

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 325**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2009** **E 09834881 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015** **EP 2385115**

54 Título: **Vector de expresión para producción a gran escala de proteína derivada de genes foráneos usando células animales, y uso del mismo**

30 Prioridad:

22.12.2008 JP 2008325690

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

27.11.2015

73 Titular/es:

**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION
HOKKAIDO UNIVERSITY (50.0%)
8, Kita 8-jo Nishi 5-chome Kita-ku
Sapporo-shi, Hokkaido 060-0808, JP y
FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**TAHARA, HIROSHI;
SUZUKI, YUSUKE;
YAMAMOTO, KEIICHI;
KITAHARA, YUZURU y
SUZUKI, YASUHIKO**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 552 325 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

Vector de expresión para producción a gran escala de proteína derivada de genes foráneos usando células animales, y uso del mismo

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a vectores de expresión de células de mamífero que le confieren a las células huésped de mamífero la capacidad de producir altos niveles de proteínas derivadas de genes foráneos. Los vectores de expresión de la presente invención son particularmente adecuados para la producción de proteínas de mamífero que requieren glicosilación y plegamiento único para los mamíferos y que difícilmente tienen actividad suficiente cuando se producen por recombinación genética utilizando E. coli o levadura como huésped.

10

Antecedentes de la técnica

Un gran número de vectores para la producción de proteínas recombinantes ha sido desarrollado, y los niveles de expresión de proteínas son altos en sistemas de expresión que utilizan bacterias tales como E. coli, microorganismos eucariotas tales como levaduras y células de insecto como huéspedes. Sin embargo, cuando se expresan proteínas únicas para mamíferos, no pueden formar una estructura tridimensional normal y la mayor parte del tiempo existe un problema con las modificaciones post-traducción tales como la glicosilación. Por lo tanto, es necesario establecer sistemas de expresión que utilicen células de mamífero como huéspedes, pero en general, el nivel de expresión es bajo en la mayoría de los casos. Además, los sistemas de expresión que utilizan vectores de virus recombinantes también se utilizan en células animales, que son superiores que las células de insectos, pero la remoción de los vectores de virus recombinantes de las proteínas expresadas es un proceso muy engorroso y el riesgo de los vectores virales mismos no se puede negar.

15

20

Los casos de producción de proteína recombinante utilizando una célula de mamífero como huésped incluyen activador plasminógeno tisular (documento 1 de patente), eritropoyetina (documento 2 de patente y documentos 1-3 que no son de patente), IFN- γ (documento 4 que no es de patente), e IFN- β (documento 3 de patente y documento 5 que no es de patente). Por otra parte, existen muchos reportes sobre la producción recombinante de anticuerpos monoclonales (documentos 4 a 6 de patente, y documentos 6 a 8 que no son de patente). Además, un ejemplo de un vector de expresión alta para células de mamífero es pNOW/CMV-AA (documento 7 de patente). El nivel de producción de conglutinina utilizando este vector fue hasta de 11,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ después de cuatro días de cultivo. Sin embargo, el nivel de producción de proteína recombinante es poco probable que sea suficiente en estos casos.

25

30

Los documentos del estado del arte que se relacionan con la invención de esta solicitud se muestran a continuación.

[Documentos del estado del arte]

[Documento de Patente]

35

[Documento 1 de patente] Solicitud de patente japonesa de Kokai, Publicación No. (JP-A) S59-183693 (solicitud de patente japonesa publicada, no examinada)

[Documento 2 de patente] JP-A (Kokai) 2002-45191

[Documento 3 de patente] JP-A (Kokai) H07-265084

[Documento 4 de patente] JP-A (Kokai) H07-67648

[Documento 5 de patente] JP-A (Kokai) H06-30788

40

[Documento 6 de patente] JP-A (Kokai) H06-217786

[Documento 7 de patente] JP-A (Kokai) H10-179169

[Documento 8 de patente] WO 2006/048459 A2

[Documento 9 de patente] WO 01/32901 A1

[Documento 10 de patente] WO 2004/024915 A1

45

[Documentos que no son de patente]

[Documento 1 que no es de patente] Fermentation Bioengineering, (1989) 4: p. 257

[Documento 2 que no es de patente] Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., (1986) 83: p. 6465

[Documento 3 que no es de patente] Biotechnology, (1988) 6: p. 67

[Documento 4 que no es de patente] Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., (1983) 80: p. 4564

5 [Documento 5 que no es de patente] Cytotechnology, (1990) 4: p. 173

[Documento 6 que no es de patente] Biotechnology, (1992) 10: p. 169

[Documento 7 que no es de patente] J. Immunol. Methods, (1989) 125: p. 191

[Documento 8 que no es de patente] Biotechnology, (1992) 10: p. 1455

Divulgación de la invención

10 [Problemas a ser resueltos por la invención]

El uso de células de mamífero, particularmente de células de ovario de hámster chino (en lo sucesivo, células CHO) en la producción de agentes farmacéuticos, ha sido confirmado como seguro y se ha convertido en una técnica común hoy en día. En la producción de proteínas recombinantes utilizando células de mamífero, el aumento de la productividad es muy importante desde los aspectos de la reducción de costes, el mantenimiento de los costes de atención médica, y similares. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de vectores de expresión para la producción de transformantes con una capacidad de producción de alto nivel a través de la transferencia eficiente de genes.

La transferencia eficiente de genes es necesaria para facilitar la producción de altos niveles de proteína recombinante en células de mamífero. La transferencia eficiente de genes significa que la probabilidad de obtener clones con alto nivel de productividad es alta, independientemente de si la selección clon es fácil o no. Específicamente, esto significa que el número de clones de células viables después de la selección de medicamentos para todas las células transformadas es relativamente pequeño, y por lo tanto la selección de clones con alto nivel de productividad es fácil. También significa que la probabilidad de ocurrencia de clones con alto nivel de productividad de alto nivel es alto, incluso si el número de células productoras de la proteína de interés es pequeña. A medida que el número de células disponibles se hace mayor, se requieren más tiempo y esfuerzo para la selección, y conduce a ineficiencia y a una alta probabilidad de pasar por alto los clones que tienen potencialmente una capacidad de producción de alto nivel.

La capacidad de producción de alto nivel se refiere al alto nivel de expresión de proteína recombinante en los clones de células transformadas obtenidas por transferencia de genes, y esto se considera que es debido principalmente a las características y el rendimiento de los vectores de expresión. Se ha encontrado que el nivel de la expresión génica es notablemente diferente dependiendo de la posición cromosómica (Annu. Rev. Cell Biol., 6, página 679, 1990), y la introducción de un gen de interés a una región con una alta actividad transcripcional en el cromosoma (en adelante, lugar activo transcripcional) es probable que aumente el nivel de producción de proteínas recombinantes.

La presente invención se logró en vista de las circunstancias anteriores. Un objetivo de la presente invención es proporcionar vectores de expresión para células de mamífero que les confiere a las células huésped de mamífero la capacidad de producir proteínas derivadas de genes foráneos en niveles altos. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar métodos para producir transformantes que utilizan los vectores y métodos anteriormente mencionados para la producción de proteínas derivadas de genes foráneos que utilizan los vectores mencionados anteriormente.

[Medio para resolver los problemas]

Tras una investigación dedicada a resolver los problemas mencionados anteriormente, los presentes inventores desarrollaron exitosamente vectores de expresión que tienen el mecanismo para incorporar un ADN plásmido en el lugar activo de la transcripción en el cromosoma de una célula huésped deficiente en el gen de la dihidrofolato reductasa, y seleccionar cepas que crecen en medio libre de hipoxantina-timidina (en adelante denominadas como HT). Ya que la dihidrofolato reductasa (DHFR) es necesaria para la biosíntesis de nucleobases, es una enzima esencial para todos los organismos que utilizan ADN como el material para la información genética. Por lo tanto, las células huésped deficientes en el gen de la dihidrofolato reductasa no pueden crecer en un medio que no contiene HT que es un componente de los ácidos nucleicos. Las células que expresan una proteína de interés se pueden seleccionar mediante la introducción de un constructo que incorpora el gen de una proteína de interés y el gen DHFR en células huésped deficientes en el gen de la dihidrofolato reductasa y luego cultivar las células bajo condiciones libres de HT. En comparación con el método de introducción de un constructo que incorpora el gen de una proteína de interés y el gen de

la neomicina fosfotransferasa y luego realizar la selección con G418, este método permite la amplificación del gen por MTX, que es un inhibidor de DHFR y por lo tanto es más adecuado para la obtención de cepas productoras de la proteína de interés en niveles altos. Como resultado, un vector de expresión que permite la producción estable de proteína de alto nivel, se construyó la producción de proteínas de alto nivel, y se completó la presente invención.

- 5 La presente invención se refiere al contenido como se define en las reivindicaciones anexas. Más específicamente, la presente invención o descripción, respectivamente, proporciona lo siguiente:
- [1] un vector de expresión para permitir la producción de alto nivel de una proteína derivada del gen foráneo en una célula huésped de mamífero, que comprende:
- 10 (a) un casete de un gen de la dihidrofolato reductasa con traducción alterada (casete del gen DHFR con traducción alterada), cuya expresión se atenúa mediante la alteración de los codones con los codones menos frecuentemente utilizados en un mamífero, particularmente como se define adicionalmente en las reivindicaciones; y
- (b) un casete de un gen que comprende un sitio de clonación para la integración de un gen foráneo entre un promotor transcripcionalmente muy activo y una señal de poliadenilación muy estable;
- 15 [2] el vector de expresión de [1], en donde los codones del casete del gen DHFR con traducción alterada de [1] (a) han sido alterados con los codones menos frecuentemente utilizados en los seres humanos;
- [3] el vector de expresión de [1], en donde los codones del casete del gen DHFR con traducción alterada de [1] (a) han sido alterados a GCA para alanina, CGA para arginina, AAU para asparagina, GAU para ácido aspártico, UGU para cisteína, CAA para glutamina, GAA para ácido glutámico, GGU para glicina, CAU para histidina, UUA para leucina, AAA para lisina, CCA para prolina, UUU para fenilalanina, UCA para serina, ACU para treonina, UAU para tirosina, y/o GUA para valina;
- 20 [4] el vector de expresión de [1], en donde el casete del gen DHFR de traducción alterada de [1] (a) utiliza un promotor con baja actividad inductora de expresión como el promotor;
- [5] el vector de expresión de [4], en donde el promotor de baja actividad utilizado es un promotor derivado de un gen que difícilmente se expresa en una célula de mamífero o un promotor cuya porción reforzadora ha sido removida;
- 25 [6] el vector de expresión de [1], en donde una región alterada del codón en el casete del gen DHFR de traducción alterada de [1] (a) es 30% o más de la longitud completa del casete del gen;
- [7] un método para producir un transformante que tiene capacidad para producir un alto nivel de una proteína derivada del gen foráneo, que comprende las etapas de insertar un gen foráneo en el vector de expresión de uno cualquiera de [1] a [6], y la transformación de una célula huésped deficiente en el gen de la dihidrofolato reductasa con el vector de expresión;
- 30 [8] un método para producir una proteína derivada del gen foráneo, que comprende las etapas de
- (a) insertar un gen foráneo en el vector de expresión de uno cualquiera de [1] a [6];
- (b) transformar una célula huésped deficiente en el gen de la dihidrofolato reductasa con el vector de expresión;
- (c) cultivar el transformante en un medio libre de hipoxantina-timidina; y
- 35 (d) recolectar la proteína derivada del gen foráneo a partir del transformante cultivado;
- [9] el método de [8], en donde se usa un medio químicamente definido (medio CD) o un medio CD complementado con un aditivo de base no animal para el cultivo en la etapa (c) de [8]; y
- [10] un método de detección para un transformante que tiene la capacidad para producir un alto nivel de una proteína derivada del gen foráneo, que comprende las etapas de:
- 40 (a) insertar un gen foráneo en el vector de expresión de uno cualquiera de [1] a [6];
- (b) transformar una célula huésped deficiente en el gen de la dihidrofolato reductasa con el vector de expresión; y
- (c) cultivar el transformante en un medio libre de hipoxantina-timidina.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La Fig. 1 muestra el constructo pDC1 con las respectivas abreviaturas que se muestran a continuación. PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento de conejo; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovina; PdSV: promotor del virus de simio 40 suprimido del reforzador; DHFR: ADNc de la dihidrofolato reductasa; PASV: señal de adición de poliA del virus de simio 40; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.
- 10 La Fig. 2 muestra el constructo pDC2 con las respectivas abreviaturas que se muestran a continuación. PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento de conejo; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovina; PdSV: promotor del virus de simio 40 suprimido del reforzador; cdDHFR: gen DHFR de traducción alterada producido por la alteración de los codones de la secuencia completa de nucleótidos de DHFR con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus de simio 40; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.
- 15 La Fig. 3 muestra el constructo pDC5 con las respectivas abreviaturas que se muestran a continuación. PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento de conejo; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovina; PdSV: promotor del virus de simio 40 suprimido del reforzador; cd90DHFR: gen NPT de traducción alterada producido mediante la alteración de los codones en el intervalo de 90 bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos de DHFR con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus de simio 40; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.
- 20 La Fig. 4 muestra el constructo pDC6 con las respectivas abreviaturas que se muestran a continuación. PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento de conejo; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovina; PdSV: promotor del virus de simio 40 suprimido del reforzador; cd180DHFR: gen DHFR de traducción alterada producido mediante la alteración de los codones en el intervalo de 180 bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos de DHFR con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus de simio 40; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.
- 25 La Fig. 5 muestra el constructo pDC7 con las respectivas abreviaturas que se muestran a continuación. PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento de conejo; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovina; PdSV: promotor del virus de simio 40 suprimido del reforzador; cd270DHFR: gen DHFR de traducción alterada producido mediante la alteración de los codones en el intervalo de 270 bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos de DHFR con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus de simio 40; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.
- 30 La Fig. 6 muestra el constructo pDC1/hMBL con las respectivas abreviaturas que se muestran a continuación. PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento de conejo; hMBL: ADNc de la lectina de enlazamiento a manosa humana; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovina; PdSV: promotor del virus de simio 40 suprimido del reforzador; DHFR: ADNc de dihidrofolato reductasa; PASV: señal de adición de poliA del virus de simio 40; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.
- 35 La Fig. 7 muestra el constructo pDC2/hMBL con las respectivas abreviaturas que se muestran a continuación. PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento de conejo; hMBL: ADNc de la lectina de enlazamiento a manosa humana; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovina; PdSV: promotor del virus de simio 40 suprimido del reforzador; cdDHFR: gen DHFR de traducción alterada producido por la alteración de los codones de la secuencia completa de nucleótidos de DHFR con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus de simio 40; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.
- 40 La Fig. 8 muestra el constructo pDC5/hMBL con las respectivas abreviaturas que se muestran a continuación. PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento de conejo; hMBL: ADNc de la lectina de enlazamiento a manosa humana; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovina; PdSV: promotor del virus de simio 40 suprimido del reforzador; cd90DHFR: gen DHFR de traducción alterada producido mediante la alteración de los codones en el intervalo de 90 bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos de DHFR con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus de simio 40; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.
- 45 La Fig. 9 muestra el constructo pDC6/hMBL con las respectivas abreviaturas que se muestran a continuación. PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento de conejo; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovina; PdSV: promotor del virus de simio 40 suprimido del reforzador;
- 55

cd180DHFR: gen DHFR de traducción alterada producido mediante la alteración de los codones en el intervalo de 180 bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos de DHFR con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus de simio 40; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

5 La Fig. 10 muestra el constructo pDC7/hMBL con las respectivas abreviaturas que se muestran a continuación. PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento de conejo; hMBL: ADNc de la lectina de enlazamiento a manosa humana; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovina; PdSV: promotor del virus de simio 40 suprimido del reforzador; cd270DHFR: gen DHFR de traducción alterada
10 producido mediante la alteración de los codones en el intervalo de 270 bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos de DHFR con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus de simio 40; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

, yFig. 11 muestra el constructo pDC6/EPO con las respectivas abreviaturas que se muestran a continuación. PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento de conejo; hEPO: ADNc de eritropoyetina humana; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovina; PdSV: promotor del virus de simio 40 suprimido del reforzador; cd180DHFR: gen DHFR de traducción alterada producido mediante la alteración de
15 los codones en el intervalo de 180 bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos de DHFR con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus de simio 40; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

20 La Fig. 12 muestra en un gráfico y una fotografía ejemplos de detección de hEPO expresada por células CHO transfectadas con el vector de expresión pDC6/hEPO de la presente invención por el método de transferencia de manchas.

La Fig. 13 muestra en una fotografía ejemplos de detección de hEPO expresada por las células CHO transfectadas con el vector de expresión pDC6/hEPO de la presente invención por transferencia tipo Western. Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: preparación estándar de EPO (sistemas R&D, 100 ng); carril 3: sobrenadante del cultivo de tres días de la línea celular No. 27; carril 4: sobrenadante del cultivo de tres días de la línea celular No. 36; carril 5: sobrenadante del cultivo de tres días de la línea celular No. 50; carril 6: sobrenadante del cultivo de tres días de la línea celular No. 60; carril 7: sobrenadante del cultivo de tres días de la línea celular No. 62; carril 8: sobrenadante del cultivo de tres días de la línea celular No. 67; carril 9: sobrenadante del cultivo de tres días de la línea celular No. 72; carril de 10: sobrenadante del cultivo de tres días de la línea celular No. 77; carril 11: sobrenadante del cultivo de tres días de la línea celular No. 78; y carril 12: sobrenadante del cultivo de tres días de la línea celular No. 82.
25
30

La Fig. 14 muestra el constructo pDC6/D-EPO con las respectivas abreviaturas que se muestran a continuación. PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento de conejo; D-EPO: ADNc de Darbepoetina alfa; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovina; PdSV: promotor del virus de simio 40 suprimido del reforzador; cd180DHFR: gen DHFR de traducción alterada producido mediante la alteración de los
35 codones en el intervalo de 180 bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos de DHFR con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus de simio 40; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

La Fig. 15 muestra en un gráfico y una fotografía, ejemplos de detección de D-EPO expresada por células CHO transfectadas con el vector de expresión pDC6/D-EPO de la presente invención por el método de transferencia de
40 manchas.

La Fig. 16 muestra en una fotografía, ejemplos de detección de D-EPO expresada por células CHO transfectadas con el vector de expresión pDC6/D-EPO de la presente invención por transferencia tipo Western. Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: Darbepoetina alfa (inyección Nesp 120 µg/jeringa plástica de 0,6 mL, Kyowa Hakko Kirin Co. Ltd., 100 ng); carril 3: sobrenadante del cultivo de tres días de la línea celular No. 12; carril 4: sobrenadante del cultivo de
45 siete días de la línea celular No. 12; carril 5: sobrenadante del cultivo de 14 días de la línea celular No. 12; carril 6: sobrenadante del cultivo de tres días de la línea celular No. 23; carril 7: sobrenadante del cultivo de tres días de la línea celular No. 23; carril 8: sobrenadante del cultivo de 14 días de la línea celular No. 23; carril 9: sobrenadante del cultivo de tres días de la línea celular No. 24; carril 10: sobrenadante del cultivo de 7 días de la línea celular No. 24; carril 11: sobrenadante del cultivo de 14 días de la línea celular No. 24; carril 12: sobrenadante del cultivo de tres días de la línea celular No. 30; carril 13: sobrenadante del cultivo de 7 días de la línea celular No. 30; carril de 14: sobrenadante del cultivo de 14 días de la línea celular No. 33; carril 15: sobrenadante del cultivo de tres días de la línea celular No. 36; carril 16: sobrenadante del cultivo de 7 días de la línea celular No. 36; y carril 17: sobrenadante del cultivo de 14 días de la línea celular No. 36.
50

La Fig. 17 muestra el constructo pDC6/hG-CSF con las respectivas indicaciones que se muestran a continuación. PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento de conejo; hG-CSF: ADNc del factor estimulador de colonias de granulocitos humanos (G-CSF); PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovina; PdSV: promotor del virus de simio 40 suprimido del reforzador; cd180DHFR: gen DHFR de
55

traducción alterada producido mediante la alteración de los codones en el intervalo de 180 bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos de DHFR con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus de simio 40; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

5 La Fig. 18 muestra un diagrama y una fotografía que indica ejemplos de detección de hG-CSF expresado por las células CHO transfectadas con el vector de expresión pDC6/hG-CSF de la presente invención por el método de transferencia de manchas.

10 La Fig. 19 muestra en una fotografía ejemplos de detección de hG-CSF expresado por las células CHO transfectadas con el vector de expresión pDC6/hG-CSF de la presente invención por transferencia tipo Western. Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: preparación estándar de G-CSF humano (Humanzyme, 50 µg/carril); carril 3: sobrenadante del cultivo de 3 días de la línea celular No. 6; carril 4: sobrenadante del cultivo de 7 días de la línea celular No. 6; carril 5: sobrenadante del cultivo de 14 días de la línea celular No. 6; carril 6: sobrenadante del cultivo de 3 días de la línea celular No. 13; carril 7: sobrenadante del cultivo de 7 días de la línea celular No. 13; carril 8: sobrenadante del cultivo de 14 días de la línea celular No. 13; carril 9: sobrenadante del cultivo de 3 días de la línea celular No. 14; carril 10: sobrenadante del cultivo de 7 días de la línea celular No. 14; carril de 11: sobrenadante del cultivo de 14 días de la línea celular No. 14; carril 12: sobrenadante del cultivo de 3 días de la línea celular No. 16; carril 13: sobrenadante del cultivo de 7 días de la línea celular No. 16; carril de 14: sobrenadante del cultivo de 14 días de la línea celular No. 16; carril 15: sobrenadante del cultivo de 3 días de la línea celular No. 17; carril 16: sobrenadante del cultivo de 7 días de la línea celular No. 17; y carril 17: sobrenadante del cultivo de 14 días de la línea celular No. 17.

20 La Fig. 20 muestra el constructo pDC6/hGM-CSF con las respectivas abreviaturas que se muestran a continuación. PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento de conejo; hGM-CSF: ADNc del factor estimulador de colonias de granulocitos humanos (GM-CSF); PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovina; PdSV: promotor del virus de simio 40 suprimido del reforzador; cd180DHFR: gen DHFR de traducción alterada producido mediante la alteración de los codones en el intervalo de 180 bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos de DHFR con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus de simio 40; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

25 La Fig. 21 muestra en un gráfico y una fotografía, ejemplos de detección de hGM-CSF expresado por las células CHO transfectadas con el vector de expresión pDC6/hGM-CSF de la presente invención por el método de transferencia de manchas.

30 La Fig. 22 muestra en una fotografía, ejemplos de detección de hGM-CSF expresado por las células CHO transfectadas con el vector de expresión pDC6/hGM-CSF de la presente invención por transferencia tipo Western. Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: preparación estándar de GM-CSF humano (Humanzyme, 5 µg/carril); carril 3: sobrenadante del cultivo de 14 días de células CHO DG44; carril 4: regulador de la muestra; carril 5: sobrenadante del cultivo de 3 días de la línea celular No. 3; carril 6: sobrenadante del cultivo de 7 días de la línea celular No. 3; carril 7: sobrenadante del cultivo de 14 días de la línea celular No. 3; carril 8: sobrenadante del cultivo de 3 días de la línea celular No. 6; carril 9: sobrenadante del cultivo de 7 días de la línea celular No. 6; carril de 10: sobrenadante del cultivo de 14 días de la línea celular No. 6; carril 11: sobrenadante del cultivo de 3 días de la línea celular No. 11; carril 12: sobrenadante del cultivo de 7 días de la línea celular No. 11; carril de 13: sobrenadante del cultivo de 14 días de la línea celular No. 11; carril 14: sobrenadante del cultivo de 3 días de la línea celular No. 17; carril 15: sobrenadante del cultivo de 7 días de la línea celular No. 17; carril de 16: sobrenadante del cultivo de 14 días de la línea celular No. 17; carril 17: sobrenadante del cultivo de 3 días de la línea celular No. 36; carril 18: sobrenadante del cultivo de 7 días de la línea celular No. 36; carril de 19: sobrenadante del cultivo de 14 días de la línea celular No. 36; carril 20: sobrenadante del cultivo de 3 días de la línea celular No. 48; carril 21: sobrenadante del cultivo de 7 días de la línea celular No. 48; y carril 22: sobrenadante del cultivo de 14 días de la línea celular No. 48.

45 La Fig. 23 muestra el constructo pDC6/hIFNα con las respectivas abreviaturas que se muestran a continuación. PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento de conejo; hIFNα: ADNc de interferón α2b humano; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovina; PdSV: promotor del virus de simio 40 suprimido del reforzador; cd180DHFR: gen DHFR de traducción alterada producido mediante la alteración de los codones en el intervalo de 180 bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos de DHFR con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus de simio 40; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

50 La Fig. 24 muestra en un gráfico y una fotografía, ejemplos de detección de hIFNα expresado por las células CHO transfectadas con el vector de expresión pDC6/hIFNα de la presente invención por el método de transferencia e manchas.

55 La Fig. 25 muestra en una fotografía, ejemplos de detección de hIFNα expresado por las células CHO transfectadas con el vector de expresión pDC6/hIFNα de la presente invención por transferencia tipo Western. Se indican cada uno de los siguientes: carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: preparación estándar de IFNα humano (Expresión IFNα2B en células humanas, Cat. HZ-1072, HumanZyme, IFN-α2b); carril 3: preparación estándar de IFNα humano (solución

patrón de IFN alfabeta iLite^{MR} (200 UI/ml), biomonitor); carril 4: sobrenadante del cultivo de 14 días de células CHO DG44; carril 5: sobrenadante del cultivo de 3 días de la línea celular No. 3 al 8; carril 6: sobrenadante del cultivo de 7 días de la línea celular No. 3 al 8; carril 7: sobrenadante del cultivo de 14 días de la línea celular No. 3 al 8; carril 8: sobrenadante del cultivo de 3 días de la línea celular No. 3 al 14; carril 9: sobrenadante del cultivo de 7 días de la línea celular No. 3 al 14; carril de 10: sobrenadante del cultivo de 14 días de la línea celular No. 3 al 14; carril 11: sobrenadante del cultivo de 3 días de la línea celular No. 2 al 12; carril 12: sobrenadante del cultivo de 7 días de la línea celular No. 2 al 12; y carril 13: sobrenadante del cultivo de 14 días de la línea celular No. 2 a 12.

La Fig. 26 muestra el constructo pDC6/hOPN con las respectivas abreviaturas que se muestran a continuación. PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento de conejo; hOPN: ADNc de osteopontina humana; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovina; PdSV: promotor del virus de simio 40 suprimido del reforzador; cd180DHFR: gen DHFR de traducción alterada producido mediante la alteración de los codones en el intervalo de 180 bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos de DHFR con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus de simio 40; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

La Fig. 27 muestra en una fotografía, ejemplos de detección de hOPN expresados por las células CHO transfectadas con el vector de expresión pDC6/hOPN de la presente invención por transferencia tipo Western. Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: sobrenadante del cultivo de 14 días de células CHO DG44; carril 3: sobrenadante del cultivo de 3 días de la línea celular No. 32; carril 4: sobrenadante del cultivo de 7 días de la línea celular No. 32; y carril 5: sobrenadante del cultivo de 14 días de la línea celular No. 32.

Modo de llevar a cabo la invención

Mediante la alteración de los codones del gen de DHFR con los codones menos frecuentemente utilizados en los mamíferos para atenuar completamente la expresión de DHFR, los presentes inventores hicieron difícil la supervivencia bajo selección en medio que no contiene HT incluso para los transformantes a menos que el gen del plásmido incorporado esté integrado en una posición con propiedades de expresión muy altas en el cromosoma de células huésped deficientes en genes de dihidrofolato reductasa.

Más específicamente, la presente invención proporciona vectores de expresión para inducir la producción de alto nivel de proteínas recombinantes en células huésped de mamífero.

Un vector de expresión de la presente invención se construye por ejemplo mediante la inclusión de lo siguiente en la estructura del vector:

(a) un casete del gen de la dihidrofolato reductasa de traducción alterada (casete del gen de DHFR de traducción alterada), cuya expresión está debilitada por la alteración de los codones con los codones menos frecuentemente utilizados en un mamífero, como se define adicionalmente en las reivindicaciones; y

(b) un casete de un gen que comprende un sitio de clonación para la integración de un gen foráneo entre un promotor muy transcripcionalmente activo y una señal de poliadenilación muy estable.

La presente invención altera notablemente el mecanismo de expresión de DHFR en la célula huésped transformada a través de la transferencia de genes mediante la alteración de los codones del gen de DHFR con los codones menos frecuentemente utilizados en los mamíferos, y el uso de promotores con una disminución de la propiedad inductora de la expresión de DHFR para el constructo del casete del gen DHFR (cistrón). En la presente invención, "casete del gen" se refiere a una unidad con la composición básica de promotor, gen estructural, y señal de poliadenilación (poliA) que expresa la proteína a través de la transcripción/traducción, y también puede incluir como secuencias de ADN, secuencias de inserción asociadas con cualquier de estas secuencias o cualquier secuencia opcional de ADN. Los casetes del gen DHFR de la presente invención se definen como "casete del gen DHFR de traducción alterada" porque difieren de aquellos con un promotor atenuado en forma simple, y específicamente permiten la adquisición de las cepas que crecen en el medio libre de HT y tienen el gen plásmido integrado en un lugar activo de la transcripción.

En la presente invención, "los codones menos frecuentemente utilizados en los mamíferos" se refiere a preferiblemente, por ejemplo, a los codones menos frecuentemente utilizados en los seres humanos. Los codones menos frecuentemente utilizados en los seres humanos incluyen los codones divulgados en el documento por Kim y colaboradores (*Gene*, 199, p. 293, 1997). Los ejemplos específicos de los codones son GCA para alanina, CGA para arginina, AAU para asparagina, GAU para ácido aspártico, UGU para cisteína, CAA para glutamina, GAA para ácido glutámico, GGU para glicina, CAU para histidina, UUA para leucina, AAA para lisina, CCA para prolina, UUU para fenilalanina, UCA para serina, ACU para treonina, UAU para tirosina, y/o GUA para valina, pero no se limitan a los mismos.

En la presente invención, "para atenuar la expresión" indica la reducción de la expresión génica en los niveles de transcripción y/o traducción, y, específicamente, esto puede lograrse mediante la alteración de los codones con los "codones utilizados con menor frecuencia en los mamíferos" antes mencionados.

5 En el "casete del gen DHFR de traducción alterada" antes mencionado, las regiones en las que se alteran los codones no están particularmente limitadas, pero preferiblemente, los codones en una región correspondiente a 30% o más (por ejemplo, 40% o más, 50% o más, 60% o más, 70% o más, 80% o más, 90% o más, 95% o más, o 100%) de la longitud total del casete del gen se altera. La gama de las regiones de codón alterado se puede determinar arbitrariamente teniendo en cuenta otras condiciones del vector.

