(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 626 232**

(51) Int. CI.:

C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2009 PCT/EP2009/067540**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **01.07.2010 WO10072676**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2009 E 09796376 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2367943**

(54) Título: **Vector de expresión de mamíferos**

(30) Prioridad:

22.12.2008 EP 08172630
17.04.2009 EP 09158118

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.07.2017

(73) Titular/es:

LEK PHARMACEUTICALS D.D. (100.0%)
Verovskova 57
1526 Ljubljana, SI

(72) Inventor/es:

FRANCKY, ANDREJ y
GASER, DOMINIK

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

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 de mamíferos

La presente invención describe nuevos vectores de expresión de mamíferos (con o sin gen(es) de interés, GOI (siglas del inglés, *gene(s) of interest*) para la integración en el genoma de mamíferos, comprendiendo los vectores una nueva combinación de elementos reguladores. En particular, la presente invención describe vectores de expresión que comprenden los siguientes elementos reguladores: (a) el potenciador del virus del simio 40 y la región promotora temprana y (b) el intrón II de la Hbb humana, en donde el vector de expresión comprende al menos un gen de interés bajo el control de los elementos reguladores definidos en (a) y (b), y en donde el intrón II de la Hbb humana se localiza entre la secuencia que codifica el al menos un gen de interés y el potenciador de SV40 y una región promotora temprana. Preferentemente, tal vector de expresión comprende al menos un gen marcador de selección (por ejemplo, pDGP que incluye gen(es) de interés, véase la Fig. 1; por ejemplo, pDGPΔGOI sin gen(es) de interés). El vector (sin gen(es) de interés) permite la incorporación de al menos uno, preferentemente dos o más genes de interés, su/sus posterior(es) expresión(es), y la selección de células transfectadas usando, por ejemplo, geneticina (G418) y/o metotrexato (MTX). El vector pDGPΔGOI, como un ejemplo de vector de expresión de mamíferos según la presente invención, presenta una secuencia de 9555 pb, cuya una hebra se representa mediante la SEQ ID NO:2. El vector pDGP-AΔGOI, como otro ejemplo de vector de expresión de mamíferos según la presente invención, presenta una secuencia de 3830 pb, cuya una hebra se representa mediante la SEQ ID NO:3.

Actualmente, antes de la clonación de las células, se tienen que realizar muchas etapas de selección sucesivas en un gran número de grupos de células para generar y seleccionar un grupo de células de alta productividad. Como resultado, el desarrollo de la línea celular es una actividad que requiere mucho tiempo y que es laboriosa.

Existe un gran número de publicaciones que tratan la influencia de los elementos reguladores en los niveles de expresión.

El efecto positivo de diferentes secuencias de intrón posicionadas en o justo antes de la secuencia codificante de GOI se conoce desde hace tiempo y se ha descrito en muchas publicaciones (2, 4, 5, 6). Los estudios que tratan la eficacia transcripcional de diferentes promotores llevaron a identificar el promotor CMV como el más eficaz (2, 3, 4, 5, 6). Por este motivo, los casetes de expresión de GOI en la mayoría de los vectores de expresión de mamíferos se dirigen hoy en día mediante el promotor CMV y tienen una secuencia de intrón justo aguas arriba de la secuencia codificante de GOI.

En lo referente a la combinación de casetes de expresión de GOI y genes marcadores de selección en un vector de expresión particular, se ha comunicado y sometido a ensayo la funcionalidad de varias combinaciones (1). Para la expresión de anticuerpos monoclonales (mAb), se han descrito soluciones con dos vectores que expresan de manera separada la cadena ligera y la cadena pesada, así como vectores que portan casetes de expresión de ambas cadenas de mAb junto con los casetes de expresión *neo* y *dhfr* en el mismo plásmido (1).
En la mayoría de los casos, solo se determinaron los niveles de expresión transitoria usando proteínas indicadoras intracelulares como luciferasa (2, 5, 6). Mediante este enfoque es difícil predecir cómo influirá un elemento regulador y/o un vector en los niveles de expresión estables de una proteína secretada tras su integración en un cromosoma, donde el nivel de expresión final es el resultado de una interacción compleja entre la transcripción, la traducción, el tráfico intracelular y las tasas de secreción. Aunque es lo más importante para la industria biofarmacéutica, esta cuestión raramente se trata en la bibliografía (3). En particular, parece que la relevancia de una combinación específica de elementos reguladores y marcadores de selección durante el tiempo necesario para desarrollar una línea celular y la eficacia del desarrollo de la línea celular nunca se ha tratado. Por consiguiente, el principal objeto de la presente invención fue buscar una combinación de elementos reguladores y marcadores de selección superiores a los conocidos en la técnica en términos de los parámetros de tiempo y eficacia mencionados anteriormente.

Por consiguiente, la presente invención supera la desventaja descrita anteriormente y proporciona vectores de expresión de mamíferos para la integración en el respectivo genoma de mamíferos (en particular, los vectores, si carecen de gen(es) de interés, designados pDGPΔGOI, que presentan la secuencia de la SEQ ID NO:2 y pDGP-AΔGOI que presentan la secuencia de la SEQ ID NO:3; y los vectores designados pDGP y pDGP-A, si incluyen el(los) gen(es) de interés, véase las Figs. 1 y 3, respectivamente) que presentan una nueva combinación de elementos reguladores: el potenciador del virus del simio 40 (SV40, por las siglas del inglés *simian virus 40*) y una región promotora temprana, el intrón II de la Hbb (que es distinto de, y por lo tanto, no debe confundirse con el intrón quimérico descrito en la bibliografía, por ejemplo, Xu et al. (2)), y de manera opcional comprende al menos un gen marcador de selección (por ejemplo, *neo, dhfr).* Tales vectores de expresión son adecuados para recoger al menos un gen de interés y, si es así, permitir su/sus expresiones y posterior selección de células transfectadas usando al menos un agente de selección adecuado (por ejemplo, G418 y/o MTX). Incluso una selección por etapas con G418 selecciona células que expresan el al menos uno polipéptido codificado por el al menos un gen de interés en altas cantidades y de un modo altamente reproducible, reduciendo de este modo el tiempo de desarrollo de líneas celulares y la carga de trabajo de una manera significativa.

