

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 021**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00	(2006.01)
C12N 5/10	(2006.01)
C12N 15/09	(2006.01)
C12P 21/02	(2006.01)
C12N 15/67	(2006.01)
C12N 15/85	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2009 PCT/JP2009/053682**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.09.2009 WO2009107775**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2009 E 09715053 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2258843**

54 Título: **Vector de expresión para producción masiva de proteína derivada de un gen foráneo usando células animales y su uso**

30 Prioridad:

27.02.2008 JP 2008046782

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

09.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 616 021 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 masiva de proteína derivada de un gen foráneo usando células animales y su uso

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a vectores de expresión de células de mamífero que 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 plegado único para mamíferos y que difícilmente tienen suficiente actividad cuando se producen mediante recombinación genética usando *E. coli* o levadura como huésped.

Estado de la técnica

10 Se han desarrollado un gran número de vectores para producir proteínas recombinantes, y los niveles de expresión de proteínas son altos en sistemas de expresión que usan bacterias tales como *E. coli*, microorganismos eucariotas tales como levadura y células de insecto como huéspedes. Sin embargo, al expresar proteínas únicas en mamíferos, pueden no formar una estructura tridimensional normal, y la mayor parte del tiempo existe un problema con modificaciones postraduccionales tales como glicosilación. Por lo tanto, es necesario establecer sistemas de expresión que usen
15 células de mamífero como huésped, 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 usan en células animales, que son superiores a las células de insecto, pero la remoción de vectores de virus recombinantes de las proteínas expresadas es un proceso muy engorroso y no se puede negar el riesgo de los propios vectores virales.

20 Los casos de producción de proteínas recombinantes utilizando una célula de mamífero como huésped incluyen activador de plasminógeno tisular (documento de patente 1), eritropoyetina (documento de patente 2 y documentos 1-3 no de patente), IFN- γ (documento 4 no de patente), e IFN- β (documento de patente 3 y documento 5 no de patente). Además, hay muchos informes sobre la producción recombinante de anticuerpos monoclonales (documentos de patente 4 a 6 y documentos 6 a 8 no de patente). Además, un ejemplo de un vector de expresión alto para células de mamífero es pNOW/CMV-AA (documento de patente 7). El nivel de producción de conglutinina utilizando este vector fue de hasta
25 11,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ después de cuatro días de cultivo. Sin embargo, es improbable que el nivel de producción de proteína recombinante sea suficiente en estos casos.

A continuación se muestran los documentos del estado de la técnica relacionados con la invención de esta solicitud.

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

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

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

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

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

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

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

[Documento de patente 8] EP 1 591 523 A1

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

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

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

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

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

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

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

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

[Documento 9 no de patente] Gene, (1997) 199: pág. 293

5 Divulgación de la invención

Problemas a resolver por la invención

10 El uso de células de mamífero, particularmente células de ovario de hámster chino (en lo sucesivo, células CHO) en la producción de agentes farmacéuticos, se ha confirmado como seguro y se ha convertido en una técnica común hoy en día. En la producción de proteínas recombinantes usando células de mamífero, el aumento de la productividad es muy importante desde los puntos de vista de reducción de costes, mantenimiento de los costes de la asistencia sanitaria, etc. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de vectores de expresión para producir transformantes que tengan una capacidad de producción de alto nivel mediante transferencia génica eficiente.

15 Es necesaria una transferencia de genes eficiente para la producción fácil de niveles elevados de proteína recombinante en células de mamífero. Una transferencia eficiente de genes significa que la probabilidad de obtener clones con un alto nivel de productividad es alta independientemente de si la selección de clones es fácil o no. Específicamente, esto significa que el número de clones de células viables con respecto a todas las células transformadas después de la selección del fármaco es relativamente pequeño y, por lo tanto, la selección de clones con un alto nivel de productividad es fácil. También significa que la probabilidad de ocurrencia de clones con alto nivel de productividad es alta incluso si el número de células que producen la proteína de interés es pequeño. A medida que el número de células disponibles se vuelve mayor, se requiere más tiempo y esfuerzo para la selección, y esto conduce a ineficiencia y a una alta probabilidad de pasar por alto clones que potencialmente tienen la capacidad de un alto nivel de producción.

20 La capacidad de producción de alto nivel se refiere al alto nivel de expresión de la proteína recombinante en los clones celulares transformados obtenidos por transferencia génica, y se considera que esto se debe principalmente a las características y el rendimiento de los vectores de expresión. Se ha encontrado que el nivel de 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 en una región con alta actividad transcripcional sobre el cromosoma (en lo sucesivo, punto caliente transcripcional) es probable que aumente el nivel de producción de proteína recombinante.

25 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 confieren células huésped de mamífero con la capacidad de producir proteínas derivadas de genes foráneos con niveles elevados. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar métodos para producir transformantes que utilicen los vectores y métodos anteriormente mencionados y métodos para producir proteínas derivadas de genes foráneos utilizando los vectores antes mencionados.

[Medios para resolver los problemas]

35 Como resultado de la investigación dedicada a resolver los problemas mencionados anteriormente, los presentes inventores han desarrollado con éxito vectores de expresión que portan un mecanismo en el que el ADN plasmídico está integrado en el punto caliente transcripcional en el cromosoma de la célula huésped, y las células se seleccionan como cepas resistentes a un fármaco (por ejemplo, neomicina, zeocina o blasticidina). La alta productividad de los clones primarios de cepas resistentes a G418 transducidas depende del mecanismo de expresión génica de NPT, la alta productividad de los clones primarios de cepas resistentes a zeocina depende del mecanismo de expresión génica de resistencia a la zeocina, y la alta productividad de los clones primarios de las cepas resistentes a la blasticidina depende del mecanismo de expresión génica de resistencia a la blasticidina. Como resultado, los presentes inventores completaron la presente invención construyendo vectores de expresión que permiten una producción de proteínas estable y de alto nivel.

40 Más específicamente, la presente invención proporciona la materia como se define en las reivindicaciones. Adicionalmente se proporciona lo siguiente:

[1] un vector de expresión que permite la producción de alto nivel de una proteína derivada de un gen foráneo en una célula huésped de mamífero, que comprende:

- (a) un casete de gen de resistencia a fármacos de traducción alterada, cuya expresión se atenúa alterando los codones con los codones menos frecuentemente utilizados en un mamífero; y
- (b) un casete de gen que comprende un sitio de clonación para la integración de un gen foráneo entre un promotor transcripcionalmente altamente activo y una señal de poliadenilación altamente estable;
- 5 [2] el vector de expresión de [1], en el que los codones del casete del gen de resistencia a fármacos de traducción alterada de [1] (a) han sido alterados con los codones menos frecuentemente utilizados en seres humanos;
- [3] el vector de expresión de [1], en el que los codones del casete del gen de resistencia a fármacos de traducción alterada de [1] (a) se han alterado a GCA para alanina, CGA para arginina, AAU para asparagina, GAU para ácido aspártico, UGU para cisteína, GAA para glutamina, GGU para glicina, CAU para la 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;
- 10 [4] el vector de expresión de [1], en el que el casete del gen de resistencia a fármacos de traducción alterada de [1] (a) utiliza un promotor con baja actividad inductora de expresión como promotor;
- [5] el vector de expresión de [4], en el que el promotor de baja actividad utilizado es un promotor derivado de un gen que apenas se expresa en una célula de mamífero o un promotor cuya porción potenciadora se ha eliminado;
- 15 [6] el vector de expresión de [1], en el que una región de codones alterados en el casete del gen de resistencia a fármacos de traducción alterada de [1] (a) es 30% o más de toda la longitud del casete del gen;
- [7] el vector de expresión de cualquiera de [1] a [6], donde el gen de resistencia a fármacos de [1] (a) es un gen de neomicina fosfotransferasa (gen de NTP);
- 20 [8] un método para producir un transformante que tiene capacidad para producir un alto nivel de una proteína derivada de un gen foráneo y para resistir a la neomicina; que comprende las etapas de insertar un gen foráneo en el vector de expresión de [7], y transformar una célula huésped utilizando el vector de expresión;
- [9] un método para producir una proteína derivada de un gen foráneo, que comprende las etapas de:
- (a) insertar un gen foráneo en el vector de expresión de [7];
- 25 (b) transformar una célula huésped con el vector de expresión;
- (c) cultivar el transformante en un medio suplementado con neomicina; y
- (d) recoger la proteína derivada de un gen foráneo del transformante cultivado;
- [10] el método de producción de [9], en el que se utiliza un medio químicamente definido (medio CD) o un medio suplementado con un aditivo no animal en el medio CD para cultivar en la etapa (c) de [9];
- 30 [11] un método de cribado para un transformante que tiene capacidad para producir un alto nivel de una proteína derivada de un gen foráneo, que comprende las etapas de:
- (a) insertar un gen foráneo en el vector de expresión de [7];
- (b) transformar una célula huésped con el vector de expresión; y
- (c) cultivar el transformante en un medio suplementado con neomicina;
- 35 [12] el vector de expresión de cualquiera de [1] a [6], en el que el gen de resistencia al fármaco de [1] (a) es un gen de resistencia a zeocina (gen de zeocina);
- [13] un método para producir un transformante que tiene capacidad para producir un alto nivel de una proteína derivada de un gen foráneo y para resistir la zeocina; que comprende las etapas de insertar un gen foráneo en el vector de expresión de [12], y transformar una célula huésped utilizando el vector de expresión;
- 40 [14] un método para producir una proteína derivada de un gen foráneo, que comprende las etapas de:

- (a) insertar un gen foráneo en el vector de expresión de [12];
- (b) transformar una célula huésped con el vector de expresión;
- (c) cultivar el transformante en un medio suplementado con zeocina; y
- (d) recoger la proteína derivada de un gen foráneo del transformante cultivado;

5 [15] El método de producción de [14], en el que se utiliza un medio químicamente definido (medio CD) o un medio suplementado con un aditivo no animal en el medio CD para cultivar en la etapa (c) de [14];

[16] un método de cribado para un transformante que tiene capacidad para producir un alto nivel de una proteína derivada de un gen foráneo, que comprende las etapas de:

(a) insertar un gen foráneo en el vector de expresión de [12];

10 (b) transformar una célula huésped con el vector de expresión; y

(c) cultivar el transformante en un medio suplementado con zeocina;

[17] el vector de expresión de cualquiera de [1] a [6], en el que el gen de resistencia al fármaco de [1] (a) es un gen de resistencia a blasticidina (gen de blasticidina);

15 [18] un método para producir un transformante que tiene la capacidad para producir un alto nivel de una proteína derivada de un gen foráneo y para resistir la blasticidina; que comprende las etapas de insertar un gen foráneo en el vector de expresión de [17], y transformar una célula huésped utilizando el vector de expresión;

[19] un método para producir una proteína derivada de un gen foráneo, que comprende las etapas de:

(a) insertar un gen foráneo en el vector de expresión de [17];

(b) transformar una célula huésped con el vector de expresión;

20 (c) cultivar el transformante en un medio suplementado con blasticidina; y

(d) recoger la proteína derivada de un gen foráneo del transformante cultivado;

[20] el método de producción de [19], en el que se utiliza un medio químicamente definido (medio CD) o un medio suplementado con un aditivo no animal en el medio CD para cultivar en la etapa (c) de [19]; y

25 [21] un método de cribado para un transformante que tiene capacidad para producir un alto nivel de una proteína derivada de un gen foráneo, que comprende las etapas de:

(a) insertar un gen foráneo en el vector de expresión de [17];

(b) transformar una célula huésped con el vector de expresión; y

(c) cultivar el transformante en un medio suplementado con blasticidina.

Breve descripción de los dibujos

30 La figura 1 muestra el constructo pNC1. Cada uno de los siguientes indica: PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento del conejo; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovino; PdSV: promotor del virus 40 vacuolado de simio sin potenciador; NPT: ADNc de neomicina fosfotransferasa; PASV: señal de adición de poliA del virus 40 vacuolado de simio; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

35 La figura 2 muestra el constructo pNC2. Cada uno de los siguientes indica: PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento del conejo; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovino; PdSV: promotor del virus 40 vacuolado de simio sin potenciador; cdNPT: gen de NPT de traducción alterada producido alterando los codones de toda la secuencia de nucleótidos de NPT con los codones menos

frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus 40 vacuolado de simio; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

5 La figura 3 muestra el constructo pNC5. Cada uno de los siguientes indica: PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento del conejo; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovino; PdSV: promotor del virus 40 vacuolado de simio sin potenciador; Cd90NPT: gen de NPT de traducción alterada producido por alteración de los codones en el intervalo de 90 bases desde el extremo 5' con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus 40 vacuolado de simio; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

10 La figura 4 muestra el constructo pNC6. Cada uno de los siguientes indica: PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento del conejo; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovino; PdSV: promotor del virus 40 vacuolado de simio sin potenciador; Cd180NPT: gen de NPT de traducción alterada producido por alteración de los codones en el intervalo de 180 bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos de NPT con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus 40 vacuolado de simio; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

15 La figura 5 muestra el constructo pNC7. Cada uno de los siguientes indica: PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento del conejo; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovino; PdSV: promotor del virus 40 vacuolado de simio sin potenciador; Cd270NPT: gen de NPT de traducción alterada producido por alteración de los codones en el intervalo de 270 bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos de NPT con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus 40 vacuolado de simio; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

20 La figura 6 muestra el constructo pNC1/hMBL. Cada uno de los siguientes indica: PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento del conejo; hMBL: ADNc de lectina de unión a manosa humana; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovino; PdSV: promotor del virus 40 vacuolado de simio sin potenciador; NPT: ADNc de neomicina fosfotransferasa; PASV: señal de adición de poliA del virus 40 vacuolado de simio; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

25 La figura 7 muestra el constructo pNC2/hMBL. Cada uno de los siguientes indica: PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento del conejo; hMBL: ADNc de lectina de unión a manosa humana; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovino; PdSV: promotor del virus 40 vacuolado de simio sin potenciador; CdNPT: gen de NPT de traducción alterada producido alterando los codones de toda la secuencia de nucleótidos de NPT con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus 40 vacuolado de simio; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

30 La figura 8 muestra el constructo pNC5/hMBL. Cada uno de los siguientes indica: PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento del conejo; hMBL: ADNc de lectina de unión a manosa humana; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovino; PdSV: promotor del virus 40 vacuolado de simio sin potenciador; Cd90NPT: gen de NPT de traducción alterada producido por alteración de los codones en el intervalo de 90 bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos de NPT con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus 40 vacuolado de simio; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

35 La figura 9 muestra el constructo pNC6/hMBL. Cada uno de los siguientes indica: PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento del conejo; hMBL: ADNc de lectina de unión a manosa humana; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovino; PdSV: promotor del virus 40 vacuolado de simio sin potenciador; Cd180NPT: gen de NPT de traducción alterada producido por alteración de los codones en el intervalo de 180 bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos de NPT con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus 40 vacuolado de simio; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

40 La figura 10 muestra el constructo pNC7/hMBL. Cada uno de los siguientes indica: PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento del conejo; hMBL: ADNc de lectina de unión a manosa humana; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovino; PdSV: promotor del virus 40 vacuolado de simio sin potenciador; Cd270NPT: gen de NPT de traducción alterada producido por alteración de los codones en el intervalo de 270 bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos de NPT con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus 40 vacuolado de simio; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

45 La figura 11 muestra el constructo pZC1. Cada uno de los siguientes indica: PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento del conejo; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovino; PdSV: promotor del virus 40 vacuolado de simio sin potenciador; Zeo: ADNc del gen de resistencia

a la zeocina (gen *Sh ble*); PASV: señal de adición de poliA del virus 40 vacuolado de simio; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

5 La figura 12 muestra el constructo pZC2. Cada uno de los siguientes indica: PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento del conejo; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovino; PdSV: promotor del virus 40 vacuolado de simio sin potenciador; CdZeo: gen de resistencia a la zeocina de traducción alterada (gen *Sh ble*) producido por alteración de los codones de toda la secuencia de nucleótidos del gen de resistencia a zeocina con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus 40 vacuolado de simio; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

10 La figura 13 muestra el constructo pZC5. Cada uno de los siguientes indica: PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento del conejo; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovino; PdSV: promotor del virus 40 vacuolado de simio sin potenciador; Cd90Zeo: gen de resistencia a zeocina (gen *Sh ble*) de traducción alterada producido por alteración de los codones en el intervalo de 90 bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos del gen de resistencia a zeocina con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus 40 vacuolado de simio; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