10 Como el promotor para el "casete del gen DHFR de traducción alterada" antes mencionado, se pueden usar los promotores derivados del promotor de un gen de una proteína que normalmente es difícil de expresar en una célula de mamífero, o promotores producido por la supresión del reforzador de un promotor normal. Más específicamente, se utilizan un promotor producido por la supresión de la región reforzadora del promotor antigénico del virus SV40 (Mol. Cell Biol., 6, p. 2593, 1986), o promotores con una propiedad equivalentemente muy baja de expresión.

15 La in del ADN del plásmido en un lugar activo de transcripción en el cromosoma de la célula huésped deficiente en el gen de la dihidrofolato reductasa puede llevarse a cabo como resultado de la selección con un medio que no contiene HT de acuerdo con las propiedades del casete del gen DHFR, pero la expresión de la proteína misma derivada del gene foráneo en el lugar activo de la transcripción del cromosoma debe ser fuertemente inducida. Por lo tanto, los promotores y la señal de poliadenilación (en lo sucesivo, denominada poliA) en el sitio de clonación múltiple (en adelante, denominado como MCS) donde se insertan los genes de la proteína serán seleccionados de entre los que tienen la propiedad más fuerte de inducción de la expresión. Los ejemplos de promotores incluyen al promotor inmediato temprano de citomegalovirus humano (hCMV MIE: Cell, 41, p. 521, 1985), el promotor de CMV5 que es un promotor de fusión del promotor de citomegalovirus humano y el promotor de adenovirus (Nucleic Acid Research, 30, p. 2, 2002), y el promotor β -actina (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 84, p. 4831, 1987); y ejemplos de poliA incluyen la secuencia de poliA derivada de la hormona de crecimiento de bovino (DNA, 5, p. 115, 1986). En este documento, un fragmento de ADN que porta un sitio de clonación múltiple para insertar el gen de una proteína de interés se llama un "casete de expresión génica".

Los vectores de expresión de la presente invención pueden ser ejemplificados por los vectores de expresión descritos específicamente en los Ejemplos, pero no se limitan a los mismos.

30 Además, la presente invención proporciona un método para producir transformantes con la capacidad para producir proteínas derivadas de genes foráneos en niveles altos y una capacidad de crecer en un medio que no contiene HT, que comprende las etapas de insertar un gen foráneo en los vectores de expresión antes mencionados y la transformación de las células huésped deficientes en el gen de la dihidrofolato reductasa utilizando los vectores de expresión.

35 Los ejemplos específicos incluyen un método de obtención de transformantes con alta capacidad de producción de proteínas, lo que implica la inserción de un gen foráneo que codifica una proteína que se expresa en el sitio de clonación múltiple (en adelante, denominado como MCS) de un vector de expresión de la presente invención, luego transformar las células huésped deficientes en el gen de la dihidrofolato reductasa con el vector de expresión mediante el uso de un método de transfección (ejemplos del método de transfección mencionado en el presente documento incluyen métodos bien conocidos para aquellos calificados en la técnica, tales como el método de la lipofectina, el método de electroporación, el método de fosfato de calcio, y el método de microinyección) y, a continuación, seleccionar por resistencia en un medio que no contiene HT.

En la presente invención, las células huésped no están particularmente limitadas, siempre y cuando sean células adecuadas para la expresión de proteínas derivadas de genes foráneos, pero preferiblemente incluyen, por ejemplo, las células de mamífero deficientes en el gen de la dihidrofolato reductasa, y más preferiblemente células de ovario de hámster chino (células CHO) deficientes en el gen de la dihidrofolato reductasa.

45 Muchas de las células transformadas que sobrevivieron a la selección en un medio libre de HT ya han alcanzado un nivel de expresión relativamente alto de proteína, pero para seleccionar a partir de estas células las células transformadas que tienen un nivel aún mayor de capacidad de producción, se puede determinar el nivel de expresión de la proteína.

50 Además, la presente invención proporciona métodos para producir una proteína derivada del gen foráneo, que comprende las etapas de:

(a) insertar un gen foráneo en un vector de expresión de la presente invención;

(b) transformar una célula huésped deficiente en el gen de la dihidrofolato reductasa con el vector de expresión;

(c) cultivar el transformante en un medio libre de HT; y

(d) recolectar la proteína derivada del gen foráneo a partir del transformante cultivado.

5 En la presente invención, en la etapa (c) mencionada anteriormente, los transformantes (colonias) que muestran expresión de proteína de alta eficiencia pueden ser seleccionados mediante cultivo en un medio libre de HT. Los transformantes seleccionados pueden ser continuamente cultivados en el mismo medio, o pueden ser cultivados después de transferencia a otro medio tal como un medio para expresión a gran escala.

En la presente invención, los medios para cultivo o naturalización de transformantes no están particularmente limitados, pero son, por ejemplo, preferiblemente un medio libre de suero, y más preferiblemente un medio CD o un medio de CD complementado con aditivos no basados en animales.

10 En la presente invención, cuando se recolectan proteínas de genes derivados de un gen foráneo de transformantes cultivados, las proteínas pueden ser purificadas por métodos conocidos por aquellos capacitados en la técnica (filtración, centrifugación, purificación en columna, y similares). Las proteínas derivadas del gen foráneo pueden ser expresadas como proteínas de fusión con otras proteínas para facilitar la purificación y similares.

15 Además, la presente invención proporciona un procedimiento de detección para transformantes con alta capacidad para producir una proteína derivada de un gen foráneo, que comprende las etapas de:

(a) insertar un gen foráneo en un vector de expresión de la presente invención;

(b) transformar una célula huésped deficiente en el gen de la dihidrofolato reductasa con el vector de expresión; y

(c) cultivar el transformante en un medio libre de HT.

Ejemplos

20 **[Ejemplo 1]** Construcción de pDC1, pDC2, pDC5, pDC6, y pDC7

25 Usando métodos bien conocidos por aquellos capacitados en el arte, se construyeron los vectores de la presente invención, pDC1, pDC2, pDC5, pDC6, y pDC7. La secuencia completa de nucleótidos del estructura del vector pDC1 se muestra en la SEQ ID NO: 1. pDC1 porta el ADNc de tipo DHFR de tipo silvestre entre los nucleótidos No. 1784 y No. 2347 (Fig. 1). pDC2 se construye sustituyendo los nucleótidos No. 1784 a No. 2347 en la secuencia de pDC1 con la secuencia de la SEQ ID NO: 2. La región sustituida de pDC2 se introduce con un gen DHFR de traducción alterada en el que los codones de la secuencia completa de nucleótidos de DHFR han sido alterados con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos (Fig. 2).

30 pDC5 se construye sustituyendo los nucleótidos No. 1784 a No. 2347 en la secuencia de pDC1 con la secuencia de la SEQ ID NO: 3. La región sustituida de pDC5 se introduce con un gen DHFR de traducción alterada en el que los codones en el rango de 90 bases del extremo 5' de la secuencia de nucleótidos DHFR ha sido alterada con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos (Fig. 3).

35 pDC6 se construye sustituyendo los nucleótidos No. 1784 a No. 2347 en la secuencia de pDC1 con la secuencia de la SEQ ID NO: 4. La región sustituida de pDC6 se introduce con un gen DHFR de traducción alterada en el que los codones en el rango de 180 bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos DHFR ha sido alterada con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos (Fig. 4).

pDC7 se construye sustituyendo los nucleótidos No. 1784 a No. 2347 en la secuencia de pDC1 con la secuencia de la SEQ ID NO: 5. La región sustituida de pDC7 se introduce con un gen DHFR de traducción alterada en el que los codones en el rango de 270 bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos DHFR ha sido alterada para los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos (Fig. 5).

40 **[Ejemplo 2]** Construcción de pDC1 / hMBL, pDC2 / hMBL, pDC5 / hMBL, pDC6/hMBL y pDC7 / hMBL

45 Utilizando métodos bien conocidos por aquellos capacitados en el arte, se sustituyeron los nucleótidos No. 1267 a No. 1275 No. en los vectores de la presente invención, pDC1, pDC2, pDC5, pDC6, y pDC7, con un ADNc que codifica la lectina que se enlaza a manano-humana (MBL) de la SEQ ID NO: 6 (de ahora en adelante denominad como hMBL), para construir pDC1 / hMBL (Fig. 6), pDC2 / hMBL (Fig. 7), pDC5 / hMBL (Fig. 8), pDC6/hMBL (Fig. 9), y pDC7 / hMBL (Fig. 10).

[Ejemplo 3] Transfección de pDC1 / hMBL, pDC2 / hMBL, pDC5 / hMBL, pDC6/hMBL, y pDC7 / hMBL en células CHO, y selección en un medio libre de HT usando un medio de CD o un medio CD complementado con aditivos de base no animal

5 Se transfectaron 10 µg de pDC1 / hMBL, PDC2 / hMBL, pDC5 / hMBL, pDC6/hMBL, y pDC7 / hMBL en 500.000 células CHO (células CHO DG44) en frascos de cultivo de 25 cm² usando el método de la Lipofectina (usando Lipofectamine^{MR} LTX; Invitrogen). Se realizó la transfección de genes de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 48 horas después de la transfección de los genes, se hizo recuento del número de células, y luego se diluyeron las células en un IS CHO-CD con medio Hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen). Se sembraron en placa las células en cinco placas de microtitulación de 96 pozos cada una con concentraciones de 1.000 células / pozo y 100 células / pozo, un total de 10 placas (960 pozos), y después cultivar en presencia de gas dióxido de carbono 5% a 37°C durante aproximadamente tres semanas, se observaron las células viables (líneas celulares que crecen en medio libre de HT). Se seleccionaron arbitrariamente 50 líneas de líneas celulares que crecen en medio libre de HT a partir de las células viables, transfectadas a placas de 24 pozos junto con el IS CHO-CD con medio Hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen), y se cultivó hasta que las células ocuparon 1/3 o más de cada pozo. Se colocaron 0,4 mL de cada línea en un tubo estéril y se centrifugó a 200 x g durante dos minutos. Se descartó el sobrenadante, y se suspendieron las células en 0,1 mL de medio fresco (IS CHO-CD con medio Hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen)). Después del recuento del número de células, se diluyeron las células con el medio a 5 x 10⁵ células / mL, luego, 0,2 mL de ellas fueron transferidas a nuevas placas de 24 pozos, y se cultivaron las células en presencia de gas dióxido de carbono al 5% a 37°C durante 72 horas. Luego, se centrifugaron las células a 9300 x g durante dos minutos y se recolectó el sobrenadante. A continuación, se determinó el nivel de producción de MBL en los sobrenadantes de cultivo.

[Ejemplo 4] Determinación de los niveles de producción de MBL por las líneas celulares transfectadas con pDC1 / hMBL, pDC5 / hMBL, pDC6/hMBL y pDC7 / hMBL

25 Se evaluó el nivel de producción por ELISA. Se recubrieron placas de 96 pozos (F96 MAXI SORP Nunc-ImmunoPlate, Cat. No. 442404, Nunc) con 1 µg / mL de un anticuerpo MBL anti-humano (obsequio de Dr. Ohtani de la Asahikawa Medical University, Japón) diluido con un regulador de recubrimiento (Na₂CO₃ 15 mM, NaHCO₃ 35 mM, NaN₃ al 0,05% NaN₃, pH 9,6) a 4°C durante 16 horas. Después de bloquear con 4% Block Ace (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.), el sobrenadante de cultivo de 72 horas (dilución 1 / 1000 a 1 / 100.000), se aplicó una serie de dos diluciones (20 a 0,3125 ng / mL) de MBL humano purificado (obsequio del doctor Ohtani de la Asahikawa Medical University, Japón) en IS CHO-CD con medio hidrolizado (IS Japón), que es un medio libre de suero para células CHO, o un medio IS CHO con hidrolizado (IS Japón) a las placas a razón de 100 µL / pozo, y se incubaron las placas a 37°C durante una hora. Esto se incubó adicionalmente con 0,1 mg / mL de anticuerpo monoclonal MBL humano biotinilado (obsequio de Dr. Ohtani de la Asahikawa Medical University, Japón) a 37°C durante una hora. Se aplicó el kit estándar VECTASTAION Elite ABC (2 gotas de Reactivo A, 2 gotas de Reactivo B / 5 mL, Vector), que había sido incubado a 37°C durante 30 minutos, razón de 100 µL / pozo, y se permitió que reaccionara a 37°C durante 45 minutos. Se aplicó adicionalmente el Kit TMB del sustrato de peroxidasa (2 gotas de regulador, 3 gotas de TMB, 2 gotas de peróxido de hidrógeno / 5 mL, Vector), que había sido incubado a temperatura ambiente durante 30 minutos, a razón de 100 µL / pozo, y después de esto reaccionó a temperatura ambiente durante 15 minutos, se añadió ácido fosfórico 1 M a razón de 100 µL / pozo para detener la reacción. Se determinó la concentración de proteína usando un lector de microplacas (modelo 680, fabricado por BioRad). Los resultados obtenidos por el método de ELISA, y las tres primeras muestras que muestran altos niveles de producción de MBL humana se muestran en la Tabla 1. La línea de células con el más alto nivel de producción mostró una productividad significativamente alta comparado con el vector con los codones no alterados.

[Tabla 1]

| Nivel de producción de hMBL de líneas de células que crecen en el medio libre de HT | |
|---|----------------------------|
| Nombre de la línea celular | Nivel de producción (g/mL) |
| pDC 1-2 | 20.5 |
| pDC 1-24 | 20.5 |
| pDC 1-50 | 20.0 |

| Nivel de producción de hMBL de líneas de células que crecen en el medio libre de HT | |
|---|----------------------------|
| Nombre de la línea celular | Nivel de producción (g/mL) |
| pDC 5-2 | 10.6 |
| pDC 5-29 | 11.8 |
| pDC 5-82 | 11.3 |
| pDC 6-1 | 51.6 |
| pDC 6-25 | 29.6 |
| pDC 6-49 | 30.0 |
| pDC 7-1 | 33.2 |
| pDC 7-37 | 21.9 |
| pDC 7-43 | 25.8 |

[Ejemplo 5] niveles de producción de hMBL por las líneas de células transfectadas pDC1 / hMBL, pDC5 / hMBL, pDC6/hMBL y pDC7 / hMBL transfectadas líneas celulares

5 La distribución de hMBL expresada por los vectores de expresión pDC1, pDC5, pDC6 y pDC7 de la presente invención en cada línea celular se muestra en la Tabla 2.

10 Para pDC1, entre las cincuenta líneas celulares que crecen en medio libre de HT libre, 28,0% produjeron hMBL a razón 0 μg / mL o más hasta menos de 5 μg / mL. 36 de las cincuenta líneas (72,0%) mostraron niveles de producción de 5 μg / mL o más. 19 de las cincuenta líneas (38,0%) mostraron niveles de producción de 10 μg / mL o más. 12 de las cincuenta líneas (24,0%) mostraron niveles de producción de 15 μg / mL o más. Dos de las cincuenta líneas (4,0%) mostraron niveles de producción de 20 μg / mL o más. La línea que muestra el nivel de producción más alto produjo 20,5 μg / mL en 3 días.

15 Para pDC5, entre las cincuenta líneas celulares cultivadas en medio libre de HT, 70,0% produjo hMBL a razón de 0 μg / mL o más hasta menos de 5 μg / mL. Quince de las cincuenta líneas (30,0%) mostraron niveles de producción de 5 μg / mL o más. Tres de las cincuenta líneas (6,0%) mostraron niveles de producción de 10 μg / mL o más. La línea que mostró el nivel de producción más alto produjo 11,8 μg / mL en 3 días.

20 Para pDC6, entre las cincuenta líneas celulares que crecen en medio libre de HT, 34,0% produjo hMBL a 0 μg / mL o más hasta menos de 5 μg / mL. 33 de las cincuenta líneas (66,0%) mostraron niveles de producción de 5 μg / mL o más. 22 de los cincuenta líneas (44,0%) mostraron niveles de producción de 10 μg / mL o más. 15 de las cincuenta líneas (30,0%) mostraron niveles de producción de 15 μg / mL o más. Siete de las cincuenta líneas (14,0%) mostraron niveles de producción de 20 μg / mL o más. Cinco de los cincuenta líneas (10,0%) mostraron niveles de producción de 25 μg / mL o más. Sorprendentemente, una de las cincuenta líneas (2,0%) mostró un nivel de producción de 50 μg / mL o más. La línea que muestra el nivel de producción más alto produjo 51,6 μg / mL en 3 días.

25 Para pDC7, entre las cincuenta líneas celulares que crecen en medio libre de HT, 56,0% produjo hMBL a razón de 0 μg / mL o más hasta menos de 5 μg / mL. Veintidós de las cincuenta líneas (44,0%) mostraron niveles de producción de 5 μg / mL o más. 16 de las cincuenta líneas (32,0%) mostraron niveles de producción de 10 μg / mL o más. 13 de las cincuenta líneas (26,0%) mostraron niveles de producción de 15 μg / mL o más. 8 de las cincuenta líneas (16,0%) mostraron niveles de producción de 20 μg / mL o más. 6 de las cincuenta líneas (12,0%) mostraron niveles de producción de 25 μg / mL o más. 3 de las cincuenta líneas (6,0%) mostraron niveles de producción de 30 μg / mL o más. 2 de las cincuenta líneas (4,0%) mostraron niveles de producción de 35 μg / mL o más. Sorprendentemente, una de las cincuenta líneas (2,0%) mostró un nivel de producción de 45 μg / mL o más. La línea que muestra el nivel de producción más alto produjo 33,2 μg / mL en 3 días.

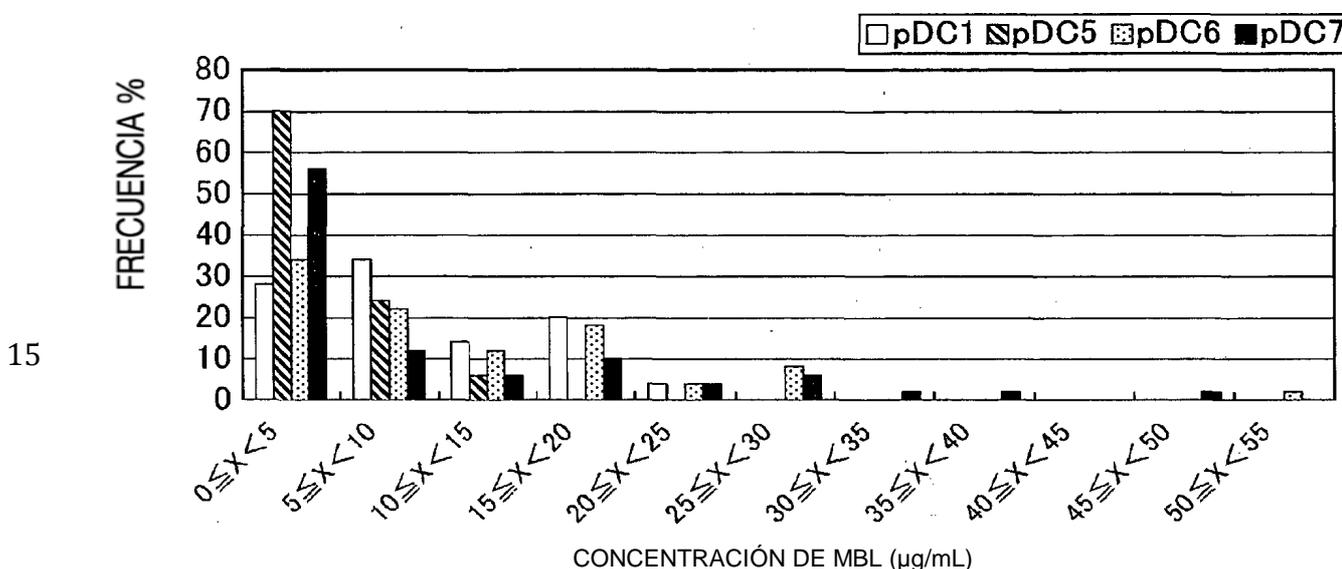
30

Esto fue del más alto nivel cuando se comparó con los datos de los clones tempranos antes de la amplificación génica por vectores de expresión representativos reportados en la literatura (DNA, 7, p. 651, 1988; Biotechnology, 10, p. 1455, 1992; Biotechnology, 8, p. 662, 1990; Gen 76, p. 19, 1989; y Biotechnology, 9, p. 64, 1991).

5 La detección de células recombinantes por amplificación génica generalmente requiere de seis meses a un año. Ya que existen grandes variaciones debido a las condiciones de cultivo y a las concentraciones del agente estimulador de la amplificación, se considera apropiado comparar la eficiencia primaria de los vectores de expresión usando el nivel de expresión de amplificación previa de los clones iniciales. Esto reveló que la eficiencia de los vectores de expresión de la presente invención es muy alta. Los resultados confirmaron que aunque los vectores de la presente invención produjeron muy pocas líneas que crecen en medio libre de HT, permiten el establecimiento de líneas celulares que son capaces de producir altos niveles de proteínas de interés con muy alta eficiencia. Esto probó que los vectores de expresión de la presente invención permiten niveles muy altos de expresión de proteína.

Tabla 2

Nivel de producción de hMBL de líneas celulares que crecen en medio libre de HT



[Ejemplo 6] Construcción de pDC6/hEPO

20 Utilizando métodos bien conocidos por aquellos capacitados en el arte, los nucleótidos No. 1267 a No. 1275 en el vector de la presente invención, pDC6, fueron sustituidos con un ADNc que codifica la eritropoyetina humana (EPO) de la SEQ ID NO: 7 (de ahora en adelante denominada como hEPO), para construir pDC6/hEPO (Fig. 11).

[Ejemplo 7] La transfección de pDC6/hEPO en células CHO, y selección en un medio libre de HT usando un medio CD o un medio CD complementado con aditivos de base no animal

25 Se transfectaron 2,5 µg de pDC6/hEPO en 4.000.000 células CHO (células CHO DG44) en frascos de cultivo de 25 cm² usando el método de la Lipofectina (usando Lipofectamine^{MR} LTX; Invitrogen). Se realizó la transfección de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 48 horas después de la transfección génica, se contó el número de células, y luego se diluyeron las células en un IS CHO-CD con medio Hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{RM}-I 4 mM (Invitrogen). Se sembraron las células en cinco placas de microtitulación de 96 pozos a una concentración de 4.000 células / pozo (480 pozos), y después de cultivaron en presencia de gas dióxido de carbono al 5% a 37°C durante aproximadamente tres semanas, se observaron las células viables (líneas de células que crecen en medio libre de HT).

30 A partir de las células viables, se seleccionaron arbitrariamente 82 líneas celulares que crecen en medio libre de HT, y se confirmó la expresión por transferencia de manchas. Se aplicaron 1 µL de una serie de dilución doble (10 a 0.16 ng / mL) de una preparación estándar de EPO humana recombinante (Recombinant Human EPO, Cat. 287-TC, sistemas R & D) y los sobrenadantes de cultivo de las 82 líneas arbitrariamente seleccionadas a una membrana (Nytran N, ítem No. 10416196, Schleicher & Schuell). Después de incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se bloqueó con Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Además, se añadieron 0,2 µg / mL de un anticuerpo policlonal anti-EPO de conejo (EPO (H-162), IgG policlonal de conejo, Cat. sc-7956, Santa Cruz Biotechnology) diluido con PBST (D-PBS, Tween 20 al 0,05%) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se diluyeron 0,2 µg / mL de un anticuerpo IgG anti-conejo marcado con peroxidasa (IgG anti-conejo

5 purificada por afinidad conjugada con peroxidasa F8C, Cat. 611 - 1303, Rock Land) diluido con PBST (D-PBS, Tween 20 al 0,05%) y se agitó durante 30 minutos. Se hizo reaccionar sustrato HRP quimioluminiscente Immobilon^{MR} Western (2 mL del reactivo Luminol, 2 ml de solución de peróxido, Millipore, Cat. WBKLS0050, Millipore) a temperatura ambiente durante cinco minutos y se añadió. Esto se incubó a temperatura ambiente durante cinco minutos, y se capturó la quimioluminiscencia utilizando un detector (ATTO de captura de luz, AE-6981FC, ATTO). La imagen obtenida por transferencia de manchas se muestra en la Fig. 12.

10 Se transfirieron las diez líneas principales que tienen alta intensidad de luminiscencia en transferencias de manchas a placas de 24 pozos junto con IS CHO-CD con medio hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen) y se cultivó hasta que las células ocuparon 1/3 o más de cada pozo. Se colocaron 0,4 mL de cada línea en un tubo estéril y se centrifugó a 200 x g durante dos minutos. Se descartó el sobrenadante, y se suspendieron las células en 0,1 ml de medio fresco (IS CHO-CD con medio Hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen)). Después el recuento del número de células, se diluyeron las células con el medio hasta 5 x 10⁵ células / mL, luego, se transfirieron 0,2 mL a nuevas placas de 24 pozos, y se cultivaron las células en presencia de gas dióxido de carbono 5% a 37°C durante 72 horas. Luego, se centrifugaron las células a 9300 x g durante dos minutos y se recolectó el sobrenadante. A continuación, se determinó el nivel de producción.

[Ejemplo 8] Medición del nivel de hEPO producido en las líneas celulares transfectadas pDC6/hEPO

20 El nivel de producción se determinó mediante ELISA. Se recubrieron placas de 96 pozos (placa F96 MAXI SORP Nunc-Inmuno, Cat. no. 442404, Nunc) a 4°C durante 16 horas con 1 µg / mL de un anticuerpo EPO anti-humano (rhEPO MAb R6K, Fuso Pharmaceutical Industries) diluido con una solución de anticuerpo en fase sólida (D-PBS (regulador de fosfato de Dulbecco, Sigma-Aldrich)). Después de bloquear con una solución de bloqueo (Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) mezclado en una proporción 1:3 con D-PBS (regulador de fosfato de Dulbecco, Sigma Aldrich)), se aplicaron 100 µL cada uno de sobrenadantes de cultivo de 72 horas (dilución 1/1000 hasta 1 / 100.000), serie de dilución dos veces (500 a 15,6 mIU / mL) de EPO humana purificada (Fuso Pharmaceutical Industries) en diluyente de antígeno anticuerpo (Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) mezclados en una proporción 1:9 con D-PBS (regulador de fosfato de Dulbecco, Sigma Aldrich)), y diluyente antígeno anticuerpo (Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) mezclados en una proporción 1:9 con D-PBS (regulador de fosfato de Dulbecco, Sigma Aldrich)) y se llevó a cabo la incubación a 25°C durante dos horas. Esto se incubó adicionalmente con 0,1 µg / mL de un anticuerpo monoclonal EPO humano marcado con peroxidasa (POD-rhEPO MAb R2C, Fuso Pharmaceutical Industries) a 25°C durante dos horas. Se aplicó sustrato de peroxidasa Sure Blue TMB Microwell (KPL) a razón de 100 µl / pozo, y después de esto reaccionó a 25°C durante 30 minutos, se añadió ácido fosfórico 1 M a razón de 100 µl / pozo para detener la reacción. Se determinó la concentración de proteína utilizando un lector de microplacas (modelo 680, fabricado por BioRad) y sobre el lector de microplacas, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm con la longitud de onda de 655 nm como control. La Tabla 3 muestra las diez primeras muestras con un nivel de producción alto de EPO humano de acuerdo con los resultados obtenidos por ELISA. La línea celular que muestra el nivel de producción más alto produjo 3,727 ± 109 IU / mL en 3 días. Este valor que proviene de una línea celular en etapa temprana no clonada, es decir, en un estado que no ha experimentado amplificación génica, indicó un nivel muy alto comparado con niveles de producción representativos de eritropoyetina reportados en la literatura (JP-A (Kokai) 2002 - 45191; J. Microbiol. Biotechnol. 2008 Jul; 18 (7): 1342 hasta 1351; Biotechnol. Appl. Biochem. 2000 dic.; 32 (Pt 3): 167-172; Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU. 1986 septiembre; 83 (17): desde 6465 hasta 6,469). Esto probó que los vectores de expresión de la presente invención permiten niveles muy altos de expresión de proteína. A continuación, se llevó a cabo una transferencia tipo Western de hEPO en sobrenadantes de cultivo para confirmar la expresión de proteína.

[Tabla 3]

| Línea Celular pDC6/hEPO No. | Valor Convertido |
|-----------------------------|------------------|
| | IU/mL |
| 27 | 547 ± 41 |
| 36 | 1.965 ± 44 |
| 50 | 3.682 ± 155 |
| 60 | 1.989 ± 80 |
| 62 | 2.351 ± 78 |

| Línea Celular pDC6/hEPO No. | Valor Convertido |
|-----------------------------|------------------|
| | IU/mL |
| 67 | 1.095 ± 42 |
| 72 | 1.558 ± 88 |
| 77 | 3.727 ± 109 |
| 78 | 1.872 ± 150 |
| 82 | 3.727 ± 78 |

[Ejemplo 9] Transferencia tipo Western de sobrenadantes de cultivo de células transfectadas con pDC6/hEPO

Se analizaron sobrenadantes de cultivo de tres días de diez muestras con el nivel de producción más alto de EPO humana obtenida en el Ejemplo 8 descrito anteriormente mediante una transferencia tipo Western. Se mezclaron 10 µL cada vez de los sobrenadantes de cultivo con 10 µL de regulador de Laemmli (BIO-RAD) que contenía 2-mercaptoetanol al 5% (Wako) para reducción por calentamiento a 98°C durante cinco minutos (termociclador de PCR TaKaRa PERSONAL, TaKaRa Biomedicals). Además, se mezcló una preparación estándar de 100 µg / 10 µL de rhEPO (Recombinant Human EPO, Cat. 287-TC, de R & D) con 10 µL de regulador de muestras de Laemmli (BIO-RAD) que contenía de 2-mercaptoetanol al 5% (Wako) para reducción de por calentamiento a 98°C durante cinco minutos (termociclador de PCR TaKaRa PERSONAL, TaKaRa Biomedicals). Se colocaron un regulador de electroforesis (Tris / glicina / SDS, BIO-RAD) y Super SEP^{MR} 10% a 20% pozo 17 (Wako) en una cámara de electroforesis (DPE-1020, DAIICHI Pure Chemicals CO., LTD), y se aplicaron 20 µL de las soluciones de las muestra tratadas con calor y una preparación estándar al Super^{MR} 10% a 20% 17 pozos (Wako), y se llevó a cabo la electroforesis a 40 mA durante 55 minutos (se usó una fuente de poder: My Run, COSMO BIO CO., LTD). Luego, se removió el gel de las placas de vidrio, y se remojó en un regulados de transferencia (regulador de Tris / Glicina (BIO-RAD) que contiene metanol al 30% (Wako)) durante 5 minutos mientras se agitaba (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries). Se activó una membrana de transferencia Immobilon-P (Millipore) mediante remojo secuencial en 8 mL de metanol (Wako) durante 15 segundos, 8 mL de agua MilliQ (Millipore) durante dos minutos, y 8 mL de regulador de transferencia (regulador Tris / Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)) durante cinco minutos mientras se agitaba (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries). En un aparato de transferencia (TRANS-BLO, SD SEMI-DRY TRANSFER CELL, BIO-RAD), papeles de filtro (papel de transferencia tamaño extra grueso Criterion^{MR}, BIO-RAD) remojada con regulador de transferencia (regulador Tris / Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)), la membrana de transferencia activada Immobilon-P (Millipore), el gel después de electroforesis remojado después de el regulador de transferencia (regulador Tris / Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)), y se colocaron papeles de filtro (papel de transferencia tamaño extra grueso Criterion^{MR}, BIO-RAD) remojado con regulador de transferencia (regulador Tris / Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)) en orden desde el lado del cátodo, se colocó una cubierta, y se llevó a cabo la electroforesis a 80 mA (PowerPac^{MR} HC, BIO-RAD) durante una y media horas para transferir las proteínas separadas sobre la membrana de transferencia Immobilon-P (Millipore). Después de la transferencia, se remojó la membrana de transferencia Immobilon-P (Millipore) en 8 mL de ImmunoBlock (marca registrada, división de Productos de Laboratorio de Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) y se bloqueó a 4°C durante 18 horas; y se hicieron reaccionar 10 mL de IgG policlonal de conejo Epo (H-162) (Santa Cruz Biotechnology) diluido 1000 veces con D-PBS (Wako) que contenía Tween 20 al 0,05% (sorbitan monolaurato polioxietileno (20), Wako) con las proteínas sobre la membrana durante una hora a temperatura ambiente mientras se agitaba (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries).