Como nota adicional, debe tenerse en cuenta lo siguiente: Los vectores de expresión que se integran en el genoma que se conocen en la técnica anterior sobre dos o más etapas de selección (una de las cuales es normalmente la selección con MTX) normalmente generan células que portan varias copias del GOI integrado en su genoma y expresan, por lo tanto, GOI a una tasa elevada. Muy al contrario, los vectores de expresión de la presente invención no requieren múltiples copias de los mismos para integrarse en el genoma y/o dos o más rondas de etapas de selección con el fin de permitir a las células hospedadoras de los mamíferos expresar GOI a una tasa elevada. Este es el resultado inmediato de la combinación de los elementos reguladores según la presente invención y reside en elevadas tasas de expresión independientemente del número de copias del gen integradas en el genoma. La ventaja de la presente invención es, por lo tanto, que no es necesario realizar al menos una etapa de selección, cada una con G418 y MTX con el fin de lograr tasas de expresión satisfactorias, pero que solo una etapa de selección, bien con G418 o con MTX, por mencionar sistemas de selección ejemplares, es suficiente.

La expresión "intrón II de la Hbb" tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico que presenta una secuencia del segundo intrón del gen de la β-globina humana *(hbb)* (intrón 2 de la Hbb) que incluye 10 pb de la secuencia inmediatamente aguas arriba de dicho intrón 2 de la Hbb en el gen *hbb* y 10 pb de la secuencia inmediatamente aguas abajo del intrón 2 de la Hbb en el gen *hbb*. Según una realización preferida de la presente invención, el intrón II de la Hbb presenta la secuencia establecida en la SEQ ID NO:1.

De este modo, un primer aspecto de la presente invención incluye la disposición de un vector de expresión para su integración en el genoma de mamíferos, comprendiendo dicho vector de expresión los siguientes elementos reguladores: (a) el potenciador del virus del simio 40 (SV40) y una región promotora temprana y (b) el intrón II de la Hbb humana, y preferentemente el intrón que presenta la secuencia de la SEQ ID NO:1, en donde el vector de expresión comprende al menos un gen de interés bajo el control de los elementos reguladores definidos en (a) y (b), y en donde el intrón II de la Hbb humana se localiza entre la secuencia que codifica el al menos un gen de interés y el potenciador de SV40 y una región promotora temprana.

Las realizaciones preferidas de este aspecto de la presente invención son

(i) un vector del primer aspecto de la presente invención, en donde el vector comprende al menos un gen que codifica un marcador de selección eucariota y/o procariota, en particular, el gen de la neomicina fosfotransferasa (*neo*) de Tn5 y/o el gen de la dihidrofolato reductasa (*dhfr*);

(ii) un vector del primer aspecto de la presente invención, en donde el vector es circular;

(iii) un vector del primer aspecto de la presente invención, en donde el al menos un gen de interés es el gen que codifica la cadena ligera de una inmunoglobulina y/o el gen que codifica la cadena pesada de una inmunoglobulina;

(iv) un vector del primer aspecto de la presente invención, en donde el orden de los elementos reguladores, los genes de interés y los genes que codifican un marcador de selección es tal como sigue: potenciador de SV40 5'-/región promotora temprana, intrón II de la Hbb, gen que codifica la cadena ligera de una inmunoglobulina, secuencia de señal de poliadenilación del SV40; potenciador del SV40/región promotora temprana, intrón II de la Hbb, gen que codifica la cadena pesada de una inmunoglobulina, secuencia de señal de poliadenilación del SV40; potenciador del SV40/región promotora temprana, gen de la neomicina fosfotransferasa de Tn5, una secuencia de señal de poliadenilación sintética, promotor temprano del SV40 sin secuencia de potenciador, gen de la dihidrofolato reductasa, secuencia de señal de poliadenilación del SV40-3 ';

(v) un vector del primer aspecto de la presente invención, en donde el vector comprende al menos un marcador de selección procariota, por ejemplo, un gen de resistencia a antibiótico tal como el gen de resistencia a la ampicilina, y/o elementos reguladores adicionales conocidos por el experto en la técnica por incluirse de manera ventajosa en un vector de expresión de mamíferos; y

(vi) un vector del primer aspecto de la presente invención, en donde el vector es el vector pDGPΔGOI que presenta una secuencia de 9555 pb, una hebra que se representa mediante la secuencia de la SEQ ID NO:2.

Un segundo aspecto de la presente invención es un sistema de vectores que comprende al menos dos vectores tal como se define en cualquiera de las realizaciones preferidas (i) y (ii), en donde cada uno de los al menos dos vectores comprende al menos un gen de interés. Se prefiere tal sistema de vectores, en donde un primer gen de interés localizado en un primer vector codifica la cadena ligera de una inmunoglobulina, y un segundo gen de interés localizado en un segundo vector codifica la cadena pesada de una inmunoglobulina. Otro sistema de vectores también contemplado en la presente invención comprende al menos dos vectores, en donde un primer vector es de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención pero no tiene marcador de selección eucariótico, y en donde un segundo vector comprende al menos un gen que codifica un marcador de selección que confiere resistencia a una célula transfectada.

Un tercer aspecto de la presente invención es una célula de mamífero aislada que comprende un vector de expresión de cualquiera de las realizaciones preferidas (i), (ii), (iii), (iv), (v) y (vi) del primer aspecto de la presente invención o un sistema de vectores según el segundo aspecto de la presente invención. Básicamente, cualquier célula de mamífero aislada se puede usar en conjunto con la presente invención siempre que permita la expresión recombinante de un polipéptido.

Según una realización preferida de ese tercer aspecto de la presente invención, tal célula es una célula COP, una célula L, una célula C127, una célula Sp2/0, una célula NS-0, una célula NS-1, una célula NIH3T3, una célula PC12, una célula PC12h, una célula BHK, una célula CHO, una célula COS1, una célula COS3, una célula COS7, una célula CV1, una célula Vero, una célula HeLa, una célula HEK-293, una célula PER C6, o una célula derivada de fibroblastos diploides, células de mieloma y HepG2.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un método *ex vivo* para producir una célula del tercer aspecto de la presente invención, el método comprende la etapa de proporcionar, y preferentemente transfectar, una célula de mamífero con un vector de expresión de cualquiera de las realizaciones preferidas (i), (ii), (iii), (iv), (v) y (vi) del primer aspecto de la presente invención o con un sistema de vectores según el segundo aspecto de la presente invención.