20 La figura 14 muestra el constructo pZC7. Cada uno de los siguientes indica: PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento del conejo; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovino; PdSV: promotor del virus 40 vacuolado de simio sin potenciador; Cd180Zeo: gen de resistencia a la zeocina (gen *Sh ble*) de traducción alterada producido por alteración de los codones en el intervalo de 180 bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos del gen de resistencia a zeocina con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus 40 vacuolado de simio; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

25 La figura 15 muestra el constructo pZC1/hMBL. Cada uno de los siguientes indica: PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento del conejo; hMBL: ADNc de lectina de unión a manosa humana; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovino; PdSV: promotor del virus 40 vacuolado de simio sin potenciador; Zeo: ADNc del gen de resistencia a zeocina (gen *Sh ble*); PASV: señal de adición de poliA del virus 40 vacuolado de simio; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

30 La figura 16 muestra el constructo pZC2/hMBL. Cada uno de los siguientes indica: PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento del conejo; hMBL: ADNc de lectina de unión a manosa humana; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovino; PdSV: promotor del virus 40 vacuolado de simio sin potenciador; CdZeo: gen de resistencia a la zeocina (gen *Sh ble*) de traducción alterada, producido por alteración de los codones de toda la secuencia de nucleótidos del gen de resistencia a zeocina con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus 40 vacuolado de simio; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

40 La figura 17 muestra el constructo pZC5/hMBL. Cada uno de los siguientes indica: PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento del conejo; hMBL: ADNc de lectina de unión a manosa humana; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovino; PdSV: promotor del virus 40 vacuolado de simio sin potenciador; Cd90Zeo: gen de resistencia a la zeocina (gen *Sh ble*) de traducción alterada producido por alteración de los codones en el intervalo de 90 bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos del gen de resistencia a zeocina con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus 40 vacuolado de simio; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

45 La figura 18 muestra el constructo pZC7/hMBL. Cada uno de los siguientes indica: PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento del conejo; hMBL: ADNc de lectina de unión a manosa humana; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovino; PdSV: promotor del virus 40 vacuolado de simio sin potenciador; Cd180Zeo: gen de resistencia a la zeocina (gen *Sh ble*) de traducción alterada producido por alteración de los codones en el intervalo de 180 bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos del gen de resistencia a zeocina con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus 40 vacuolado de simio; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

50 La figura 19 muestra el constructo pBC1. Cada uno de los siguientes indica: PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento del conejo; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovino; PdSV: promotor del virus 40 vacuolado de simio sin potenciador; Bsd: ADNc del gen de resistencia a blastidina (gen *bsd*); PASV: señal de adición de poliA del virus 40 vacuolado de simio; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

La figura 20 muestra el constructo pBC6. Cada uno de los siguientes indica: PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento del conejo; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovino; PdSV: promotor del virus 40 vacuolado de simio sin potenciador; Cd120Bsd: gen de resistencia a blasticidina de traducción alterada (gen bsd) producido por alteración de los codones en el intervalo de 120 bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos del gen de resistencia a blasticidina con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus 40 vacuolado de simio; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

La figura 21 muestra el constructo pBC1/hMBL. Cada uno de los siguientes indica: PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento del conejo; hMBL: ADNc de lectina de unión a manosa humana; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovino; PdSV: promotor del virus 40 vacuolado de simio sin potenciador; Bsd: ADNc del gen de resistencia a blasticidina (gen bsd); PASV: señal de adición de poliA del virus 40 vacuolado de simio; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

La figura 22 muestra el constructo pBC6/hMBL. Cada uno de los siguientes indica: PCMV: promotor de citomegalovirus; INRBG: intrón de la hormona de crecimiento del conejo; hMBL: ADNc de lectina de unión a manosa humana; PABGH: señal de adición de poliA del gen de la hormona de crecimiento bovino; PdSV: promotor del virus 40 vacuolado de simio sin potenciador; Cd120Bsd: gen de resistencia a blasticidina de traducción alterada (gen bsd) producido por alteración de los codones en el intervalo de 120 bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos del gen de resistencia a blasticidina con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos; PASV: señal de adición de poliA del virus 40 vacuolado de simio; y Amp^r: marcador de selección (resistencia a ampicilina) en *E. coli*.

Modo para llevar a cabo la invención

Alterando los codones de un gen de resistencia a fármacos (gen de NPT, gen de resistencia a zeocina, o gen de resistencia a blasticidina) con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos para atenuar completamente la expresión del gen de resistencia a fármaco, los presentes inventores hicieron que fuera difícil la supervivencia por selección de fármaco en el medio (selección de neomicina (por ejemplo G418), selección de zeocina o selección de blasticidina) incluso para transformantes a menos que el gen del plásmido incorporado esté integrado en una posición del cromosoma con propiedades de expresión muy altas.

Más específicamente, la presente invención proporciona vectores de expresión para inducir una producción de alto nivel de proteínas recombinantes en células huésped de mamífero como se define en las reivindicaciones.

Un vector de expresión de la presente descripción o invención, respectivamente, se puede construir mediante la inclusión de lo siguiente en un vector principal:

(a) un casete del gen de resistencia a fármacos de traducción alterada, cuya expresión se debilita alterando codones con los codones menos frecuentemente utilizados en un mamífero; y

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

La presente invención altera notablemente el mecanismo de expresión del gen de resistencia a fármacos en la célula huésped transformada alterando los codones de un gen de resistencia a fármacos con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos y utilizando promotores con menor propiedad de inducción de expresión del gen de resistencia a fármacos para el constructo del casete del gen de resistencia a fármacos (cistrón). En la presente invención, "casete del gen" se refiere a una unidad con la composición básica del promotor, gen estructural y señal de poliadenilación (poliA) que expresa la proteína mediante transcripción/traducción, y también puede incluir como secuencias de inserción secuencias de ADN asociadas con cualquiera de estas secuencias o cualquiera de las secuencias opcionales de ADN. Los casetes de genes de resistencia a fármacos de la presente invención se definen como "casetes de genes de resistencia a fármacos de traducción alterada" porque difieren de aquellos con un promotor simplemente atenuado, y permiten específicamente la adquisición de cepas resistentes a fármacos que tienen el gen plasmídico integrado en el punto caliente transcripcional. En la presente invención, los genes de resistencia a fármacos incluyen un gen de resistencia a neomicina (gen de neomicina fosfotransferasa, gen de NTP), o un gen de resistencia a blasticidina. Se describe además un gen de resistencia a zeocina.

En la presente invención, "los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos" se refiere preferiblemente, por ejemplo, a los codones menos frecuentemente utilizados en seres humanos. Los codones menos frecuentemente utilizados en humanos incluyen los codones descritos en el documento por Kim y colaboradores (Gene, 199, pág. 293, 1997). 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 estos.

En la presente invención, "atenuar la expresión" indica la reducción de la expresión génica en los niveles de transcripción y/o traducción, y específicamente, esto puede conseguirse alterando los codones con los codones "menos frecuentemente utilizados en los mamíferos".

5 En el "casete del gen de resistencia a fármacos 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 al 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, están alterados. El intervalo de las regiones de codones alterados se puede determinar arbitrariamente considerando otras condiciones del vector.

10 Como promotor del "casete del gen de resistencia a fármacos de traducción alterada" mencionado anteriormente, se pueden usar los promotores derivados del promotor de un gen de una proteína que es normalmente difícil de expresar en una célula de mamífero, o promotores producidos suprimiendo el potenciador de un promotor normal. Más específicamente, se utilizan preferiblemente un promotor producido por supresión de la región potenciadora del promotor del antígeno del virus SV40 (Mol. Cell Biol., 6, pág. 2593, 1986), o promotores con una propiedad de expresión equivalente muy baja.

15 La integración del ADN plasmídico en un punto caliente transcripcional en el cromosoma de la célula huésped puede lograrse como resultado de la selección con neomicina (G418), zeocina, blastidina o de acuerdo con las propiedades del casete del gen de resistencia a fármacos, pero la expresión de la proteína misma derivada del gen foráneo en el punto caliente transcripcional 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 lo sucesivo, denominado MCS),
20 donde se insertan los genes de la proteína, se seleccionarán de entre aquellos que tienen la propiedad inductora de expresión más fuerte. Ejemplos de los promotores incluyen el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (hCMV MIE: Cell, 41, pág. 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, pág. 2, 2002), y el promotor de β -actina (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 84, pág. 4831, 1987); y ejemplos de poliA incluyen la secuencia de poliA derivada de la hormona de crecimiento bovina (DNA 5, pág. 115, 1986). En este caso, un fragmento de ADN que porta un sitio de clonación múltiple para insertar el gen de una proteína de interés se denomina un "casete de expresión génica".

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

30 Además, la presente invención proporciona un método para producir transformantes con una capacidad para producir proteínas derivadas de genes foráneos en niveles elevados y una capacidad para resistir un fármaco, que comprende las etapas de insertar un gen foráneo en los vectores de expresión antes mencionados y la transformación de células huésped utilizando los vectores de expresión.

35 Ejemplos específicos incluyen un método para obtener transformantes con alta capacidad de producción de proteínas, que implica la inserción de un gen foráneo que codifica una proteína que se expresa en el sitio de clonación múltiple (de aquí en adelante denominado como MCS) de un vector de expresión de la presente invención, transformando a continuación células huésped con el vector de expresión usando un método de transfección (ejemplos del método de transfección a que se hace referencia en la presente invención incluyen métodos bien conocidos por los expertos en la técnica tales como el método de lipofectina, el método de electroporación, el método de fosfato de calcio y el método de microinyección), y luego seleccionar por la resistencia al fármaco (neomicina, zeocina o blastidina).

40 En la presente invención, las células huésped no están particularmente limitadas siempre que sean células adecuadas para expresar proteínas derivadas de genes foráneos, pero preferiblemente incluyen, por ejemplo, células de mamífero y más preferiblemente células de ovario de hámster chino (células CHO).

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

Además, la presente invención proporciona métodos para producir una proteína derivada de un gen foráneo, que comprenden las etapas de:

- (a) insertar un gen foráneo en un vector de expresión de la presente invención;
- (b) transformar una célula huésped con el vector de expresión;
- 50 (c) cultivar el transformante en un medio suplementado con un fármaco (neomicina, zeocina o blastidina); y
- (d) recoger la proteína derivada del gen foráneo del transformante cultivado.

En la presente invención, en la etapa (c) mencionada anteriormente, los transformantes (colonias) que muestran una expresión de proteína de alta eficacia se pueden seleccionar cultivando en un medio suplementado con un fármaco (neomicina, zeocina o blastidina). Los transformantes seleccionados pueden cultivarse continuamente en el mismo medio, o pueden cultivarse después de la transferencia a otro medio tal como un medio para la expresión a gran escala.

5 En la presente invención, los medios para cultivar o naturalizar transformantes no están particularmente limitados, sino que son, por ejemplo, preferiblemente un medio exento de suero, y más preferiblemente un medio CD o un medio CD suplementado con aditivos no basados en animales.

10 En la presente invención, cuando se recogen proteínas derivadas de genes foráneos a partir de transformantes cultivados, las proteínas pueden purificarse por métodos conocidos por los expertos en la técnica (filtración, centrifugación, purificación en columna, etc.). Las proteínas derivadas de genes foráneos pueden expresarse como proteínas de fusión con otras proteínas para facilitar la purificación.

Además, la presente invención proporciona un método de cribado 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;

15 (b) transformar una célula huésped con el vector de expresión; y

(c) cultivar el transformante en un medio suplementado con un fármaco (neomicina, zeocina o blastidina).

[Ejemplos]

A continuación, se ilustrará específicamente la presente invención con referencia a los siguientes Ejemplos.

[Ejemplo 1] Construcción de pNC1, pNC2, pNC2, pNC6 y pNC7

20 Usando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, se construyeron los vectores de la presente invención, respectivamente, pNC1, pNC2, pNC5, pNC6 y pNC7. La secuencia de nucleótidos completa del vector de cadena principal pNC1 se muestra en la SEQ ID NO: 1. pNC1 transporta el ADNc de NPT de tipo silvestre entre los nucleótidos No. 1784 y No. 2578 (figura 1).

25 pNC2 se construye sustituyendo los nucleótidos No. 1784 a No. 2578 en la secuencia de pNC1 con la secuencia de la SEQ ID NO: 2. La región sustituida de pNC2 se introduce con un gen de NPT de traducción alterada en el que los codones de la secuencia completa de nucleótidos de NPT ha sido alterada con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos (figura 2).

30 pNC5 se construye sustituyendo los nucleótidos No. 1784 a No. 2578 en la secuencia de pNC1 con la secuencia de la SEQ ID NO: 3. La región sustituida de pNC5 se introduce con un gen de NPT de traducción alterada en el que los codones en el intervalo de 90 bases desde el extremo 5' (11,3% de alteración del codón) de la secuencia de nucleótidos de NPT se ha alterado con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos (figura 3).

35 pNC6 se construye sustituyendo los nucleótidos No. 1784 a No. 2578 en la secuencia de pNC1 con la secuencia de la SEQ ID NO: 4. La región sustituida de pNC6 se introduce con un gen de NPT de traducción alterada en el que los codones en el intervalo de 180 bases desde el extremo 5' (22,6% de alteración de codón) de la secuencia de nucleótidos de NPT se ha alterado con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos (figura 4).

pNC7 se construye sustituyendo los nucleótidos No. 1784 a No. 2578 en la secuencia de pNC1 con la secuencia de la SEQ ID NO: 5. La región sustituida de pNC7 se introduce con un gen de NPT de traducción alterada en el que los codones en el rango de 270 bases desde el extremo 5' (34,0% de alteración de codón) de la secuencia de nucleótidos de NPT se ha alterado con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos (figura 5).

40 **[Ejemplo 2] Construcción de pNC1/hMBL, pNC2/hMBL, pNC5/hMBL, pNC6/hMBL y pNC7/hMBL**

45 Utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, los nucleótidos No. 1267 a No. 1275 en los vectores de la presente invención o descripción, respectivamente, pNC1, pNC2, pNC5, pNC6 y pNC7, se sustituyeron por un ADNc que codifica la lecitina de unión a manano humano (MBL) de la SEQ ID NO: 6 (denominada en lo sucesivo hMBL), para construir pNC1/hMBL (figura 6), pNC2/hMBL (figura 7), pNC5/hMBL (figura 8), pNC6/hMBL (figura 9), y pNC7/hMBL (figura 10).

[Ejemplo 3] Transfección de pNC1/hMBL, pNC2/hMBL, pNC5/hMBL, pNC6/hMBL y pNC7/hMBL en células CHO y selección de G418 usando un medio CD o un medio CD suplementado con aditivos no basados en animales

Se transfectaron 10 µg de pNC1/hMBL, pNC2/hMBL, pNC5/hMBL, pNC6/hMBL y pNC7/hMBL en 5,0 x 10⁵ células CHO (células CHO DG44) en matraces de cultivo de 25 cm² utilizando el método de lipofectina (utilizando Lipofectamina^{MR} LTX; Invitrogen). La transfección génica se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cuarenta y ocho horas después de la transfección génica, se contó el número de células, y después se diluyeron las células en IS CHO-CD con medio hidrolizado (IS Japón) suplementado con Gluta MAX^{MR}-I (Invitrogen) 4 mM. Las células se sembraron en placas de microtitulación de 96 pozos cada una en concentraciones de 1.000 células/pozo y 100 células/pozo, un total de 10 placas (960 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 (clon resistente a G418). Los clones resistentes a G418 se seleccionaron arbitrariamente a partir de las células viables, se transfirieron a placas de 24 pozos junto con IS CHO-CD con medio hidrolizado (IS Japón) suplementado con Gluta MAX^{MR} (Invitrogen) 4 mM y se cultivaron hasta que las células ocupaban 1/3 o más de cada pozo. Se colocaron 0,4 ml de cada clon en un tubo estéril y se centrifugaron 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) suplementado con Gluta MAX^{MR}-I (Invitrogen) 4 mM). Después de contar el número de células, se diluyeron las células con el medio hasta 5,0 x 10⁵ células/mL, luego se transfirieron 0,2 mL de ellas a nuevas placas de 24 pozos, se cultivaron las células en presencia de gas dióxido de carbono al 5% a 37°C durante 72 horas. A continuación, se centrifugaron las células a 9.300 x g durante dos minutos y se recogió el sobrenadante. A continuación, se determinó el nivel de producción de MBL en los sobrenadantes del cultivo.