Después de remover los anticuerpos no enlazados, se añadieron 10 mL IgG F(c) anti-conejo purificada por afinidad conjugada con peroxidasa [cabra] (Rock Land) diluido 5000 veces con D-PBS (Wako) que contenía Tween 20 al 0,05% (sorbitan monolaurato de polioxietileno (20), Wako), y esto reaccionó durante una hora a temperatura ambiente mientras se agitaba (ROTO-SHAKE GENIE, la Scientific Industries). Luego de remover los anticuerpos no enlazados, se añadieron 2 mL de sustrato HRP quimioluminiscente Immobilon^{MR} Western (Millipore) para quimioluminiscencia, y se tomaron fotografías de 30 segundos utilizando un sistema de cámara CCD enfriado de captura de luz ATTO (ATTO) con su configuración normal. La imagen obtenida por transferencias tipo Western se muestra en la Fig. 13. Se detectaron bandas similares a aquellas de la preparación estándar.

[Ejemplo 10] medición de los niveles de producción hEPO en cultivos de 7 días y cultivos de 14 días

Las líneas celulares que muestran altos niveles de producción de EPO, así como de crecimiento rápido (Nos. 27, 36, 50, 78, y 82) fueron seleccionadas y se cultivadas adicionalmente durante 7 y 14 días, y se midieron las concentraciones

hEPO en los sobrenadantes de cultivo. El método de cultivo involucró inicialmente la medición del número de células, la dilución de las células con un medio para obtener $0,5 \times 10^5$ células / mL, luego, se transfirieron 7,5 mL de esta a un frasco nuevo T75, cultivando en presencia de dióxido de carbono al 5% a 37°C durante 7 y 14 días, y recolectando el sobrenadante después de centrifugación a 9300 g durante dos minutos. Los niveles de producción se determinaron mediante ELISA. Se recubrieron placas de 96 pozos (placa F96 MAXI SORP Nunc-Inmuno, Cat. no. 442404, Nunc) a 4°C durante 16 horas con 1 µg / mL de un anticuerpo EPO anti-humano (rhEPO MAb R6K, Fuso Pharmaceutical Industries) diluido con una solución de anticuerpo en fase sólida (D-PBS (regulador de fosfato de Dulbecco, Sigma-Aldrich)). Después de bloquear con una solución de bloqueo (Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) mezclada en una proporción 1:3 con D-PBS (regulador de fosfato de Dulbecco, Sigma Aldrich)), se aplicaron 100 µL cada vez de los sobrenadantes de cultivo de 7 días y 14 días (dilución 1 / 1.000 a 1 / 100.000), serie de dilución dos veces (500 a 15,6 mIU / mL) de EPO humana purificada (Fuso Pharmaceutical Industries) en diluyente de antígeno anticuerpo (Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) mezclado en una proporción 1: 9 con D-PBS (regulador de fosfato de Dulbecco, Sigma Aldrich)), y el diluyente de antígeno anticuerpo (Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) mezclados en una proporción 1: 9 con D-PBS (regulador de fosfato de Dulbecco, Sigma Aldrich)), y se llevó a cabo la incubación 25°C durante dos horas. Esto fue incubado adicionalmente con 0,1 µg / mL de un anticuerpo monoclonal EPO humana marcada con peroxidasa (POD-rhEPO MAb R2C, Fuso Pharmaceutical Industries) a 25°C durante dos horas. Se aplicó sustrato de peroxidasa Sure Blue TMB de Microwell (KPL) a 100 µL / pozo, y después de esto reaccionó a 25°C durante 30 minutos, se añadió ácido fosfórico 1 M a razón de 100 µL / pozo para detener la reacción. Se determinó la concentración de proteína utilizando un lector de microplacas (modelo 680, manufacturado por BioRad) y sobre el lector de microplacas, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm con la longitud de onda de 655 nm como control. La Tabla 4 muestra los niveles de producción de los cultivos de 7 días y de 14 días en una tabla según los resultados obtenidos por ELISA. La línea celular que muestra el nivel de producción más alto produjo $31,590 \pm 444$ IU / mL en 14 días.

Este valor que proviene de una línea celular no clonada de etapa temprana, es decir, también, es decir, también en un estado que no ha sufrido amplificación génica, indicó un nivel muy alto comparado con los niveles de producción de eritropoyetina representativos reportados en la literatura (JP-A (Kokai) 2002-45191; J. Microbiol. Biotechnol. 2008 Jul; 18 (7): 1342 - 1351; Biotechnol. Appl. Biochem. 2000 dic; 32 (Pt 3): 167 - 172; Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU. 1986 septiembre; 83 (17): desde 6465 - 6469). Usualmente, la amplificación génica por MTX se lleva a cabo después de la clonación para tratar incrementar el nivel de producción; sin embargo, el nivel de producción de clones amplificados génicamente es algunas veces no estable. Además, la detección de células recombinantes a partir de amplificación génica requiere de seis meses a un año. En este sentido, las células obtenidas transfección del vector anterior mostraron un alto nivel de producción hasta el grado en el que la amplificación génica no es necesaria, y las células con altos niveles de producción fueron fácilmente obtenidas con éxito y en un corto período de tiempo. Por lo tanto, se reveló que el vector de la presente invención tiene un desempeño muy alto.

[Tabla 4]

| Línea celular pDC6/hEPO No. | Nivel de producción de EPO | |
|-----------------------------|----------------------------|------------------|
| | IU/mL/7 días | IU/mL/14 días |
| 27 | $3,738 \pm 54$ | $2,601 \pm 61$ |
| 36 | $9,310 \pm 151$ | $18,897 \pm 139$ |
| 50 | $7,600 \pm 489$ | $12,167 \pm 252$ |
| 78 | $12,210 \pm 294$ | $31,590 \pm 444$ |
| 82 | $16,133 \pm 396$ | $24,949 \pm 428$ |

[Ejemplo 11] Generación de líneas celulares que producen hEPO con alto rendimiento

Para generar células que tienen una capacidad de producción incluso mayor, se incrementó el número de células en la detección en un intento por generar líneas celulares que producen hEPO con alto rendimiento.

Se transfectaron 2,5 µg de pDC6/hEPO en 16.000.000 de células CHO (células CHO DG44) en frascos de cultivo de 25 cm² utilizando el método Lipofectina (utilizando Lipofectamine^{MR} LTX; Invitrogen). La transfección se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 48 horas después de la transfección génica, se contó el número de células, y luego se diluyeron las células en un medio CD Opti CHO AGT (Invitrogen) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM

(Invitrogen). Se sembraron en placas las células en 45 placas de microtitulación de 96 pozos a una concentración de 16.000 células / pozo (4320 pozos), y después de cultivar en presencia gas dióxido de carbono al 5% a 37°C durante aproximadamente tres semanas, se observaron células viables (líneas de células que crecen en medio libre de HT).

5 Se utilizó transferencia de manchas para confirmar la expresión de todas las líneas de las placas sobre las cuales se sembraron las células. Se aplicaron 2 µL de cada uno de los sobrenadantes de cultivo de todas las líneas a una membrana (Nytran N, ítem No.10416196, Schleicher & Schuell), y después de incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se bloqueó con Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después se añadieron 0,2 µg / mL de un anticuerpo anti-EPO policlonal de conejo (EPO (H-162), IgG policlonal de conejo, Cat.sc-7956, Santa Cruz Biotechnology) diluido con PBST (D-PBS, Tween 20 al 0,05%) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 0,2 µg / mL de un anticuerpo IgG anti-conejo marcado con peroxidasa (IgG anti-conejo purificado por afinidad conjugado con peroxidasa F8C, Cat. 611 - 1303, Rock Land) diluido con PBST (D-PBS, Tween 20 al 0,05%) y se agitó durante 30 minutos. Se hizo reaccionar sustrato HRP quimioluminiscente Immobilon^{MR} Western (2 mL del reactivo Luminol, 2 mL de solución de peróxido, Millipore, Cat. WBKLS0050, Millipore) a temperatura ambiente durante cinco minutos y se añadió. Esto se incubó a temperatura ambiente durante cinco minutos, y se capturó la quimioluminiscencia utilizando un detector (ATTO de captura de luz, AE-6981FC, ATTO). Las imágenes capturadas fueron analizadas utilizando Image J (NIH) y se compararon las intensidades de luminiscencia. Las 450 líneas que tienen la intensidad de luminiscencia más alta fueron transferidas a placas de 24 pozos junto con medio CD Opti CHO AGT (Invitrogen) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen), y se cultivaron como cultivos estacionarios en presencia de gas dióxido de carbono al 5% a 37°C hasta que las células ocuparon 1/3 o más en cada pozo.

25 Se confirmó la expresión mediante transferencia de manchas para las 450 líneas principales. Se aplicaron 2 µL cada vez de los sobrenadantes de cultivo de todas las líneas a una membrana (Nytran N, ítem No.10416196, Schleicher & Schuell), y después de la incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se bloqueó con Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Además, 0,2 mg / ml de un anticuerpo anti-EPO policlonal de conejo (EPO (H-162), IgG policlonal de conejo, Cat. sc-7956, Santa Cruz Biotechnology) diluido con PBST (D-PBS, Tween 20 al 0,05%) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 0,2 µg / mL de un anticuerpo IgG anti-conejo marcado con peroxidasa (IgG anti-conejo purificado con afinidad conjugada con peroxidasa F8C, Cat. 611-1303, Rock Land) diluido con PBST (D-PBS, Tween 20 al 0,05%) y se agitó durante 30 minutos. Se hizo reaccionar el sustrato HRP quimioluminiscente Immobilon^{MR} Western (2 mL de reactivo Luminol, 2 mL de solución de peroxidasa, Millipore, Cat. WBKLS0050, Millipore) a temperatura ambiente durante cinco minutos y se añadió. Se incubó a temperatura ambiente durante cinco minutos, y se capturó la quimioluminiscencia utilizando un detector (ATTO de captura de luz, AE-6981FC, ATTO). Las imágenes capturadas fueron analizadas usando Image J (NIH) y se compararon las intensidades de luminiscencia. Las 200 líneas que tenían la intensidad más alta de luminiscencia fueron transferidas a placas de 6 pozos junto con un medio CD Opti CHO AGT (Invitrogen) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen) y se cultivó con agitación a 90 min⁻¹ en presencia de gas dióxido de carbono al 5% a 37 ° C hasta que las células ocupada 1/3 o más de cada pozo.

40 Se confirmó la expresión fue confirmada por transferencias de manchas de las 200 mejores líneas. Se aplicaron 2 µL de cada uno de los sobrenadantes de cultivo de todas las líneas a una membrana (Nytran N, NO.10416196 ITEM, Schleicher & Schuell), y después de la incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se bloqueó con Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Además, se añadieron 0,2 µg / mL de un anticuerpo anti-EpO policlonal de conejo (EPO (H-162), IgG policlonal de conejo, Cat. sc-7956, Santa Cruz Biotechnology) diluido con PBST (D-PBS, Tween 20 al 0,05%) fue añadió y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 0,2 µg / mL de un anticuerpo IgG anti-conejo marcado con peroxidasa (IgG anti-conejo purificado por afinidad conjugada con peroxidasa F8C, Cat. 611-1303, Rock Land) diluido con PBST (D-PBS, Tween 20 al 0,05%) y se agitó durante 30 minutos. Sustrato HRP quimioluminiscente Immobilon^{MR} Western (2 mL del reactivo Luminol, 2 mL de solución de peróxido, Millipore, Cat.WBKLS0050, Millipore) a temperatura ambiente durante cinco minutos y se añade. Esto se incubó a temperatura ambiente durante cinco minutos, y la quimioluminiscencia fue capturada utilizando un detector (ATTO de captura de luz, AE-6981FC, ATTO). Se analizaron las imágenes capturadas usando Image J (NIH) y se compararon las intensidades de luminiscencia. Las 80 líneas que tienen la intensidad más alta de la luminiscencia se transfirieron a placas de 6 pozos junto con un medio CD Opti CHO AGT (Invitrogen) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen) y se cultivó con agitación a 90 min⁻¹ en presencia de CO₂ 5% a 37°C, hasta que las células ocuparon 1/3 o más de cada pozo. Además, las 80 líneas que tienen la intensidad de la luminiscencia más alta fueron transferidas a placas de 6 pozos junto con un medio CD Opti CHO AGT (Invitrogen) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen) y se cultivó mientras se agitaba a 90 min⁻¹ en presencia de gas dióxido de carbono al 5% a 37°C, hasta que las células ocuparon 1/3 o más de cada pozo. Además, las 80 líneas que tenían la intensidad de la luminiscencia más alta fueron transferidas a placas de 6 pozos junto con un medio CD Opti CHO AGT (Invitrogen) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen) y se cultivó mientras se agitaba a 90 min⁻¹ en presencia de gas dióxido de carbono al 5% a 37°C, hasta que las células ocuparon 1/3 o más de cada pozo.

60 Se confirmó la expresión mediante transferencia de manchas para las 80 líneas principales. Se aplicaron 2 µL cada vez de los sobrenadantes de cultivo de todas las líneas a una membrana (Nytran N, ítem No.10416196, Schleicher & Schuell), y después de incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se bloqueó con Block Ace al 4%

5 (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Además, se añadieron 0,2 µg / mL de un anticuerpo anti-EPO policlonal de conejo (EPO (H-162), IgG policlonal de conejo, Cat. sc-7956, Santa Cruz Biotechnology) diluido con PBST (D-PBS, Tween 20 al 0,05%) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 0,2 µg / mL de un anticuerpo IgG anti-conejo marcado con peroxidasa (IgG anti-conejo purificado por afinidad conjugado con peroxidasa F8C, Cat. 611-1303, Rock Land) diluido con PBST (D-PBS, Tween 20 al 0,05%) y se agitó durante 30 minutos. Sustrato HRP quimioluminiscente Immobilon^{MR} Western (2 mL de reactivo Luminol, 2 mL de solución de peroxidasa, Millipore, Cat. WBKLS0050, Millipore) a temperatura ambiente durante cinco minutos y se añadió. Se incubó a temperatura ambiente durante cinco minutos, y se capturó la quimioluminiscencia utilizando un detector (ATTO de captura de luz, AE-6981FC, ATTO). Se analizaron las imágenes capturadas usando Image J (NIH) y se compararon las intensidades de luminiscencia. Para las 40 líneas que tenían la intensidad más alta de luminiscencia, se colocaron 0,4 mL de cada línea en un tubo estéril y se centrifugó a 200 x g durante dos minutos. Se descartó el sobrenadante, y se suspendieron las células en 0,1 mL de medio fresco (IS CHO-CD con medio Hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen)). Después de contar el número de células, se diluyeron las células con el medio hasta 5 x 10⁵ células / mL, luego, se transfirieron 0,2 mL de las mismas a nuevas placas de 24 pozos, y se cultivaron las células en presencia de gas dióxido de carbono al 5% de a 37°C durante 72 horas. Luego, se centrifugaron las células a 9300 x g durante dos minutos y se recolectó el sobrenadante. Se determinaron los niveles de producción.

[Ejemplo 12] Medición del nivel de hEPO producido por líneas celulares que producen EPO con alto rendimiento

20 Se determinó el nivel de producción mediante ELISA. Se recubrieron placas de 96 pozos (placa F96 MAXI SORP Nunc-Inmuno, Cat. no. 442404, Nunc) a 4°C durante 16 horas con 1 µg / mL de un anticuerpo EPO anti-humano (rhEPO MAb R6K, Fuso Pharmaceutical Industries) diluido con una solución de anticuerpo en fase sólida (D-PBS (regulador de fosfato de Dulbecco, Sigma-Aldrich)). Después de bloquear con una solución de bloqueo (Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) se mezcló en una proporción 1:3 con D-PBS (regulador de fosfato de Dulbecco, Sigma Aldrich)), se aplicaron 100 µL de cada vez de sobrenadantes de cultivo de 72 horas (1 / 40.000 hasta 1 / 160.000), series de dilución dos veces (500 a 15.6 mIU / mL) de EPO humana purificada (Fuso Pharmaceutical Industries) en diluyente de antígeno anticuerpo (Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) mezclados en una proporción 1: 9 con D-PBS (regulador de fosfato de Dulbecco, Sigma Aldrich)), y diluyente anticuerpos antígeno (Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) mezclados en una relación 1: 9 con D-PBS (regulador de fosfato de Dulbecco, Sigma Aldrich)), y se llevó a cabo la incubación a 25°C durante dos horas. Se incubó adicionalmente con 0,1 µg / mL de un anticuerpo monoclonal EPO humano marcado con peroxidasa (POD-rhEPO MAb R2C, Fuso Pharmaceutical Industries) a 25°C durante dos horas. Se aplicó sustrato de peroxidasa Sure Blue TMB Microwell (KPL) a razón de 100 µL / pozo, y después de esto reaccionó a 25°C durante 30 minutos, se añadió ácido fosfórico 1 M a razón de 100 µL / pozo para detener la reacción. Se determinó la concentración de proteína utilizando un lector de microplacas (modelo 680, fabricado por BioRad) y sobre el lector de microplacas, se midió la absorbancia con la longitud de onda de 450 nm con la longitud de onda de 655 nm como control. La Tabla 5 muestra las 40 muestras principales con un nivel de producción alto de EPO humana de acuerdo con los resultados obtenidos por ELISA.

[Tabla 5]

| Línea celular pDC6/hEPO No. | Nivel de producción de EPO | Línea celular pDC6/hEPO No. | Nivel de producción de EPO |
|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | IU/mL | | IU/mL |
| 1 | 2,960 ± 27.8 | 21 | 4,204 ± 159.1 |
| 2 | 2,476 ± 27.8 | 22 | 3,307 ± 144.2 |
| 3 | 6,356 ± 83.9 | 23 | 3,733 ± 70.6 |
| 4 | 7,311 ± 192.5 | 24 | - ± - |
| 5 | 3,142 ± 46.8 | 25 | 4,489 ± 35.3 |
| 6 | 6,889 ± 77.0 | 26 | 12,390 ± 123.1 |
| 7 | 4,684 ± 66.7 | 27 | 2,422 ± 23.1 |
| 8 | 2,631 ± 61.1 | 28 | 2,662 ± 35.3 |

| | | | |
|----|----------------|----|----------------|
| 9 | 3,387 ± 55.5 | 29 | 1,331 ± 6.7 |
| 10 | 1,416 ± 13.3 | 30 | 1,836 ± 26.7 |
| 11 | 3,347 ± 88.8 | 31 | 804 ± 11.5 |
| 12 | 10.622 ± 277.6 | 32 | 13,744 ± 123.1 |
| 13 | 4,413 ± 68.4 | 33 | 4,356 ± 123.9 |
| 14 | 6,556 ± 126.2 | 34 | 4,084 ± 38.5 |
| 15 | 1,424 ± 13.9 | 35 | 2,013 ± 53.3 |
| 16 | 4,702 ± 116.5 | 36 | 3,596 ± 68.4 |
| 17 | 8,067 ± 66.7 | 37 | 7,241 ± 162.8 |
| 18 | 2,742 ± 65.8 | 38 | 7,056 ± 61.5 |
| 19 | 2,551 ± 101.8 | 39 | 4,231 ± 30.8 |
| 20 | 3,702 ± 126.0 | 40 | 7,262 ± 248.7 |

5 De las 40 líneas que crecen en medio libre de HT generadas por la repetición de la detección anterior, 15% produjeron hEPO a razón de 0 IU / mL / 3 días o más hasta menos de 2.000 IU / mL / 3 días. De las 40 líneas, 34 líneas (85%) produjeron 2.000 IU / mL / 3 días o más. De las 40 líneas, 19 líneas (47,5%) produjeron 4.000 IU / mL / 3 días o más. De las 40 líneas, 11 líneas (27,5%) produjeron 6.000 IU / mL / 3 días o más. De las 40 líneas, cuatro líneas (10%) produjeron 8.000 IU / mL / 3 días o más. De las 40 líneas, tres líneas (7,5%) produjeron 10.000 IU / mL / 3 días o más. Sorprendentemente, de las 40 líneas, dos líneas (5,0%) produjeron 12.000 IU / mL / 3 días o más. La línea que muestra el nivel de producción más alto produjo 13.744 ± 123 IU / mL en 3 días. Este valor que proviene de una línea de células etapa temprana no clonado, es decir, también en un estado que no experimentó amplificación génica, indicó un nivel muy alto comparado con los niveles representativos de producción de eritropoyetina reportados en la literatura (JP-A (Kokai) 2002-45191; J. Microbiol. Biotechnol. 2008 Jul; 18 (7): 1342 hasta 1351; Biotechnol. Appl. Biochem. 2000 dic; 32 (Pt 3): 167-172; Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU. 1986 septiembre; 83 (17): desde 6465 - 6469). Esto demostró que los vectores de expresión de la presente invención permiten niveles muy altos de expresión de proteína.

[Ejemplo 13] Construcción de pDC6 / D-EPO

15 Usando métodos por aquellos bien capacitados en el arte, se sustituyeron los nucleótidos No. 1267 a No. 1275 No. en el vector de la presente invención, pDC6, fueron sustituido con un ADNc que codifica la Darbeopetina alfa (D-EPO) de la SEQ ID NO: 8 (de ahora en adelante denominada D-EPO) para construir pDC6 / D-EPO (Fig. 14).

[Ejemplo 14] Transfección de pDC6 / D-EPO en células CHO, y selección en un medio libre de HT utilizando un medio de CD o un medio de CD complementado con aditivos de base no animal

20 Se transfectaron 2,5 µg de pDC6 / D-EPO en 4.000.000 de células CHO (células CHO DG44) en frascos de cultivo de 25 cm² utilizando el método de la Lipofectina (utilizando Lipofectamine^{MR} LTX; Invitrogen). Se realizó la transfección de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 48 horas después de la transfección génica, se contó el número de células, y luego se diluyeron las células en IS CHO-CD con medio Hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{RM}-I 4mN (Invitrogen). Se sembraron las células en placa en cinco placas de microtitulación de 96 pozos a una concentración de 4.000 células / pozo (480 pozos), y después de cultivar en presencia de gas dióxido de carbono al 5% a 37°C durante aproximadamente tres semanas, se observaron células viables (líneas celulares que crecen en medio libre de HT).

30 A partir de las células viables, se seleccionaron arbitrariamente 84 líneas de células que crecieron en medio libre de HT, y se confirmó la expresión mediante trasferencia de manchas. Se aplicó 1 µL de cada una de una serie de diluciones dos veces (10 a 0.16 ng / mL) de una preparación estándar de EPO humana recombinante (Recombinant Human EPO, Cat. Sistemas 287-TC, de R & D) y los sobrenadantes del cultivo de las 84 líneas seleccionadas arbitrariamente a una membrana (Nytran N, ítem No.10416196, Schleicher & Schuell), y después de la incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, de bloqueó con Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) a temperatura ambiente

5 durante 30 minutos. Además se añadieron 0,2 µg / mL de un anticuerpo anti-EPO policlonal de conejo (EPO (H-162), IgG policlonal de conejo, Cat. sc-7956, Santa Cruz Biotechnology) diluido con PBST (D-PBS, Tween 20 al 0,05%) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 0,2 µg / mL de un anticuerpo IgG anti-conejo marcado con peroxidasa (IgG anti-conejo purificado por afinidad conjugado con peroxidasa F8C, Cat. 611-1303, Rock Land) diluido con PBST (D-PBS, 0,05% Tween 20) y se agitó durante 30 minutos. Se hizo reaccionar el sustrato HRP quimioluminiscente Immobilon^{MR} Western (2 mL de reactivo Luminol, 2 mL de solución de peróxido, Millipore, Cat. WBKLS0050, Millipore) se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante cinco minutos y se añadió. Se incubó a temperatura ambiente durante cinco minutos, y se capturó la quimioluminiscencia utilizando un detector (ATTO de captura de luz, AE-6981FC, ATTO). La imagen obtenida por transferencia manchas se muestra en la Fig. 15.

10 Las líneas para la que se observó luminiscencia en transferencias de manchas se transfirieron a placas de 24 pozos junto con IS CHO-CD con medio hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen), y se cultivaron hasta que las células ocuparon 1/3 o más de cada pozo. Las líneas para la que se observó un mayor crecimiento fueron transferidas a placas de 6 pozos junto con IS CHO-CD con medio hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen), y se cultivaron hasta que las células ocuparon 1/3 o más de cada pozo. Las líneas para la que se observó un mayor crecimiento fueron transferidos a matraces T75 (BD), junto con IS CHO-CD con medio hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen), y se cultivaron hasta que las células alcanzaron 1,0 x 10⁶ células/mL o más en cada pozo.

20 Se colocaron 15 ml de cada línea en un tubo de 15 ml y se centrifugaron a 1100 rpm durante siete minutos. Se desechó el sobrenadante, y se suspendieron las células en 15 ml de medio fresco (IS CHO-CD con medio Hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen)). Después de contar el número de células, se diluyeron las células con el medio a razón de 5 x 10⁵ células/mL, a continuación se transfirieron 7,5 ml de ellas a matraces T75 nuevos, y se cultivaron las células en presencia de gas dióxido de carbono al 5% a 37°C durante 14 días. El día 3, el día 7 y el día 14 del cultivo, se recolectaron 1 mL de cada solución de cultivo, se centrifugó a 9300 x g durante dos minutos, y se recogió el sobrenadante. A continuación, se determinó el nivel de producción.

25 **[Ejemplo 15]** Medición del nivel de D-EPO producido por las líneas celulares transfectadas con pDC6/D-EPO

30 Se determinó el nivel de producción por ELISA. Se recubrieron placas de 96 pozos (placa F96 MAXI SORP Nunc-Inmuno, Cat. no. 442404, Nunc) a 4°C durante 16 horas con 1 µg/ml de un anticuerpo EPO anti-humano (rEPO MAb R6K, Fuso Pharmaceutical Industries) diluido con una solución de anticuerpo en fase sólida (D-PBS (regulador de fosfato de Dulbecco, Sigma-Aldrich)). Después de bloquear con una solución de bloqueo (Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) mezclado en una proporción de 1:3 con D-PBS (regulador de fosfato de Dulbecco, Sigma Aldrich)), se mezclaron 100 µL de cada uno de sobrenadante de cultivo de 3 días, 7 días, o 14 días (dilución 1/1000 a 1/100.000), serie de dilución dos veces (10 a 0.156 ng/mL) de Darbeopetina alfa (inyección Nesp de 120 µg/ jeringa de plástico de 0,6 mL, Kyowa Hakko Kirin Co. Ltd.) en diluyente de antígeno anticuerpo (Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) mezclados en una relación 1:9 con D-PBS (regulador de fosfato de Dulbecco, Sigma Aldrich)), y se aplicaron el diluyente antígeno anticuerpo (Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) mezclados en una proporción 1:9 con D-PBS (regulador de fosfato de Dulbecco, Sigma Aldrich)), y se llevó a cabo la incubación a 25°C durante dos horas. Se incubó adicionalmente con 0,1 µg/ml de un anticuerpo monoclonal EPO humana marcada con peroxidasa (POD-rEPO MAb R2C, Fuso Pharmaceutical Industries) a 25°C durante dos horas. Se aplicó sustrato de peroxidasa Sure Blue TMB Microwell (KPL) a razón de 100 µl/pozo, y después de esto reaccionó a 25°C durante 30 minutos, se añadió ácido fosfórico 1 M a razón de 100 µl/pozo para detener la reacción. Se determinó la concentración de proteína utilizando un lector de microplacas (Modelo 680, fabricado por BioRad) y, en el lector de microplacas, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm con la longitud de onda de 655 nm como control. La Tabla 6 muestra las cinco primeras muestras con alto nivel de producción de D-EPO de acuerdo con los resultados obtenidos por ELISA. La línea que muestra el nivel más alto de producción produjo 22 ± 0,3 µg/ml en 3 días, 135 ± 3,3 µg/ml en 7 días, y 170 ± 3,7 µg/ml en 14 días. A continuación, se llevó a cabo una transferencia tipo Western de D-EPO en los sobrenadantes del cultivo para confirmar la expresión de la proteína.

[Tabla 6]

| Línea celular pDC6/D-EPO No. | Nivel de producción de D-EPO | | |
|------------------------------|------------------------------|--------------|--------------|
| | µg/mL/3días | µmg/mL/7días | µg/mL/14días |
| 12 | 14 ± 0.0 | 95 ± 4.8 | 134 ± 1.4 |
| 23 | 14 ± 0.1 | 97 ± 3.5 | 173 ± 2.6 |
| 24 | 12 ± 0.2 | 87 ± 1.5 | 170 ± 1.4 |

| Línea celular pDC6/D-EPO No. | Nivel de producción de D-EPO | | |
|------------------------------|------------------------------|--------------|--------------|
| | µg/mL/3días | µmg/mL/7días | µg/mL/14días |
| 30 | 22 ± 0.3 | 135 ± 3.3 | 170 ± 3.7 |
| 36 | 20 ± 0.3 | 122 ± 9.6 | 130 ± 3.5 |

[Ejemplo 16] Transferencia tipo Western de sobrenadantes de cultivo de células transfectadas con pDC6/D-EPO

5 Los sobrenadantes de cultivo de 3 días, 7 días y 14 días de cinco muestras con el nivel de producción más alto de D-EPO obtenido en el Ejemplo 15 descrito anteriormente se analizaron por transferencia tipo Western. Se mezclaron 10 µl de cada uno de los sobrenadantes de cultivo con 10 µl de regulador de muestras de Laemmli (BIO-RAD) que contiene 2-mercaptoethanol al 5% (Wako) para reducción por calentamiento a 98°C durante cinco minutos (termociclador de PCR TaKaRa PERSONAL, TaKaRa Biomedicals). Además, se mezclaron 100 ng/10 µL de preparación estándar de Darbeopetina alfa (inyección Nesp de 120 µg/jeringa de plástico de 0,6 ml, Kyowa Hakko Kirin Co. Ltd.) con 10 µL de regulador de muestra de Laemmli (BIO-RAD) que contiene 2-mercaptoetanol al 5% (Wako) para la reducción por calentamiento a 98°C durante cinco minutos (Termociclador de PCR TaKaRa PERSONAL, TaKaRa Biomedicals). Se colocaron un regulador de electroforesis (Tris/Glicina/SDS, BIO-RAD) y Super SEP^{MR} 10% a 20% 17 pozos (Wako) en un recipiente de electroforesis (DPE-1020, DAIICHI Pure Chemicals CO., LTD), y 20 µl de las soluciones de muestra tratadas con calor y se aplicó la preparación estándar a la Super^{MR} 10% a 20% 17 pozos (Wako), y se llevó a cabo la electroforesis a 40 mA durante 55 minutos (aparato de fuente de alimentación: se utilizó My Run, COSMO BIO CO., LTD). A continuación, se removió el gel de las placas de vidrio, y se enjuagó en un regulador de transferencia (regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)) mientras se agitaba (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries) durante cinco minutos.