Un quinto aspecto de la presente invención es un método para producir al menos un polipéptido de interés, en donde dicho método comprende la etapa de cultivar una célula del tercer aspecto de la presente invención en un medio de cultivo celular en condiciones que permitan la expresión de dicho al menos un polipéptido de interés.

Según una realización preferida de este quinto aspecto de la presente invención, el al menos un polipéptido de interés se produce mediante el cultivo de una célula CHO según el tercer aspecto de la presente invención. Los vectores según la presente invención son particularmente adecuados para producir polipéptidos en células de roedores tales como células CHO. Según otra realización preferida de este quinto aspecto de la presente invención, tal método además comprende la etapa de aislar del medio de cultivo celular dicho al menos un polipéptido de interés.

Los vectores según la presente invención se pueden usar en un método de selección de proteínas a alto rendimiento.

La selección (pruebas) de proteínas, por ejemplo, de diferentes variantes de una proteína candidata, que difieren en su secuencia de aminoácidos es una etapa temprana convencional en el desarrollo de nuevas proteínas terapéuticas (productos biofarmacéuticos). El propósito de este programa de selección es la evaluación y la posterior optimización de características moleculares tales como bioactividad, inmunogenicidad, comportamiento de agregación, potencial de expresión, modificaciones postraduccionales, etc., de la proteína de interés sometida a ensayo.

Actualmente, en la mayoría de los casos, la cantidad de proteína necesaria para realizar la evaluación mencionada anteriormente se obtiene de la expresión de proteína transitoria en células HEK (de riñón embrionario humano), tales como las células HEK293. Por, entre otras cosas, razones reglamentarias, sin embargo, las células CHO se usan con mayor frecuencia como las células de producción final en el caso de los productos biofarmacéuticos. Independientemente de esta discrepancia, los investigadores en la industria y el mundo académico mantienen el enfoque actual debido a los títulos de proteína relativamente elevados que se pueden obtener casi desde el principio mediante una expresión de proteína transitoria en células HEK cuando se compara con células CHO, evitando de este modo la necesidad de un largo proceso de selección para obtener células CHO transfectadas de manera estable. Uno de los principales inconvenientes de este enfoque tradicional es, sin embargo, que el sistema de selección (pruebas) y el sistema de producción final hacen uso de células hospedadoras de diferente origen (células humanas frente a células de hámster). Esta discrepancia de la selección y el sistema de producción por supuesto supone el uso de diferentes medios de crecimiento, condiciones del proceso, etc., que dan como resultado datos mucho menos comparables - si es que lo son- (es decir, relevantes) referentes por ejemplo a la predicción del comportamiento de agregación, niveles de expresión, modificaciones postraduccionales, etc., cuando la proteína de interés se va a expresar en el sistema de producción final. De este modo, existe una necesidad por un sistema de selección/prueba que combine las ventajas de expresión rápida y alta de proteína de título (tal como se obtiene, por ejemplo, mediante una expresión de proteína transitoria en células HEK) con la ventaja de realizar la evaluación temprana de una proteína de interés que se ha obtenido de un sistema de expresión de proteína que se corresponde en gran medida con el sistema de producción final.

El problema anterior se soluciona mediante los vectores de acuerdo con la presente invención, dado que permiten la expresión de altas cantidades de la proteína de interés en células transfectadas de manera estable tras un solo tiempo de selección corto (por ejemplo, tras dos semanas de selección en, por ejemplo, medio que contiene G418). De este modo, los vectores de la invención se pueden usar ventajosamente para expresar proteínas de interés (por ejemplo, diferentes variantes de proteína) con fines de prueba/selección directamente en el sistema de producción

(por ejemplo, células CHO) y en las condiciones del cultivo celular (por ejemplo, medio y proceso) que se usarán en última instancia para producir el producto biofarmacéutico final. Este enfoque elimina, particularmente en las fases de desarrollo tempranas de una multiplicidad de proteínas terapéuticas candidatas (por ejemplo, variantes de proteína), la pérdida de tiempo significativa que de lo contrario se asociaría con la generación de una línea celular de producción transfectada de manera estable para cada una de dichas proteínas candidatas. De manera concomitante, este nuevo enfoque genera más datos comparables (es decir, relevantes) con respecto al pronóstico de la cantidad de proteína y al comportamiento posterior tanto durante la producción (a gran escala) así como en estudios preclínicos y clínicos.

Los vectores de expresión de mamíferos de la presente invención que presentan dos o más casetes de expresión de GOI son particularmente útiles para la expresión de proteínas multiméricas, en particular, proteínas heteromultiméricas que incluyen anticuerpos monoclonales. Los vectores de la presente invención que presentan solo un casete de expresión de GOI se pueden usar ventajosamente para expresar proteínas monoméricas tales como citocinas y hormonas que incluyen factores eritropoyéticos como darbepoyetina alfa. Cuando las proteínas multiméricas, en particular, los anticuerpos monoclonales, se van a expresar, también se contempla un sistema de vectores que consiste en al menos dos vectores de la presente invención, en donde un primer vector comprende un primer gen de interés y un segundo vector comprende un segundo gen de interés. Preferentemente, en dicho sistema de vectores, dicho primer gen de interés localizado en el primer vector codifica la cadena ligera de una inmunoglobulina y el segundo gen de interés localizado en el segundo vector codifica la cadena pesada de una inmunoglobulina.