[Ejemplo 4] Determinación de los niveles de producción de MBL mediante los clones transfectados con pNC1/hMBL, pNC5/hMBL, pNC6/hMBL y pNC7/hMBL

Se ensayó el nivel de producción mediante ELISA. Se recubrieron placas de 96 pozos (F96 MAXI SORP Nunc-Immuplate, catálogo No. 442404, Nunc) con 1 µg/ml de anticuerpo anti-MBL humano (obsequio del Dr. Ohtani de la Asahikawa Medical University, Japón) diluido con un regulador de recubrimiento (Na₂CO₃ 15 mM, NaHCO₃ 35 mM, NaN₃ al 0,05%, pH 9,6) a 4°C durante 16 horas. Después del bloqueo con Block Ace (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) al 4%, se aplicó el sobrenadante de cultivo de 72 horas (dilución de 1/1.000 a 1/100.000), dilución serial dos veces (0,3125 a 20 ng/ml) de MBL humana purificada (obsequio del Dr. Ohtani de la Asahikawa Medical University, Japón) en IS CHO-CD con medio hidrolizado (IS Japón), que es un medio exento de suero para las células CHO, o 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 un a hora. Esto se incubó adicionalmente con 0,1 µg/ml de anticuerpo monoclonal de MBL humana biotinilada (obsequio del Dr. Ohtani en 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 se había incubado a 37°C durante 30 minutos, a 100 µL/pozo, y se lo dejó reaccionar a 37°C durante 45 minutos. Se aplicó adicionalmente el kit TMB del sustrato peroxidasa (2 gotas de regulador, 3 gotas de TMB, 2 gotas de peróxido de hidrogeno/5 mL, Vector), que se había incubado a temperatura ambiente durante 30 minutos, a 100 µL/pozo y después de dejarlos reaccionar a temperatura ambiente durante 15 minutos, se añadió ácido fosfórico 1 M a 100 µL/pozo para detener la reacción. La concentración de proteína se determinó usando un lector de microplacas (Modelo 680, fabricado por BioRad). Los resultados obtenidos por el método de ELISA y las tres muestras más importantes que muestran altos niveles de producción de MBL humana se muestran en la Tabla 1. El clon con el nivel de producción más alto mostró una productividad significativamente alta en comparación con el vector con los codones no alterados.

[Tabla 1]

Producción de hMBL en un clon resistente a G418	
Nombre del clon	Cantidad de producción (µg/ml)
pNC1-1	14,9
pNC1-17	13,2
pNC1-49	12,2
pNC2-23	14,7
pNC2-37	20,0
pNC2-48	23,3

pNC5-2	9,2
pNC5-3	9,5
pNC5-5	9,9
pNC6-7	13,7
pNC6-21	16,0
pNC6-24	11,5
pNC7-5	32,5
pNC7-29	36,4
pNC7-30	46,1

[Ejemplo 5] niveles de producción de hMBL mediante clones de células transfectadas con pNC1/hMBL, pNC2/hMBL, pNC5/hMBL, pNC6/hMBL y pNC7/hMBL

5 La distribución de hMBL expresada por los vectores de expresión pNC1, pNC2, pNC2, pNC6 y pNC7 de la presente invención o descripción, respectivamente, en cada clon se muestra en la Tabla 2.

Para pNC1, entre las cincuenta cepas resistentes a G418, 72,0% produjeron hMBL a 0 µg/mL o más hasta menos de 5 µg/mL. Catorce de las cincuenta cepas (28,0%) mostraron niveles de producción de 5 µg/mL o más. Siete de las cincuenta cepas (14,0%) mostraron niveles de producción de 10 µg/mL o más. La cepa que muestra el nivel de producción más alto produjo 15,0 µg/ml en 3 días.

10 Para pNC2, entre las cincuenta cepas resistentes a G418, el 40,0% produjo hMBL a 0 µg/mL o más hasta menos de 5 µg/mL. Treinta de las cincuenta cepas (60,0%) mostraron niveles de producción de 5 µg/mL o más. Catorce de las cincuenta cepas (28,0%) mostraron niveles de producción de 10 µg/mL o más. Dos de las cincuenta cepas (4,0%) mostraron niveles de producción de 15 µg/ml o más. La cepa que muestra el nivel de producción más alto produjo 23,3 µg/ml en 3 días.

15 Para pNC5, entre las cincuenta cepas resistentes a G418, el 70,0% produjo hMBL a 0 µg/mL o más hasta menos de 5 µg/mL. Quince de las cincuenta cepas (30,0%) mostraron niveles de producción de 5 µg/mL o más. La cepa que mostró el mayor nivel de producción produjo 9,9 µg/mL en 3 días.

20 Para pNC6, entre las cincuenta cepas resistentes a G418, el 60,0% produjo hMBL a 0 µg/mL o más hasta menos de 5 µg/mL. Veinte de las cincuenta cepas (40,0%) mostraron niveles de producción de 5 µg/mL o más. Cuatro de las cincuenta cepas (8,0%) mostraron niveles de producción de 10 µg/mL o más. Una de cada cincuenta cepas (2,0%) mostró niveles de producción de 15 µg/mL o más. La cepa que muestra el nivel de producción más alto produjo 16,0 µg/ml en 3 días.

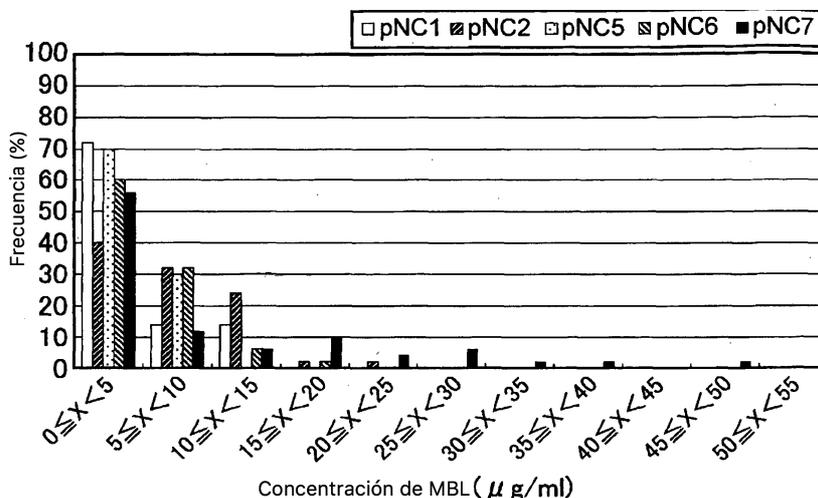
25 Para pNC7, entre las cincuenta cepas resistentes a G418, el 56,0% produjo hMBL a 0 µg/mL o más hasta menos de 5 µg/mL. Veintidós de las cincuenta cepas (44,0%) mostraron niveles de producción de 5 µg/mL o más. Dieciséis de las cincuenta cepas (32,0%) mostraron niveles de producción de 10 µg/mL o más. Sorprendentemente, trece de las cincuenta cepas (26,0%) mostraron niveles de producción de 15 µg/mL o más. La cepa que muestra el nivel de producción más alto produjo 46,1 µg/mL en 3 días.

30 Este fue el nivel más alto cuando se comparó con los datos de clones iniciales antes de la amplificación génica por vectores de expresión representativos reportados en la literatura (DNA, 7, pág. 651, 1988, Biotechnology, 10, pág. 1455, 1992, Biotechnology, 8, pág. 662, 1990, Gene 76, pág. 19, 1989, y Biotechnology, 9, pág. 64, 1991).

35 El cribado de células recombinantes por amplificación génica usualmente requiere de seis meses a un año. Debido a que existen grandes variaciones debido a las condiciones de cultivo y a las concentraciones de agente estimulador de amplificación, se considera apropiado comparar la eficacia primaria de los vectores de expresión usando el nivel de expresión de amplificación previa de los clones iniciales. Esto reveló que la eficacia de los vectores de expresión de la presente invención es muy alta. Los resultados confirmaron que mientras que los vectores de la presente invención producen muy pocas cepas resistentes a G418, permiten el establecimiento de cepas celulares que son capaces de

producir altos niveles de proteínas de interés con muy alta eficiencia. Esto demostró que los vectores de expresión de la presente invención permiten niveles muy altos de expresión de proteínas.

[Tabla 2]



5 **[Ejemplo 6]** Construcción de pZC1, pZC2, pZC5 y pZC7

Usando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, se construyeron pZC1, pZC2, pZC5 y pZC7, que son vectores de la presente invención. pZC1 transporta el gen de resistencia a zeocina de tipo silvestre (gen Sh ble) descrito en la SEQ ID NO: 7 entre los nucleótidos No. 1784 a No. 2578 en la secuencia del vector de cadena principal pNC1 (figura 11). pZC2 se construye sustituyendo los nucleótidos No. 1784 a No. 2578 en la secuencia de nucleótidos de pNC1 con la secuencia de la SEQ ID NO: 8. La región sustituida de pZC2 se introduce con un gen de resistencia a zeocina de traducción alterada en el que los codones en el nucleótido del gen de resistencia a zeocina han sido alterados con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos (figura 12).

10

15

pZC5 se construye sustituyendo los nucleótidos No. 1784 a No. 2578 en la secuencia de pNC1 con la secuencia de la SEQ ID NO: 9. La región sustituida de pZC5 se introduce con un gen de resistencia a zeocina de traducción alterada en el que los codones en el intervalo de 90 bases desde el extremo 5' (24,0% de alteración del codón) de la secuencia de nucleótidos del gen de resistencia a zeocina han sido alterados con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos (figura 13).

20

pZC7 se construye sustituyendo los nucleótidos No. 1784 a No. 2578 en la secuencia de pNC1 con la secuencia de la SEQ ID NO: 10. La región sustituida de pZC7 se introduce con un gen de resistencia a zeocina de traducción alterada en el que los codones en el intervalo de 180 bases desde el extremo 5' (48,0% de alteración del codón) de la secuencia de nucleótidos del gen de resistencia a zeocina han sido alterados con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos (figura 14).

[Ejemplo 7] Construcción de pZC1/hMBL, pZC2/hMBL, pZC5/hMBL y pZC7/hMBL

25

Utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, se sustituyeron los nucleótidos No. 1267 a No. 1275 de vectores de la presente invención, pZC1, pZC2, pZC5 y pZC7, con un ADNc que codifica la lectina de unión a manano humano (MBL) de la SEQ ID NO: 6 (en lo sucesivo denominado hMBL), para construir pZC1/hMBL (figura 15), pZC2/hMBL (figura 16), pZC5/hMBL (figura 17) y pZC7/hMBL (figura 18).

[Ejemplo 8] Transfección de pZC1/hMBL, pZC2/hMBL, pZC5/hMBL y pZC7/hMBL en células CHO, y selección de zeocina utilizando un medio CD o un medio CD suplementado con aditivos no basados en animales

30

Se transfectaron 10 µg de pZC1/hMBL, pZC2/hMBL, pZC5/hMBL, pZC6/hMBL y pZC7/hMBL en 5,0 x 10⁵ células CHO (células CHO DG44) en matraces de cultivo de 25 cm² utilizando el método de lipofectina (utilizando Lipofectamina^{MR} LTX; Invitrogen). La transfección génica se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cuarenta y ocho horas después de la transfección génica, se contó el número de células, y después se diluyeron las células en IS CHO-CD con medio hidrolizado (IS Japón) suplementado con Gluta MAX^{MR}-I (Invitrogen) 4 mM y 200 µg/mL de zeocina (Invitrogen). Las células se sembraron en placas de microtitulación de 96 pozos (480 pozos) a una en concentraciones de 4.000 células/pozo, y después de cultivar en presencia de gas dióxido de carbono al 5% a 37°C durante aproximadamente tres semanas, se observaron células viables (clon resistente a zeocina). Los clones resistentes a

35

5 zeocina se seleccionaron arbitrariamente a partir de las células viables, se transfirieron a placas de 24 pozos junto con IS CHO-CD con medio hidrolizado (IS Japón) suplementado con Gluta MAX^{MR} (Invitrogen) 4 mM y 200 µg/mL de zeocina (Invitrogen), y se cultivaron hasta que las células ocupaban 1/3 o más de cada pozo. Se colocaron 0,4 ml de cada clon en un tubo estéril y se centrifugaron 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) suplementado con Gluta MAX^{MR}-I (Invitrogen) 4 mM). Después de contar el número de células, se diluyeron las células con el medio hasta 5,0 x 10⁵ células/mL, luego se transfirieron 0,2 mL de ellas a nuevas placas de 24 pozos, se cultivaron las células en presencia de gas dióxido de carbono al 5% a 37°C durante 72 horas. A continuación, se centrifugaron las células a 9.300 x g durante dos minutos y se recogió el sobrenadante. A continuación, se determinó el nivel de producción de MBL en los sobrenadantes del cultivo.

[Ejemplo 9] Determinación de los niveles de producción de MBL mediante los clones transfectados pZC1/hMBL, pZC5/hMBL y pZC7/hMBL

15 Se ensayó el nivel de producción mediante ELISA. Se recubrieron placas de 96 pozos (F96 MAXI SORP Nunc-Immunoplate, catálogo No. 442404, Nunc) con 1 µg/ml de anticuerpo anti-MBL humano (obsequio del Dr. Ohtani de la Asahikawa Medical University, Japón) diluido con un regulador de recubrimiento (Na₂CO₃ 15 mM, NaHCO₃ 35 mM, NaN₃ al 0,05%, pH 9,6) a 4°C durante 16 horas. Después del bloqueo con Block Ace (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) al 4%, se aplicó el sobrenadante de cultivo de 72 horas (dilución de 1/1.000 a 1/100.000), dilución serial dos veces (0,3125 a 20 ng/ml) de MBL humana purificada (obsequio del Dr. Ohtani de la Asahikawa Medical University, Japón) en IS CHO-CD con medio hidrolizado (IS Japón), que es un medio exento de suero para las células CHO, o IS CHO con medio hidrolizado (IS Japón) a las placas a razón de 100 µL/pozo, y se incubaron las placas a 37°C durante un a hora. Esto se incubó adicionalmente con 0,1 µg/ml de anticuerpo monoclonal de MBL humana biotinilada (obsequio del Dr. Ohtani en 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 se había incubado a 37°C durante 30 minutos, a 100 µL/pozo, y se lo dejó reaccionar a 37°C durante 45 minutos. Se aplicó adicionalmente el kit TMB de sustrato peroxidasa (2 gotas de regulador, 3 gotas de TMB, 2 gotas de peróxido de hidrogeno/5 mL, Vector), que se había incubado a temperatura ambiente durante 30 minutos, a 100 µL/pozo y después de dejarlos reaccionar a temperatura ambiente durante 15 minutos, se añadió ácido fosfórico 1 M a 100 µL/pozo para detener la reacción. La concentración de proteína se determinó usando un lector de microplacas (Modelo 680, fabricado por BioRad). Los resultados obtenidos por el método de ELISA y las tres muestras más importantes que muestran altos niveles de producción de MBL humana se muestran en la Tabla 3. Los clones con vectores con codones alterados mostraron una productividad equivalente a la del vector con los codones no alterados.

[Tabla 3]

Producción de hMBL en un clon resistente a zeocina	
Nombre del clon	Cantidad de producción (µg/ml)
pZC1-23	11,7
pZC1-26	8,8
pZC1-27	14,3
pZC1-30	15,1
pZC1-46	12,4
pZC5-1	12,2
pZC5-3	7,7
pZC5-12	7,0
pZC5-39	8,3
pZC5-44	8,2
pZC7-4	7,9

pZC7-5	9,1
pZC7-6	8,5
pZC7-9	10,1
pZC7-38	8,8

[Ejemplo 10] Niveles de producción de hMBL mediante los clones de células transfectadas pZC1/hMBL, pZC5/hMBL y pZC7/hMBL

5 La distribución de hMBL expresada por los vectores de expresión pZC1, pZC2 y pZC7 de la presente descripción en cada clon se muestra en la Tabla 4.