20 Se activó una membrana de transferencia Immobilon-P (Millipore) por remojo secuencial en 8 mL de metanol (Wako) durante 15 segundos, 8 mL de agua MilliQ (Millipore) durante dos minutos, y 8 mL de regulador de transferencia (regulador Tris/Glicina (BIO -RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)) durante cinco minutos mientras se agitaba (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries). En un aparato de transferencia (TRANS-BLO, SD SEMI-DRY TRANSFER CELL, BIO-RAD), se colocaron papeles filtro (Papel de transferencia tamaño extra grueso Criterion^{MR}, BIO-RAD) remojados con regulador de transferencia (regulador Tris/Glicina (BIO- RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)), la membrana de transferencia activada Immobilon-P (Millipore), el gel después de la electroforesis remojado en regulador de transferencia (regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)), y se colocaron papeles filtro (papel de transferencia tamaño extra grueso Criterion^{MR}, BIO-RAD) remojados con regulador de transferencia (regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)) en orden desde el lado del cátodo, se colocó una cubierta, y se realizó la electroforesis a 80 mA (PowerPac HC^{MR}, BIO-RAD) durante una hora y media para transferir las proteínas separadas sobre la membrana de transferencia Immobilon-P (Millipore). Después de la transferencia, se remojó la membrana de transferencia Immobilon-P (Millipore) en 8 mL de ImmunoBlock (marca registrada, División de Productos de Laboratorio de Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) y se bloqueó a 4°C durante 18 horas, y se hicieron reaccionar 10 mL de IgG policlonal de conejo Epo (H-162) (Santa Cruz Biotechnology) diluido 1000 veces con D-PBS (Wako) que contenía Tween 20 al 0,05% (sorbitán monolaurato de polioxietileno (20), Wako) con las proteínas en la membrana durante una hora a temperatura ambiente mientras se agita (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries). Después de remover los anticuerpos no enlazados, se añadieron 10 mL de IgG F(c) anticonejo purificado por afinidad conjugado con peroxidasa (Cabra) (Rock Land) diluido 5000 veces con D-PBS (Wako) que contenía Tween 20 al 0,05% (sorbitán monolaurato de polioxietileno (20), Wako) y reaccionó durante una hora a temperatura ambiente con agitación (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries). Después de remover los anticuerpos no enlazados, se añadieron 2 ml de sustrato HRP quimioluminiscente Immobilon^{MR} Western (Millipore) para quimioluminiscencia, y se tomaron fotografías de 5 segundos usando un sistema de cámara CCD enfriado ATTO de captura de luz con sus ajustes normales. La imagen obtenida por transferencias tipo Western se muestra en la Fig. 16. Se detectaron bandas similares a las de la preparación estándar.

[Ejemplo 17] Construcción de pDC6/hG-CSF

45 Usando métodos bien conocidos por las personas calificadas en la técnica, se sustituyeron los nucleótidos No. 1267 a 1275 No. en el vector de la presente invención, pDC6, con un ADNc que codifica el factor estimulante de colonias de granulocitos humanos (G-CSF) de la SEQ ID NO: 9 (en lo sucesivo denominado como hG-CSF) para construir pDC6/hG-CSF (Fig. 17).

[Ejemplo 18] La transfección de pDC6/hG-CSF en células CHO, y la selección en un medio libre de HT usando un medio CD o un medio CD complementado con aditivos de base no animal

Se transfectaron 2,5 µg de pDC6/hG-CSF en 4.000.000 de células CHO (células CHO DG44) en frascos de cultivo de 25 cm² utilizando el método de Lipofectina (utilizando Lipofectamine^{MR} LTX; Invitrogen). La transfección se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 48 horas después de la transfección del gen, se contó el número de células, y luego se diluyeron las células en un medio CD Opti CHO AGT (Invitrogen) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen). Las células se sembraron en cinco placas de microtitulación de 96 pozos a una concentración de 4.000 células/pozo (480 pozos), y después de cultivar en presencia de gas dióxido de carbono al 5% a 37°C durante aproximadamente tres semanas, se observaron células viables (líneas de células que crecen en medio libre de HT).

A partir de las células viables, se seleccionaron arbitrariamente 50 líneas de células que crecen en medio libre de HT, y la expresión fue confirmada por transferencias de manchas. Se aplicaron 2 µL cada una de una serie de diluciones dobles (10 a 0,0390625 µg/ml) de una preparación estándar de G-CSF humana recombinante (G-CSF humana recombinante, cat. 1001C, Apolo) y se aplicaron los sobrenadantes de cultivo de las 50 líneas seleccionadas arbitrariamente a una membrana (Nytran N, ítem No.10416196, Schleicher & Schuell), y después de la incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se bloqueó con Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Además, se añadieron 0,5 mg/mL de un anticuerpo monoclonal de ratón G-CSF anti-humano (anticuerpo anti-G-CSF humano, Cat. MAB214, R & D) diluido con PBST (D-PBS, Tween 20 al 0,05%) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 0,2 µg/ml de un anticuerpo IgG antirratón marcado con peroxidasa (IgG antirratón de cabra (H + L), Cat. 115-036-062, Jackson) diluido con PBST (D-PBS, Tween 20 al 0,05%) y se agitó durante 30 minutos. Se hizo reaccionar sustrato HRP quimioluminiscente Immobilon^{MR} Western (2 mL del reactivo Luminol, 2 ml de solución de peróxido, Millipore, Cat. WBKLS0050, Millipore) a temperatura ambiente durante cinco minutos y se añadió. Se incubó a temperatura ambiente durante cinco minutos, y la quimioluminiscencia fue capturada utilizando un detector (ATTO de captura de luz, AE-6981FC, ATTO). La imagen obtenida por transferencia de manchas se muestra en la Fig. 18.

Las líneas para la que se observó luminiscencia en transferencias de manchas se transfirieron a placas de 24 pozos junto con medio CD Opti CHO AGT (Invitrogen) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen), y se cultivaron hasta que las células ocuparon 1/3 o más de cada pozo. Las líneas para la que se observó un mayor crecimiento fueron transferidas a placas de 6 pozos junto con medio CD Opti CHO AGT (Invitrogen) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen), y se cultivaron hasta que las células ocuparon 1/3 o más de cada pozo. Las líneas para la que se observó un mayor crecimiento fueron transferidas a matraces T75 (BD), junto con medio CD Opti CHO AGT (Invitrogen) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen), y se cultivaron hasta que las células alcanzaron 1,0 x 10⁶ células/ml o más en cada pozo.

Se colocaron 15 ml de cada línea en un tubo de 15 mL y se centrifugaron a 1100 rpm durante siete minutos. Se desechó el sobrenadante, y se suspendieron las células en 15 mL de medio fresco (medio CD Opti CHO AGT (Invitrogen) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen)). Después de contar el número de células, se diluyeron las células con el medio hasta 5 x 10⁵ células/mL, a continuación, se transfirieron 7,5 ml de ellas a matraces T75 nuevos, y se cultivaron las células en presencia de gas dióxido de carbono al 5% a 37°C durante 14 días. El día 3, el día 7 y el día 14 del cultivo, se recolectó 1 ml de cada solución de cultivo, se centrifugó a 9300 x g durante dos minutos, y se recogió el sobrenadante. Se determinó el nivel de producción.

[Ejemplo 19] Medición del nivel de hG-CSF producido por las líneas celulares transfectadas con pDC6/hG-CSF

Se determinó el nivel de producción por ELISA. Se recubrieron placas de 96 pozos (placa F96 MAXI SORP Nunc-Immuno, Cat. no. 442404, Nunc) a 4°C durante 16 horas con 0,5 µg/ml de un anticuerpo G-CSF anti-humano (anticuerpo monoclonal G-CSF anti-humano, Cat No. MAB214, sistema R&D) diluido con un regulador de recubrimiento (Na₂CO₃ 15 mM, NaHCO₃ 35 mM, NaN₃ al 0,05%, pH 9.6). Después de bloquear con una solución de bloqueo (Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) mezclados en una proporción de 1:3 con D-PBS (regulador de fosfato de Dulbecco, Sigma Aldrich)), se aplicaron 100 µl de cada uno de sobrenadantes de cultivo de 3 días, 7 días, y 14 días (dilución 1/10.000 a 1/200.000), serie de dilución de dos veces (5 a ,078125 ng/mL) de una preparación estándar de G-CSF humana recombinante (Recombinant Human G-CSF, Cat 1001C, Apolo) en diluyente de antígeno anticuerpo (Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) mezclados en una relación 1:9 con D-PBS (regulador de fosfato de Dulbecco, Sigma Aldrich)), y diluyente antígeno anticuerpo (Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) mezclados en una proporción 1:9 con D-PBS (regulador de fosfato de Dulbecco, Sigma Aldrich)), y la incubación se realizó a 25°C durante una hora. Se incubó adicionalmente con 0,25 µg/ml de un anticuerpo G-CSF humano biotilado (anticuerpo G-CSF anti-humano biotilado, Cat. No. BAF214, sistema R&D) a 25°C durante una hora. Se aplicó el kit de tinción ABC ultrasensible estándar (reactivo A 2 gotas, reactivo B 2 gotas/10 mL, Pro # 32050, Pierce) incubado a 25°C durante 30 minutos a razón de 100 µL/pozo, y se llevó a cabo la reacción a 25°C durante 30 minutos. Se aplicó sustrato de peroxidasa Sure Blue TMB Microwell (KPL) a razón de 100 µl/pozo, y después de esto se hizo reaccionar a 25°C durante 30 minutos, se añadió ácido fosfórico 1 M a razón de 100 mL/pozo para detener la reacción. Se determinó la concentración de proteína utilizando un lector de microplacas (Modelo 680, fabricado por BioRad) y en el lector de microplacas, se midió la absorbancia a la longitud de onda de 450 nm con la longitud de onda de 655 nm como control. La Tabla 7 muestra las diez primeras muestras con alto nivel de producción de G-CSF humano de acuerdo con los resultados obtenidos por ELISA. La línea que muestra el nivel más alto de producción produjo 34,7 ± 1,1 µg/mL en 3 días, 193,6 ± 0,6 mg/mL en 7 días, y 235,5 ± 14,8 µg/mL en 14 días. Este valor que proviene de una

5

línea de células en etapa temprana no clonada, es decir, también en un estado que no ha experimentado amplificación de genes, indica un nivel muy alto en comparación con los niveles de producción de G-CSF representativos reportados en la literatura (J Biosci Bioeng. 2000, 89 (6): 534-538; Gen 1.996, Nov. 21, 180 (1-2): 145-150; Mol Biotechnol. 1997 junio, 7(3): 231-240; la publicación de la solicitud de patente japonesa de Kohyo No. (JP-A) H01-500483 (publicación en fase nacional japonesa no examinada que corresponde a una publicación internacional no japonesa)).

Esto demostró que los vectores de expresión de la presente invención permiten niveles muy altos de expresión de proteína. A continuación, la transferencia tipo Western de hG-CSF en los sobrenadantes del cultivo se llevó a cabo para confirmar la expresión de proteínas.

[Tabla 7]

| Línea celular pDC6/hIG-CSF No. | Nivel de producción de G-CSF | | |
|--------------------------------|------------------------------|--------------|---------------|
| | µg/mL/3 días | µg/mL/7 días | µg/mL/14 días |
| 3 | 0.6 ± 0.6 | 51.9 ± 1.3 | 68.5 ± 1.7 |
| 6 | 35.7 ± 1.5 | 149.7 ± 0.5 | 180.7 ± 1.6 |
| 7 | 10.5 ± 0.2 | 33.2 ± 0.2 | 27.2 ± 0.3 |
| 13 | 42.6 ± 0.5 | 105.6 ± 0.5 | 96.9 ± 1.4 |
| 14 | 31.2 ± 0.1 | 150.2 ± 0.5 | 188.4 ± 3.1 |
| 15 | 11.5 ± 0.1 | 49.4 ± 0.3 | 49.7 ± 0.6 |
| 16 | 34.7 ± 1.1 | 193.6 ± 0.6 | 235.5 ± 14.8 |
| 17 | 32.7 ± 1.4 | 177.0 ± 0.6 | 231.3 ± 4.4 |
| 19 | 5.8 ± 0.1 | 42.1 ± 1.4 | 70.7 ± 0.5 |
| 20 | 3.1 ± 0.1 | 40.0 ± 0.3 | 65.6 ± 0.7 |

10

[Ejemplo 20] Transferencia tipo Western de sobrenadantes de cultivo de células transfectadas con pDC6/hG-CSF

Se analizaron sobrenadantes de cultivo de 3 días, 7 días y 14 días de cinco muestras con el más alto nivel de producción de G-CSF humano obtenido en el Ejemplo 19 anteriormente descrito por transferencias tipo Western. Se mezclaron 10 µl de cada uno de los sobrenadantes de cultivo con 10 µL de regulador de muestras de Laemmli (BIO-RAD) que contenía 2-mercaptoethanol al 5% (Wako) para la reducción por calentamiento a 98°C durante cinco minutos (Termociclador de PCR TaKaRa PERSONAL, TaKaRa Biomedicals). Además, se mezcló una preparación estándar de 10 µg/10 µL de G-CSF humana recombinante (Recombinant Human G-CSF, Cat 1001 C, Apollo) con 10 µL de regulador de muestras de Laemmli (BIO-RAD) que contenía 2-mercaptoethanol al 5% (Wako) para reducción por calentamiento a 98°C durante cinco minutos (Termociclador de PCR TaKaRa PERSONAL, TaKaRa Biomedicals). Se colocaron un regulador de electroforesis (Tris/Glicina/SDS, BIO-RAD) y Super SEP^{MR} 10% a 20% 17 pozos (Wako) en un recipiente de electroforesis (DPE-1020, DAIICHI Pure Chemicals CO., LTD), y se aplicaron 20 µL de las soluciones de muestra tratadas térmicamente y una preparación estándar a la Super^{MR} 10% a 20% 17 pozos (Wako), y se llevó a cabo la electroforesis a 40 mA durante 55 minutos (se utilizó una fuente de alimentación: My Run, COSMO BIO CO., LTD). A continuación, se removió el gel de las placas de vidrio, y se remojó en un regulador de transferencia (regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)) mientras se agitaba (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries) durante cinco minutos. Se activó una membrana de transferencia Immobilon-P (Millipore) por remojo secuencial en 8 mL de metanol (Wako) durante 15 segundos, 8 mL de agua MilliQ (Millipore) durante dos minutos, y 8 mL de regulador de transferencia (regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)) durante cinco minutos mientras se agitaba (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries). En un aparato de transferencia (TRANS-BLO, SD SEMI-DRY TRANSFER CELL, BIO-RAD), se colocaron papeles de filtro (papel de transferencia tamaño extra grueso Criterion^{MR}, BIO-RAD) remojados con regulador de transferencia (regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)), se colocaron la membrana de transferencia activada Immobilon-P (Millipore), se remojó el gel después de la electroforesis en regulador de transferencia (regulador Tris/Glicina (BIO-RAD)

30

que contenía 30% de metanol (Wako)), y papeles de filtro (papel de transferencia tamaño extra grueso Criterion^{MR}, BIO-RAD) remojados con regulador de transferencia (regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)) en orden desde el lado negativo, se colocó una cubierta, y se llevó a cabo la electroforesis a 80 mA (PowerPac HC^{MR}, BIO-RAD) durante una hora y media para transferir las proteínas separadas sobre la membrana de transferencia Immobilon-P (Millipore). Después de la transferencia, se remojó la membrana de transferencia Immobilon-P (Millipore) en 8 mL de ImmunoBlock (marca registrada, la división de Productos de Laboratorio de Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) y se bloqueó a 4°C durante 18 horas, y se hicieron reaccionar 10 mL de un anticuerpo monoclonal de ratón G-CSF anti-humano (anticuerpo monoclonal G-CSF anti-humano, Cat. MAB214, R & D) diluido 2000 veces con D-PBS (Wako) que contenía Tween 20 al 0,005% (sorbitán monolaurato de polioxietileno (20), Wako) con las proteínas en la membrana durante una hora a temperatura ambiente con agitación (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries). Después de remover los anticuerpos no enlazados, se añadieron 10 mL de un anticuerpo IgG antirratón marcado con peroxidasa (IgG de cabra antirratón (H + L), Cat 115-036-062, Jackson) diluido 5000 veces con D-PBS (Wako) que contenía Tween 20 al 0,05% (sorbitán monolaurato de polioxietileno (20), Wako) y esto reaccionó durante una hora a temperatura ambiente mientras se agitaba (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries). Después de remover los anticuerpos no enlazados, se añadieron 2 ml de sustrato HRP quimioluminiscente Immobilon^{MR} Western (Millipore) para quimioluminiscencia, y se tomaron fotografías de 30 segundos usando un sistema de cámara CCD enfriado ATTO de captura de luz (ATTO) en su configuración normal. La imagen obtenida por las transferencias tipo Western se muestra en la Fig. 19. Se detectaron bandas similares a aquellas de la preparación estándar.

[Ejemplo 21] Construcción de pDC6/hGM-CSF

Usando métodos bien conocidos por aquellos capacitados en la técnica, se sustituyeron los nucleótidos No. 1267 a No. 1275 en el vector de la presente invención, pDC6, con un ADNc que codifica el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humanos (GM-CSF) de la SEQ ID NO: 10 (denominado en lo sucesivo hGM-CSF) para construir pDC6/hGM-CSF (Fig. 20).

[Ejemplo 22] Transfección de pDC6/hGM-CSF en células CHO, y selección en un medio libre de HT usando un medio CD o un medio CD complementado con aditivos de base no animal

Se transfectaron 2,5 µg de pDC6/hGM-CSF en 4.000.000 de células CHO (células CHO DG44) en frascos de cultivo de 25 cm² utilizando el método de Lipofectina (utilizando Lipofectamine^{MR} LTX; Invitrogen). La transfección se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 48 horas después de la transfección del gen, se contó el número de células, y luego se diluyeron las células en un IS CD-CHO con medio hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen). Las células se sembraron en cinco placas de microtitulación de 96 pozos hasta una concentración de 4.000 células/pozo (480 pozos), y después de cultivar en presencia de gas dióxido de carbono al 5% a 37°C durante aproximadamente tres semanas, se observaron células viables (líneas de células que crecen en medio libre de HT).

A partir de las células viables, se seleccionaron arbitrariamente 48 líneas de células que crecen en medio libre de HT, y la expresión fue confirmada por transferencia de manchas. Se aplicaron 2 µl cada una de una serie de diluciones de dos veces (100 a 0,16 ng/mL) de una preparación estándar de GM-CSF recombinante humano (Recombinant Human GM-CSF, Cat No. 071-04111, Wako) y se aplicaron los sobrenadantes de cultivo de las 48 líneas seleccionadas arbitrariamente a una membrana (Nytran N, ítem No. 10416196, Schleicher & Schuell), y después de la incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se bloqueó con Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Además, se añadió 1 µg/ml de un anticuerpo policlonal de cabra GM-CSF anti-humano (anticuerpo neutralizante GMCSF anti-humano, Cat. AB-215-NA, sistemas R & D) diluido con PBST (D-PBS, Tween 20 al 0,05%) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 0,2 µg/ml de un anticuerpo IgG anti-cabra marcado con peroxidasa (IgG [Conejo] anti-cabra purificada por afinidad conjugada con peroxidasa) diluido con PBST (D-PBS, Tween 20 al 0,05%) y se agitó durante 30 minutos. Se hizo reaccionar sustrato HRP quimioluminiscente Immobilon^{MR} Western a temperatura ambiente durante cinco minutos y se añadió. Se incubó a temperatura ambiente durante cinco minutos, y se capturó la quimioluminiscencia utilizando un detector (ATTO de captura de luz, AE-6981FC, ATTO). La imagen obtenida por transferencia de manchas se muestra en la Fig. 21.

Las líneas para la que se observó luminiscencia en transferencias de manchas se transfirieron a placas de 24 pozos junto con IS CHO-CD con medio hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen), y se cultivaron hasta que las células ocuparon 1/3 o más de cada pozo. Las líneas para la que se observó un mayor crecimiento fueron transferidas a placas de 6 pozos junto con IS CHO-CD con medio hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen), y se cultivaron hasta que las células ocuparon 1/3 o más de cada pozo. Las líneas para las que se observó un mayor crecimiento fueron transferidos a matraces T75 (BD), junto con IS CHO-CD con medio hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen), y se cultivaron hasta que las células alcanzaron 1,0 x 10⁶ células/mL o más en cada pozo.

Se colocaron 15 mL de cada línea en un tubo de 15 mL y se centrifugaron a 1100 rpm durante siete minutos. Se desechó el sobrenadante, y se suspendieron las células en 15 mL de medio fresco (IS CHO-CD con medio hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen)). Después de contar el número de células, se diluyeron

las células con el medio hasta 5×10^5 células/mL, a continuación, se transfirieron 7,5 ml a matraces T75 nuevos, y se cultivaron las células en presencia de gas dióxido de carbono al 5% a 37°C durante 14 días. El día 3, el día 7 y el día 14 del cultivo, se recolectó 1 mL de cada solución de cultivo, se centrifugó a 9300 x g durante dos minutos, y se recogió el sobrenadante. Se determinó el nivel de producción.

5 **[Ejemplo 23]** Medición del nivel de hGM-CSF producido por las líneas celulares transfectadas pDC6/hGM-CSF

Se determinó el nivel de producción por ELISA. Se recubrieron placas de 96 pozos (placa F96 MAXI SORP Nunc-Inmuno, Cat. no. 442404, Nunc) a 4°C durante 16 horas con 0,5 µg/ml de un anticuerpo GM-CSF anti-humano (MAB de captura de anti-hGM-CSF de ratón, Cat No. 404CE14G12, Invitrogen) diluido con un regulador de recubrimiento (15 mM, Na₂CO₃, NaHCO₃ 35 mM, NaN₃ al 0,05%, pH 9.6). Después de bloquear con una solución de bloqueo (Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) se mezclaron en una relación 1:3 con D-PBS (regulador de fosfato de Dulbecco, Sigma Aldrich)), se aplicaron 100 µL de cada uno de los sobrenadantes de cultivo de 72 horas (dilución 1/1000 a 1/25000), serie de dilución dos veces (10 a 0,15625 ng/mL) de GM-CSF humana recombinante (Recombinant Human GM-CSF expresado en células humanas, Cat No. HZ-1001, HumanZyme Inc.) en diluyente de antígeno anticuerpo (Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) mezclados en una relación 1:9 con D-PBS (regulador de fosfato de Dulbecco, Sigma Aldrich)), y se aplicaron el diluyente de antígeno anticuerpo (Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) mezclados en una relación 1:9 con D-PBS (regulador de fosfato de Dulbecco, Sigma Aldrich)), y se realizó la incubación a 25°C durante una hora. Se incubó adicionalmente con 0,25 µg/mL de un anticuerpo GM-CSF humano biotinilado (conjugado de biotina anti-hGM-CSF de ratón, Cat No. 404CE10A8, Invitrogen) a 25°C durante una hora. Se aplicó un kit de coloración ABC ultrasensible estándar (2 gotas de reactivo A, 2 gotas de reactivo B / 10 mL, Pro # 32050, Pierce) incubado a 25°C durante 30 minutos a 100 µL/pozo, y se llevó a cabo la reacción a 25°C durante 30 minutos. Se aplicó sustrato de peroxidasa Sure Blue TMB Microwell (KPL) a razón de 100 µL/pozo, y después de esto se hizo reaccionar a 25°C durante 30 minutos, se añadió ácido fosfórico 1 M a razón de 100 µL/pozo para detener la reacción. Se determinó la concentración de proteína utilizando un lector de microplacas (Modelo 680, fabricado por BioRad) y en el lector de microplacas, se midió la absorbancia a la longitud de onda de 450 nm con la longitud de onda de 655 nm como control. La Tabla 8 muestra las seis primeras muestras con alto nivel de producción de GM-CSF humano de acuerdo con los resultados obtenidos por ELISA. La línea que muestra el nivel más alto de producción produjo $33,1 \pm 0,8$ µg/ml en 3 días, $171,7 \pm 3,0$ µg/ml en 7 días, y $321,7 \pm 2,1$ µg/ml en 14 días. Este valor, que viene de una línea de células no clonada en etapa temprana, es decir, también en un estado que no ha sufrido amplificación génica, indica un nivel muy alto en comparación con los niveles de producción representativos de GM-CSF reportados en la literatura (Journal of Biotechnology 109 (2004) 179-191; Biotechnol. Prog. 2005, 21, 17-21; EUR. J. Biochem. 271, 907-919 (2004); J Biosci Bioeng. 2002, 94 (3): 271 a 274).

Esto probó que los vectores de expresión de la presente invención permiten niveles muy altos de expresión de la proteína. A continuación, se llevó a cabo la transferencia tipo Western de hGM-CSF en los sobrenadantes del cultivo para confirmar la expresión de proteínas.

35 [Tabla 8]

| Línea celular pDC6/hIGM-CSF No. | Nivel de producción de GM-CSF | | |
|---------------------------------|-------------------------------|--------------|---------------|
| | µg/mL/3 días | µg/mL/7 días | µg/mL/14 días |
| 3 | 24.1 ± 0.6 | 97.2 ± 1.4 | 248.0 ± 4.6 |
| 6 | 9.0 ± 0.2 | 27.0 ± 1.2 | 94.3 ± 0.8 |
| 11 | 15.7 ± 0.2 | 80.2 ± 1.6 | 151.9 ± 5.5 |
| 17 | 7.8 ± 0.1 | 48.6 ± 1.7 | 103.5 ± 2.1 |
| 36 | 33.1 ± 0.8 | 171.7 ± 3.0 | 321.7 ± 2.1 |
| 48 | 14.5 ± 0.9 | 82.8 ± 1.1 | 178.8 ± 3.5 |

40 **[Ejemplo 24]** Transferencia tipo Western de sobrenadantes de cultivo de células transfectadas pDC6/hGM-CSF

Se analizaron sobrenadantes de cultivo de 3 días, 7 días y 14 días de seis muestras con el más alto nivel de producción de GM-CSF humano obtenido en el Ejemplo 23 descrito anteriormente mediante transferencias tipo Western. Se mezclaron 10 µL de cada uno de los sobrenadantes de cultivo con 10 µL de regulador de muestras de Laemmli (BIO-

RAD) que contenía 2-mercaptoethanol al 5% (Wako) para reducción por calentamiento a 98°C durante cinco minutos (Termociclador de PCR TaKaRa PERSONAL, TaKaRa Biomedicals). Por otra parte, se mezcló una preparación estándar de 10 µg/10 µL de GM-CSF humano (Recombinant Human GM-CSF, expresado en células humanas, Cat No. HZ-1001, HumanZyme Inc.) con 10 µL de regulador de muestras de Laemmli (BIO-RAD) que contenía 2-mercaptoetanol al 5% (Wako) para reducción por calentamiento a 98°C durante cinco minutos (Termociclador de PCR TaKaRa PERSONAL, TaKaRa Biomedicals). Se colocaron un regulador de electroforesis (Tris/glicina/SDS, BIO-RAD) y se aplicaron Super SEP^{MR} 10% a 20% 17 pozos (Wako) en un recipiente de electroforesis (DPE-1020, DAIICHI Pure Chemicals CO., LTD), y se aplicaron 20 µL de las soluciones de muestra tratadas térmicamente y la preparación estándar a la Super^{MR} 10% a 20% 17 pozos (Wako), y se llevó a cabo la electroforesis a 40 mA durante 55 minutos (se utilizó una fuente de alimentación: My Run, COSMO BIO CO., LTD). A continuación, se removió el gel de las placas de vidrio, y se remojó en un regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)) mientras se agitaba (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries) durante cinco minutos. Se activó la membrana de transferencia Immobilon-P (Millipore) por remojo secuencial en 8 mL de metanol (Wako) durante 15 segundos, 8 mL de agua MilliQ (Millipore) durante dos minutos, y 8 mL de regulador de transferencia (regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)) durante cinco minutos mientras se agitaba (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries). En un aparato de transferencia (TRANS-BLO, SD SEMI-DRY TRANSFER CELL, BIO-RAD), se colocaron papeles de filtro (papel de transferencia tamaño extra grueso Criterion^{MR}, BIO-RAD) remojados con regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)), la membrana de transferencia activada Immobilon-P (Millipore), el gel después de electroforesis remojado en regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)), y papeles de filtro (papel de transferencia tamaño extra grueso Criterion^{MR}, BIO-RAD) remojado con regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)) en orden desde el lado negativo, se colocó una cubierta, y se llevó a cabo la electroforesis a 80 mA (PowerPac HC^{MR}, BIO-RAD) durante una hora y media para transferir las proteínas separadas sobre la membrana de transferencia Immobilon-P (Millipore). Después de la transferencia, se remojó la membrana de transferencia Immobilon-P (Millipore) se empapó en 8 mL de ImmunoBlock (marca registrada, división de Productos de Laboratorio de Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) y se bloqueó a 4°C durante 18 horas, y reaccionaron 10 mL de un anticuerpo GM-CSF anti-humano (anticuerpo neutralizante GM-CSF anti-humano, Cat No. AB-215-NA, sistemas R&D) diluidos 2000 veces con D-PBS (Wako) que contenía Tween 20 al 0,05% (sorbitán monolaurato de polioxietileno (20), Wako) con las proteínas sobre la membrana durante una hora a temperatura ambiente mientras se agitaba (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries). Después de retirar los anticuerpos no enlazados, se añadieron 10 ml de un anticuerpo IgG anticabra de conejo marcado con peroxidasa (IgG anti-cabra purificada por afinidad conjugado con peroxidasa, Cat No. 605-4302, Rock Land) diluido 5000 veces con D-PBS (Wako) que contenía Tween 20 al 0,05% (sorbitán monolaurato de polioxietileno (20), Wako) y reaccionó durante una hora a temperatura ambiente mientras se agitaba (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries). Después de remover los anticuerpos no enlazados, se añadieron 2 ml de sustrato HRP quimioluminiscente Immobilon^{MR} Western (Millipore) para quimioluminiscencia, y se tomaron fotografías de 5 segundos utilizando un sistema de cámara CCD enfriado ATTO de captura de luz (ATTO) con su configuración normal. La imagen obtenida por transferencias tipo Western se muestran en la Fig. 22. Se observaron bandas similares a aquellas de la preparación estándar, y se sugirió que las intensidades de las bandas eran más oscuras en proporción al número de días del cultivo.