Los vectores de mamífero de acuerdo con la presente invención son adecuados para la producción (recombinante) de proteínas monoméricas y multiméricas, como anticuerpos. Generalmente, las proteínas (recombinantes) que se pueden producir con los vectores de mamíferos de la invención incluyen aquellas que comprenden secuencias de aminoácidos idénticas a, o sustancialmente similares a toda o parte de una de las siguientes proteínas: un ligando FI3, un ligando CD40, proteínas que estimulan la eritropoyesis como eritropoyetina (EPO), darbepoyetina que incluye darbepoyetina alfa y trombopoyetina, calcitonina, leptina, un ligando Fas, un ligando para el activador del receptor de NF-Kappa B (RANKL), un ligando (TRAIL) que induce apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TNF), linfopoyetina derivada del estroma tímico, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), factores de crecimiento que incluyen factor de crecimiento de mastocitos, factor de crecimiento de células madre, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos, RANTES, hormona de crecimiento, insulina, insulinotropina, factores de crecimiento de tipo insulina, hormona paratiroidea, interferones que incluyen α-interferón, ß-interferón y γ-interferón, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico derivado del cerebro, proteínas de tipo sinaptotagmina (SLP1-5), neurotrofina-3"glucagón, interleucinas que incluyen IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17 e IL-18, factores estimulantes de colonias, linfotoxina-p, factor de necrosis tumoral (TNF), factor inhibidor de leucemia, oncostatina-M y diversos ligandos para las moléculas ELK y Hek de superficie celular (tales como los ligandos para quinasas relacionadas con eph o LERKS).

Las proteínas adicionales que se pueden producir usando los vectores de mamífero de la invención incluyen proteínas que comprenden toda o parte de la secuencia de aminoácidos de un receptor para cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente, un antagonista para tal receptor de cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente y proteínas sustancialmente similares a tales receptores o antagonistas.

También, las proteínas que se pueden producir usando los vectores de mamíferos de la invención incluyen proteínas que comprenden todas o parte de las secuencias de aminoácidos de los antígenos de diferenciación (denominados proteínas CD) o sus ligandos o proteínas sustancialmente similares a cualquiera de ellos. Ejemplos de tales antígenos son los antígenos de diferenciación que incluyen CD20, CD22, CD27, CD30, CD39, CD40 y ligandos a los mismos.

Las proteínas enzimáticamente activas o sus ligandos también se pueden producir usando los vectores de mamíferos de la invención. Los ejemplos incluyen proteínas que comprenden toda o parte de una de las siguientes proteínas o sus ligandos o proteínas similares a una de estas: miembros de la familia de las metaloproteinasas-desintegrinas, quinasas, glucocerebrosidasa, superóxido dismutasa, activador del plasminógeno tisular, Factor VIII, Factor IX, apolipoproteína E, apolipoproteína A-1, globinas, un antagonista de IL-2, alfa-1 antitripsina, enzima convertidora de TNF-alfa, ligandos para cualquiera de las enzimas mencionadas anteriormente y otras numerosas enzimas y sus ligandos.

Los vectores de mamífero de la invención también se pueden usar para producir proteínas quiméricas seleccionadas *in vitro* para unirse a una proteína diana específica y modificar su actividad, y anticuerpos o porciones de los mismos y anticuerpos quiméricos, es decir, anticuerpos que tienen dominios constantes de inmunoglobulina o anticuerpo acoplados con uno o más dominios variables de inmunoglobulina o anticuerpo murino, fragmentos del mismo o proteínas sustancialmente similares. Los vectores de mamífero de la invención también se pueden usar para producir conjugados que comprenden un anticuerpo y una sustancia citotóxica o luminiscente. Ejemplos de

anticuerpos, proteínas quiméricas seleccionadas *in vitro* o conjugados de anticuerpo/citotoxina o de anticuerpo/luminóforo que se pueden producir usando los vectores de mamífero de la invención incluyen aquellos que reconocen uno cualquiera o una combinación de proteínas que incluye, pero no se limita a, cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente y/o los siguientes antígenos: CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a CD14, CD18, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD147, IL-Ia, IL-1, IL-2, IL-3, IL-7, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, receptor de IL-2, receptor de IL-4, receptor de IL-6, receptor de IL-13, subunidades del receptor de IL-18, PDGF-ß y análogos de los mismos, VEGF, TGF, TGF-ß2, TGF-p1, receptor de EGF, receptor de VEGF, factor de crecimiento de hepatocitos, ligando de osteoprotegerina, interferón gamma, estimulante de linfocitos B, complemento C5, IgE, antígeno tumoral CA125, antígeno tumoral MUC1, antígeno PEM, ErbB2/HER-2, epítopos asociados a tumores que están presentes en niveles elevados en los sueros de los pacientes, epítopos asociados con cáncer o proteínas expresadas en células cancerosas de mama, colon, células escamosas, próstata, pulmón y/o riñón y/o en células de melanoma, glioma o neuroblastoma, el núcleo necrótico de un tumor, integrina alfa 4 beta 7, la integrina VLA-4, integrinas B2, receptores 1, 2, 3 y 4 de TRAIL, RANK, un ligando de RANK, TNF-α, la molécula de adhesión VAP-1, la molécula de adhesión de célula epitelial (EpCAM), la molécula de adhesión intercelular 3 (ICAM-3), adhesina leucointegrina, la glicoproteína de plaqueta gp IIb/IIIa, la cadena pesada de miosina cardíaca, hormona paratiroidea, MHC I, antígeno carcinoembriónico (CEA), alfa-fetoproteína (AFP), factor de necrosis tumoral (TNF), receptor Fc-y-1, HLA-DR 10 beta, antígeno HLA-DR, L-selectina y IFN-γ.

Los vectores de mamíferos de la invención también se pueden usar para producir proteínas de fusión recombinantes que comprenden cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente o proteínas sustancialmente similares. Por ejemplo, las proteínas de fusión recombinantes que comprenden una de las proteínas mencionadas anteriormente más un dominio de multimerización, tal como una cremallera de leucina, una superhélice, una porción Fc de un anticuerpo o una proteína sustancialmente similar, se pueden producir usando los vectores de mamíferos de la invención. Las proteínas incluidas específicamente entre tales proteínas de fusión recombinantes son las proteínas en las que al menos una porción de TNFR o RANK está fusionada con una porción Fc de un anticuerpo.

Se entenderá que el experto en la técnica es totalmente capaz de determinar una variedad de proteínas adicionales que se contemplan para su uso en conexión con la presente invención.

Los elementos genéticos (véase las abreviaturas utilizadas en la Fig. 1) comprendidos en los vectores de acuerdo con la presente invención (y en particular, en pDGPΔGOI/pDGP) son:

- pot/prom de SV40: el potenciador del virus del simio 40 y la región promotora temprana;
- Intrón II de la Hbb humana.