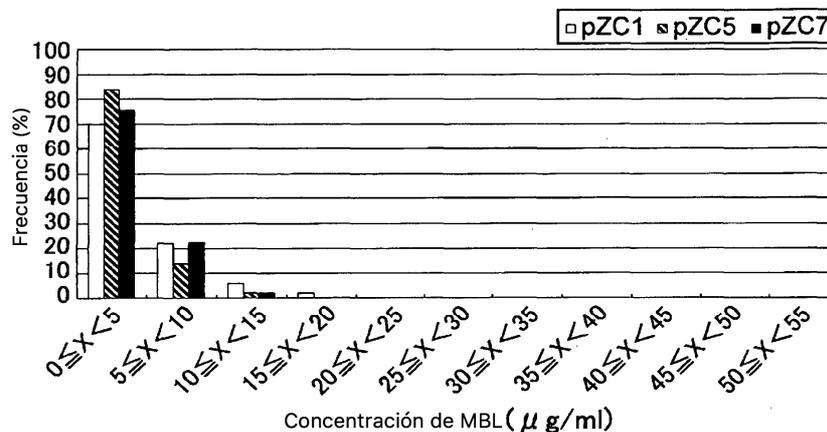
10 Para pZC1, entre las cincuenta cepas resistentes a zeocina, el 70,0% produjo hMBL a 0 µg/mL o más hasta menos de 5 µg/mL. Quince de las cincuenta cepas (30,0%) mostraron niveles de producción de 5 µg/mL o más. Cuatro de las cincuenta cepas (8,0%) mostraron niveles de producción de 10 µg/mL o más. Una de las cincuenta cepas (2,0%) mostró niveles de producción de 15 µg/mL o más. La cepa que muestra el nivel de producción más alto produjo 15,1 µg/ml en 3 días.

Para pZC5, entre las cincuenta cepas resistentes a zeocina, el 84,0% produjo hMBL a 0 µg/mL o más hasta menos de 5 µg/mL. Ocho de las cincuenta cepas (16,0%) mostraron niveles de producción de 5 µg/mL o más. Una de las cincuenta cepas (2,0%) mostró niveles de producción de 10 µg/mL o más. La cepa que muestra el nivel de producción más alto produjo 12,2 µg/ml en 3 días.

15 Para pZC7, entre las 49 cepas resistentes a zeocina, el 75,5% produjo hMBL a 0 µg/mL o más hasta menos de 5 µg/mL. Doce de las 49 cepas (24,5%) mostraron niveles de producción de 5 µg/mL o más. Una de las 49 cepas (2,0%) mostró niveles de producción de 10 µg/mL o más. La cepa que muestra el nivel de producción más alto produjo 10,1 µg/ml en 3 días.

20 Entre los pZC, el nivel de producción del clon que mostró el nivel más alto de producción de proteína foránea fue de 15,1 µg/ml en 3 días; y entre los pNC, el nivel de producción del clon que mostró el mayor nivel de producción de proteína foránea fue de 46,1 µg/mL en 3 días. Esto mostró que mediante la alteración de los codones del gen de resistencia a fármacos incluido como componente con los codones menos frecuentemente utilizados, las productividades de proteína foránea de los pNC aumentaron significativamente. Con respecto a pZC, se puede iniciar la región de alteración del codón del gen de resistencia al fármaco desde el lado del extremo terminal C o la región central de la secuencia. Alternativamente, se puede pensar colocar alternativamente codones que serán alterados y codones que no serán alterados, etc. De cualquier manera, ajustando los codones que serán alterados, aumentará la eficacia de selección del fármaco, y se cree que tales vectores se insertan en una posición en el cromosoma de las células competentes que tiene una capacidad de expresión muy alta, como en el caso de los pNC.

[Tabla 4]



[Ejemplo 11] Construcción de pBC1 y pBC6

Utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, se construyeron vectores de la presente descripción o invención, respectivamente, pBC1 y pBC6. pBC1 transporta el gen de resistencia a blasticidina de tipo silvestre (gen *bsd*) descrito en la SEQ ID NO: 11 entre los nucleótidos No. 1784 a No. 2578 en la secuencia del vector de cadena principal pNC1 (figura 19).

pBC6 se construye sustituyendo los nucleótidos No. 1784 a No. 2578 en la secuencia de pNC1 con la secuencia de la SEQ ID NO: 12. La región sustituida de pBC6 se introduce con un gen de resistencia a la blasticidina de traducción alterada en el que los codones en el intervalo de 120 bases desde el extremo 5' (30,1% de alteración del codón) de la secuencia de nucleótidos del gen de resistencia a la blasticidina han sido alterados con los codones menos frecuentemente utilizados en mamíferos (figura 20).

[Ejemplo 12] Construcción de pBC1/hMBL y pBC6/hMBL

Usando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, los nucleótidos No. 1267 a No. 1275 de vectores de la presente descripción o invención, respectivamente, pBC1 y pBC6, se sustituyeron por un ADNc que codifica la lectina de unión a manano humano (MBL) de la SEQ ID NO: 6 (en lo sucesivo denominado hMBL), para construir pBC1/hMBL (figura 21) y pBC6/hMBL (figura 22).

[Ejemplo 13] Transfección de pBC1/hMBL y pBC6/hMBL en células CHO, y selección de blasticidina usando un medio CD o un medio CD suplementado con aditivos no basados en animales

Se transfectaron 10 µg de pBC1/hMBL y pBC6/hMBL en 5,0 x 10⁵ células CHO (células CHO DG44) en matraces de cultivo de 25 cm² usando el método de lipofectina (usando Lipofectamina^{MR} LTX; Invitrogen). La transfección génica se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cuarenta y ocho horas después de la transfección génica, se contó el número de células y después se diluyeron las células en IS CHO-CD con medio hidrolizado (IS Japón) suplementado con Gluta MAX^{MR}-I (Invitrogen) 4 mM y 10 µg/mL de blasticidina (Invitrogen). Las células se sembraron en placas de microtitulación de 96 pozos (480 pozos) a una concentración de 4.000 células/pozo, y después de cultivar en presencia de gas dióxido de carbono al 5% a 37°C durante aproximadamente tres semanas, se observaron células supervivientes (clon resistente a blasticidina): Los clones resistentes a blasticidina se seleccionaron arbitrariamente a partir de las células supervivientes, se transfirieron a placas de 24 pozos junto con el IS CHO-CD con medio hidrolizado (IS Japón) suplementado con Gluta MAX^{MR}-I (Invitrogen) 4 mM y 10 µg/mL de blasticidina (Invitrogen), y se cultivaron hasta que las células ocupaban 1/3 o más de cada pozo. Se colocaron 0,4 mL de cada clon 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) suplementado con Gluta MAX^{MR}-I (Invitrogen) 4 mM). Después de contar el número de células, las células se diluyeron con el medio hasta 5,0 x 10⁵ células/mL, luego se transfirieron 0,2 ml de ellas a nuevas placas de 24 pozos, 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 9.300 x g durante dos minutos y se recogió el sobrenadante. A continuación, se determinó el nivel de producción de MBL en el sobrenadante del cultivo.

[Ejemplo 14] Determinación del nivel de producción de MBL por clones transfectados pBC1/hMBL y pBC6/hMBL

Se ensayó el nivel de producción mediante ELISA. Se recubrieron placas de 96 pozos (F96 MAXI SORP Nunc-ImmunoPlate, catálogo No. 442404, Nunc) con 1 µg/ml de anticuerpo anti-MBL humano (obsequio del Dr. Ohtani de la Asahikawa Medical University, Japón) diluido con un regulador de recubrimiento (Na₂CO₃ 15 mM, NaHCO₃ 35 mM, NaN₃ al 0,05%, pH 9,6) a 4°C durante 16 horas. Después del bloqueo con Block Ace (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) al 4%, se aplicó el sobrenadante de cultivo de 72 horas (dilución de 1/1.000 a 1/100.000), dilución serial dos veces (0,3125 a 20 ng/ml) de MBL humana purificada (obsequio del Dr. Ohtani de la Asahikawa Medical University, Japón) en IS CHO-CD con medio hidrolizado (IS Japón), que es un medio exento de suero para las células CHO, o IS CHO con medio 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 µg/ml de anticuerpo monoclonal de MBL humana biotinilada (obsequio del Dr. Ohtani en 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 se había incubado a 37°C durante 30 minutos, a 100 µL/pozo, y se lo dejó reaccionar a 37°C durante 45 minutos. Se aplicó adicionalmente el kit TMB de sustrato peroxidasa (2 gotas de regulador, 3 gotas de TMB, 2 gotas de peróxido de hidrogeno/5 mL, Vector), que se había incubado a temperatura ambiente durante 30 minutos, a 100 µL/pozo y después de dejarlos reaccionar a temperatura ambiente durante 15 minutos, se añadió ácido fosfórico 1 M a 100 µL/pozo para detener la reacción. La concentración de proteína se determinó usando un lector de microplacas (Modelo 680, fabricado por BioRad). Los resultados obtenidos por el método de ELISA y las cinco muestras más importantes que muestran altos niveles de producción de MBL humana se muestran en la Tabla 5. Los clones con vectores con codones alterados mostraron una productividad equivalente a la del vector con los codones no alterados.

[Tabla 5]

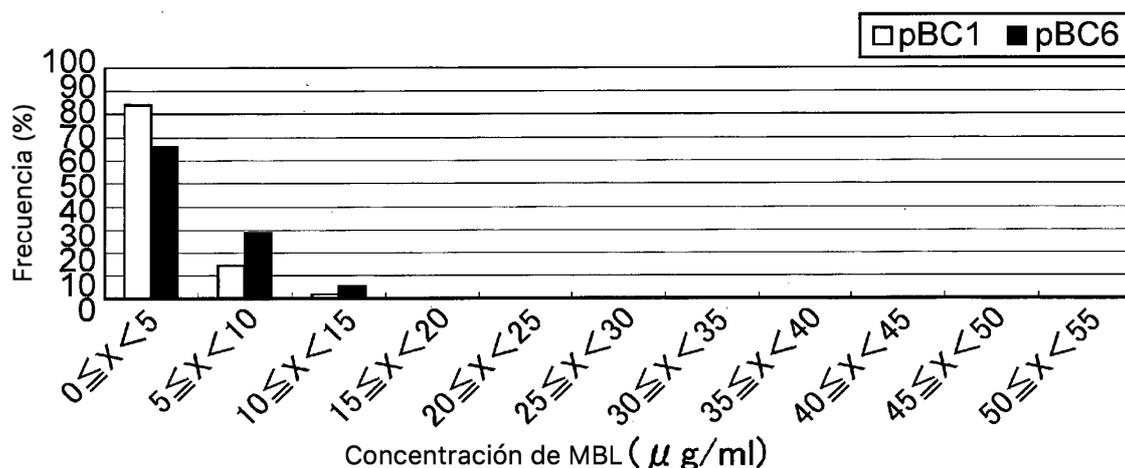
Producción de hMBL en el clon resistente a blasticidina	
Nombre del clon	Cantidad de producción (µg/ml)
pBC1-6	6,2
pBC1-19	11,2
pBC1-22	9,2
pBC1-35	7,5
pBC1-48	5,7
pBC6-13	7,9
pBC6-19	9,1
pBC6-25	11,5
pBC6-32	8,5
pBC6-45	12,5

[Ejemplo 15] Niveles de producción de hMBL mediante clones de células transfectadas pBC1/hMBL y pBC6/hMBL

La distribución de hMBL expresada por los vectores de expresión pBC1 y pBC6 de la presente descripción o invención, respectivamente, en cada clon se muestra en la Tabla 6.

- 5 Para pBC1, entre las cincuenta y seis cepas resistentes a blasticidina, 83,9% produjeron hMBL a 0 µg/mL o más hasta menos de 5 µg/mL. Nueve de las cincuenta y seis cepas (26,1%) mostraron niveles de producción de 5 µg/mL o más. Una de las cincuenta y seis cepas (1,8%) mostró niveles de producción de 10 µg/mL o más. La cepa que mostró el mayor nivel de producción produjo 11,2 µg/mL en 3 días.
- 10 Para pBC6, entre las cincuenta y nueve cepas resistentes a blasticidina, el 66,1% produjo hMBL a 0 µg/mL o más hasta menos de 5 µg/mL. Veinte de las cincuenta y nueve cepas (33,9%) mostraron niveles de producción de 5 µg/mL o más. Tres de las cincuenta y nueve cepas (5,1%) mostraron niveles de producción de 10 µg/mL o más. La cepa que muestra el nivel de producción más alto produjo 12,5 µg/ml en 3 días.
- 15 Entre los pBC, el nivel de producción del clon que mostró el nivel más alto de producción de proteína foránea fue de 12,5 µg/ml en 3 días; y entre los pNC, el nivel de producción del clon que mostró el mayor nivel de producción de proteínas foráneas fue de 46,1 µg/mL/3 días. Esto mostró que al alterar los codones del gen de resistencia a fármacos incluido como componente a los codones menos utilizados con frecuencia, las productividades de proteínas foráneas de los pNC aumentaron significativamente. Con respecto a los pBC, se puede iniciar la región de alteración del codón del gen de resistencia al fármaco desde el lado del extremo terminal C o la región central de la secuencia. Alternativamente, se puede pensar alternativamente colocar codones que serán alterados y codones que no serán alterados, etc. De cualquier manera, ajustando los codones que serán alterados, la eficacia de selección del fármaco aumentará, y se cree que tales vectores se insertan en una posición en el cromosoma de las células competentes que tiene una capacidad de expresión muy alta, como en el caso de los pNC.
- 20

[Tabla 6]



Aplicabilidad industrial

5

La presente invención puede proporcionar vectores de expresión que permitan la producción de alto nivel de proteínas derivadas de genes foráneos usando células de mamífero como huéspedes. Además, pueden producir proteínas que tienen modificaciones postraduccionales inherentes a los mamíferos y alta actividad biológica. Por lo tanto, el coste de producción de sustancias proteicas útiles tales como productos biofarmacéuticos puede reducirse significativamente.

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

Listado de secuencias

10

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

<120> Vector de expresión para producción de proteínas codificadas por un gen foráneo en células de mamífero y su uso

<130> F2-A0801P

15

<150> JP 2008-046782

<151> 2008-02-27

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

20

<211> 6078

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de vector artificialmente sintetizada

25

<400> 1

ES 2 616 021 T3

cgatgtacgg gccagatata cgcgttgaca ttgattattg actagttatt aatagtaatc 60
 aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcgttacat aacttacggt 120
 aatggcccc cctggctgac cgcccacga cccccgcca ttgacgtcaa taatgacgta 180
 tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg agtatttacg 240
 gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga 300
 cgtcaatgac ggtaaattggc ccgcctggca ttatgccag tacatgacct tatgggactt 360
 tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatgggtga tgcggttttg 420
 gcagtacatc aatgggegtg gatagcgggt tgactcacgg ggatttcaa gtctccacc 480
 cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca caaaatcaa cgggactttc caaatgtcg 540
 taacaactcc gcccattga cgcaaattgg cggtaggcgt gtacgggtgg aggtctatat 600
 aagcagagct ctctggctaa ctagagaacc cactgttaac tggcttatcg aaattgtcga 660
 ggagaacttc agggtgagtt tggggaccct tgattgttct ttcttttctg ctattgtaaa 720
 attcatgtta tatggagggg gcaaagtttt cagggtgttg tttagaatgg gaagatgtcc 780
 cttgtatcac catggaccct catgataatt ttgtttcttt cactttctac tctgttgaca 840
 accattgtct cctcttattt tcttttcatt ttctgtaact ttttcgtaa actttagctt 900
 gcatttgtaa cgaattttta aattcacttt tgtttatttg tcagattgta agtactttct 960
 ctaatcactt tttttcaag gcaatcaggg tatattatat tgtacttcag cacagtttta 1020
 gagaacaatt gttataatta aatgataagg tagaatattt ctgcatataa attctggctg 1080
 gcgtggaaat attcttattg gtagaaacaa ctacatcctg gtcacatcc tgcctttctc 1140
 tttatggtta caatgatata cactgtttga gatgaggata aaatactctg agtccaaacc 1200