40 **[Ejemplo 25]** Construcción de pDC6/hIFN α

Utilizando métodos bien conocidos por aquellos capacitados en el arte, se sustituyeron los nucleótidos No. 1267 a 1275 en el vector de la presente invención, pDC6, con un ADNc que codifica el interferón α 2b humano (hIFN α) de la SEQ ID NO: 11 (de aquí en adelante denominado como hIFN α) para construir pDC6/hIFN α (Fig. 23).

45 **[Ejemplo 26]** Transfección de pDC6/hIFN α en células CHO, y selección en un medio libre de HT usando un medio CD o un medio CD complementado con aditivos de base no animal

Se transfectaron 2,5 µg de pDC6/hIFN α en 4.000.000 de células CHO (células CHO DG44) en frascos de cultivo de 25 cm² utilizando el método de Lipofectina (utilizando Lipofectamine^{MR} LTX; Invitrogen). La transfección se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 48 horas después de la transfección del gen, se contó el número de células, y luego se diluyeron las células en IS CHO-CD con medio hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen). Las células se sembraron en cinco placas de microtitulación de 96 pozos a una concentración de 4.000 células/pozo (480 pozos), y después de cultivar en presencia de gas dióxido de carbono al 5% a 37°C durante aproximadamente tres semanas, se observaron células viables (líneas de células que crecieron en medio libre de HT).

A partir de las células viables, se seleccionaron arbitrariamente 66 líneas celulares que crecieron en medio libre HT, y se confirmó la expresión por transferencia de manchas. Se aplicaron 2µL de cada una de una de las series de dilución dos veces (10 a 0.16 ng/mL) de una preparación estándar de IFN α 2b recombinante humano (IFN α 2b (hBA-165), Cat. Sc-4624, Santa Cruz Biotechnology) y expresión de IFN α 2B en células humanas, Cat HZ-1072, Human Zyme, y IFN- α 2b, Cat 5002C, Apolo) y se aplicaron los sobrenadantes de cultivo de las 66 líneas seleccionadas arbitrariamente a una membrana (Nytran N, ítem NO.10416196, Schleicher & Schuell), y después de incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se bloqueó con Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) a temperatura ambiente

5 durante 30 minutos. Además, se añadió 1 µg/mL de un anticuerpo policlonal de conejo IFN α antihumano ((anticuerpo policlonal de conejo contra interferón alfa humano (PBL, Cat 31130 a 1) diluido con PBST (D-PBS, Tween 20 al 0,05%) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 0,2 µg/mL de un anticuerpo IgG anti conejo marcado con peroxidasa (IgG anti-conejo purificado por afinidad conjugado con peroxidasa F8C, Cat. 611-1303, Rock Land) diluido con PBST (D-PBS, Tween 20 al 0,05%) y se agitó durante 30 minutos. El sustrato HRP quimioluminiscente Immobilon^{MR} Western (2 mL de reactivo Luminol, 2 mL de solución de peróxido, Millipore, Cat.WBKLS0050, Millipore) reaccionó a temperatura ambiente durante cinco minutos y se añadió. Se incubó a temperatura ambiente durante cinco minutos, y se capturó la quimioluminiscencia utilizando un detector (ATTO de captura de luz, AE-6981FC, ATTO). La imagen obtenida por transferencia de manchas se muestra en la Fig. 24.

10 Se transfirieron las líneas para las que se observó luminiscencia en transferencia de manchas a placas de 24 pozos junto con IS CHO-CD con medio hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen), y se cultivó hasta que las células ocuparon 1/3 o más de cada pozo. Se transfirieron las líneas para la cuales se observó un crecimiento adicional a placas de 6 pozos junto con IS CHO-CD con medio hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen), y se cultivó hasta que las células ocuparon 1/ o más de cada pozo. Se transfirieron las líneas para la que se observó crecimiento adicional a matraces T75 (BD), junto con IS CHO-CD con medio hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen), y se cultivó hasta que las células alcanzaron 1,0 x 10⁶ células/mL o más en cada pozo.

20 Se colocaron 15 ml de cada línea en un tubo de 15 mL y se centrifugó a 1100 rpm durante siete minutos. Se desechó el sobrenadante, y las células se suspendieron en 15 mL de medio fresco (IS CHO-CD con medio hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen)). Después de contar el número de células, las células se diluyeron con el medio hasta 5x10⁵ células/mL, a continuación, se transfirieron 7,5 ml a matraces T75 nuevos, y se cultivaron células en presencia de gas dióxido de carbono al 5% a 37°C durante 14 días. El día 3, día 7, y día 14 del cultivo, se recolectó 1 ml de cada solución de cultivo, se centrifugó a 9300 x g durante dos minutos, y se recogió el sobrenadante. Se determinó el nivel de producción.

25 **[Ejemplo 27]** Medición del nivel de hIFN α producido por las líneas celulares transfectadas con pDC6/hIFN α

30 Se determinó el nivel de producción por ELISA. Se recubrieron placas de 96 pozos (placa F96 MAXI SORP Nunc-Inmuno, Cat. no. 442404, Nunc) a 4°C durante 16 horas con 0,5 µg/mL de un anticuerpo IFN α anti humano (anticuerpo monoclonal para interferón- α humano, Pro. 3423-3, MABTECH) diluido con un regulador de recubrimiento (15 mM, Na₂CO₃, NaHCO₃ 35 mM, NaN₃ al 0,05%, pH 9,6). Después de bloquear con una solución de bloqueo (Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) mezclada en una relación 1:3 con D-PBS (regulador de fosfato de Dulbecco, Sigma Aldrich)), se aplicaron 100 µL de cada uno de los sobrenadantes de cultivo de 72 horas (dilución 1/40.000 a 1/640.000), serie de dilución de dos veces (80 a 1,25 IU/mL) de interferón α -2b recombinante (Intrón A para inyección 1000, Schering Plough) en un diluyente de antígeno anticuerpo (Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) mezclado en una relación 1:9 con D-PBS (regulador de fosfato de Dulbecco, Sigma Aldrich)), y diluyente de antígeno anticuerpo (Block Ace al 4% (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) mezclado en una proporción de 1:9 con D-PBS (regulador de fosfato de Dulbecco, Sigma Aldrich)), y se llevó a cabo la incubación a 25°C durante una hora. Esto se incubó adicionalmente con 0,5 µg/mL de anticuerpo monoclonal IFN α humano biotinilado (anticuerpo monoclonal para conjugado biotina interferón- α humano, Pro. 3423-6, MABTECH) a 25°C durante una hora. Se aplicó un Kit de coloración ABC Ultra-Sensible estándar (reactivo A 2 gotas, Reactivo B 2 gotas /10 mL, Pro # 32050, Pierce) incubado a 25 °C durante 30 minutos a razón de 100 µL/pozo, y se llevo a cabo la reacción a 25°C durante 30 minutos. Se aplicó sustrato peroxidasa Sure Blue TMB Microwell (KPL) a razón de 100 µL/pozo, y después reaccionó a 25°C durante 30 minutos, se añadió ácido fosfórico 1 M a razón de 100 µL/pozo para detener la reacción. Se determinó la concentración de proteína utilizando un lector de microplacas (modelo 680, fabricado por BioRad) y sobre el lector de microplacas, se midió la absorbancia a la longitud de onda de 450 nm con la longitud de onda de 655 nm como control. La Tabla 9 muestra las tres primeras muestras con alto nivel de producción de IFN α humano de acuerdo con los resultados obtenidos por ELISA. La línea que muestra el nivel más alto de producción produjo (56,3 \pm 5,0) x 10⁴ IU/mL en 3 días, (219,3 \pm 11,1) x 10⁴ IU/mL en 7 días, y (436,5 \pm 17,1) x 10⁴ IU/mL en 14 días. Este valor que proviene de una línea celular de etapa temprana no clonada, es decir, también en un estado que no ha sufrido amplificación génica, indicó un nivel muy alto comparado con los niveles de producción representativos de IFN α reportados en la literatura (J Gen Virol. 1985 Abr; 66 (Pt 4): 685-691; Nucleic Acids Res.1983 febrero 11; 11 (3): 555-573; Phil. Trans. R. Soc. Lond. B299, 7-28 (1982); JP-A (Kohyo) 1003-530070).

55 Esto probó que los vectores de expresión de la presente invención permiten niveles muy altos de expresión de proteína. A continuación, se llevó a cabo una transferencia tipo Western de hIFN α en sobrenadantes de cultivo para confirmar la expresión de proteínas.

[Tabla 9]

| Línea celular pDC6/hIFN α 2b No. | Nivel de producción de IFN α 2b | Nivel de producción de IFN α 2b | Nivel de producción de IFN α 2b |
|---|--|--|--|
| | x10 ⁴ IU/mL/3días | x10 ⁴ IU/mL/7días | x10 ⁴ IU/mL/14días |
| 3rd-8 | 31.4 \pm 1.2 | 127.9 \pm 8.2 | 371.4 \pm 10.3 |
| 3rd-14 | 16.7 \pm 1.2 | 94.6 \pm 0.9 | 252.8 \pm 5.1 |
| 2nd-12 | 56.3 \pm 5.0 | 219.3 \pm 11.1 | 436.5 \pm 17.1 |

[Ejemplo 28] Transferencia tipo Western de sobrenadantes de cultivo de las células transfectadas con pDC6/ hIFN α

5 Se analizaron sobrenadantes de cultivo de 3 días, 7 días y 14 días de diez muestras con el más alto nivel de producción de hIFN α humano obtenido en el Ejemplo 27 descrito anteriormente por transferencia tipo Western. Se mezclaron 10 μ L cada uno de los sobrenadantes de cultivo con 10 μ L de regulador de muestras de Laemmli (BIO-RAD) que contenía 2-mercaptoethanol al 5% (Wako) para reducción por calentamiento a 98°C durante cinco minutos (Termociclador de PCR TaKaRa PERSONAL, TaKaRa Biomedicals). Además, se mezclaron una preparación estándar de 10 μ g/10 μ L IFN α humano (expresión de IFN α 2B en células humanas, Cat HZ-1072, human Zyme, IFN- α 2b) y una preparación estándar de 200 IU/mL/10 μ L de IFN α humano (solución patrón de IFN alfabeto iLite^{MR} (200 IU/mL), biomonitor) con 10 μ L de regulador de muestras de Laemmli (BIO-RAD) que contenía 2-mercaptoetanol al 5% (Wako) para reducción por calentamiento a 98°C durante cinco minutos (Termociclador de PCR TaKaRa PERSONAL, TaKaRa Biomedicals). Un regulador de electroforesis (Tris/glicina/SDS, BIO-RAD) y Super SEP^{MR} 10% a 20% 17 pozos (Wako) se colocaron en un recipiente de electroforesis (DPE-1020, DAIICHI Pure Chemicals CO., LTD), y se aplicaron 20 μ L de las soluciones de muestra tratada térmicamente y de preparación del estándar con el Super^{MR} 10% a 20% 17 pozos (Wako), y se llevó a cabo una electroforesis a 40 mA durante 55 minutos (se utilizó una fuente de poder: My Run, COSMO BIO CO., LTD). A continuación, se removió el gel de las placas de vidrio, y se remojó en un regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)) mientras se agitaba (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries) durante cinco minutos. Se activó la membrana de transferencia Immobilon-P (Millipore) mediante remojo secuencial en 8 mL de metanol (Wako) durante 15 segundos, 8 mL de agua MilliQ (Millipore) durante dos minutos, y 8 mL de regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)) durante cinco minutos mientras se agitaba (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries). Se colocaron en un aparato de transferencia (TRANS-BLO, SD SEMI-DRY TRANSFER CELL, BIO-RAD), papeles de filtro (papel de transferencia tamaño extra grueso Criterion^{MR}, BIO-RAD) remojado con regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)), membrana de transferencia activada de Immobilon-P (Millipore), el gel después de electroforesis remojado en regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)), y papeles de filtro (papel de transferencia de tamaño extra grueso Criterion^{MR}, BIO-RAD) remojados con regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)) en orden desde el lado negativo, se colocó una cubierta, y se llevó a cabo una electroforesis a 80 mA (PowerPac HC^{MR}, BIO-RAD) durante una y media horas para transferir las proteínas separadas sobre la membrana de transferencia Immobilon-P (Millipore). Después de la transferencia, se remojó la membrana de transferencia Immobilon-P (Millipore) en 8 mL de ImmunoBlock (marca registrada, división de Productos de Laboratorio de Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) y se bloqueó a 4°C durante 18 horas, y se hicieron reaccionar 10 mL de un anticuerpo policlonal de conejo contra interferón alfa humano (Cat No. 31130-1, PBL) diluido 2000 veces con D-PBS (Wako) que contenía Tween 20 al 0,05% (sorbitán monolaurato de polioxietileno (20), Wako) con las proteínas sobre la membrana durante una hora a temperatura ambiente con agitación (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries). Después de remover los anticuerpos no enlazados, se añadieron 10 mL de IgG anticonejo purificado por afinidad conjugado con peroxidasa F(c) (Cabra) (Rock Land) diluido 5000 veces con D-PBS (Wako) que contenía Tween 20 al 0,05% (sorbitán monolaurato de polioxietileno (20), Wako) y esto se hizo reaccionar durante una hora a temperatura ambiente con agitación (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries). Después de remover los anticuerpos no enlazados, se añadieron 2 mL de sustrato HRP quimioluminiscente Immobilon^{MR} Western (Millipore) para quimioluminiscencia, y se tomaron fotografías de 3 segundos usando un sistema de cámara CCD enfriado ATTO de captura de luz (ATTO) con su configuración normal. La imagen obtenida por transferencias tipo Western se muestra en la Fig. 25. Se detectaron bandas similares a aquellas de la preparación estándar.

45

[Ejemplo 29] Construcción de pDC6/hOPN

Utilizando métodos bien conocidos por aquellos capacitados en arte, se sustituyeron los nucleótidos No. 1267 hasta No. 1275 en el vector de la presente invención, pDC6, con un ADNc que codifica la osteopontina humana (OPN) de la SEQ ID NO: 12 (en lo sucesivo denominado como hOPN) para construir pDC6/hOPN (Fig. 26).

[Ejemplo 30] Transfección de pDC6/hOPN en células CHO, y selección en un medio libre de HT utilizando un medio de CD o un medio CD complementado con aditivos de base no animal

Se transfectaron 2,5 µg de pDC6/hOPN en 4.000.000 de células CHO (células CHO DG44) en frascos de cultivo de 25 cm² utilizando el método Lipofectina (utilizando Lipofectamine^{MR} LTX; Invitrogen). Se realizó la transfección de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 48 horas después de la transfección del gen, se contó el número de células, y luego se diluyeron las células en un IS CHO-CD con medio hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen). Las células se sembraron en cinco placas de microtitulación de 96 pozos a una concentración de 4.000 células/pozo (480 pozos), y después de cultivar en presencia de gas dióxido de carbono al 5% a 37°C durante aproximadamente tres semanas, se observaron células viables (líneas de células que crecen en medio libre de HT).

Se verificó la expresión mediante transferencia tipo Western para todas las células para las cuales se observó crecimiento. Se transfirieron las líneas para las cuales se observó luminiscencia en transferencias tipo Western para placas de 24 pozos junto con IS CHO-CD con medio hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen), y se cultivaron hasta que las células ocuparon 1/ o más de cada pozo. Las líneas para las cuales se observó crecimiento adicional fueron transferidas a placas de 6 pozos junto con IS CHO CD con medio hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen), y se cultivaron hasta que las células ocuparon 1/3 o más de cada pozo. Las líneas para las cuales se observó crecimiento adicional fueron transferidas a matraces T75 (BD), junto con IS CHO CD con medio hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen), y se cultivaron hasta que las células alcanzaron 1.0 x 10⁶ células/mL o más en cada pozo.

Se colocaron 15 mL de cada línea se colocaron en un tubo de 15 mL y se centrifugó a 1100 rpm durante siete minutos. Se desechó el sobrenadante, y las células se suspendieron en 15 mL de medio fresco (es CHO CD con medio hidrolizado (IS Japón) complementado con Gluta MAX^{MR}-I 4 mM (Invitrogen)). Después de contar el número de células, las células se diluyeron con el medio hasta 5x10⁵ células/mL, a continuación, se transfirieron 7,5 mL de ellas a matraces T75 nuevos, y se cultivaron las células en presencia de dióxido de carbono al 5% gas a 37°C durante 14 días. El día 3, el día 7, y el día 14 del cultivo, se recolectó 1 ml de cada solución de cultivo, se centrifugó a 9300 x g durante dos minutos, y se recogió el sobrenadante. Se determinó el nivel de producción.

[Ejemplo 31] Medición del nivel de hOPN producido por las líneas celulares transfectadas con pDC6/hOPN

La determinación del nivel de producción se llevó a cabo usando un kit de ELISA (Kit de ensayo de osteopontina humana, Código 27158, IBL). Para las placas de anticuerpo (IgG de conejo de OPN antihumana (O-17) AP fase sólida), se aplicaron 100 µl de cada uno de los sobrenadantes de cultivo de 3 días, 7 días y 14 días (dilución 1/10 a 1/8000) y una serie de diluciones dos veces (5 a 320 ng/mL) de una preparación estándar de OPN humana recombinante en un regulador de dilución (PBS que contenía BSA al 1% y Tween-20 al 0,05%), y se llevó a cabo la incubación a 37°C durante una hora. Esto se incubó adicionalmente con un anticuerpo marcado (IgG de ratón MoAb Fab AP de OPN antihumana marcada con HRP(10A16)) a 4°C durante una hora. Se aplicó una solución de sustrato TMB a razón de 100 µL/pozo, y después de esto reaccionó a 25°C durante 30 minutos, se añadió una solución de detención (H₂SO₄ 1N) a razón de 100 µL/pozo para detener la reacción. Se determinó la concentración de proteína utilizando un lector de microplacas (modelo 680, fabricado por BioRad) y sobre el lector de microplacas, se midió la absorbancia a la longitud de onda de 450 nm con la longitud de onda de 655 nm como control. El carril 32 produjo 1,12 ± 0,07 µg/mL en 3 días, 7,40 ± 0,24 µg/mL en 7 días, y 13,75 ± 0,03 µg/mL en 14 días. A continuación, se llevó a cabo una transferencia tipo Western para hOPN en el sobrenadante del cultivo para confirmar la expresión de la proteína.

[Ejemplo 32] Transferencia tipo Western de sobrenadantes de cultivo de células transfectadas con pDC6/hOPN

Se analizaron los sobrenadantes de cultivo de 3 días, 7 días y 14 días del carril 32 obtenidos en el Ejemplo 31 descritos anteriormente mediante transferencias tipo Western. Se mezclaron 10 µL de cada uno de los sobrenadantes de cultivo con 10 µL de regulador de muestras de Laemmli (BIO-RAD) que contenía 2-mercaptoethanol al 5% (Wako) para la reducción mediante calentamiento a 98°C durante cinco minutos (Termociclador de PCR TaKaRa PERSONAL, TaKaRa Biomedicals). Se colocaron un regulador de electroforesis (Tris/glicina / SDS, BIO-RAD) y Super SEP^{MR} 10% a 20% 17 pozos (Wako) en un recipiente de electroforesis (DPE-1020, DAIICHI Pure Chemicals CO., LTD), y se aplicaron 20 µL de las soluciones de muestra tratada térmicamente y preparación estándar a la Super^{MR} 10% a 20% 17 pozos (Wako), y se llevó a cabo una electroforesis a cabo a 40 mA durante 55 minutos (se utilizó una fuente de poder: My Run, COSMO BIO CO., LTD). Después de eso, se removió el gel de las placas de vidrio, y se remojó en un regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)) mientras se agitaba (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries) durante cinco minutos. Se activó la membrana de transferencia Immobilon-P (Millipore) por remojo secuencial en 8 mL de metanol (Wako) durante 15 segundos, 8 mL de agua MilliQ (Millipore) durante dos minutos, y 8 mL de regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)) durante cinco minutos mientras se agitaba (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries). En un aparato de transferencia

(TRANS-BLO, SD SEMY-DRY TRANSFER CELL, BIO-RAD), se colocaron papeles de filtro (papel de transferencia tamaño extra grueso Criterion^{MR}, BIO-RAD) remojados con regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)), la membrana de transferencia activada Immobilon-P (Millipore), el gel después de la electroforesis remojado en regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contiene 30% de metanol (Wako)), y papeles de filtro (papel de transferencia de tamaño extra grueso Criterion^{MR}, BIO-RAD) remojados con regulador de transferencia (Regulador Tris/Glicina (BIO-RAD) que contenía 30% de metanol (Wako)) en orden desde el lado a negativo, se colocó una cubierta, y se llevó a cabo la electroforesis a 80 mA (PowerPac HC^{MR}, BIO-RAD) durante una hora y media para transferir las proteínas separadas sobre la membrana de transferencia Immobilon-P (Millipore). Después de la transferencia, se remojó la membrana de transferencia Immobilon-P (Millipore) en 8 mL de ImmunoBlock (marca registrada, división de Productos de Laboratorio de Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) y se bloqueó a 4^o C durante 18 horas, y se hicieron reaccionar 10 mL del anticuerpo monoclonal de ratón OPN anti-humana (IgG de ratón MoAb de osteopontina anti-humana (10A16), Cat 10011, IBL) diluido 2000 veces con D-PBS (Wako) que contenía Tween 20 al 0,05% (sorbitán monolaurato de polioxietileno (20), Wako) con las proteínas sobre la membrana durante una hora a temperatura ambiente con agitación (ROTO-SHAKE GENIE, Scientific Industries). Después de remover los anticuerpos no enlazados, se añadieron 10 mL de un anticuerpo IgG anti-ratón marcado con peroxidasa (IgG de cabra antirratón (H+L), Cat 115-036-062, Jackson) diluido 5000 veces con D-PBS (Wako) que contenía Tween 20 al 0,05% (sorbitán monolaurato de polioxietileno (20), Wako) y reaccionó durante una hora a temperatura ambiente mientras se agitaba (ROTO SHAKE GENIE-, Scientific Industries). Después de eliminar los anticuerpos no enlazados, se añadieron 2 mL de sustrato de HRP quimioluminiscente Immobilon^{MR} Western (Millipore) para quimioluminiscencia, y se tomaron fotografías de 30 segundos utilizando un sistema de cámara CCD enfriada ATTO de captura de luz (ATTO) con sus ajustes normales. La imagen obtenida por transferencia tipo Western se muestra en la Fig. 27.

Aplicabilidad Industrial

La presente invención puede proporcionar vectores de expresión que permiten la producción de alto nivel de proteínas derivadas de genes foráneos utilizando células de mamíferos deficientes en genes de dihidrofolato reductasa como huéspedes. Además, pueden producir proteínas que tienen modificaciones post-traducción inherentes a los mamíferos y alta actividad biológica. Por lo tanto, el coste de producción de sustancias proteicas útiles, tales como productos biofarmacéuticos puede ser significativamente reducidos.

Además, ya que los métodos para producción de proteínas de acuerdo con la presente invención no utilizan virus o microorganismos, es posible una producción de proteínas altamente segura.

30 Listado de secuencias

<110> FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD. NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY

<120> Vector de expresión para producción a gran escala de proteína derivada de genes foráneos usando células animales, y uso del mismo

35 <130> S67789PCEP

<140> EP 09834881.6

<141> 2009-12-22

<150> JP 2008-325690

<151> 2008-12-22

40 <160> 12

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 5848

<212> ADN

45 <213> Artificial

ES 2 552 325 T3

<220>

<223> Una secuencia de vector sintetizada artificialmente

<400> 1

| | |
|---|-----|
| cgatgtacgg gccagatata cgcgttgaca ttgattattg actagttatt aatagtaatc | 60 |
| aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcgttacat aacttacggt | 120 |
| aaatggcccc cctggctgac cgcccaacga cccccgccca ttgacgtcaa taatgacgta | 180 |
| tgttcccata gtaacgccaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg agtatttacg | 240 |
| gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga | 300 |
| cgtcaatgac ggtaaattggc ccgctggca ttatgccag tacatgacct tatgggactt | 360 |
| tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatggtga tgcggttttg | 420 |
| gcagtacatc aatgggctg gatagcggtt tgactcacgg ggatttccaa gtctccaccc | 480 |
| cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaaatcaa cgggactttc caaaatgtcg | 540 |
| taacaactcc gcccattga cgaaatggg cggtaggcgt gtacggtggg aggtctatat | 600 |
| aagcagagct ctctggctaa ctagagaacc cactgttaac tggcttatcg aaattgtcga | 660 |
| ggagaacttc agggtgagtt tggggaccct tgattgttct ttctttttcg ctattgtaaa | 720 |
| attcatgtta tatggagggg gcaaagtfff cagggtgttg tttagaatgg gaagatgtcc | 780 |
| cttgatcac catggaccct catgataatt ttgtttcttt cactttctac tctgttgaca | 840 |
| accattgtct cctcttattt tcttttcatt ttctgtaact ttttcgtaa actttagctt | 900 |
| 5 gcatttgtaa cgaattttta aattcacttt tgtttatttg tcagattgta agtactttct | 960 |

ES 2 552 325 T3

ctaatcactt ttttttcaag gcaatcaggg tatattatat tgtacttcag cacagtttta 1020
 gagaacaatt gttataatta aatgataagg tagaatatth ctgcatataa attctggctg 1080
 gcgtggaaat attcttattg gtagaaacaa ctacatcctg gtcacatcc tgcctttctc 1140
 tttatggtta caatgatata cactgtttga gatgaggata aaatactctg agtccaaacc 1200
 gggcccctct gctaaccatg ttcatgcctt cttctttttc ctacagctcc tgggcaacgt 1260
 gctggcggcc gccttctaga gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt 1320
 gccctcccc cgtgccttcc ttgaccctgg aagggtccac tcccactgtc ctttccctaat 1380
 aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg ggggggtgggg 1440
 tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggaggatc 1500
 tccgcggtgt ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt ccccaggctc cccagcaggc 1560
 agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca tagtcccgcc cctaactccg 1620
 cccatccgc ccctaactcc gcccagttcc gccattctc cgccccatgg ctgactaatt 1680
 ttttttattt atgcagaggc cgaggccgcc tcggcctctg agctattcca gaagtagtga 1740
 ggaggctttt ttggaggcct aggccttttgc aaaaaagctg cagatggttc gaccattgaa 1800
 ctgcatcgtc gccgtgtccc aaaatatggg gattggcaag aacggagacc taccctggcc 1860
 tccgctcagg aacgagttca agtacttcca aagaatgacc acaacctctt cagtgggaagg 1920
 taaacagaat ctggtgatta tgggtaggaa aacctggttc tccattcctg agaagaatcg 1980
 acctttaaag gacagaatta atatagttct cagtagagaa ctcaaagaac caccacgagg 2040
 agctcatttt cttgccaaaa gtttgatga tgccttaaga cttattgaac aaccggaatt 2100
 ggcaagtaaa gtagacatgg tttggatagt cggaggcagt tctgtttacc aggaagccat 2160
 gaatcaacca ggccacctca gactctttgt gacaaggatc atgcaggaat ttgaaagtga 2220
 cacgtttttc ccagaaattg atttggggaa atataaactt ctcccagaat acccaggcgt 2280
 cctctctgag gtccaggagg aaaaaggcat caagtataag tttgaagtct acgagaagaa 2340
 agactaaaga tccgtgacat aattggacaa actacctaca gagattttaa gctctaaggt 2400
 aaatataaaa tttttaagtg tataatgtgt taaactactg attctaattg tttgtgtatt 2460
 ttagattcca acctatggaa ctgatgaatg ggagcagtgg tggaatgcct ttaatgagga 2520
 aaacctgttt tgctcagaag aatgccatc tagtgatgat gaggctactg ctgactctca 2580
 acattctact cctccaaaaa agaagagaaa ggtagaagac cccaaggact ttccttcaga 2640
 attgctaagt tttttgagtc atgctgtgtt tagtaataga actcttgctt gctttgctat 2700
 ttacaccaca aaggaaaaag ctgcactgct atacaagaaa attatggaaa aatattctgt 2760

ES 2 552 325 T3

aacctttata agtaggcata acagttataa tcataacata ctgttttttc ttactccaca 2820
cagggcataga gtgtctgcta ttaataacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttagcttttt 2880
aatttgtaaa ggggttaata aggaatattt gatgtatagt gccttgacta gagatcataa 2940
tcagccatac cacatttgta gaggttttac ttgctttaa aaacctcca cacctcccc 3000
tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg ttgttgtaa cttgtttatt gcagcttata 3060
atggttacia ataaagcaat agcatcacia atttcacaaa taaagcattt ttttcaactgc 3120
attctagttg tggtttgtcc aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg gcccatcgat 3180
gaattcaacg tacgtagctt ggcaactggc gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac --3240
cctggcgta cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat 3300
agcgaagagg cccgcaccga tcgccttcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg 3360
cgcctgatgc ggtattttct cettacgat ctgtgcggta tttcacaccg catatggtgc 3420
actctcagta caatctgctc tgatgccga tagttaagcc agccccgaca cccgccaaca 3480
cccgtgacg cgcctgacg ggcttgtctg ctcccggcat ccgcttacag acaagctgtg 3540
accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg tttcaccgt catcaccgaa acgcgcgagg 3600
acgaaagggc ctctgatac gcctatTTTT ataggTTaat gtcataataa taatggTTTT 3660
ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga accctattt gtttattttt 3720
ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata 3780
atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgccctta ttcccttttt 3840
tgcggcattt tgccttctg tttttgctca ccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc 3900
tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggta catcgaactg gatctcaaca gcggtaagat 3960
ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagttctgct 4020
atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca 4080
ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcacc ttacggatgg 4140
catgacagta agagaattat gcagtgctgc cataaccatg agtgataaca ctgcgcccaa 4200
cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg 4260
ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg aatgaagcca tacciaacga 4320
cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg 4380
cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt 4440
tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg 4500
agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc 4560

ES 2 552 325 T3

ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca 4620
 gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc 4680
 atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat 4740
 cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc 4800
 agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg 4860
 ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct 4920
 accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct 4980
 tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct 5040
 cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg 5100
 gttggactca agacgatagt taccggataa ggccgagcgg tcgggctgaa cgggggggtc 5160
 gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga 5220
 gcattgagaa agcgcacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg 5280
 cagggtcgga acaggagagc gcacgagggg gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta 5340
 tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg 5400
 ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg 5460
 ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat 5520
 taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg ccgagccga acgaccgagc gcagcagtc 5580
 agtgagcgag gaagcggaag agcgccea at acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc 5640
 gattcattaa tgcagctggc acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcga 5700
 cgcaattaat gtgagttagc tactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc 5760
 ggctcgtatg ttgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga 5820
 ccatgattac gaatttcgta cgaagctt 5848

<210> 2

<211> 564

<212>ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de nucleótidos sintetizada artificialmente