Los elementos genéticos (véase las abreviaturas utilizadas en la Fig. 1) que pueden estar comprendidos en los vectores de acuerdo con la presente invención (y en particular, en pDGPΔGOI/pDGP) son:

- *neo:* El gen de la aminoglucósido-3'-fosfotransferasa (APH 3' II), también llamado gen de la neomicina fosfotransferasa, de Tn5; APH 3' II inactiva el antibiótico geneticina (G418);
- *dhfr:* el gen de la dihidrofolato reductasa;
- poli(A) de SV40: la secuencia de la señal de poliadenilación del SV40;
- poli(A) sint: una señal de poliadenilación sintética basada en la señal de poliadenilación del gen de la β-globina de conejo.

El vector pDGP como una realización que ejemplifica la presente invención (para un vector con al menos un gen de interés) se representa de manera esquemática en la Fig. 1. Contiene dos casetes de expresión de GOI, cada uno de los cuales presenta básicamente estructuras idénticas y elementos reguladores, excepto que los genes a expresar son distintos: el gen de cadena ligera y pesada, respectivamente, de un anticuerpo monoclonal (un anticuerpo anti-CD20), los casetes de expresión, por tanto, permiten la expresión de dos genes distintos de interés en células de mamífero.

El vector pDGP-A como otra realización que ejemplifica la presente invención (para un vector con un gen de interés) se representa de manera esquemática en la Fig. 3. Contiene un casete de expresión de GOI que presenta el gen de la darbepoyetina alfa (que es una hormona o factor eritropoyético) bajo el control de la novedosa e inventiva combinación de elementos reguladores descrita anteriormente.

Los genes de interés típicamente son secuencias de ADNc, pero también puede ser secuencias de ADN (genómicas).

Tal como se menciona anteriormente, los vectores de acuerdo con la presente invención (y en particular, pDGPΔGOI/pDGP y pDGP-AΔGOI/pDGP-A) también pueden contener genes/casetes de expresión que codifican un marcador de selección. Los marcadores de selección preferidos son la neomicina fosfotransferasa codificada por el gen/casete de expresión *neo* y la dihidrofolato reductasa codificada por el gen/casete de expresión *dhfr*. Los genes/casetes de expresión que codifican los marcadores seleccionables permiten la selección de células transfectadas mediante, por ejemplo, geneticina (G418) y metotrexato (MTX). El casete de expresión *neo* de pDGP contiene el gen de la neomicina fosfotransferasa dirigido por el potenciador de SV40 y la región promotora temprana y adicionalmente se regula de manera transcripcional mediante una secuencia de señal de poliadenilación sintética (tal como se muestra en la Fig. 1). El gen de la neomicina fosfotransferasa se origina a partir de bacterias y se expresa en células de mamífero si está bajo el control de los elementos reguladores mencionados anteriormente. Muy al contrario, el casete de expresión *dhfr* de pDGP contiene el gen *dhfr* dirigido por la región promotora temprana de SV40 (sin la secuencia del potenciador) y se regula de manera transcripcional por la señal de poliadenilación de SV40 en 3' hasta la orientación en 5'. La enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) se requiere para la conversión de dihidrofolato a tetrahidrofolato que, a su vez, se requiere para la síntesis de ácido nucleico en las células. La selección de células eficaz se logra mediante una inhibición irreversible de dihidrofolato reductasa mediante metotrexato. De este modo, el crecimiento de las células de mamífero transfectadas de manera satisfactoria con el vector pDGP (y, por tanto, sobreexpresando la proteína DHFR) se habilita en un medio de crecimiento suplementado con metotrexato.

La Figura 1 ilustra de manera esquemática un vector de acuerdo con una realización preferida de la presente invención (vector pDGP) que incluye dos genes de interés, es decir, mAb HC y mAb LC (mAb: anticuerpo monoclonal; HC: cadena pesada; LC: cadena ligera).

La Figura 2 ilustra de manera esquemática un vector de control.

La Figura 3 ilustra de manera esquemática un vector de acuerdo con una realización preferida de la presente invención (vector pDGP -) que incluye dos genes de interés, es decir, darbepoyetina alfa (abreviatura: Darbe alfa).

La Figura 4 ilustra de manera esquemática otro vector de control, es decir, el vector de control 1, en donde la expresión de GOI (darbepoyetina alfa) está bajo el control regulador del potenciador/promotor CMV (pot/prom CMV) y el intrón II de la Hbb.

La Figura 5 ilustra de manera esquemática otro vector de control más, es decir, vector de control 2, en donde la expresión de GOI (darbepoyetina alfa) está bajo el control regulador del potenciador/promotor SV40 (pot/prom SV40) solo (sin secuencias de intrones).

En un intento de probar el rendimiento del vector de expresión pDGP según la presente invención, los inventores compararon pDGP (ilustrado en la Fig. 1) con el vector control (ilustrado en la Fig. 2). Tanto el pDGP como el vector control incluyen los mismos dos genes de interés: mAB HC y mAb LC (de un anticuerpo anti-CD20). Ambos vectores se transfectaron en las mismas líneas celulares hospedadoras (por ejemplo, CHO K1PD, COS1, CV1, Vero, HeLa, HEK-293, PER C6). Las células se sometieron después a sucesivas etapas de selección en presencia de G418 y MTX. Después de cada etapa de selección, se determinaron y compararon los títulos de mAb en lotes de matraz de agitación convencional. Los detalles experimentales se presentan a continuación.

En un intento adicional de probar el rendimiento del vector de expresión pDGP-A según la presente invención, los inventores compararon pDGP-A (ilustrado en la Fig. 3) con el vector de control 1 y 2 (representado en las Figs. 4 y 5, respectivamente). Tanto el pDGP-A y el vector de control 1 y 2 incluyen el mismo gen de interés: darbepoyetina alfa, una hormona (factor eritropoyético). Los vectores se transfectaron en las mismas líneas celulares hospedadoras (por ejemplo, CHO K1PD, COS1, CV1, Vero, HeLa, HEK-293, PER C6). Al contrario de lo mencionado anteriormente para el vector pDGP, cada uno de los vectores de expresión de pDGP-A, los vectores de control 1 y 2 comprenden un único casete de expresión de GOI y no comprenden ningún gen(es) marcador(es) de selección eucariótico. Por lo tanto, el vector *Neo* - que comprende el gen de la resistencia a la neomicina - se cotransfectó con el fin de posibilitar la selección de una etapa en medio que contiene geneticina (G418). Los detalles experimentales se presentan a continuación.