ES 2 616 021 T3

gggccccctct gctaaccatg ttcattgcctt cttcttttttc ctacagctcc tgggcaacgt 1260
 gctggcgggcc gccttctaga gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt 1320
 gcccctcccc cgtgccttcc ttgaccctgg aagggtgccac tcccactgtc ctttcctaat 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
 cccatcccgc ccctaactcc gccagttcc gccattctc cgccccatgg ctgactaatt 1680
 ttttttattt atgcagagge cgaggccgcc tcggcctctg agctattcca gaagtagtga 1740
 ggaggctttt ttggaggcct aggcttttgc aaaaaagctg cagatgattg aacaagatgg 1800
 attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca 1860
 acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg ggcgcccggg 1920
 tctttttgtc aagaccgacc tgtccgggtg cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg 1980
 gctatcgtgg ctggccacga cgggcggtcc ttgcgcagct gtgctcgacg ttgtcactga 2040
 agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc tgtcatctca 2100
 ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc tgcatacgct 2160
 tgatccggct acctgccc atcgaccacca agcgaaacat cgcacgcagc gagcacgtac 2220
 tcggatggaa gccggctctg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc aggggctcgc 2280
 gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcagag atctcgtcgt 2340
 gacccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt 2400
 catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctaccgg 2460
 tgatattgct gaagagcttg gcggcgaaatg ggctgaccgc ttctcctgctc tttacgggat 2520
 cgccgctccc gattcgcagc gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt tcttctgaga 2580
 tccgtgacat aattggacaa actacctaca gagatttaaa gctctaaggt aaatataaaa 2640
 tttttaagtg tataatgtgt taaactactg attctaattg tttgtgtatt ttagattcca 2700
 acctatggaa ctgatgaatg ggagcagtggt tggaatgcct ttaatgagga aaacctgttt 2760
 tgctcagaag aatgccatc tagtgatgat gaggctactg ctgaetctca acattctact 2820
 cctccaaaaa agaagagaaa ggtagaagac cccaaggact ttccttcaga attgctaagt 2880
 tttttgagtc atgctgtgtt tagtaataga actccttgctt gctttgctat ttacaccaca 2940
 aaggaaaaag ctgcactgct atacaagaaa attatggaaa aatattctgt aacctttata 3000
 agtaggcata acagttataa tcataacata ctgttttttc ttactccaca caggcataga 3060
 gtgtctgcta ttaataacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttagcttttt aatttgtaaa 3120

ES 2 616 021 T3

ggggttaata aggaatattt gatgtatagt gccttgacta gagatcataa tcagccatac 3180
 cacatttgta gaggtttttac ttgcttttaa aaacctecca cacctcccc tgaacctgaa 3240
 acataaaatg aatgcaattg ttgttgtaa cttgtttatt gcagcttata atggttacaa 3300
 ataaagcaat agcatcacia atttcacaaa taaagcattt ttttactgc attctagttg 3360
 tggtttgtec aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg gcccatcgat gaattcaacg 3420
 tacgtagctt ggcactggcc gtogttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcgтта 3480
 cccaacttaa tgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg 3540
 cccgcaccga tgccttcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg cgcctgatgc 3600
 ggtattttct ccttacgcat ctgtgcggta tttcacaccg catatggtgc actctcagta 3660
 caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agccccgaca cccgccaaca cccgctgacg 3720
 cgccctgacg ggcttgctc ctcccggcat ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg 3780
 ggagctgcat gtgtcagagg tttcacctg catcaccgaa acgcgcgagg acgaaagggc 3840
 ctogtgatac gcctatTTTT ataggTTaat gtcatgataa taatggtttc ttagacgtca 3900
 ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttattttt ctaaatacat 3960
 tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa 4020
 aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtgcacctta ttcccttttt tgcggcattt 4080
 tgccttctc tttttgctca cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag 4140
 ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtaaagat ccttgagagt 4200
 tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagttctgct atgtggcgcg 4260
 gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag 4320
 aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcadc ttacggatgg catgacagta 4380
 agagaattat gcagtgctgc cataaccatg agtgataaca ctgcccga cttacttctg 4440
 acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta 4500
 actcgccttg atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac 4560
 accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt 4620
 actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca 4680
 cttctgcgct cgcccttcc ggetggetgg tttattgctg ataaatctgg agccggtgag 4740
 cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta 4800
 gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgtgag 4860
 ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atataactt 4920
 tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat ctttttgat 4980
 aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgctcc actgagcgtc agaccccgta 5040
 gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct tttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa 5100

acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt 5160
 tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag 5220
 ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta 5280
 atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca 5340
 agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag 5400
 cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gcattgagaa 5460
 agcgcacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga 5520
 acaggagagc gcacgagggg gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc 5580
 gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggaggagc 5640
 ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt 5700
 gctcacatgt tcttctctgc gttatccctt gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt 5760
 gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcagagc agtgagcgag 5820
 gaagcggag agcgcaccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa 5880
 tgcagctggc acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcga cgcaattaat 5940
 gtgagttagc tactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg 6000
 ttgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac 6060
 gaatttcgta cgaagctt 6078

<210> 2

<211> 795

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de nucleótidos sintetizada artificialmente

<400> 2

ES 2 616 021 T3

atgattgaac aagatggttt acatgcaggt tcaccagcag catgggtaga acgattatth 60
 gggtatgatt gggcacaaca aactattggt tgttcagatg cagcagtatt tgcattatca 120
 gcacaaggtc gaccagtatt atttgtaaaa actgattttat caggtgcatt aatgaatta 180
 caagatgaag cagcagcatt atcatgggta gcaactactg gtgtaccatg tgcagcagta 240
 ttagatgtag taactgaagc aggtcgagat tggttattat taggtgaagt accagggtcaa 300
 gatttattat catcacattt agcaccagca gaaaaagtat caattatggc agatgcaatg 360
 cgacgattac atactttaga tccagcaact tgtccatttg atcatcaagc aaaacatcga 420
 attgaacgag cacgaactcg aatggaagca ggtttagtag atcaagatga ttagatgaa 480
 gaacatcaag gtttagcacc agcagaatta tttgcacgat taaaagcacg aatgccagat 540
 ggtgaagatt tagtagtaac tcatgggtgat gcatgtttac caaatattat ggtagaaaat 600

 ggtcgatttt caggttttat tgattgtggt cgattaggtg tagcagatcg atatcaagat 660
 attgcattag caactcgaga tattgcagaa gaattaggtg gtgaatgggc agatcgattt 720
 ttagtattat atggtattgc agcaccagat tcacaacgaa ttgcatttta tgcattatta 780
 gatgaatttt tttga 795

<210> 3

<211> 795

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de nucleótidos sintetizada artificialmente

<400> 3

ES 2 616 021 T3

atgattgaac aagatggttt acatgcaggt tcaccagcag catgggtaga acgattattt 60
 ggttatgatt gggcacaaca aactattggt tgctctgatg ccgccgtggt ccggctgtca 120
 gcgcaggggc gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg 180
 caggacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg 240
 ctcgacgttg tcaactgaagc ggaagggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag 300
 gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg 360
 cggcggctgc atacgcttga tccggctacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc 420
 atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgtcg atcaggatga tctggacgaa 480
 gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccagge tcaaggcgcg catgcccgcac 540
 ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat 600
 ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac 660
 atagcgttgg ctaccctgga tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc 720
 ctcgtgcttt acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgcg tcgccttcta tcgccttctt 780
 gacgagttct tctga 795

<210> 4

<211> 795

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de nucleótidos sintetizada artificialmente

<400> 4

atgattgaac aagatggttt acatgcaggt tcaccagcag catgggtaga acgattattt 60
 ggttatgatt gggcacaaca aactattggt tgttcagatg cagcagtatt tcgattatca 120
 gcacaaggtc gaccagtatt atttgtaaaa actgatttat caggatgcatt aatgaatta 180
 caggacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg 240
 ctcgacgttg tcaactgaagc ggaagggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag 300

ES 2 616 021 T3

gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg 360
cggcggtgc atacgcttga tccggctacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc 420
atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgctg atcaggatga tctggacgaa 480
gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttgccaggc tcaaggcgcg catgcccgc 540
ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat 600
ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac 660
atagcgttgg ctaccctga tattgctgaa gagcttggcg gccaatgggc tgaccgcttc 720
ctcgtgcttt acggtatcgc cgtcccgat tcgcagcgc tgccttcta tgccttctt 780
gacgagttct tctga 795

<210> 5

<211> 795

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de nucleótidos sintetizada artificialmente

<400> 5

ES 2 616 021 T3

atgattgaac aagatggttt acatgcaggt tcaccagcag catgggtaga acgattattt 60
 ggttatgatt gggcacaaca aactattggg tgttcagatg cagcagtatt tcgattatca 120
 gcacaagggtc gaccagtatt atttgtaaaa actgatttat caggtgcatt aatgaatta 180
 caagatgaag cagcacgatt atcatgggta gcaactactg gtgtaccatg tgcagcagta 240
 ttagatgtag taactgaagc aggtcgagat tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag 300
 gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg 360
 cggcggctgc atacgcttga tccggctacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc 420
 atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgctg atcaggatga tctggacgaa 480
 gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccgcac 540
 ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat 600
 ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac 660
 atagcgttgg ctaccctgga tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc 720
 ctcgtgcttt acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgcga tcgccttcta tcgccttctt 780
 gacgagttct tctga 795

<210> 6

<211> 759

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

ggccgccacc atgagcctgt tccccagcct gcccctgctg ctgctgagca tgggtggccgc 60

cagctacagc gagaccgtga cctgcgagga cgcccagaag acctgccccg ccgtgattgc 120
 ctgcagcagc cccggcatca acggcttccc cggcaaggac ggccgcgacg gcaccaaggg 180
 cgagaagggc gagcccggcc agggcctgcg cggcctgcag ggcccccccg gcaagctggg 240
 cccccccggc aaccccggcc ccagcggcag ccccggcccc aagggccaga agggcgaccc 300
 cggcaagagc cccgacggcg acagcagcct ggccgccagc gagcgcaagg ccctgcagac 360
 cgagatggcc cgcatcaaga agtggctgac cttcagcctg ggcaagcagg tgggcaacaa 420
 gttcttctctg accaacggcg agataatgac cttcgagaag gtgaaggccc tgtgctgaa 480
 gttccaggcc agcgtggcca cccccgcaa cgccgccgag aacggcgcca ttcagaacct 540
 gatcaaggag gaggccttcc tgggcatcac cgacgagaag accgagggcc agttcgtgga 600
 cctgaccggc aaccgcctga cctacaccaa ctggaacgag ggcgagccca acaacgccgg 660
 cagcgacgag gactgctgctg tgctgctgaa gaacggccag tggaacgacg tgcctctgag 720
 caccagccac ctggccgtgt gcgagttccc catctgaat 759

<210> 7

<211> 375

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de nucleótidos sintetizada artificialmente

<400> 7

atggccaagt tgaccagtgc cgttccgggtg ctcaccgcgc ggcacgtcgc cggagcggtc 60
 gagttctgga ccgaccggct cgggttctcc cgggacttcg tggaggacga cttegccggg 120
 gtggtccggg acgacgtgac cctgttcate agcgcgggtcc aggaccaggt ggtgccggac 180
 aacaccctgg cctgggtgtg tgtgctcggc ctggacgagc tgtacgccga gtggtcggag 240
 gtcgtgtcca cgaacttccg ggacgcctcc gggccggcca tgaccgagat cggcgagcag 300
 ccgtgggggc gggagtctgc cctgctcgcac ccggccggca actgctgca cttegtggcc 360
 gaggagcagg actga 375

10 <210> 8

<211> 375

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de nucleótidos sintetizada artificialmente

<400> 8

atggcaaaat taacttcagc agtaccagta ttaactgcac gagatgtagc aggtgcagta	60
gaatdddgga ctgatcgatt aggtdddca cgagatdddg tagaagatga ddddgcaggt	120
gtagtacgag atgatgtaac ddtatdddatt tcagcagtac aagatcaagt agtaccagat	180
aatactdddag catgggtatg tgtacgaggt ttagatgaaat tatatgcaga atggtcagaa	240
gtagtatcaa ctaatdddtcg agatgcatca ggtccagcaa tgactgaaat tggdgaacaa	300
ccatgggggc gagaatdddgc attacgagat ccagcaggtta attgtgtaca ddddgtagca	360
5 gaagaacaag attga	375

<210> 9

<211> 375

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> Una secuencia de nucleótidos sintetizada artificialmente

<400> 9

atggcaaaat taacttcagc agtaccagta ttaactgcac gagatgtagc aggtgcagta	60
gaatdddgga ctgatcgatt aggtdddca cgggacttcg tggaggacga cttdgcccgt	120
gtggdcccggg acgacgtgac cctgdtcate agcgcggdtdc aggdaccaggt ggtgcccggac	180
aacaccctgg cctgggtgtg tgtgdcgdcgc ctggacgagc tgtacgcccga gtggdcccggag	240
gtcgtgtcca cgaacttdccg ggacgcctcc gggcccggcca tgaccgagat cggcgcagcag	300
ccgtgggggc gggagtdtcgc cctgdcgdcgac ccggcccggca actgdcgtgca cttdcgtggcc	360
gaggagcagg actga	375

<210> 10

15 <211> 375

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

ES 2 616 021 T3

<223> Una secuencia de nucleótidos sintetizada artificialmente

<400> 10

atggcaaat taacttcagc agtaccagta ttaactgcac gagatgtagc aggtgcagta 60
 gaattttgga ctgatcgatt aggtttttca cgagattttg tagaagatga ttttgcaggt 120
 gtagtacgag atgatgtaac tttatttatt tcagcagtac aagatcaagt agtaccagat 180
 aacaccctgg cctgggtgtg tgtgcgcggc ctggacgagc tgtacgccga gtggtcggag 240
 gtcgtgtcca cgaacttccg ggacgcctcc gggccggcca tgaccgagat cggecagcag 300
 ccgtgggggc gggagttcgc cctgocgcgac ccggccggca actgcgtgca cttegtggcc 360
 gaggagcagg actga 375

<210> 11

5 <211> 393

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de nucleótidos sintetizada artificialmente

10 <400> 11

atgcctttgt ctcaagaaga atccaccctc attgaaagag caacggctac aatcaacagc 60
 atccccatct ctgaagacta cagcgtcgcc agcgcagctc tctctagcga cggccgcac 120
 ttcactgggtg tcaatgtata tcattttact gggggacctt gtgcagaact cgtgggtgctg 180
 ggcactgctg ctgctgcggc agctggcaac ctgacttcta tcgtcgcgat cggaaatgag 240
 aacaggggca tcttgagccc ctgcggacgg tgtcgacagg tgcttctcga tctgcaccc 300
 gggatcaaag cgatagttaa ggacagtgat ggacagccga cggcagttgg gattcgtgaa 360
 ttgctgcctt ctggttatgt gtgggagggc taa 393

<210> 12

<211> 399

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de nucleótidos sintetizada artificialmente

<400> 12

ES 2 616 021 T3

atggcaaac cattatcaca agaagaatca actttaattg aacgagcaac tgcaactatt 60
aattcaattc caatttcaga agattattca gtagcatcag cagcattatc atcagatggg 120
cgcatcttca ctgggtgtcaa tgtatatcat tttactgggg gaccttgtgc agaactcgtg 180
gtgctgggca ctgctgctgc tgcggcagct ggcaacctga ottgtatcgt cgcgatcgga 240
aatgagaaca ggggcatctt gagcccctgc ggacgggtgcc gacaggtgct tctcgatctg 300
catcctggga tcaaagccat agtgaaggac agtgatggac agccgacggc agttgggatt 360
cgtgaattgc tgcctctgg ttatgtgtgg gagggctaa 399

REIVINDICACIONES

1. Un vector de expresión que permite la producción de alto nivel de una proteína derivada de un gen foráneo en una célula huésped de mamífero, que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1 excepto los nucleótidos No. 1784 a No. 2578 de la misma, que han sido sustituidos con la secuencia de la SEQ ID NO: 2 o 5.
- 5 2. Un método para producir un transformante que tiene capacidad para producir un alto nivel de una proteína derivada de un gen foráneo y para resistir la neomicina; que comprende las etapas de insertar un gen foráneo en el vector de expresión de la reivindicación 1, y transformar una célula huésped utilizando el vector de expresión.
3. Un método para producir una proteína derivada de un gen foráneo, que comprende las etapas de:
- (a) insertar un gen foráneo en el vector de expresión de la reivindicación 1;
- 10 (b) transformar una célula huésped con el vector de expresión;
- (c) cultivar el transformante en un medio suplementado con neomicina; y
- (d) recoger la proteína derivada del gen foráneo del transformante cultivado.
4. El método de producción de la reivindicación 3, en el que se usa un medio químicamente definido (medio CD) o un medio suplementado con un aditivo no basado en animales con el medio CD para cultivar en la etapa (c) de la
- 15 reivindicación 3.
5. Un método de cribado para un transformante que tiene la capacidad para producir un alto nivel de una proteína derivada de un gen foráneo, que comprende las etapas de:
- (a) insertar un gen foráneo en el vector de expresión de la reivindicación 1;
- (b) transformar una célula huésped con el vector de expresión; y
- 20 (c) cultivar el transformante en un medio suplementado con neomicina.
6. Un vector de expresión que permite la producción de alto nivel de una proteína derivada de un gen foráneo en una célula huésped de mamífero, que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1 excepto los nucleótidos No. 1784 a No. 2578 de la misma, que han sido sustituidos con la secuencia de la SEQ ID NO: 12.
7. Un método para producir un transformante que tiene la capacidad para producir un alto nivel de una proteína derivada de un gen foráneo y para resistir la blasticidina; que comprende las etapas de insertar un gen foráneo en el vector de
- 25 expresión de la reivindicación 6, y transformar una célula huésped utilizando el vector de expresión.
8. Un método para producir una proteína derivada de un gen foráneo, que comprende las etapas de:
- (a) insertar un gen foráneo en el vector de expresión de la reivindicación 6;
- (b) transformar una célula huésped con el vector de expresión;
- 30 (c) cultivar el transformante en un medio suplementado con blasticidina; y
- (d) recoger la proteína derivada del gen foráneo del transformante cultivado.
9. El método de producción de la reivindicación 8, en el que se usa un medio químicamente definido (medio CD) o un medio suplementado con un aditivo no basado en animales con el medio CD para cultivar en la etapa (c) de la reivindicación 8.
- 35 10. Un método de cribado para un transformante que tiene la capacidad para producir un alto nivel de una proteína derivada de un gen foráneo, que comprende las etapas de:
- (a) insertar un gen foráneo en el vector de expresión de la reivindicación 6;
- (b) transformar una célula huésped con el vector de expresión; y

(c) cultivar el transformante en un medio suplementado con blasticidina.