ES 2 552 325 T3

<400> 2

| | |
|--|-----|
| atggtacgac cattaattg tattgtagca gtatcacaaa atatgggtat tggtaaaaat | 60 |
| ggtgatttac catggccacc attacgaaat gaattttaa attttcaacg aatgactact | 120 |
| acttcatcag tagaaggtaa acaaaattta gtaattatgg gtcgaaaaac ttggttttca | 180 |
| attccagaaa aaaatcgacc attaaaagat cgaattaata ttgtattatc acgagaatta | 240 |
| aaagaaccac cacgaggtgc acatttttta gcaaaatcat tagatgatgc attacgatta | 300 |
| attgaacaac cagaattatc atcaaaagta gatatgggtat ggattgtagg tggttcatca | 360 |
| gtatatcaag aagcaatgaa tcaaccaggt catttacgat tatttgtaac tcgaattatg | 420 |
| caagaatttg aatcagatac tttttttcca gaaattgatt taggtaaata taaattatta | 480 |
| ccagaatatac caggtgtatt atcagaagta caagaagaaa aaggattata atataaattt | 540 |
| gaagtatatg aaaaaaaga ttaa | 564 |

<210> 3

5 <211> 564

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de nucleótidos sintetizada artificialmente

10 <400> 3

| | |
|---|-----|
| atggtacgac cattaattg tattgtagca gtatcacaaa atatgggtat tggtaaaaat | 60 |
| ggtgatttac catggccacc attacgaaat gagttcaagt acttccaag aatgaccaca | 120 |
| acctcttcag tggaaggtaa acagaatctg gtgattatgg gtaggaaaac ctggttctcc | 180 |
| attcctgaga agaatcgacc tttaaaggac agaattaata tagttctcag tagagaactc | 240 |
| aaagaaccac cacgaggagc tcattttctt gccaaaagt tggatgatgc cttaagactt | 300 |
| attgaacaac cggaattggc aagtaaagta gacatggtt ggatagtcgg aggcagttct | 360 |
| gtttaccagg aagccatgaa tcaaccaggc cacctcagac tctttgtgac aaggatcatg | 420 |
| caggaatttg aaagtgacac gtttttcca gaaattgatt tggggaaata taaacttctc | 480 |
| ccagaatacc caggcgtcct ctctgaggtc caggaggaaa aaggcatcaa gtataagttt | 540 |
| gaagtctacg agaagaaga ctaa | 564 |

<210> 4

<211> 564

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Una secuencia de nucleótidos sintetizada artificialmente

<400> 4

| | |
|---|-----|
| atggtacgac cattaattg tattgtagca gtatcacaaa atatgggtat tggtaaaaat | 60 |
| ggtgatttac catggccacc attacgaaat gaattttaa attttcaacg aatgactact | 120 |
| acttcatcag tagaaggtaa acaaaattta gtaattatgg gtcgaaaaac ttggttttca | 180 |
| attcctgaga agaatcgacc tttaaaggac agaattaata tagttctcag tagagaactc | 240 |
| aaagaaccac cacgaggagc tcattttctt gccaaaagtt tggatgatgc cttaagactt | 300 |
| attgaacaac cggaattggc aagtaaagta gacatggttt ggatagtcgg aggcagttct | 360 |
| gtttaccagg aagccatgaa tcaaccaggc cacctcagac tctttgtgac aaggatcatg | 420 |
| caggaatttg aaagtgacac gtttttccca gaaattgatt tggggaaata taaacttctc | 480 |
| ccagaatacc caggcgtcct ctctgaggtc caggaggaaa aaggcatcaa gtataagttt | 540 |
| gaagtctacg agaagaaaga ctaa | 564 |

10

<210> 5

<211> 564

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15

<223> Una secuencia de nucleótidos sintetizada artificialmente

<400> 5

ES 2 552 325 T3

atggtacgac cattaattg tattgtagca gtatcacaaa atatgggtat tggtaaaaat 60
 ggtgatttac catggccacc attacgaaat gaatttaaat attttcaacg aatgactact 120
 acttcatcag tagaaggtaa acaaaattta gtaattatgg gtcgaaaaac ttggttttca 180
 attccagaaa aaaatcgacc attaaaagat cgaattaata ttgtattatc acgagaatta 240
 aaagaaccac cacgaggtgc acatttttta gccaaaagtt tggatgatgc cttaagactt 300
 attgaacaac cggaattggc aagtaaagta gacatggttt ggatagtcgg aggcagttct 360
 gtttaccagg aagccatgaa tcaaccaggc cacctcagac tctttgtgac aaggatcatg 420
 caggaatttg aaagtgacac gtttttccca gaaattgatt tggggaaata taaacttctc 480
 ccagaatacc caggcgtcct ctctgaggtc caggaggaaa aaggcatcaa gtataagttt 540
 gaagtctacg agaagaaga ctaa 564

<210> 6

<211> 759

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

ggccgccacc atgagcctgt tccccagcct gccctgctg ctgctgagca tgggtggccgc 60
 cagctacagc gagaccgtga cctgcgagga cgcccagaag acctgccccg ccgtgattgc 120
 ctgcagcagc cccggcatca acggcttccc cggcaaggac ggccgcgacg gcaccaaggg 180
 cgagaagggc gagcccggcc agggcctgcg cggcctgcag ggcccccccg gcaagctggg 240
 ccccccggc aaccocggcc ccagcggcag ccccgcccc aagggccaga agggcgaccc 300
 cggcaagagc cccgacggcg acagcagcct ggccgccagc gagcgcaagg ccctgcagac 360
 cgagatggcc cgcatacaaga agtggttgac cttcagcctg ggcaagcagg tgggcaacaa 420
 gttcttctctg accaacggcg agataatgac cttegagaag gtgaaggccc tgtgcgtgaa 480
 gttccaggcc agcgtggcca cccccgcaa cgccgccgag aacggcgcca ttcagaacct 540
 gatcaaggag gaggccttcc tgggcatcac cgacgagaag accgagggcc agttcgtgga 600
 cctgaccggc aaccgcctga cctacaccaa ctggaacgag ggcgagccca acaacgccgg 660
 cagcgacgag gactgcgtgc tgctgctgaa gaacggccag tggaaacgacg tgccctgcag 720
 caccagccac ctggccgtgt gcgagttccc catctgaat 759

ES 2 552 325 T3

<210> 7

<211> 594

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5

<400> 7

```

ggccgccacc atgggtgttc atgaatgtcc agcttggtta tggttattat tatctttatt      60
atctttacca ttaggtttac cagttttagg tgcccccccc cgctgatct gcgacagccg      120
cgtgctggag cgctacctgc tggaggccaa ggaggccgag aacatcacca ccggctgcgc      180
cgagcactgc agcctgaacg agaacatcac cgtgccccgac accaaggtga acttctacgc      240
ctggaagcgc atggaggtgg gccagcaggc cgtggaggtg tggcagggcc tggcctgct      300
gagcgaggcc gtgctgcgcg gccaggccct gctggtgaac agcagccagc cctgggagcc      360
cctgcagctg cacgtggaca aggccgtgag cggcctgcgc agcctgacca ccctgctgcg      420
cgccctgggc gcccagaagg aggccatcag cccccccgac gccgccagcg ccgccccct      480
gcgccaccatc accgccgaca ccttccgcaa gctgttccgc gtgtacagca acttctgcg      540
cggcaagctg aagctgtaca ccggcgaggc ctgccgcacc ggcgaccgct gaat          594

```

<210> 8

<211> 594

<212> ADN

10

<213> Homo sapiens

<400> 8

```

ggccgccacc atgggtgttc atgaatgtcc agcttggtta tggttattat tatctttatt      60
atctttacca ttaggtttac cagttttagg tgcccccccc cgctgatct gcgacagccg      120
cgtgctggag cgctacctgc tggaggccaa ggaggccgag aacatcacca ccggctgcaa      180
cgagacctgc agcctgaacg agaacatcac cgtgccccgac accaaggtga acttctacgc      240
ctggaagcgc atggaggtgg gccagcaggc cgtggaggtg tggcagggcc tggcctgct      300

```

ES 2 552 325 T3

gagcgaggcc gtgctgcgcg gccaggccct gctggtgaac agcagccagg tgaacgagac 360
 cctgcagctg cacgtggaca aggccgtgag cggcctgcbc agcctgacca ccctgctgcb 420
 cgccctgggc gcccagaagg aggccatcag cccccccgac gccgccagcb ccgccccct 480
 gcgcaccatc accgccgaca ccttccgcaa gctgttccgc gtgtacagca acttctgcb 540
 cggcaagctg aagctgtaca ccggcgaggc ctgccgcacc ggcgaccgct gaat 594

<210> 9

<211> 626

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 9

ggccgcacc atggctggtc cagctactca atctccaatg aaattaatgg ctttacaatt 60
 attattatgg cattctgctt tatggactgt tcaagaagct actcccctgg gccccgccag 120
 cagcctgccc cagagcttcc tgctgaagtg cctggagcag gtgcgcaaga tccagggcga 180
 cggcgccgcc ctgcaggaga agctgtgcbc cacctacaag ctgtgccacc cggaggagct 240
 ggtgctgctg ggccacagcc tgggcatccc ctgggcccc ctgagcagct gccccagcca 300
 ggccctgcag ctggccggct gcctgagcca gctgcacagc ggccctgttcc tgtaccaggg 360
 cctgctgcag gccctcgagg gcatcagccc cgagctgggc cccaccctgg acaccctgca 420
 gctggacgtg gccgacttcg ccaccaccat ctggcagcag atggaggagc tgggcatggc 480
 ccccgccctg cagcccaccc agggcgccat gcccgcttc gccagcgcct tccagcgcg 540
 cgccggcggc gtgctggtgg ccagccacct gcagagcttc ctggaggtga gctaccgct 600
 gctgcgccac ctggcccagc cctagt 626

<210> 10

<211> 446

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 10

ES 2 552 325 T3

ggccgcccacc atgtggttac aatctttatt attattaggt actgttgctt gttctatctc 60
 tgcccccgcc cgcagcccca gccccagcac ccagccctgg gagcacgtga acgcatcca 120
 ggaggcccgc cgcctgctga acctgagccg cgacaccgcc gccgagatga acgagaccgt 180
 ggagggtgatc agcgagatgt tcgacctgca ggagcccacc tgcctgcaga cccgcctgga 240
 gctgtacaag cagggcctgc gcggcagcct gaccaagctg aagggcccc tgacatgat 300
 ggccagccac tacaagcagc actgcccccc ccccccgag accagctgcg ccaccagac 360
 catcaccttc gagagcttca aggagaacct gaaggacttc ctgctgggtga tccccttga 420
 ctgctgggag cccgtgcagg agtagt 446

<210> 11

<211> 578

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 11

ggccgcccacc atggctttaa cttttgcttt attagttgct ttattagttt tatcttghaa 60
 atcttcttgt tctgttggtt gcgacctgcc ccagaccac agcctgggca gccgcccac 120
 cctgatgctg ctggcccaga tgcgccgat cagcctgttc agctgcctga aggaccgcca 180
 cgacttcggc ttccccagc aggagtccgg caaccagttc cagaaggccg agaccatccc 240
 cgtgctgcac gagatgatcc agcagatctt caacctgttc agcaccaagg acagcagcgc 300
 cgctgggac gagaccctgc tggacaagtt ctacaccgag ctgtaccagc agctgaacga 360
 cctggaggcc tgcgtgatcc agggcgtggg cgtgaccgag acccccctga tgaaggagga 420
 cagcatcctg gccgtgcga agtacttcca gcgcatcacc ctgtacctga aggagaagaa 480
 gtacagcccc tgcgcctggg aggtggtgcg cgccgagatc atgcgcagct tcagcctgag 540
 caccaacctg caggagagcc tgcgcagcaa ggagtagt 578

<210> 12

10 <211> 952

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 12

ES 2 552 325 T3

ggccgccacc atgagaatcg ctgttatctg tttttgttta ttaggtatca cttgtgctat 60
 ccccgtgaag caggccgaca gcggcagcag cgaggagaag cagctgtaca acaagtaccc 120
 cgacgccgtg gccacctggc tgaaccccga ccccagccag aagcagaacc tgctggcccc 180
 ccagaacgcc gtgagcagcg aggagaccaa cgacttcaag caggagaccc tgcccagcaa 240
 gagcaacgag agccacgacc acatggacga catggacgac gaggacgacg acgaccacgt 300
 ggacagccag gacagcatcg acagcaacga cagcagcagc gtggacgaca ccgacgacag 360
 ccaccagagc gacgagagcc accacagcga cgagagcagc gagctggtga ccgacttccc 420
 caccgacctg cccgccaccg aggtgttcac ccccgtggtg cccaccgtgg acacctacga 480
 cggccgcggc gacagcgtgg tgtacggcct gcgcagcaag agcaagaagt tccgccgccc 540
 cgacatccag taccgacg ccaccgacga ggacatcacc agccacatgg agagcgagga 600
 gctgaacggc gcctacaagg ccatccccgt ggcccaggac ctgaacgccc ccagcgactg 660
 ggacagccgc ggcaaggaca gctacgagac cagccagctg gacgaccaga gcgccgagac 720
 ccacagccac aagcagagcc gcctgtacaa gcgcaaggcc aacgacgaga gcaacgagca 780
 cagcagcgtg atcgacagcc aggagctgag caaggtgagc cgcgagttcc acagccacga 840
 gttccacagc cacgaggaca tgctggtggt ggaccccaag agcaaggagg aggacaagca 900
 cctgaagttc cgcacagcc acgagctgga cagcgcagc agcgaggtga ac 952

REIVINDICACIONES

1. Un vector de expresión para permitir la producción de alto nivel de una proteína derivada de gen foráneo en una célula huésped de mamífero, que comprende:
- 5 (a) un casete del gen de la dihidrofolato reductasa de traducción alterada (casete del gen DHFR de traducción alterada), cuya expresión se atenúa mediante la alteración de los codones con los codones menos frecuentemente utilizados en un mamífero, en donde los codones han sido alterados con ACG para alanina, CGA para arginina, AAU para asparagina, GAU para ácido aspártico, UGU para cisteína, CAA para glutamina, GAA para ácido glutámico, GGU para glicina, CAU para histidina, UUA para leucina, AAA para lisina, CCA para prolina, UUU para fenilalanina, UCA para serina, ACU para treonina, UAU para tirosina, y/o GUA para valina, y en donde una región de codón alterado en el casete del gen DHFR de traducción alterada es 30% o más de la longitud completa del casete del gen; y
- 10 (b) un casete de un gen que comprende un sitio de clonación para la integración de un gen foráneo entre un promotor altamente activo transcripcionalmente y una señal de poliadenilación altamente estable.
2. El vector de expresión de la reivindicación 1, en donde el casete del gen DHFR de traducción alterada de la reivindicación 1 (a) utiliza un promotor con baja actividad inductora de expresión como el promotor.
- 15 3. El vector de expresión de la reivindicación 2, en donde el promotor de baja actividad utilizado es un promotor derivado de un gen que es apenas expresado en una célula de mamífero o un promotor cuya porción reforzadora ha sido eliminada.
4. Un método para producir un transformante que tiene capacidad para producir un alto nivel de una proteína derivada de gen foráneo, que comprende las etapas de insertar un gen foráneo en el vector de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y la transformación de una célula huésped deficiente en el gen de la dihidrofolato reductasa con el vector de expresión.
- 20 5. Un método para producir una proteína derivada de gen foráneo, que comprende las etapas de:
- (a) insertar un gen foráneo en el vector de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;
- (b) transformar una célula huésped deficiente en el gen de la dihidrofolato reductasa con el vector de expresión;
- 25 (c) cultivar el transformante en un medio libre de hipoxantina-timidina; y
- (d) recolectar la proteína derivada del gen foráneo a partir del transformante cultivado;
6. El método de la reivindicación 5, en donde un medio químicamente definido (medio CD) o un medio CD complementado con un aditivo de base no animal se utiliza para el cultivo en la etapa (c) de la reivindicación 5.
- 30 7. Un método de detección para un transformante que tiene capacidad para producir un alto nivel de una proteína derivada de gen foráneo, que comprende las etapas de:
- (a) insertar un gen foráneo en el vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;
- (b) transformar una célula huésped deficiente en el gen de la dihidrofolato reductasa con el vector de expresión;
- y
- (c) cultivar el transformante en un medio libre de hipoxantina-timidina.