Experimentos

Los vectores de mamíferos según la invención se pueden usar y se usaron para producir diversas proteínas diferentes (recombinantes). Los siguientes ejemplos ilustran la configuración experimental general de una expresión recombinante de una proteína monomérica y multimérica, respectivamente. En particular, los datos presentados en lo sucesivo en este documento se han recogido usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD20 y darbepoyetina alfa, una hormona (factor eritropoyético), como proteínas ejemplares que se pueden expresar usando el vector de mamífero según la invención.

Ejemplo 1: Expresión de una proteína multimérica (anticuerpo monoclonal anti-CD20) Diseño y construcción de vector de expresión

Los vectores usados en el presente estudio se diseñaron *in silico* usando el programa informático de evaluación de vector NTI 9.0. Los fragmentos requeridos para la construcción de vectores tales como el vector pDGP y el vector de control (Fig. 2) se prepararon en Geneart AG, Regensburg, Alemania. Los expertos en la técnica entienden que son factibles varios ensamblajes vectoriales de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. Dado que los elementos individuales de los vectores de acuerdo con la invención son conocidos en la técnica, los vectores adecuados se pueden ensamblar, por ejemplo, mediante secuenciación o amplificación y la clonación apropiada de los elementos genéticos básicos y los casetes de expresión. Por lo tanto, se entenderá que otras varias realizaciones y modos de obtener los respectivos vectores son adecuados y fácilmente disponibles.

Los elementos genéticos reguladores que dirigen la expresión de los 4 casetes de expresión en cada vector de expresión se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1: Listado de elementos genéticos reguladores comprendidos en el pDGP/vector de control

Vector	**GOI (2)**			***neo***		***dhfr***	
	promotor	**intrón**	**poli(A)**	**promotor**	**poli(A)**	**promotor**	**poli(A)**
vector pDGP	pot/prom de SV40	intrón II de la Hbb	poli(A) de SV40	pot/prom de SV40	poli(A) sint	pot/prom de SV40	poli(A) de SV40
Vector de control	pot/prom de CMV	intrón de RK	poli(A) de SV40	pot/prom de SV40	poli(A) sint	pot/prom de SV40	poli(A) de SV40

Preparación de vector para la transfección

Ambos vectores de expresión se alinearon usando la endonucleasa de restricción de un solo corte SwaI *(ATTTAAAT,* Roche, n.º de cat. 11 371 525 001). Se digirió un máximo de 100 µg de ADN del vector por reacción usando SwaI a 5 U/µg de ADN. A las mezclas de reacción se añadieron las cantidades apropiadas de tampón de reacción 10x y H_2O. Las mezclas de reacción se incubaron a 25 °C durante 4 h durante la noche. Tras la digestión del ADN, la precipitación se realizó en una cámara de aire de flujo laminar tal como se describe a continuación:

- Añadir 1 volumen de isopropanol
- Agitar vorticialmente de manera concienzuda
- Centrifugar 30 min a 21000 x g a 4 °C
- Descartar el sobrenadante
- Añadir cuidadosamente 1 volumen de etanol estéril y frío al 70 %
- Centrifugar 1 min a máxima velocidad, a 4 °C
- Descartar el sobrenadante
- Secar al aire el sedimento a TA durante 5-30 min (en laminar)
- Resuspender el ADN en 100 µl de agua estéril.

Tras a digestión, la pureza (OD 260/280) y la concentración de ADN lineal se determinó usando NanoDrop ND-1000. La electroforesis en gel de ADN digerido (e-gel de agarosa al 0,8 %, Invitrogen) se realizó para controlar la linearización.

Células hospedadoras

Se usaron las células CHO K1PD, COS1, CV1, Vero, HeLa, HEK-293 y PER C6.

La línea celular CHO K1PD es una subpoblación de la línea celular CHO K1 que se origina a partir de ATCC (nº. de cat. CCL-61.3). La línea celular original se adaptó a un cultivo de suspensión libre de suero en medio DM122. El medio de crecimiento DM122 se usó para todos los experimentos que emplean células CHO K1PD.

Transfección

El sistema Amaxa se usó para la transfección celular (Nucleofector kit V, n.º de cat.: VCA-1003). No se transfectaron más de 5 grupos a la vez, para permitir el tiempo suficiente para todas las manipulaciones celulares necesarias. El protocolo detallado es como sigue:

1. En el momento de la transfección, las células deben ser de hasta 2 x 10^6/ml con una viabilidad ≥ al 90 %.

2. Se usan 5 x 10^6 células por transfección.

3. Contar las células y centrifugar a 90 x g, 10 min, a TA en un tubo de centrifugación de 50 ml.

4. Retirar cuidadosamente el medio y resuspender el sedimento celular en 100 µl de solución V (contenida en el kit Amaxa)

5. Añadir ADN (3 µg) y mezclar suavemente.

6. Añadir la mezcla de la etapa 5 a una cubeta de transfección y colocar la misma en un dispositivo Amaxa Nucleofector.

7. Transfectar las células usando el programa Amaxa a 23 U.

8. Para las células que crecen en matraces de agitación (por ejemplo, CHO K1PD) añadir un poco de medio de crecimiento en la cubeta y transferir cuidadosamente las células a un matraz de agitación de 125 ml utilizando 20 ml de medio de crecimiento. Enjuagar la cubeta una vez o dos con medio de crecimiento y añadirlo al matraz de agitación. Incubar las células 24 - 48 h en un agitador (110 rpm), a 37 °C, con CO_2 al 10 %.

Medio de crecimiento y selección con G418/MTX

Las células (por ejemplo, células CHO K1PD, COS1, CV1, Vero, HeLa, HEK-293, PER C6) se cultivaron en un medio adecuado para cultivar células de mamífero, tal como medio de crecimiento DM122 suplementado con L-glutamina 8 mM (Sigma, n.º de cat. G7513) cuando se usa CHO K1PD para los experimentos.

Las etapas de selección se realizaron en el mismo medio suplementado adicionalmente con G418 (Geneticina, Gibco, n.º de cat. 10131-027; concentración final: 0,8 mg/ml) y/o metotrexato (metotrexato hidrato, Sigma, n.º de cat. M8407150; concentración final: 150 o 250 nM).