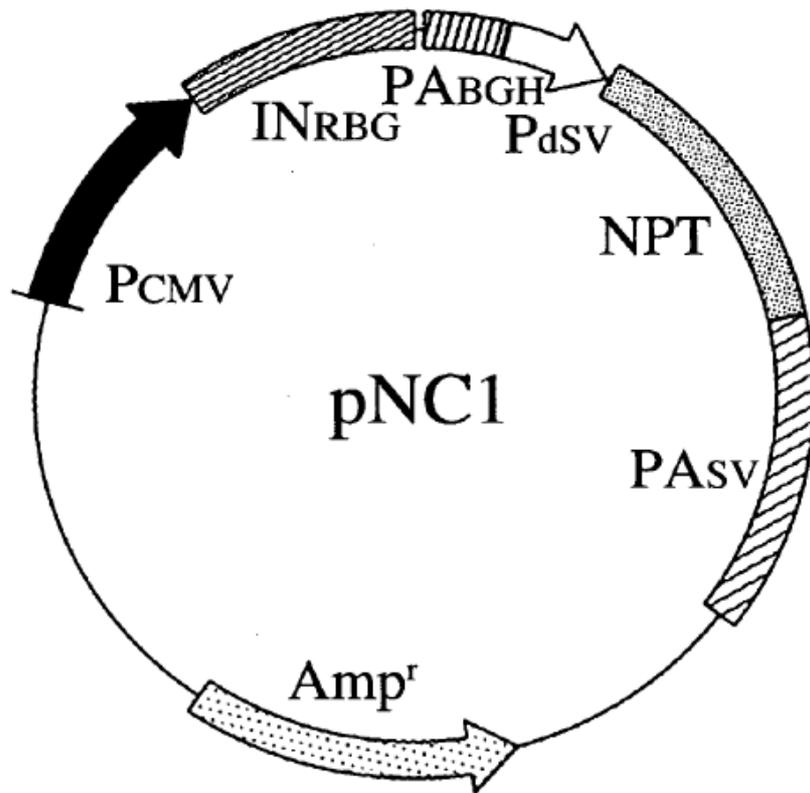


FIG. 1

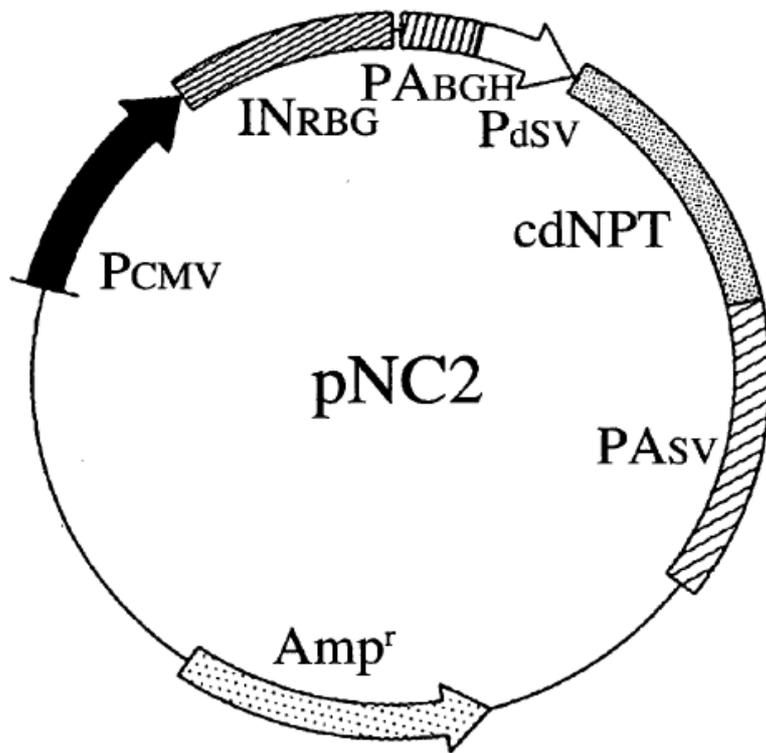


FIG. 2

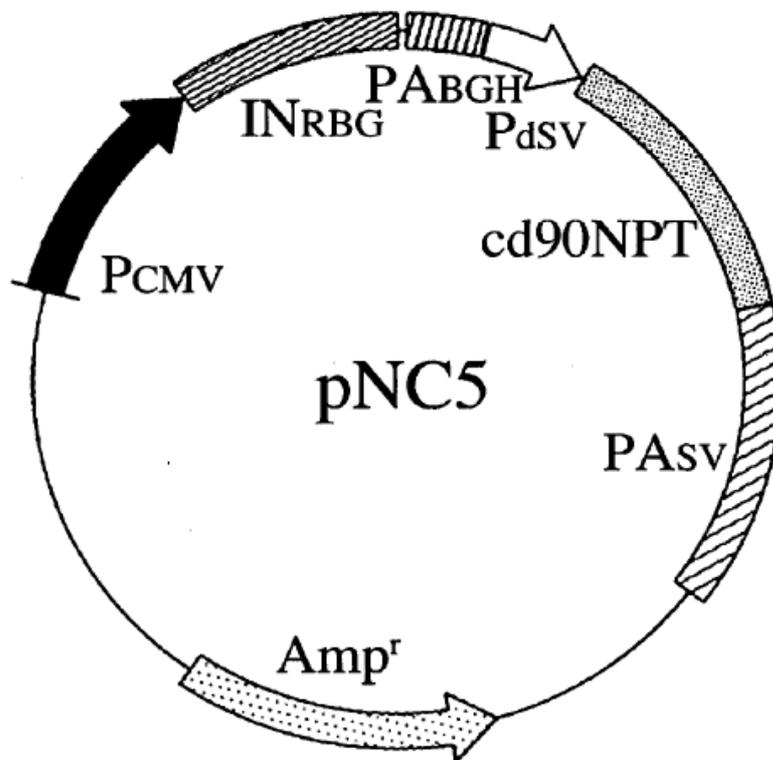


FIG. 3

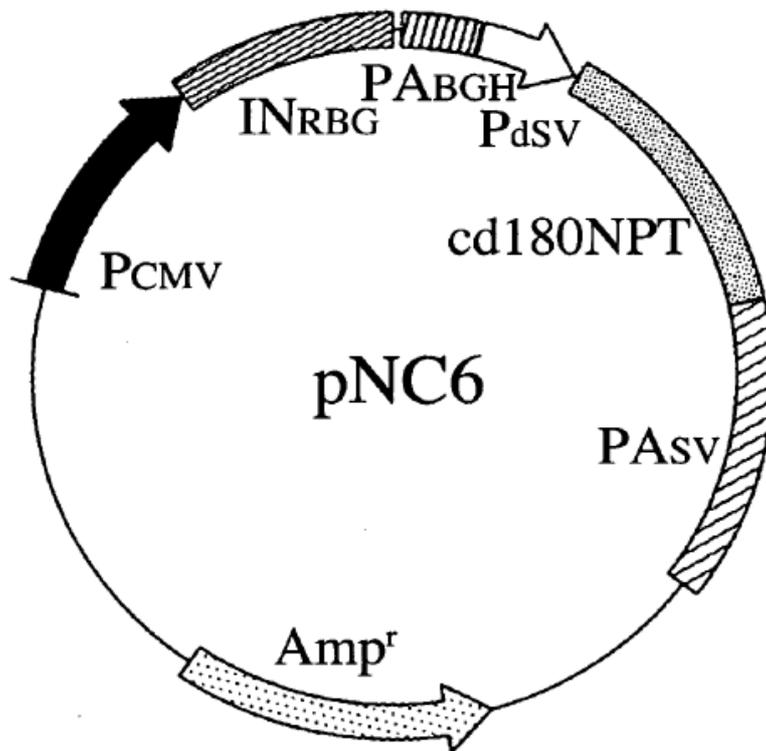


FIG. 4

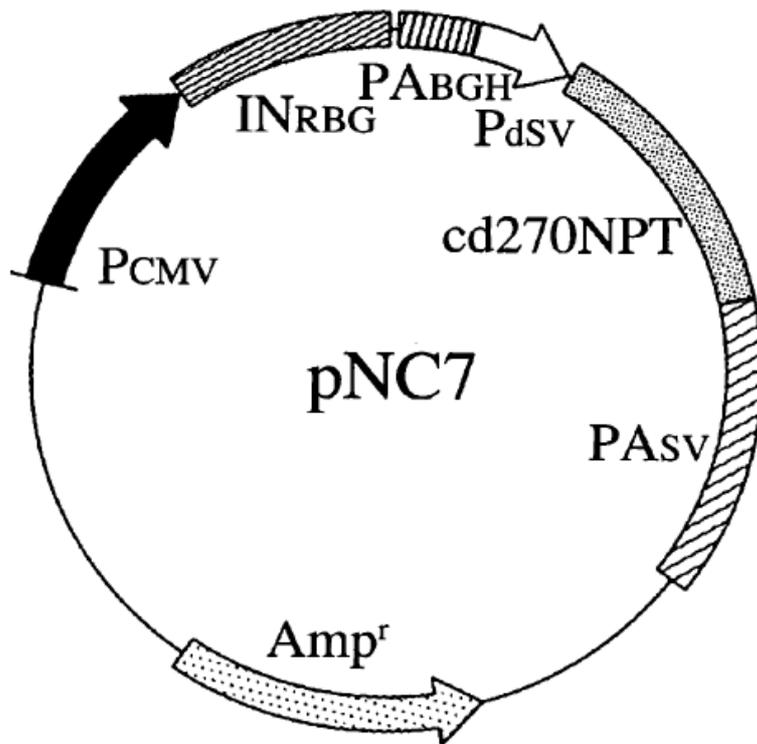


FIG. 5

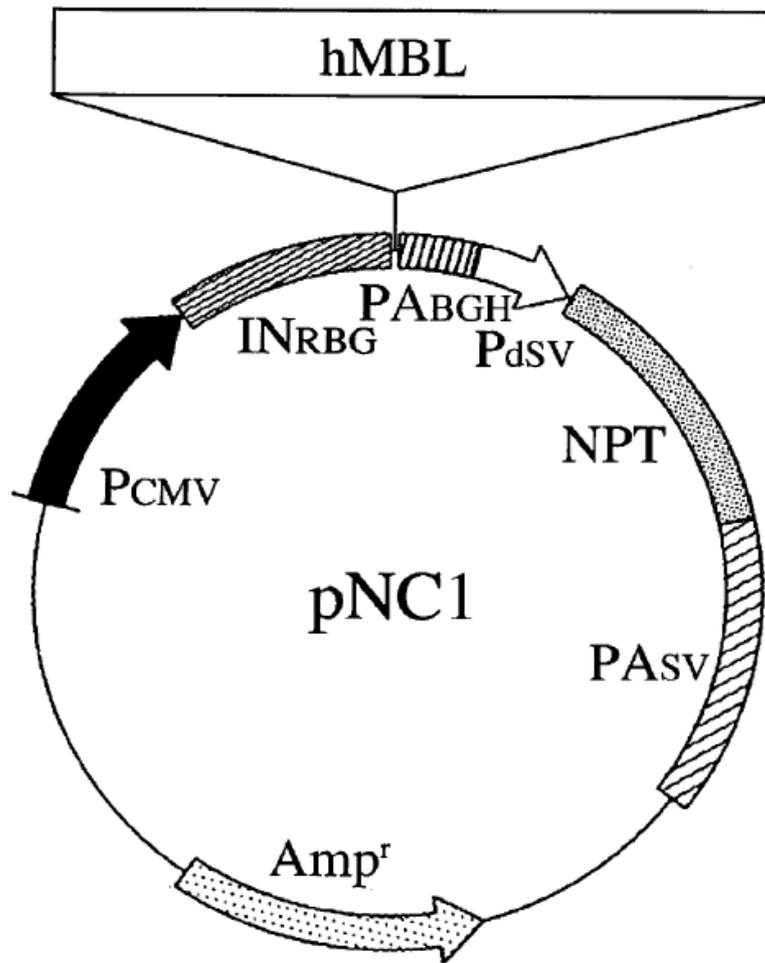


FIG. 6

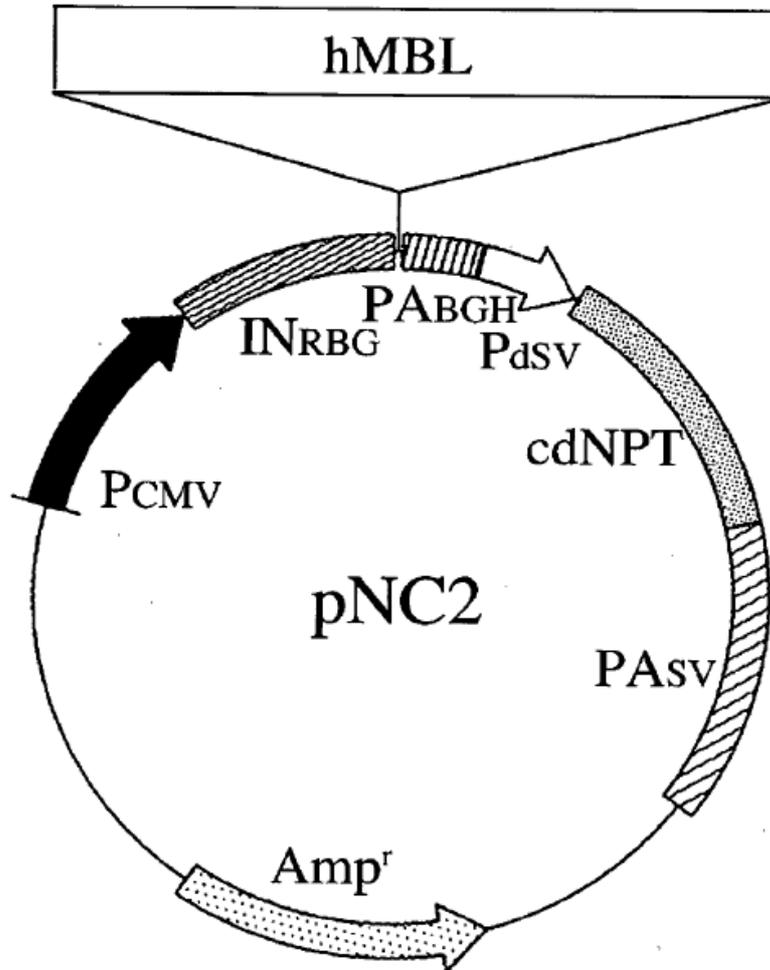


FIG. 7