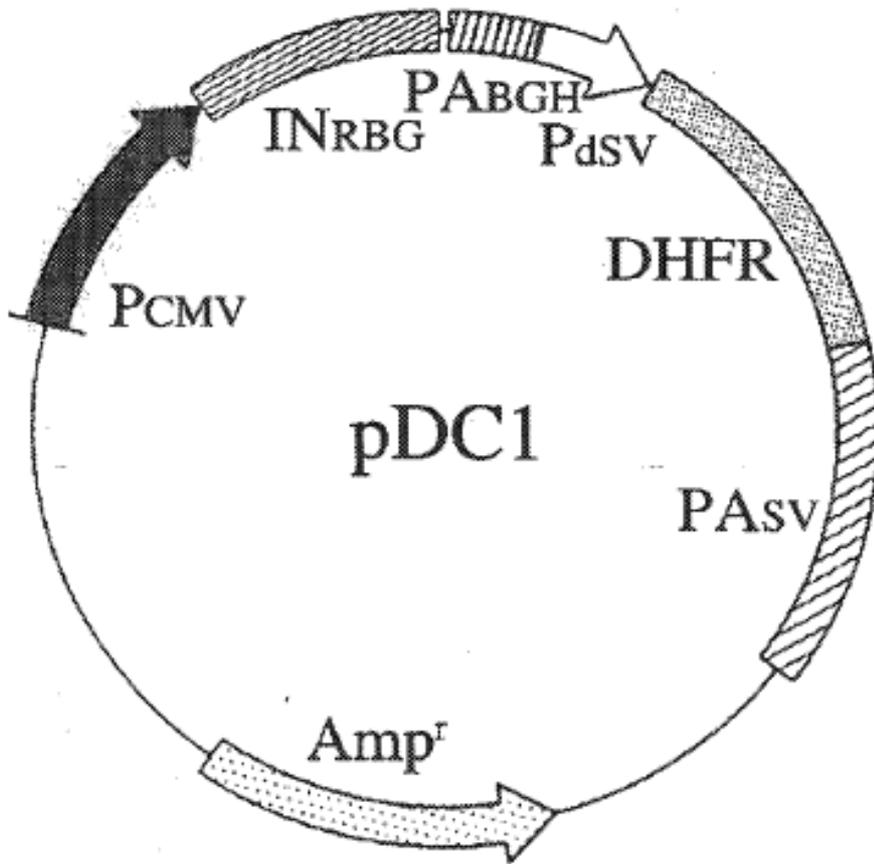


FIG. 1

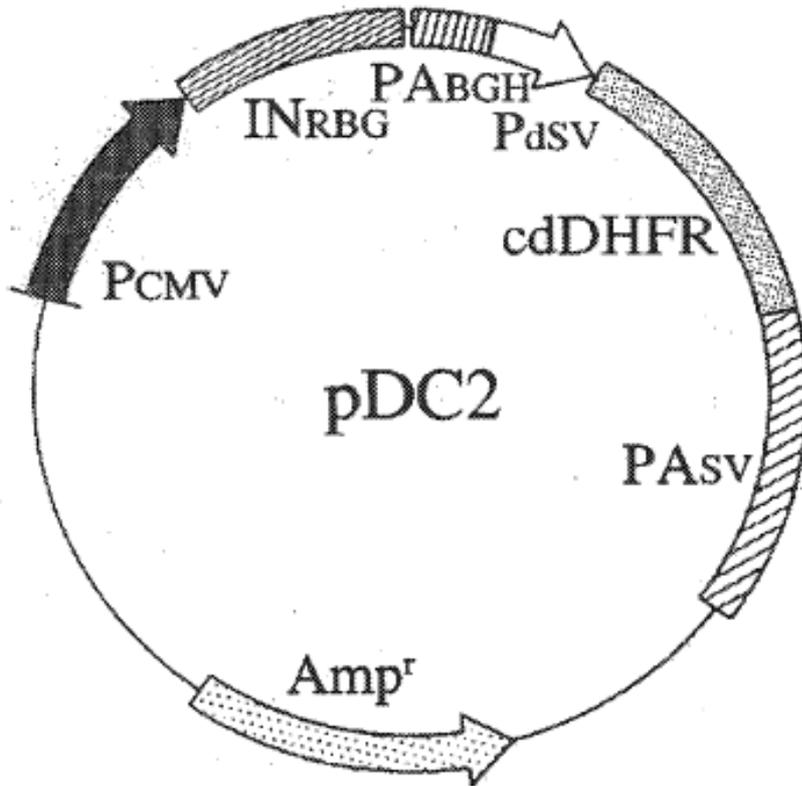


FIG. 2

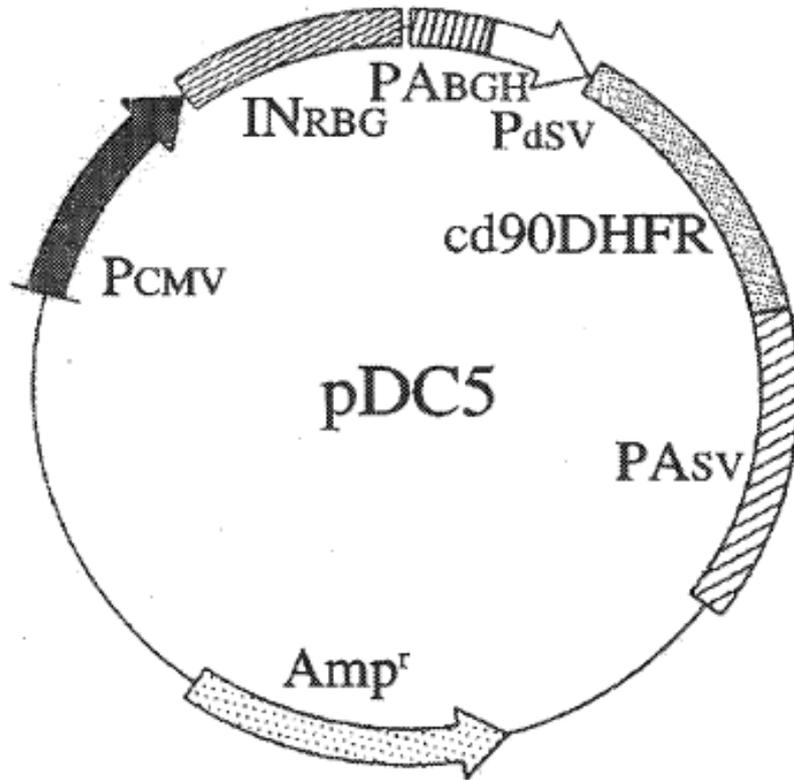


FIG. 3

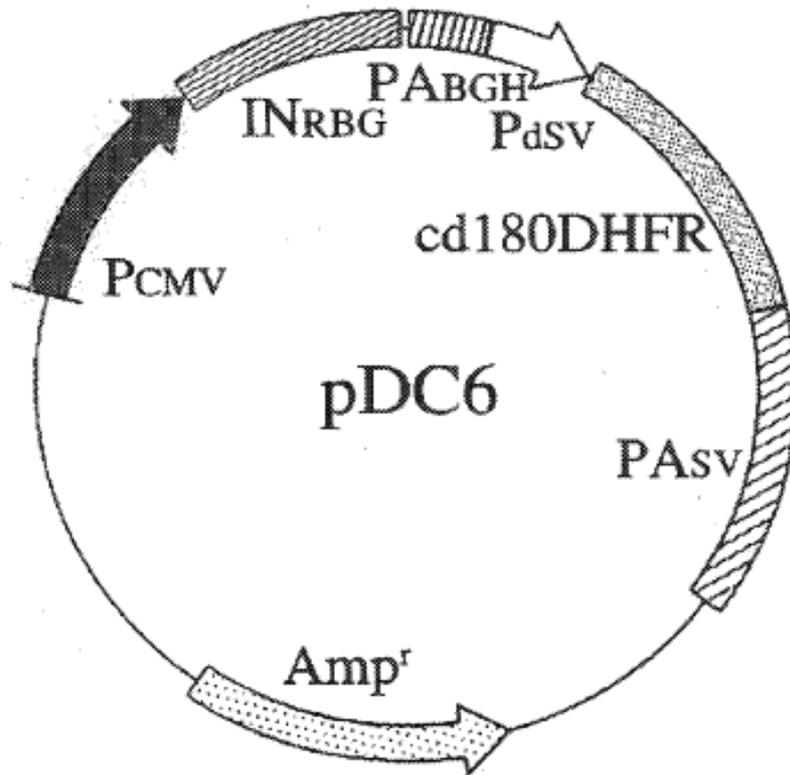


FIG. 4

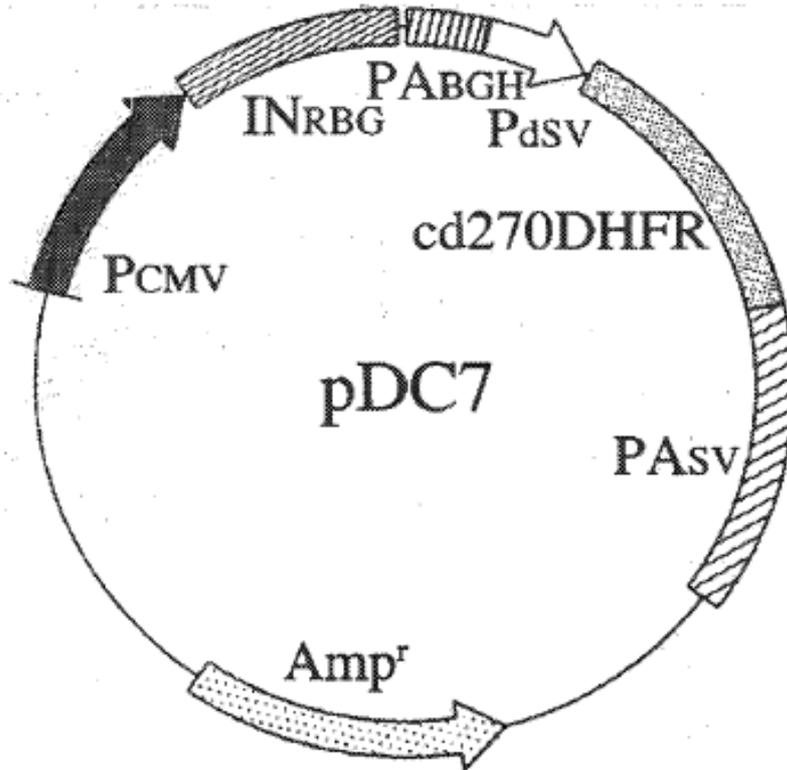


FIG. 5

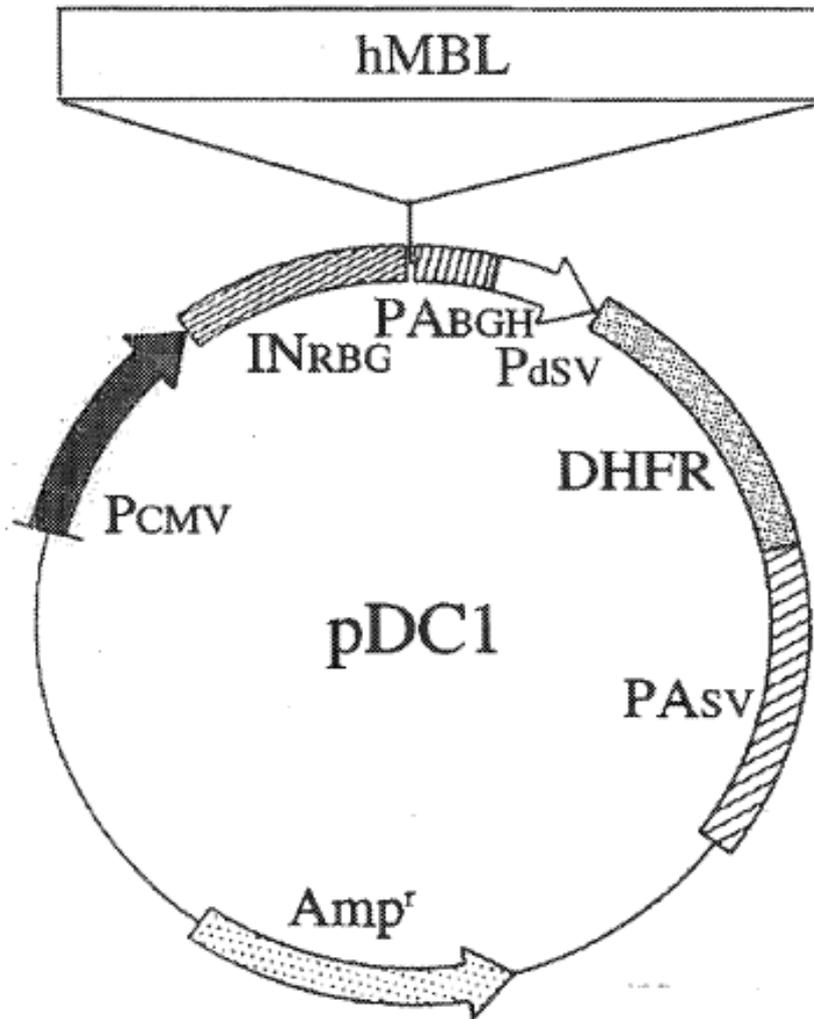


FIG. 6

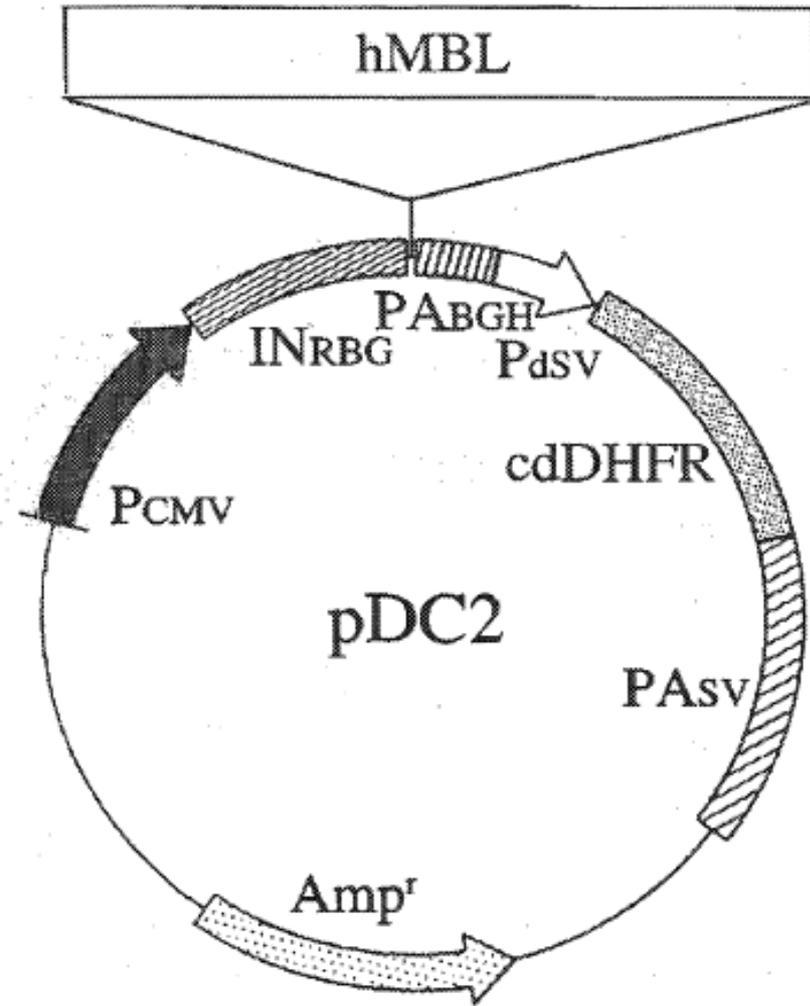


FIG. 7

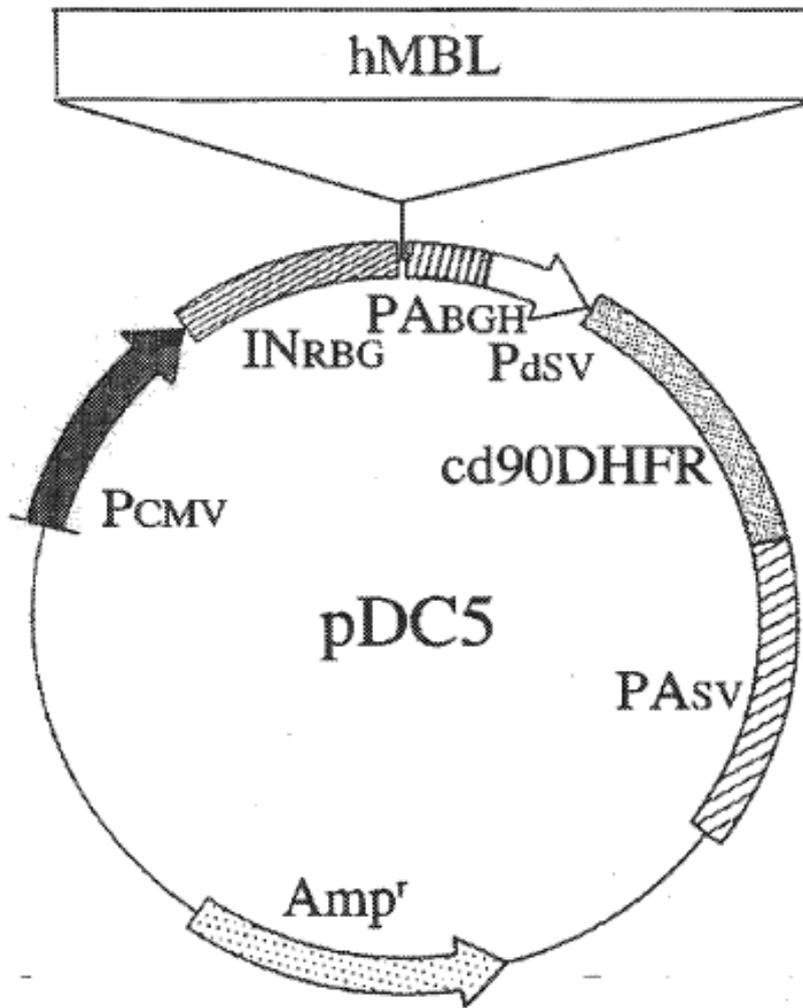


FIG. 8

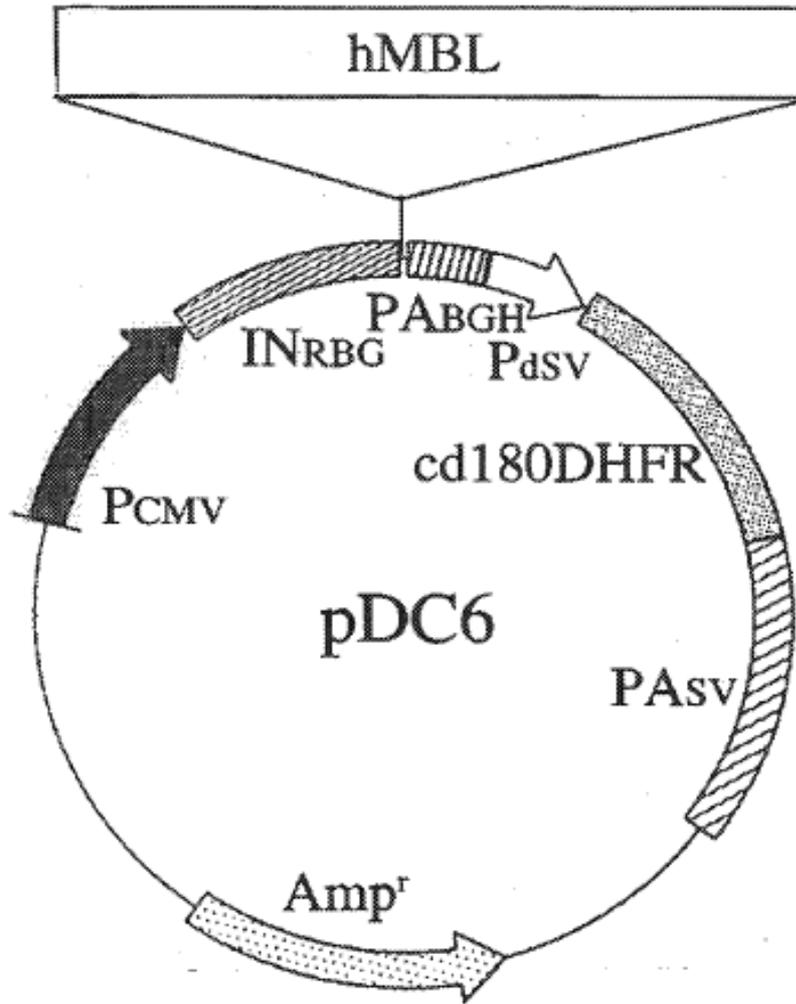


FIG. 9

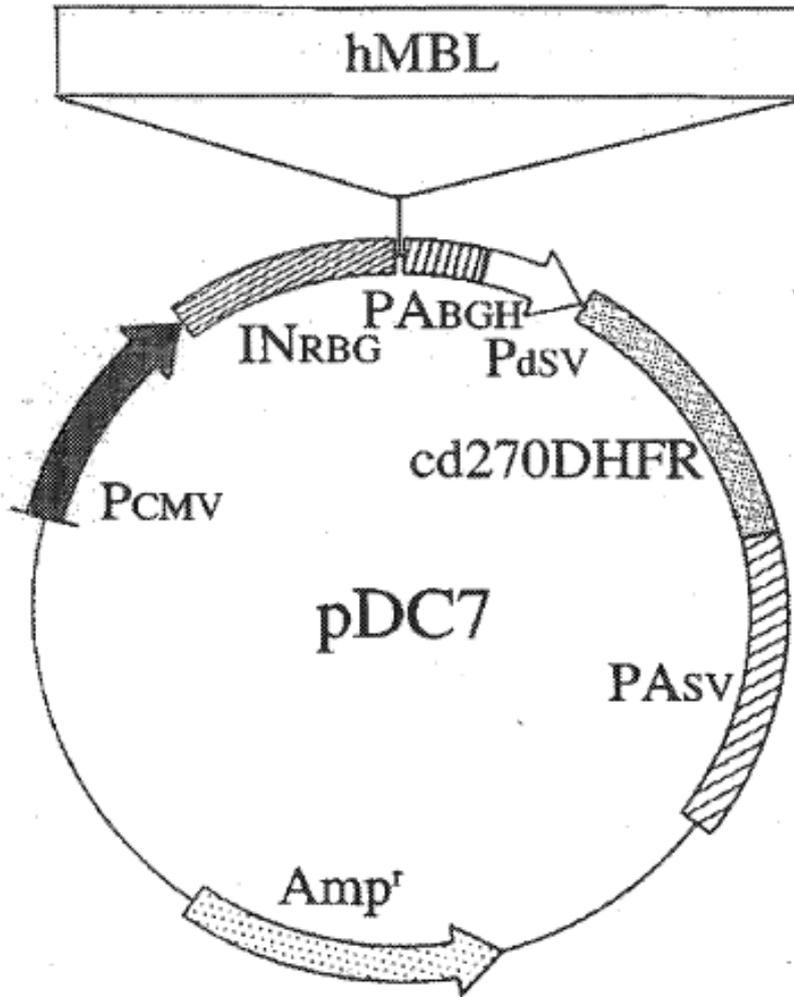


FIG. 10

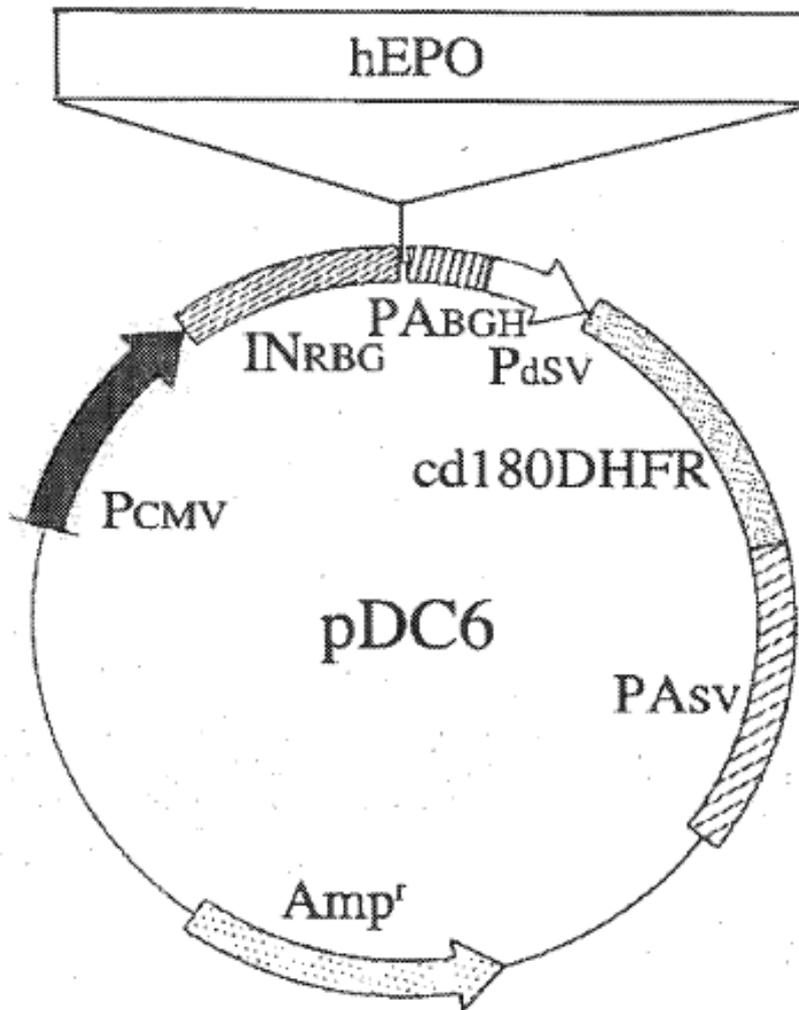


FIG. 11

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|---|-----------------|----|-----------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | Estándar de EPO | | Muestras de EPO | | | | | | | | | | | | |
| A | 10ng/μL | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | | |
| B | 5ng/μL | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | | |
| C | 2.5ng/μL | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | | |
| D | 1.25ng/μL | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | | |
| E | 0.63ng/μL | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | | |
| F | 0.31ng/μL | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | | |
| G | 0.16ng/μL | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | | | | |
| H | 0 ng/ml | | | | | | | | | | | | | | |

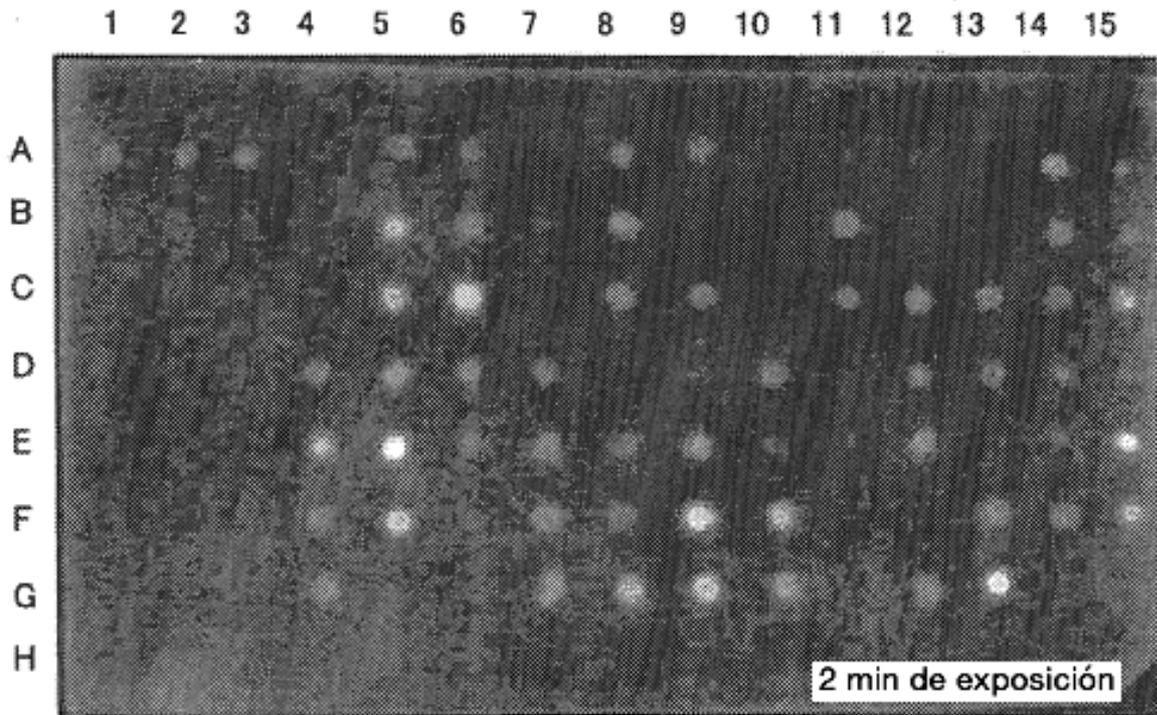


FIG. 12

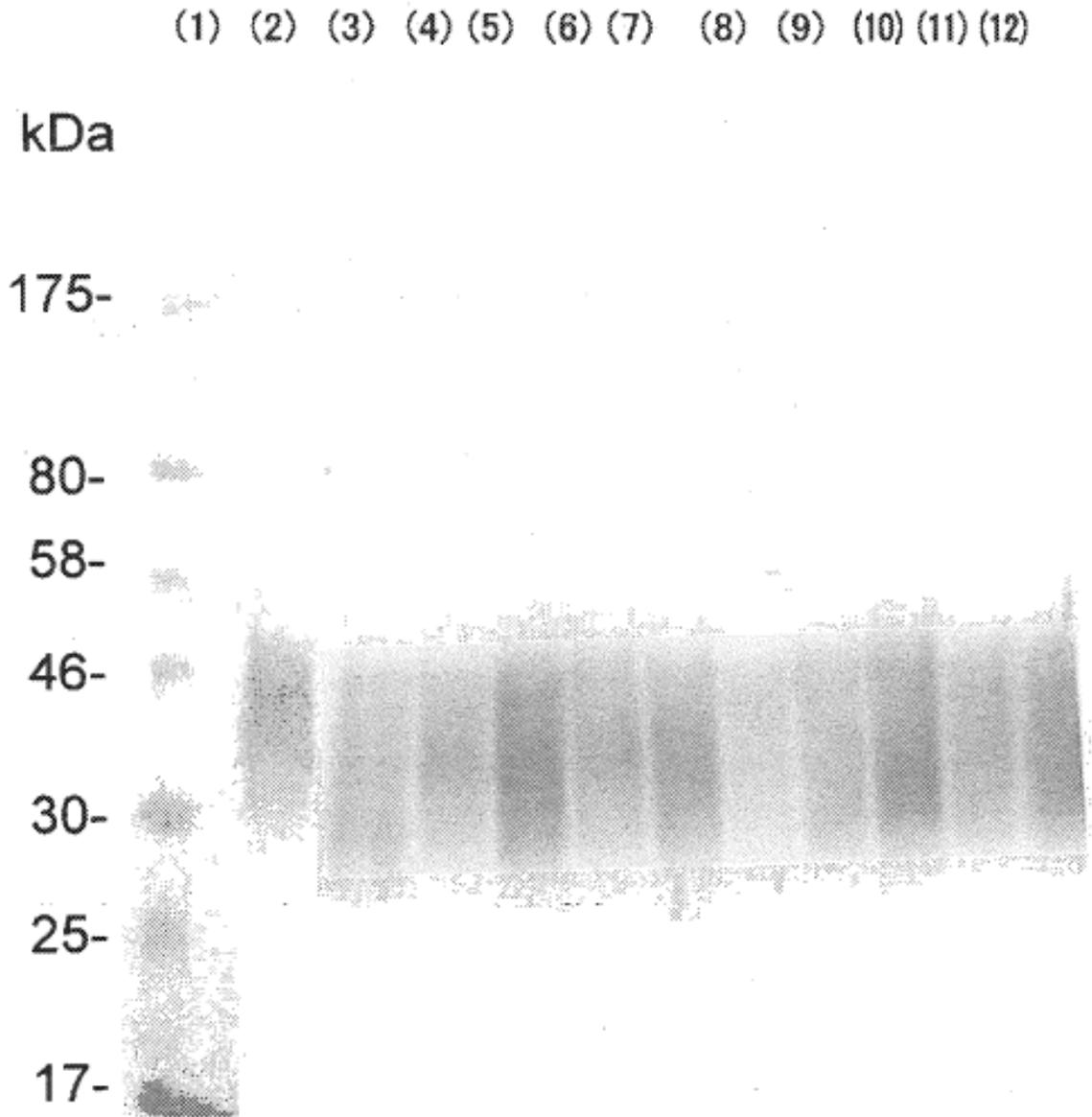


FIG. 13

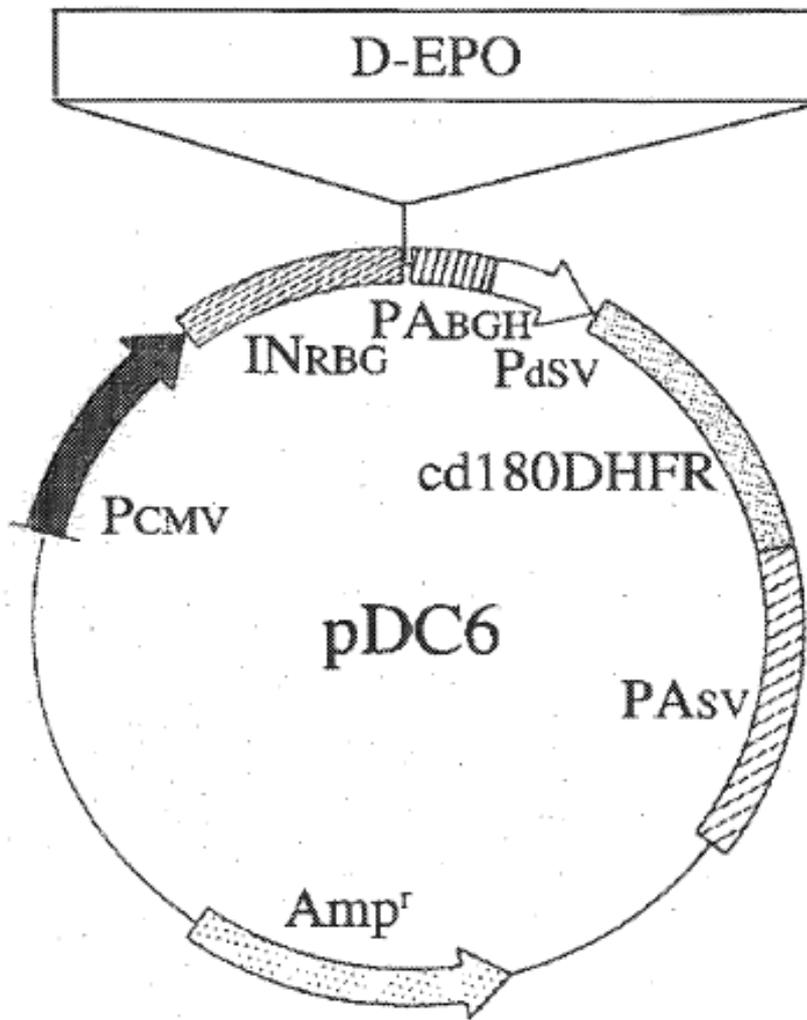


FIG. 14

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|---|-----------------|----|----|-------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | Estándar de EPO | | | Muestras de D-EPO | | | | | | | | | | | |
| A | 10ng/μL | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | | |
| B | 5ng/μL | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | | |
| C | 2.5ng/μL | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | | |
| D | 1.25ng/μL | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | | |
| E | 0.63ng/μL | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | | |
| F | 0.31ng/μL | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | | |
| G | 0.16ng/μL | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | | |
| H | 0 ng/ml | | | | | | | | | | | | | | |