La selección con G418 fue la primera etapa de selección tras la transfección. Se añadió G418 a las células 2-5 días después de la transfección, cuando la viabilidad de las células superaba el 60 %. La selección con G418 normalmente dura 2-4 semanas. Una vez que la viabilidad de las células había alcanzado al menos el 85 %, se llevó a cabo la selección con MTX.

Se usó una densidad de cultivo de 2 x 10^5 células viables por ml para comenzar la selección con MTX en células preseleccionadas con G418. Se realizaron dos subetapas de selección usando las concentraciones de MTX indicadas anteriormente (150/250 nM). La selección con MTX normalmente dura de 2 a 3 semanas, hasta que la viabilidad de las células alcanza más del 85 %.

Descongelación/congelación de células

Las células se descongelaron a 37 °C y se inocularon gota a gota directamente a matrices de agitación de 250 ml que contienen 50 ml de medio precalentado en una densidad celular inicial de aproximadamente 10^5 células variables por ml. Las células se cultivaron a 37 °C, con CO_2 al 10 % y a 110 rpm.

Las células se congelaron en fase de crecimiento exponencial a una viabilidad > del 90 %. Se congelaron 5-10 x 10^6 células viables por frasco en medio acondicionado que contiene DMSO al 7,5 %. En primer lugar, el cultivo celular se centrifugó a 180 x g, 5 min, TA. En segundo lugar, se retiró parcialmente el sobrenadante. A continuación, se añadió DMSO al sobrenadante restante hasta una concentración final del 7,5 %. Los sedimentos celulares se resuspendieron suavemente. Los frascos de congelación se rellenaron cada uno con 1 ml de suspensión celular y se transfirieron a un congelador profundo a - 80 °C en un recipiente de congelación Mr. Frosty. En 1 mes, las células congeladas en los frascos de congelación se transfirieron en un recipiente de nitrógeno líquido.

Cultivo y manejo de células

Las células se dividieron cada 2-3 días a una densidad de 1-1,5 x 10^5 células viables por ml y se añadieron al medio de crecimiento precalentado apropiado para mantener el crecimiento exponencial.

Condiciones de incubación: 37 °C, 90-110 rpm (para matraces de agitación de 125 y 250 ml), CO_2 al 10 %(para medio DM122).

Prueba para la expresión de mAb

Después de cada etapa de selección (G418, MTX) un experimento de lote de diez días en medio suplementado de manera apropiada (por ejemplo, DM122) se realizó para evaluar la expresión de mAb. Las células se cultivaron a una densidad final de 1,5 x 10^5 células viables/ml en matraces de agitación de 125 ml. Los volúmenes de cultivo total fueron de 25 ml. Las células se cultivaron en un incubador de agitación (a 37 °C, 110 rpm, con CO_2 al 10 %). En el día 10, se tomó 1 ml de las muestras de sobrenadante de cultivo celular para medir el título de mAb. El contenido en mAb se determinó mediante CA (Cromatografía de Afinidad con proteína A).

Resultados

Los títulos de lote de diez días de células transfectadas con vector pDGP tras las diferentes etapas de selección se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Títulos de lote de diez días; células transfectadas con vector pDGP tras las diferentes etapas de selección

Experimento	**G418**	**MTX 150 nM**	**MTX 250 nM**
	Título (mg/l)	**Título (mg/l)**	**Título (mg/l)**
1	94	246	281
2	80	249	284
3	94	225	288
4	96	229	303
5	91	218	309
6	84		
7	74	212	339
8	89	216	289
9	89		
10	94	243	260

Los títulos de lote de diez días de células transfectadas con vector de control tras las diferentes etapas de selección se muestran en la Tabla 3

Tabla 3: Títulos de lote de diez días; células transfectadas con vector de control tras las diferentes etapas de selección

Experimento	**G418**	**MTX 150 nM**	**MTX 250 nM**
	Título (mg/l)	**Título (mg/l)**	**Título (mg/l)**
1	15	190	192
2	15	247	372
3	14	251	219
4	15	207	341
5	15	154	385
6	15	422	646

En comparación con las células transfectadas con el vector de control, se midieron títulos 4-5 veces mayores para las células transfectadas con pDGP tras la selección con G418. En promedio, se midieron los mismos títulos para ambos enfoques experimentales tras la selección con MTX. Sin embargo, los títulos logrados fueron mucho más reproducibles con las células transfectadas con pDGP (± 10 %) en comparación con las células transfectadas con el vector de control (± 50 %).

Ejemplo 2: Expresión de una proteína monomérica (darbepoyetina alfa)

Diseño y construcción del vector de expresión

Los vectores y fragmentos usados en el presente estudio se diseñaron y prepararon tal como se describe en el Ejemplo 1. Los experimentos de expresión con darbepoyetina alfa se realizaron usando un derivado adicional del vector pDGPΔGOI mencionado anteriormente, el vector pDGP-AΔGOI. El vector pDGP-AΔGOI comprende la misma combinación novedosa e inventiva de elementos reguladores que dirigen la expresión de GOI, cuando se insertan, el vector pDGP-AΔGOI mencionado anteriormente (y el vector pDGP del Ejemplo 1): el potenciador del virus del simio 40 y la región promotora temprana y el intrón II de la Hbb. En el ejemplo presente, la darbepoyetina alfa se inserta en pDGP-AΔGOI como una proteína ejemplar de interés. Además, el vector de control 1, el vector de control 2 t el vector *Neo* se usaron en este estudio (véase más abajo).

Al contrario de vector pDGP usado en el Ejemplo 1, cada uno de los vectores de expresión mencionados anteriormente (excepto el vector *Neo*) comprende un único casete de expresión de GOI y no comprende ningún gen(es) marcador(es) de selección eucariótico. Por lo tanto, el vector *Neo* - que comprende el gen de la resistencia a la neomicina - se cotransfectó en todos los experimentos con el fin de posibilitar la selección en medio que contiene geneticina (G418). El Ejemplo 2, por tanto, representa un sistema de vectores según el tercer aspecto de la invención.

Los elementos genéticos reguladores que dirigen la expresión de darbepoyetina alfa en el vector pDGP-A y en el vector de control 1 y 2 se enumeran en la Tabla 4. Así mismo, la Tabla 4 muestra los elementos genéticos reguladores que dirigen la expresión del gen de resistencia a la neomicina en el vector *Neo*.