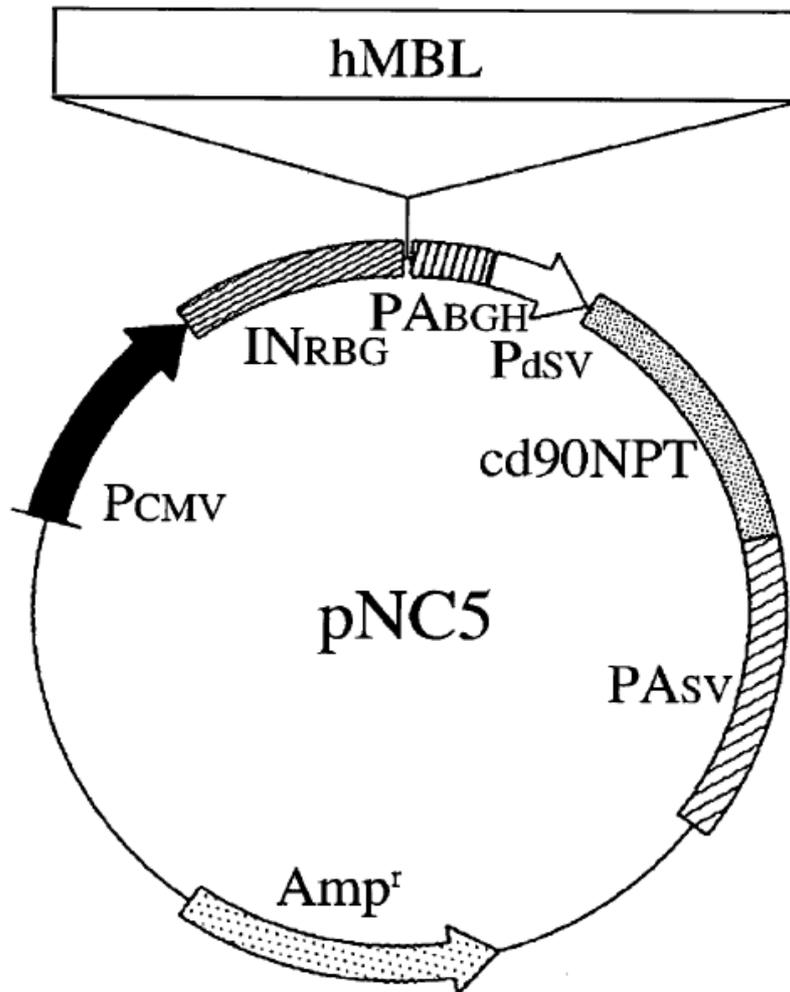


FIG. 8

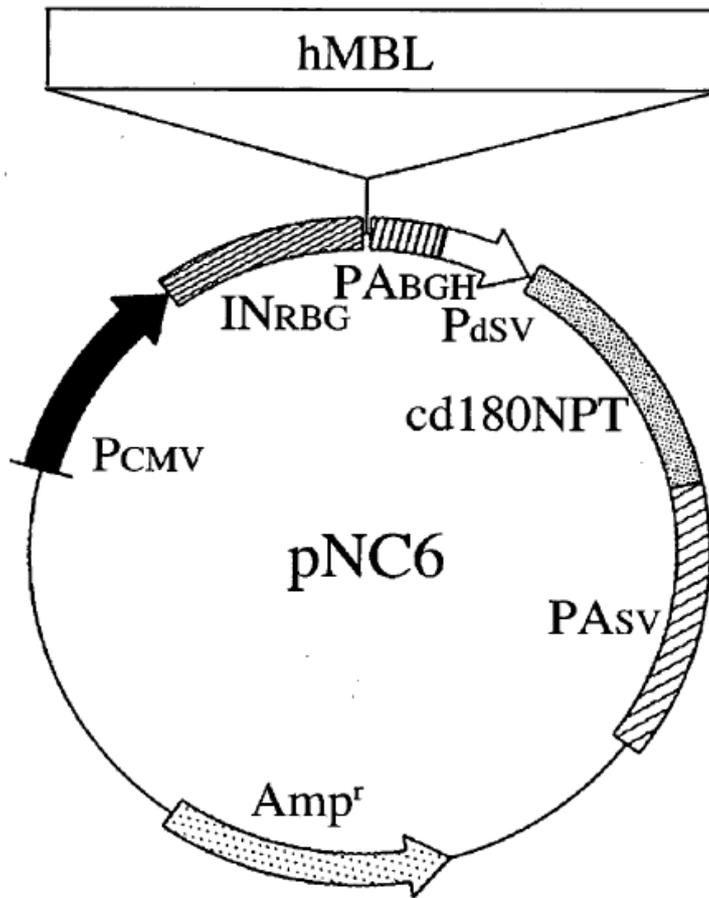


FIG. 9

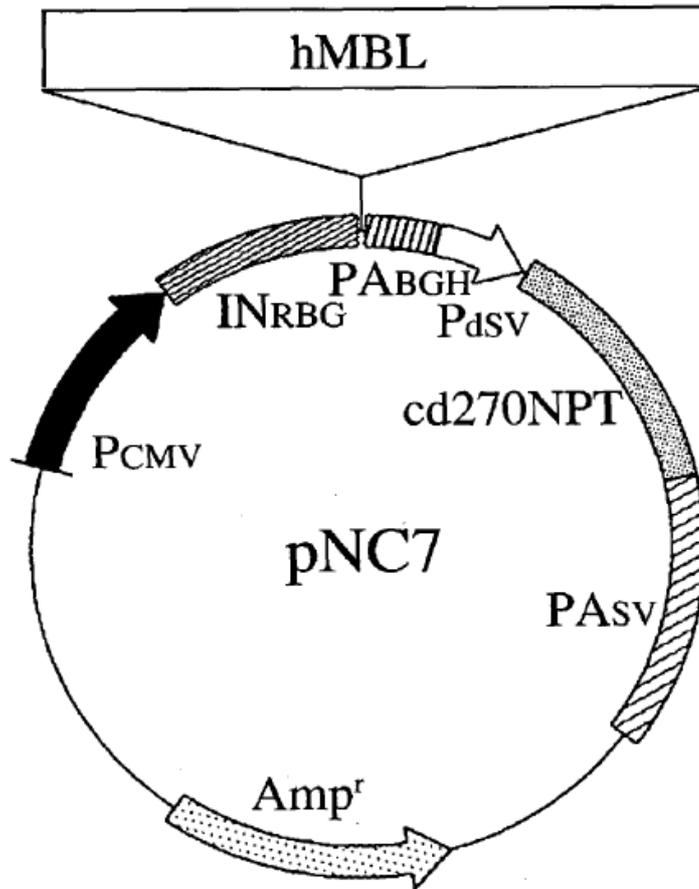


FIG. 10

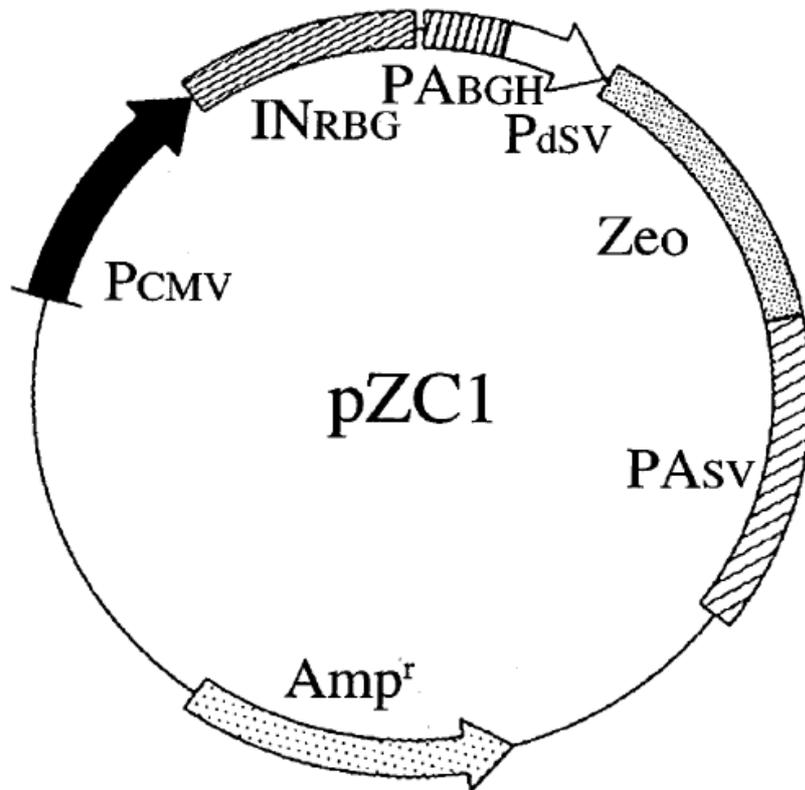


FIG. 11

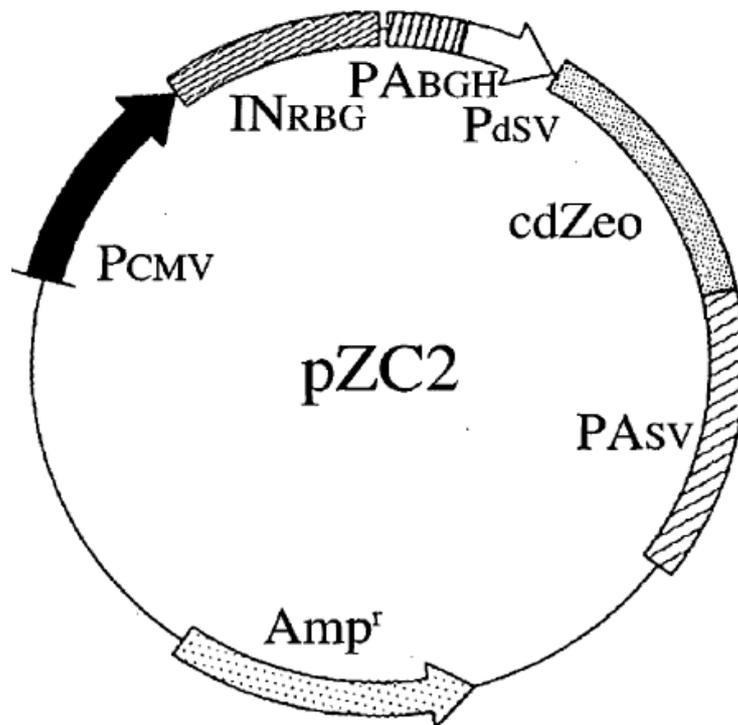


FIG. 12

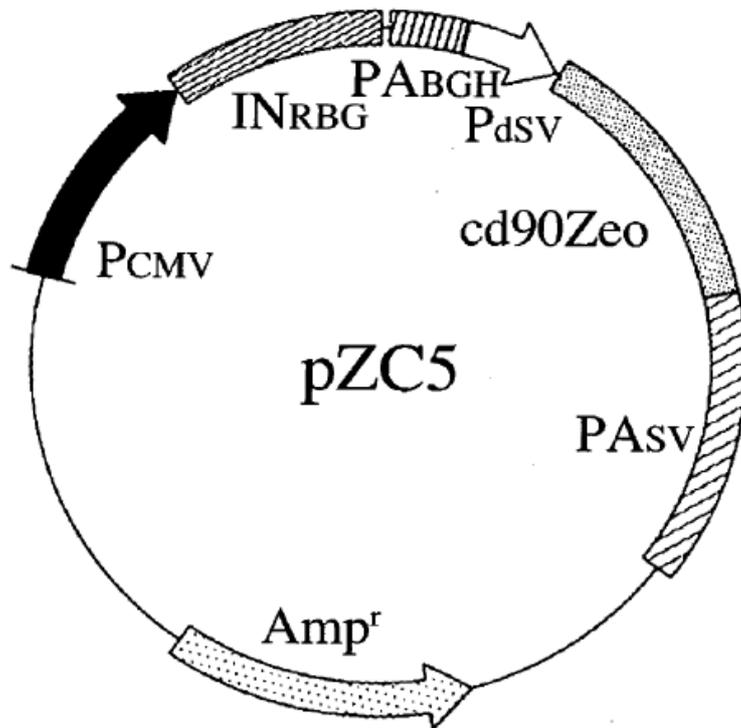


FIG. 13

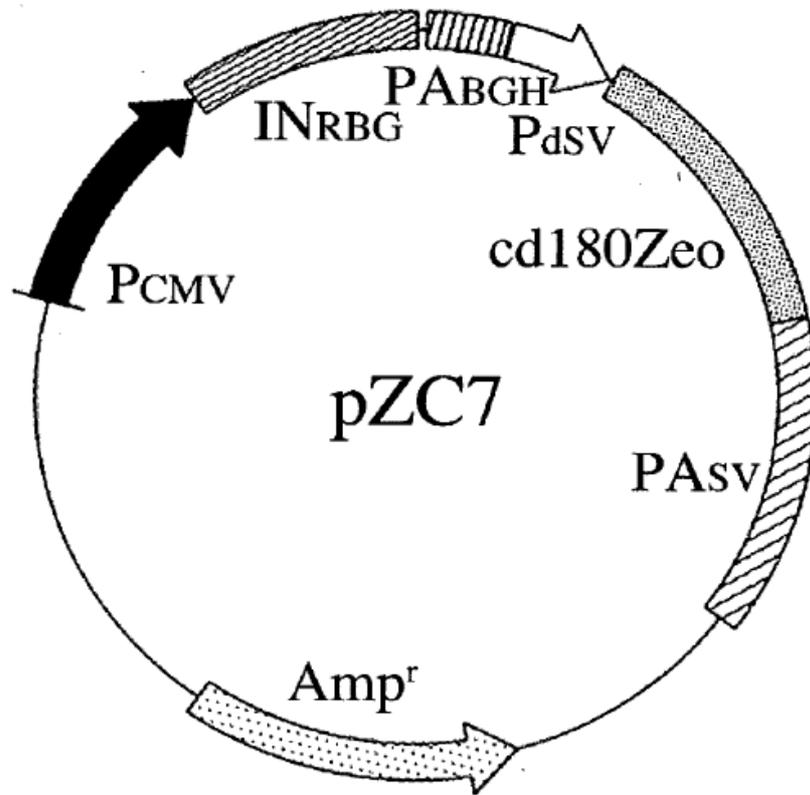


FIG. 14

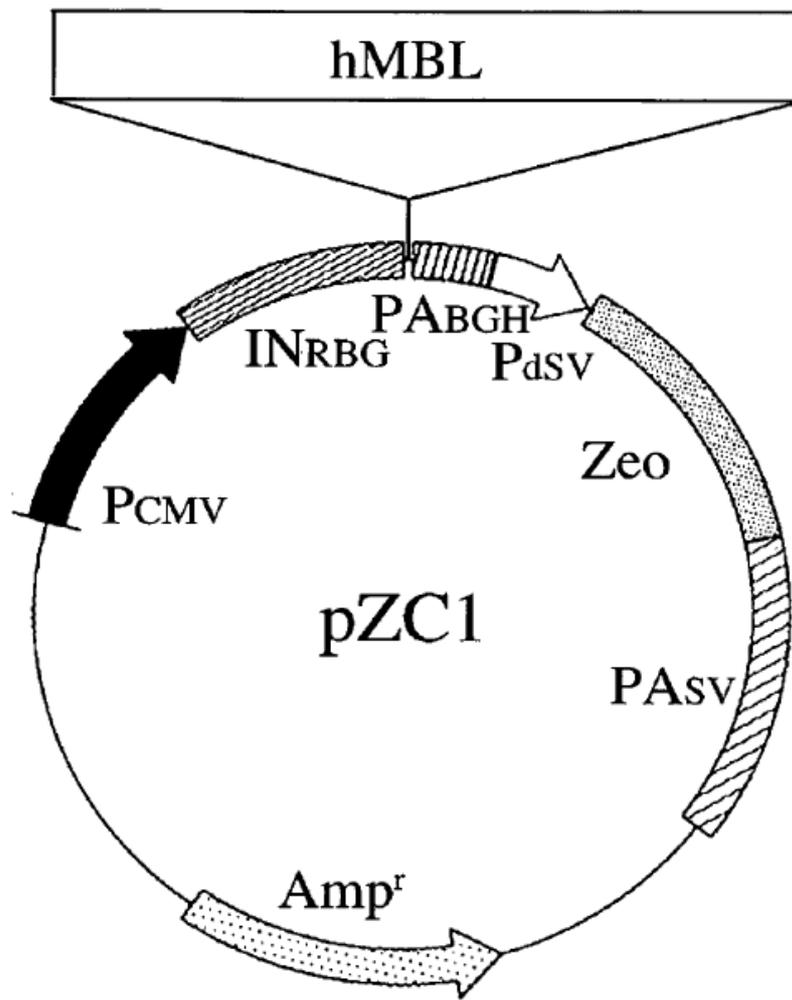