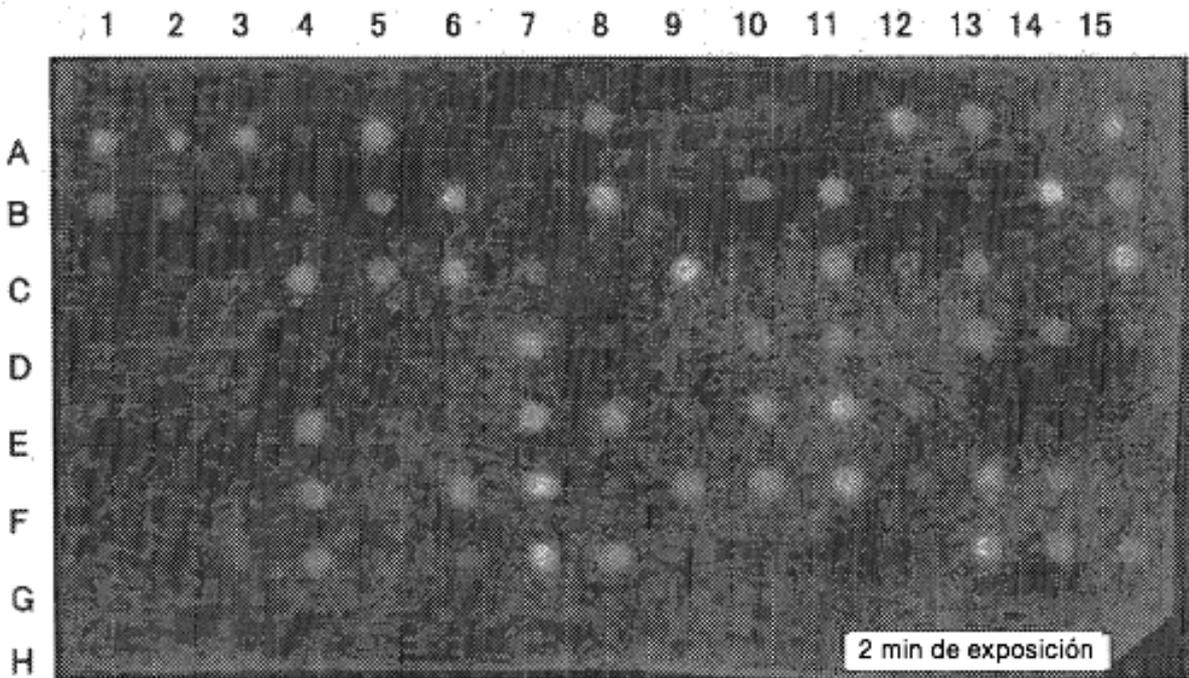


FIG. 15

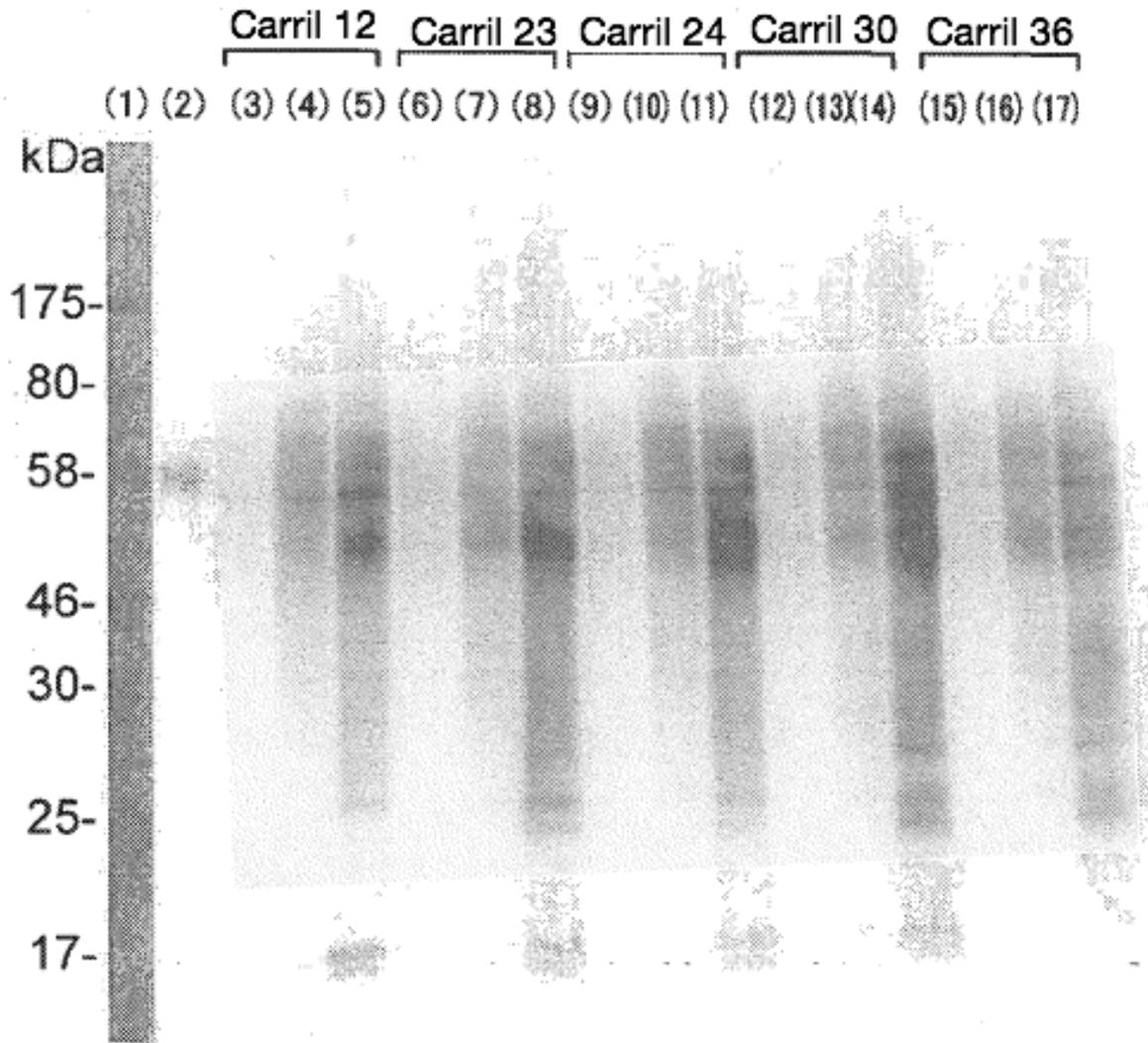


FIG. 16

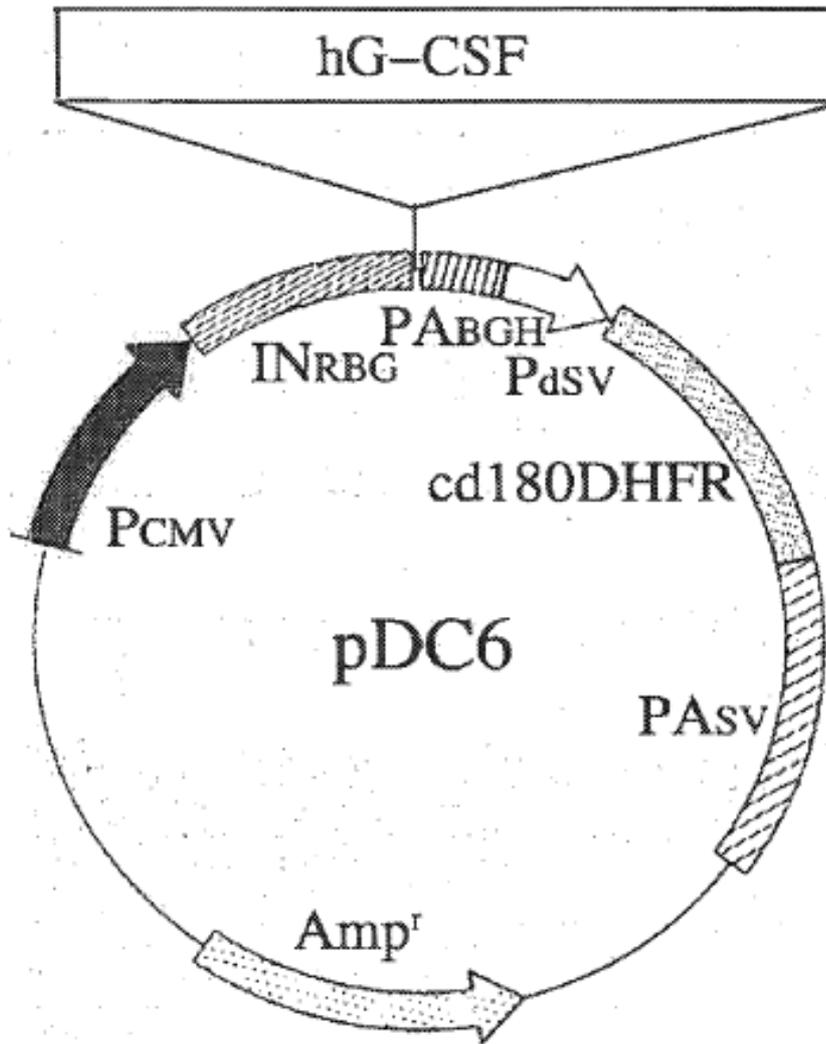


FIG. 17

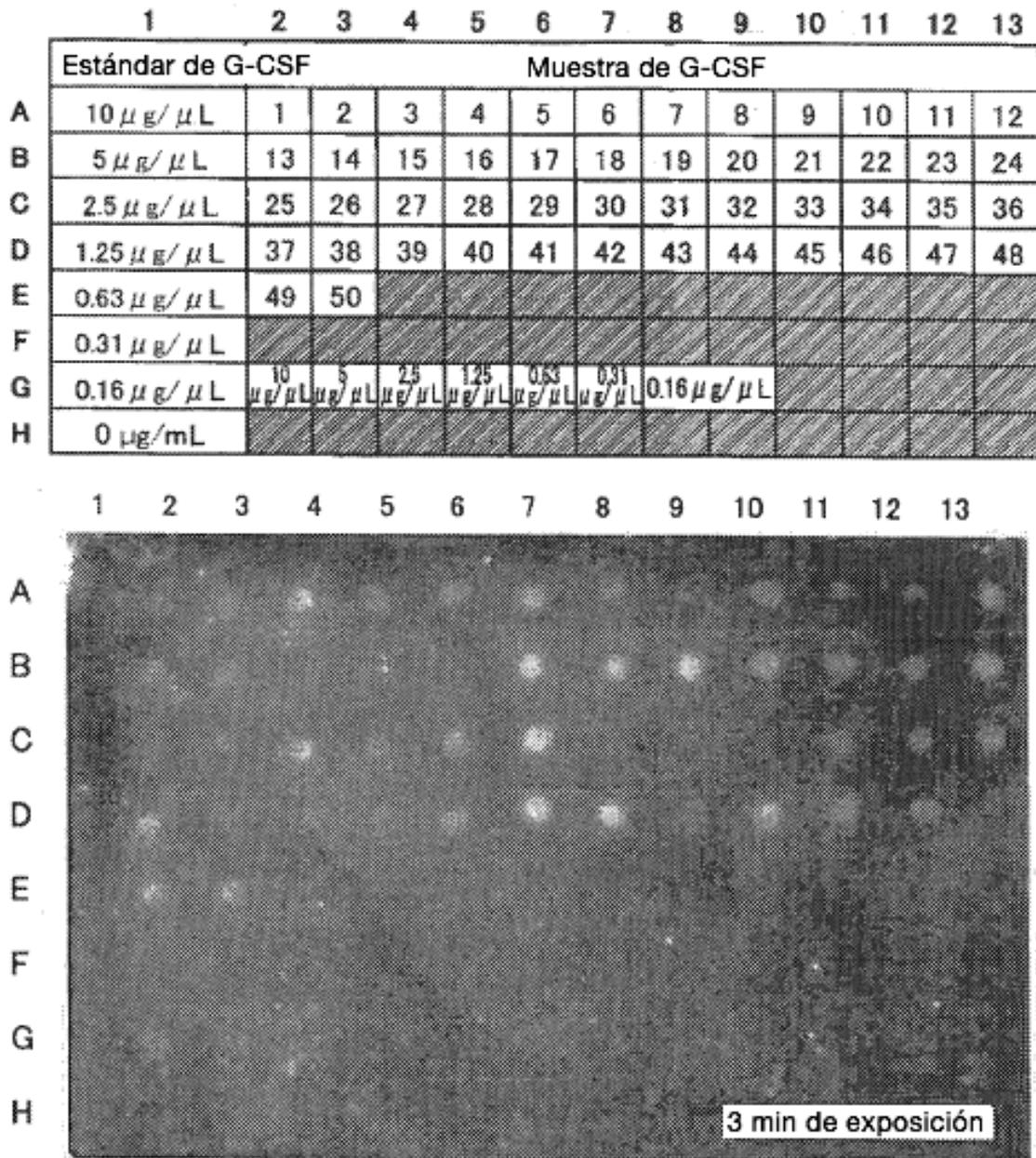


FIG. 18

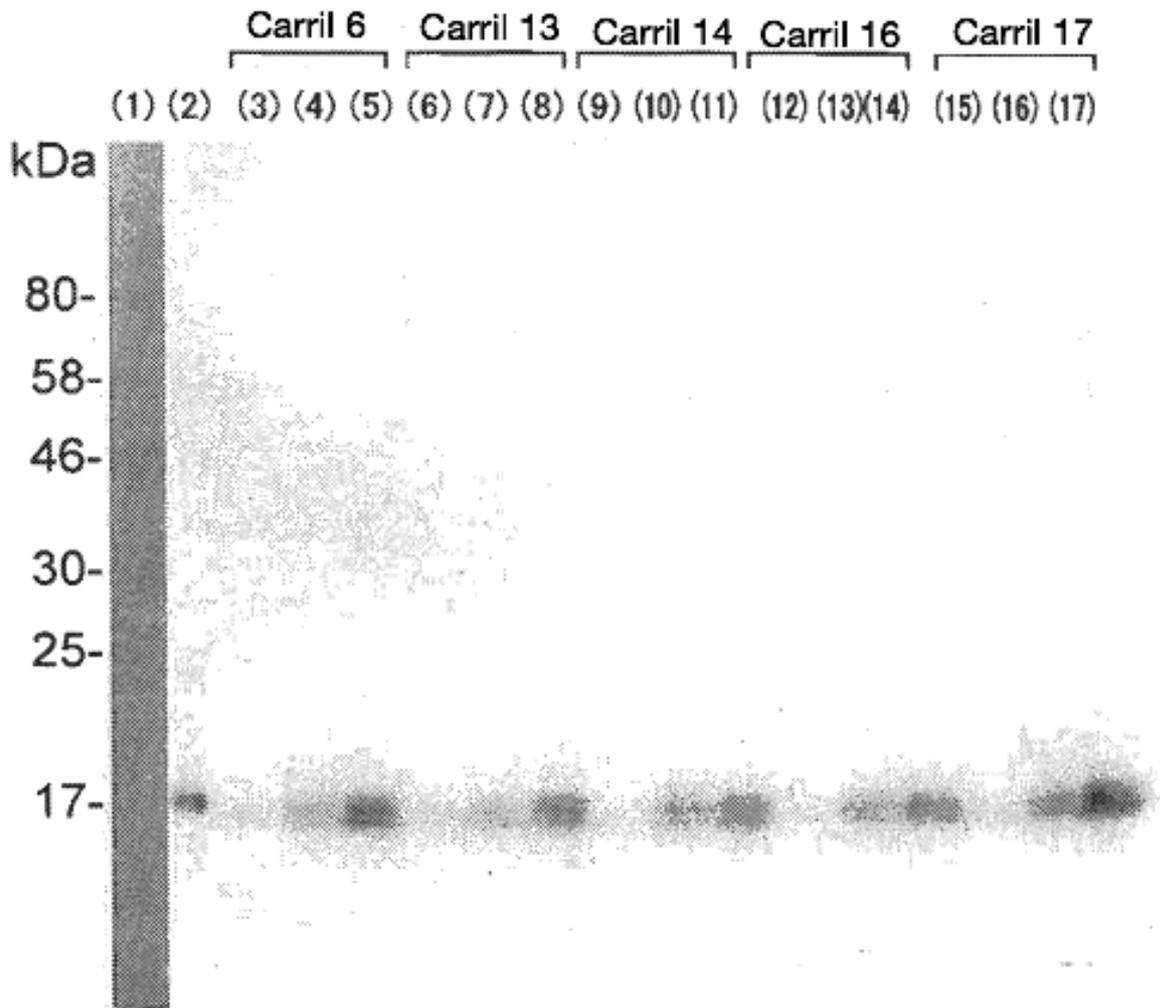


FIG. 19

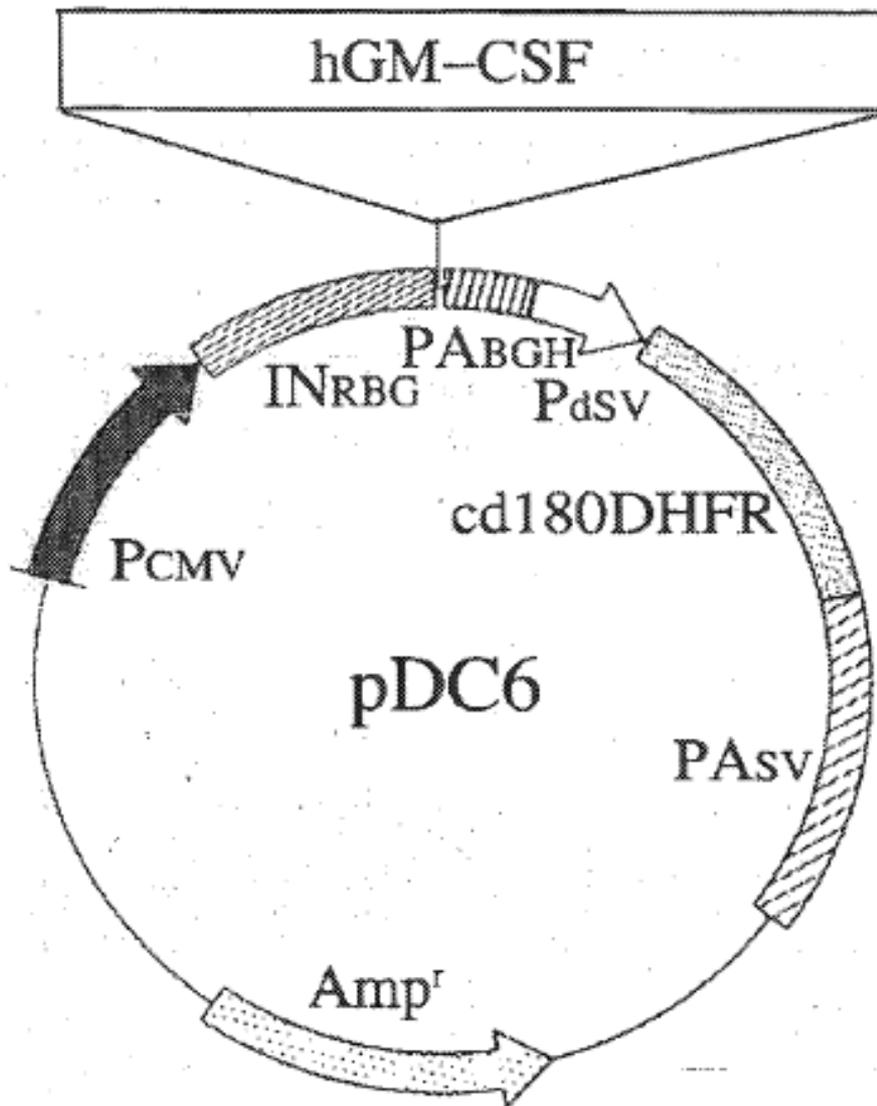


FIG. 20

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|---|--------------------|----|----|----|-------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | Estándar de GM-CSF | | | | Muestra de GM-CSF | | | | | | | | |
| A | 100µg/mL | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| B | 50µg/mL | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
| C | 25µg/mL | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 |
| D | 12.5µg/mL | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 |
| E | 6.25µg/mL | | | | | | | | | | | | |
| F | 3.125µg/mL | | | | | | | | | | | | |
| G | 1.5625µg/mL | | | | | | | | | | | | |
| H | 0 µg/mL | | | | | | | | | | | | |

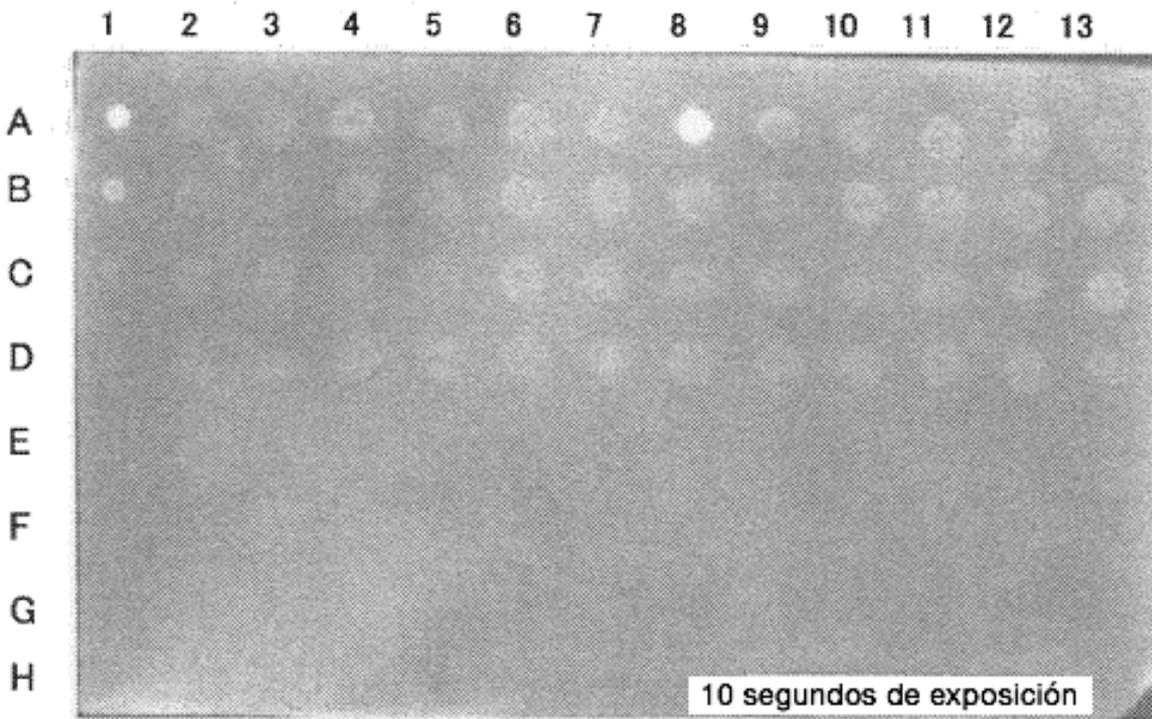


FIG. 21

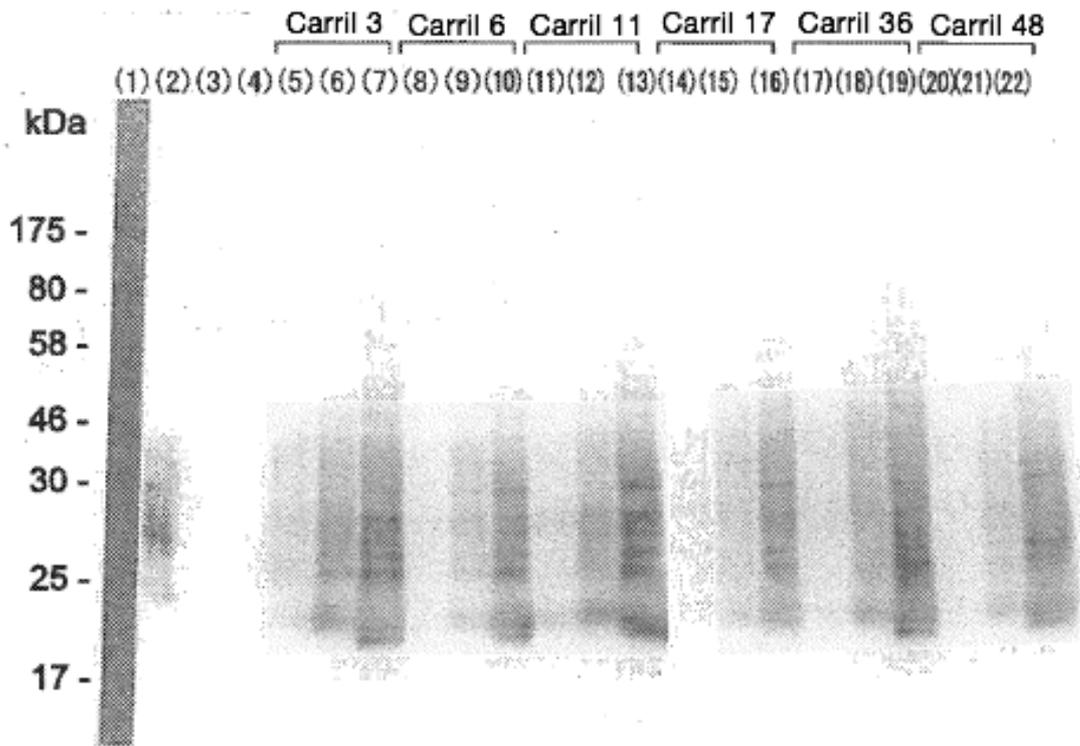


FIG. 22

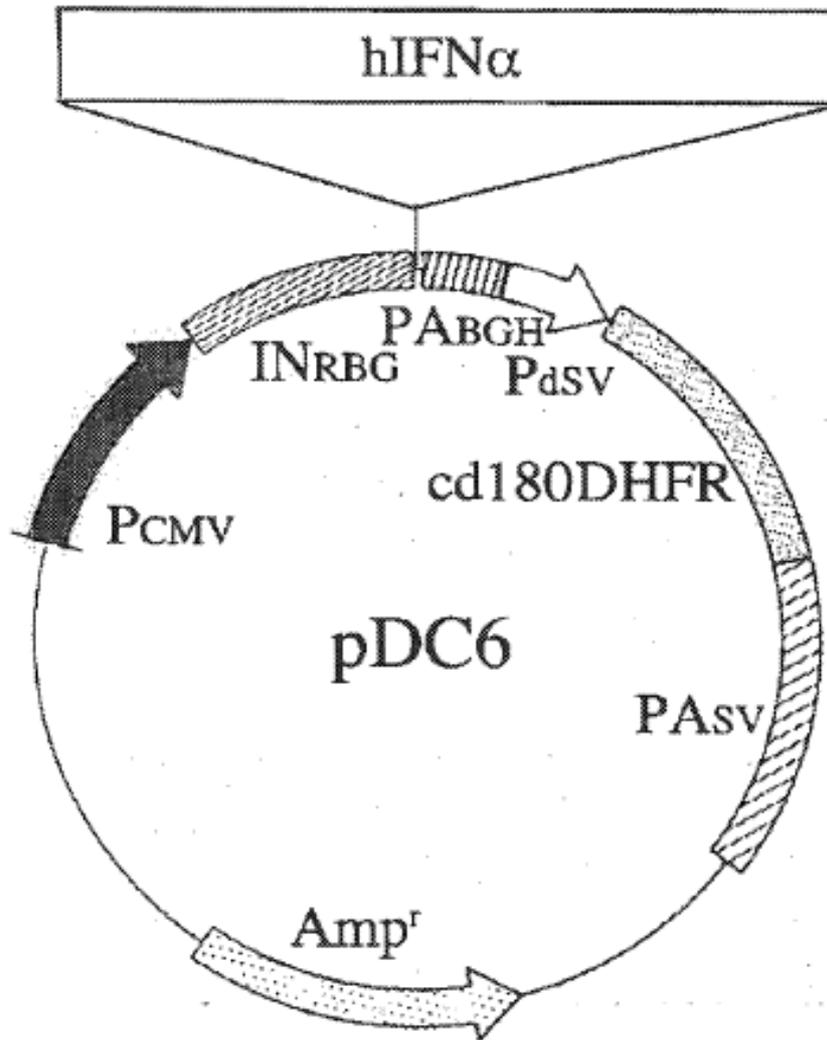


FIG. 23

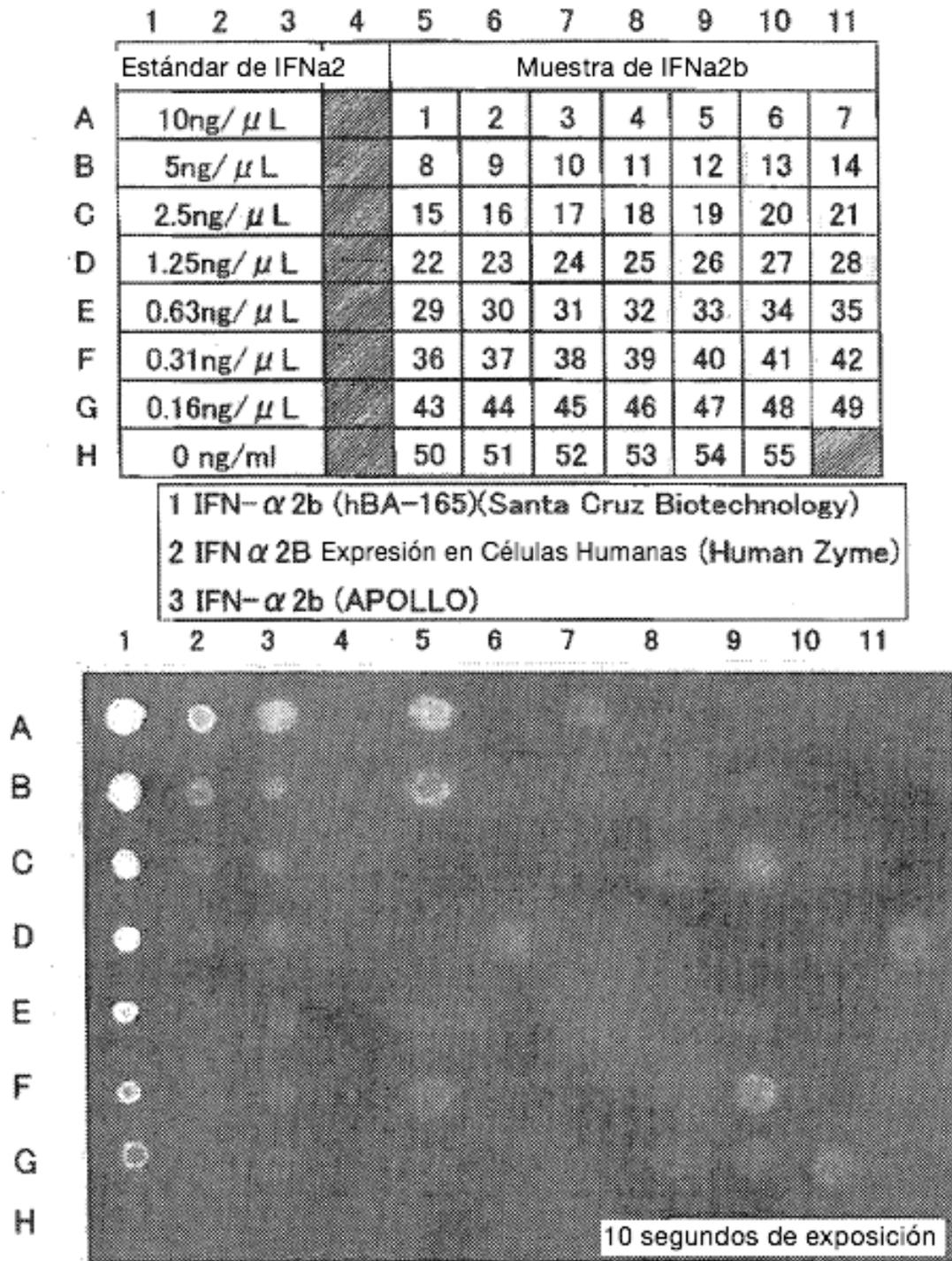


FIG. 24

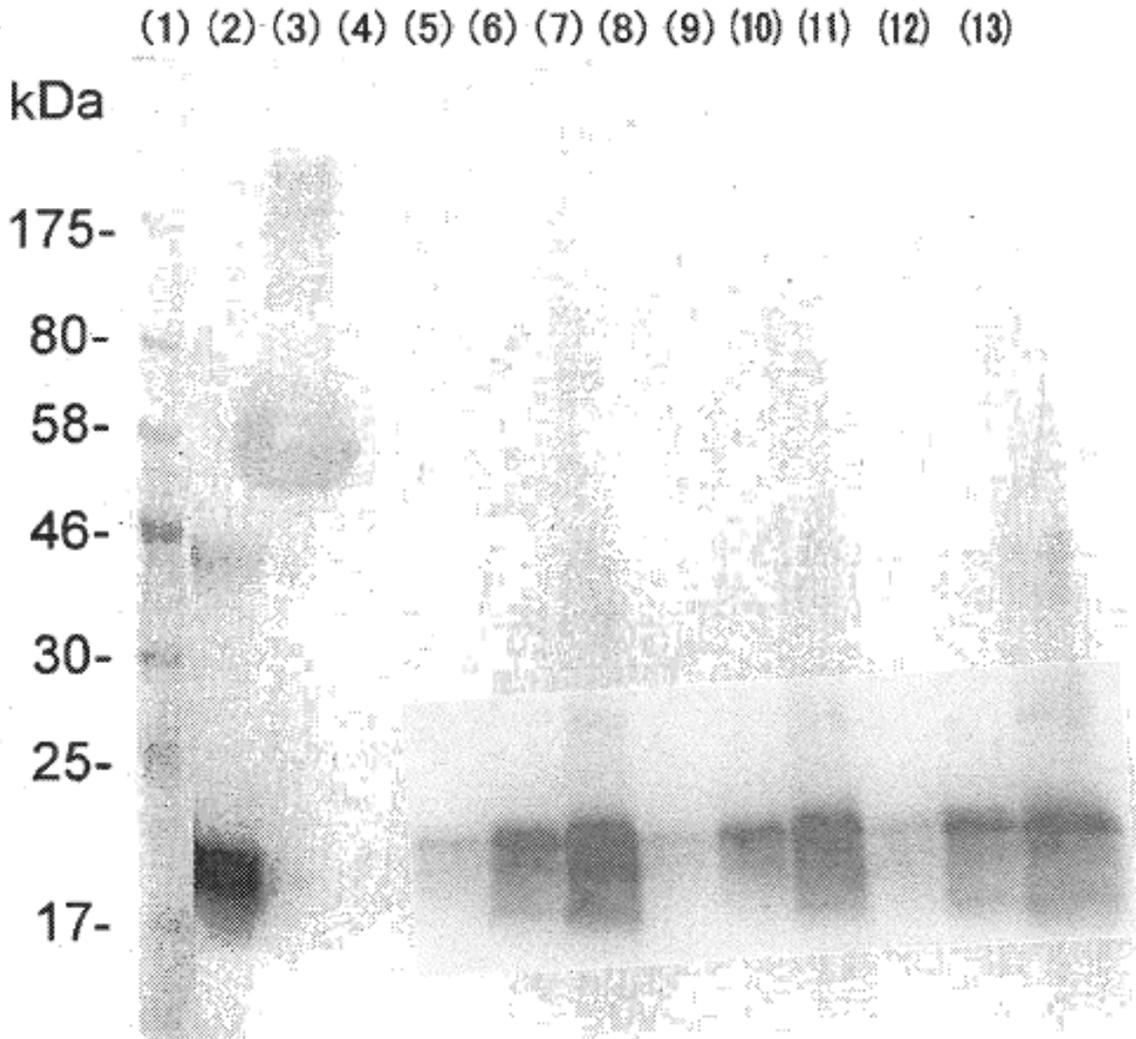


FIG. 25

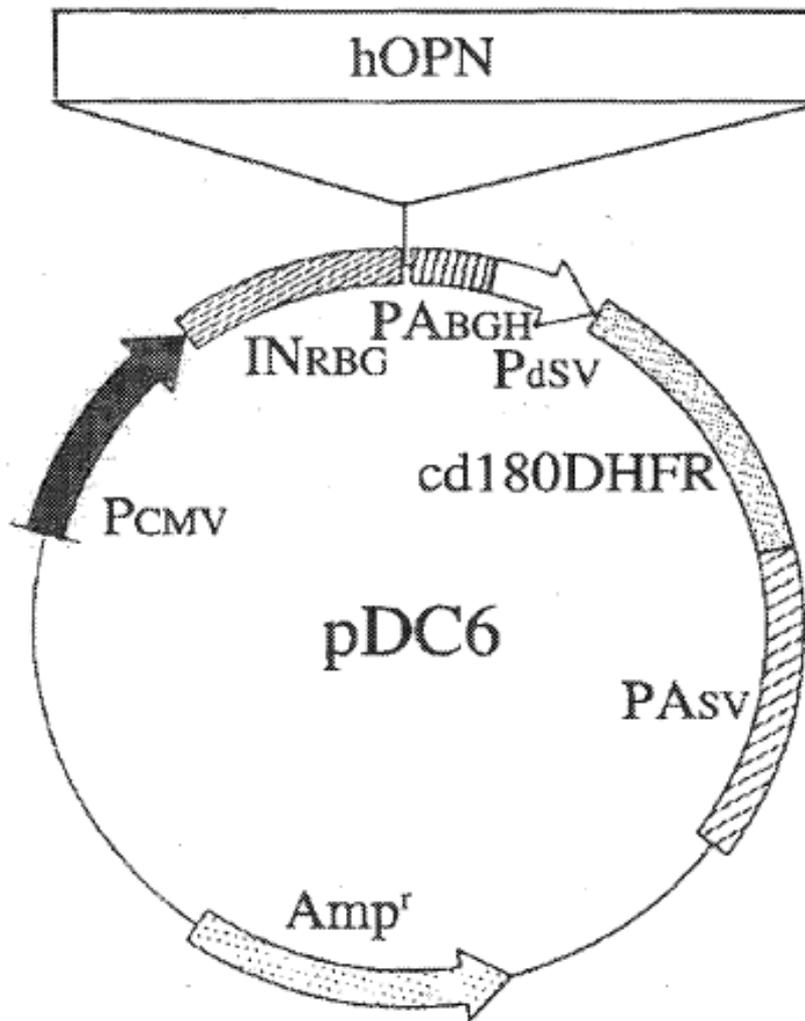


FIG. 26

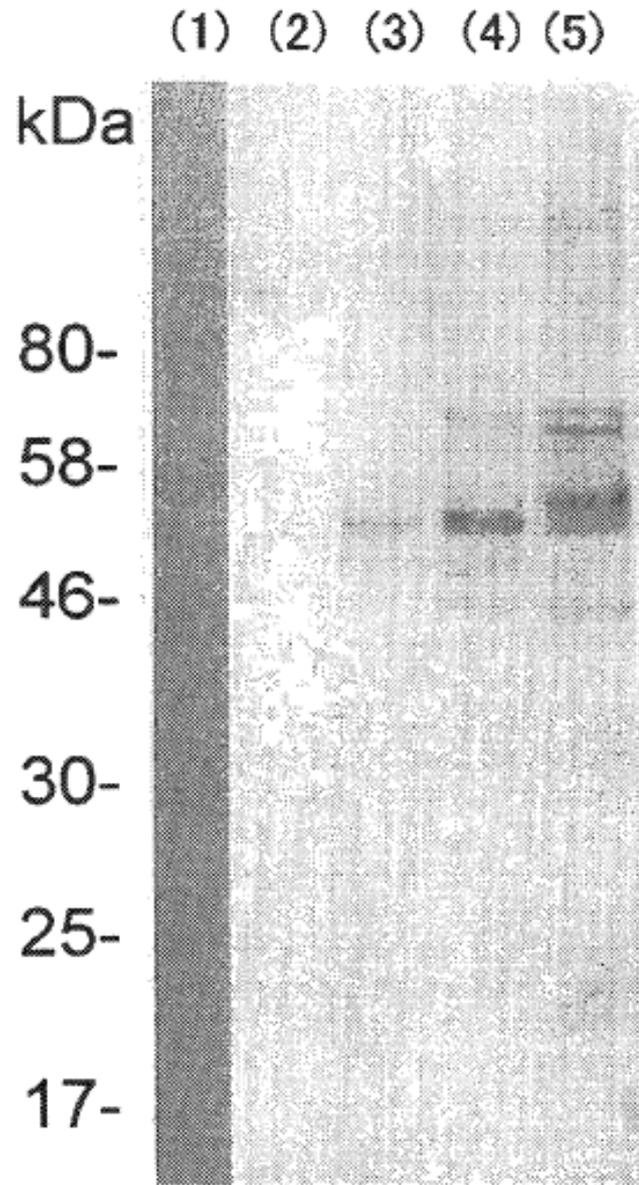


FIG. 27