FIG. 15

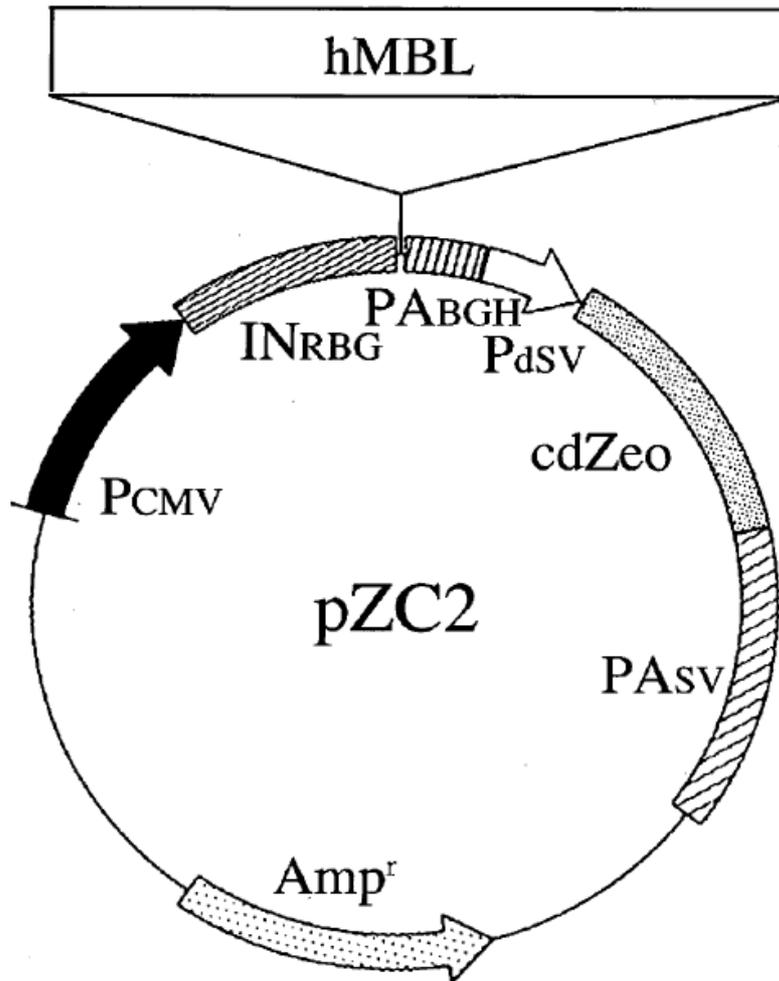


FIG. 16

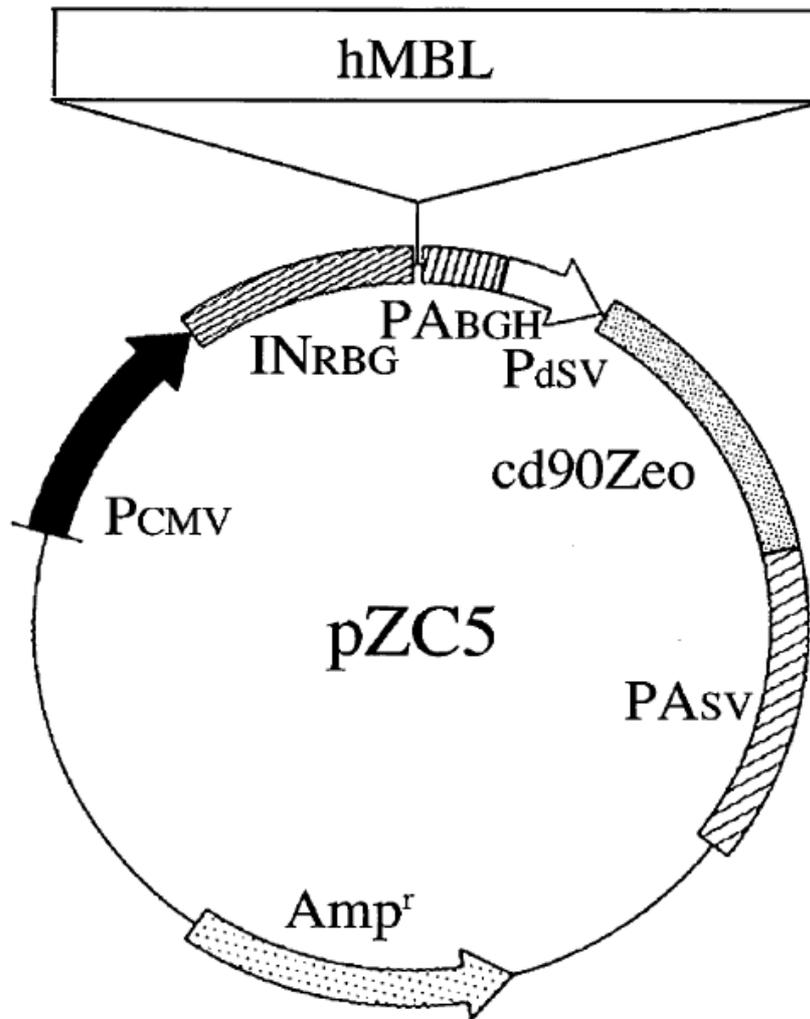


FIG. 17

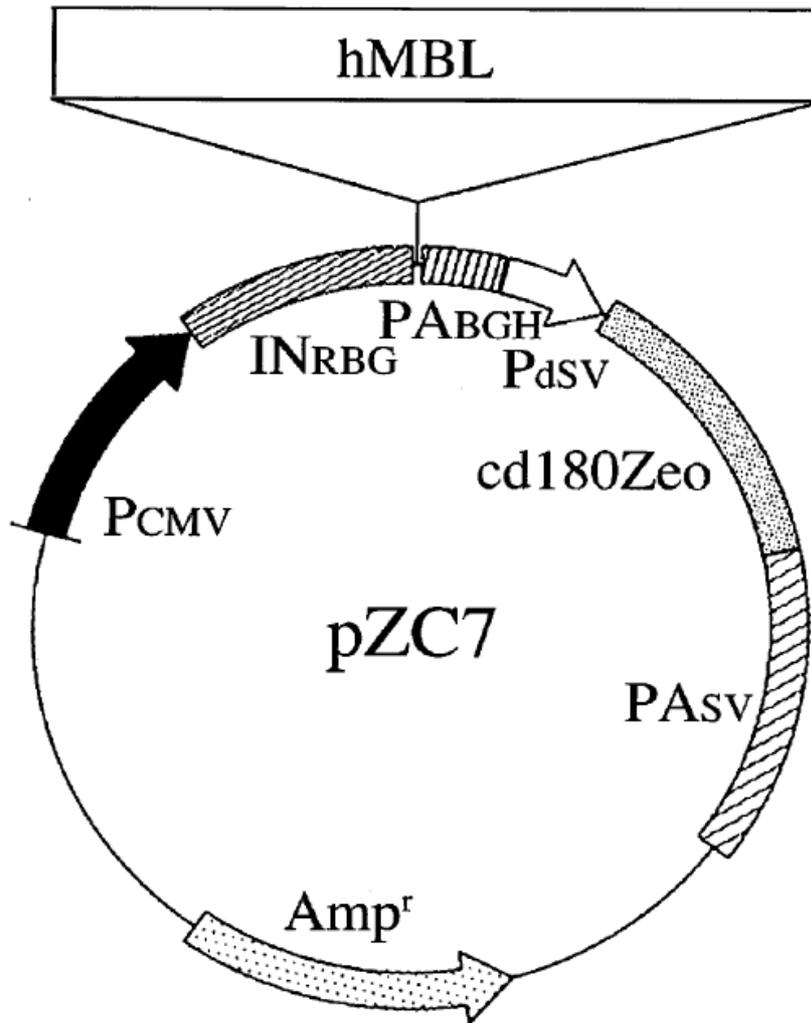


FIG. 18

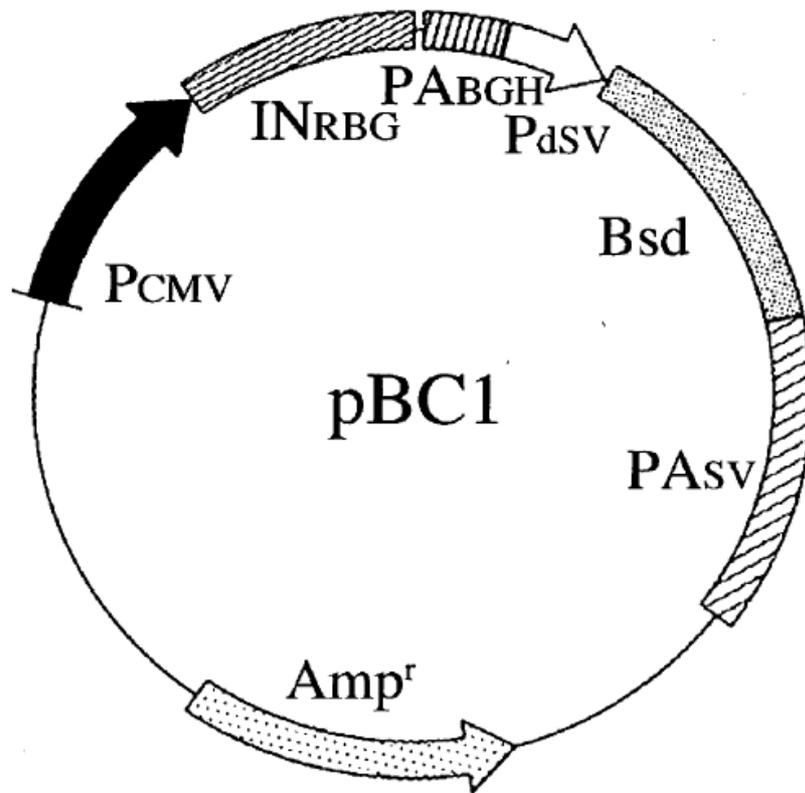


FIG. 19

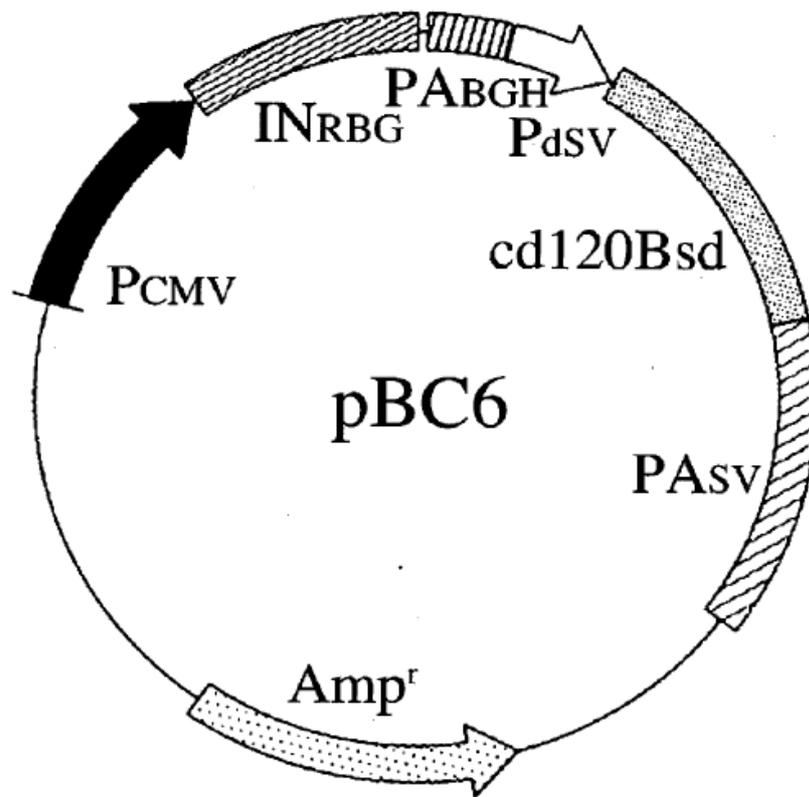


FIG. 20

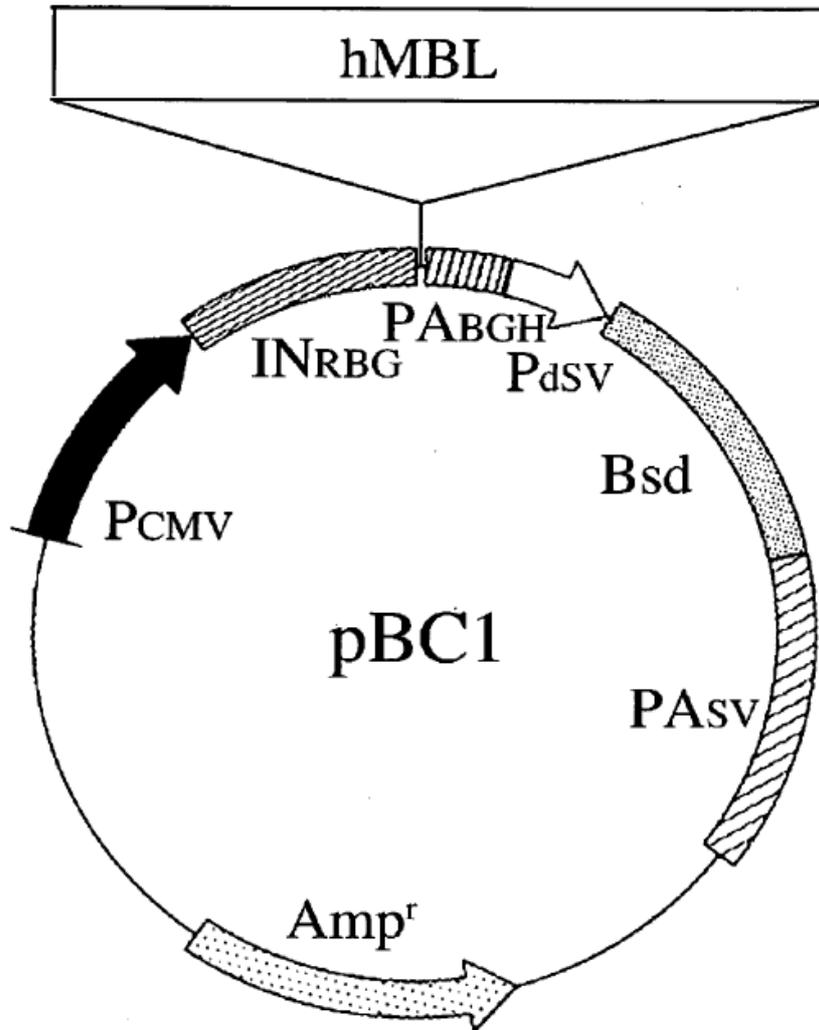


FIG. 21

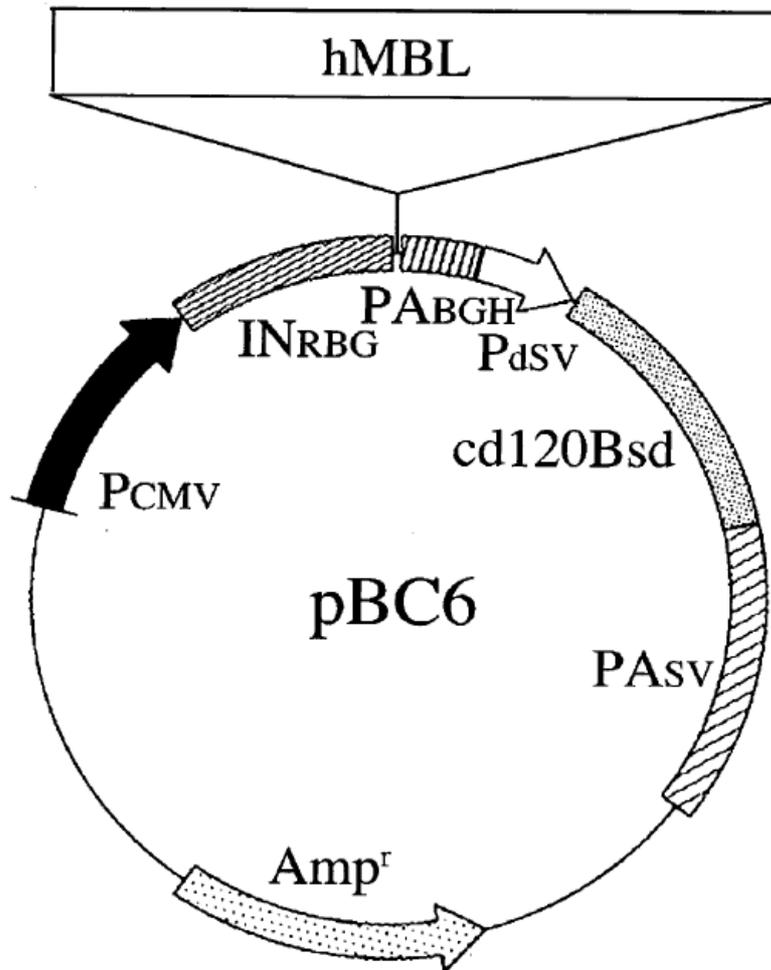


FIG. 22