Tabla 4: Listado de elementos genéticos reguladores comprendidos en el pDGP-A, el vector de control 1, el vector de control 2 y el vector *Neo*

Vector	**GOI** (darbepoyetina alfa)			***neo***	
	promotor	**intrón**	**poli(A)**	**promotor**	**poli(A)**
pDGP-A	pot/prom de SV40	intrón II de la Hbb	poli(A) de SV40	-	-
Vector de control 1	pot/prom de CMV	intrón II de la Hbb	poli(A) de SV40	-	-
Vector de control 2	pot/prom de SV40	-	poli(A) de SV40	-	-
Vector *Neo*	-	-	-	pot/prom de SV40	poli(A) de SV40

Células hospedadoras

Se usaron las mismas líneas celulares que en el Ejemplo 1.

Transfección

Se usó el mismo método y sistema de transfección que en el Ejemplo 1.

Medio de crecimiento y selección con G418

Las células (por ejemplo, células CHO K1PD, COS1, CV1, Vero, HeLa, HEK-293, PER C6) se cultivaron en un medio adecuado para cultivar células de mamífero, tal como el medio de crecimiento DM122 desarrollado internamente suplementado con L-glutamina 8 mM (Sigma, n.º de cat. G7513) cuando se usa CHO K1PD para los experimentos.

La etapa de selección se realizó en el mismo medio suplementado adicionalmente con G418 (Geneticina, Gibco, n.º de cat. 10131-027; concentración final: 0,8 mg/ml).

Se añadió G418 a las células 2-5 días después de la transfección, cuando la viabilidad de las células superaba el 60

%. La selección con G418 normalmente dura 2-4 semanas.

Descongelación/congelación de células

La descongelación/congelación de células se realizó tal como se describe en el Ejemplo 1.

Cultivo y manejo de células

El cultivo y manejo de células se realizó tal como se describe en el Ejemplo 1.

Prueba para la expresión de darbepoyetina alfa

Los grupos se sometieron a ensayo con respecto a la expresión de darbepoyetina alfa estable tras la etapa de selección con G418. Un experimento de lote en medio suplementado de manera apropiada (por ejemplo, DM122) se realizó para evaluar la expresión de darbepoyetina alfa. Las células se cultivaron a una densidad final de 1,5 x 10^5 células viables/ml en matraces de agitación de 125 ml. Los volúmenes de cultivo total fueron de 25 ml. Las células se cultivaron en un incubador de agitación (a 37 °C, 110 rpm, con CO_2 al 10 %). En los días 5 y 9, se tomaron 0,5 ml de las muestras de sobrenadante de cultivo celular para medir el título de darbepoyetina alfa. El contenido de darbepoyetina alfa se determinó mediante un ensayo ELISA específico de EPO (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) (kit Epo-ELISA Quantikine, R&D Systems, n.º de cat.: DEP00).

Resultados

Los contenidos en darbepoyetina alfa en los días 5 y 9 en los cultivos de lotes de células transfectadas con pDGP-A, vector de control 1 y vector de control 2 se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Contenido en darbepoyetina alfa en los días 5 y 9 en cultivos de lotes de células transfectadas con el vector pDGP-A, el vector de control 1 y el vector de control 2, respectivamente.

Experimento	**Día 5**	**Día 9**
	Título (mg/l)	**Título (mg/l)**
pDGP-A		
1	27,4	76,4
2	26,9	49,1
Vector de control 1		
1	3,7	8,4
2	5,0	8,3
Vector de control 2		
1	1,9	5,5
2	1,7	4,2

En comparación con las células transfectadas con el vector de control 1, se obtuvieron títulos de 5 a 10 veces mayor a partir de células transfectadas con el vector pDGP-A tras la selección con G418. En comparación con las células transfectadas con el vector de control 2, el uso del vector pDGP-A dio como resultado un título de alfa darbepoyetina de hasta 14 veces mayor, mostrando la ventaja y superioridad de la combinación del potenciador del virus del simio 40 y la región promotora temprana y el intrón II de la Hbb como elementos reguladores para dirigir la expresión de proteína recombinante.

Conclusión

Los vectores de expresión de la presente invención (tales como pDGP y pDGP-A) proporcionan las siguientes ventajas sobre vectores de expresión usados actualmente en la técnica (tales como los vectores de control):

- Debido a la alta reproducibilidad, el uso de pDGP y pDGP-A, como ejemplos de vectores de acuerdo con la invención, reduce de manera considerable el número de muestras celulares (es decir, grupos celulares transfectados) a generar y someter a ensayo a solo de 3 a 5, reduciendo de este modo la carga de trabajo de

manera significativa. Actualmente, se requiere la generación de un elevado número de muestras celulares (hasta 50) debido a la baja reproducibilidad generalmente para identificar muestras celulares de alta productividad.

- El uso de vectores, tales como pDGP y pDGP-A, proporciona títulos adecuados de la proteína expresada de interés para la caracterización del producto, estudios preclínicos y de fase I tras solo una única etapa de selección con G418. No se requieren etapas de selección con MTX adicionales para aumentar el título de la proteína (es decir, anticuerpo) antes de la clonación celular.
- El tiempo requerido para desarrollar una línea celular se puede reducir notablemente cuando se usa, por ejemplo, pDGP o pDGP-A, así como el número de etapas de selección se reduce a una sola etapa con G418.

Referencias

1 Trill JJ, Shatzman AR, Ganguly S: Production of monoclonal antibodies in COS and CHO cells. Current Opinion in Biotechnology 6, 1995: 553-560

2 Xu Z, Mizuguchi H, Ishii-Watabe A, Uchida E, Mayumi T, Hayakawa T: Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors. Gene 272, 2006: 149-156

3 Melcher R, Grosch HW, Hasilik A: Plasmid vectors with a 5'-hybrid intron facilitate high-level glycoprotein expression in CHO-cells. Biochimica et Biophysica Acta, 1575, 2002: 49-53

4 Kim Y, Kim S, Lee J, Shin, H: Expression vector for mammal comprising murine cytomegalovirus immediate early gene enhancer/promoter and human beta globin intron, cell transformed therewith and method for producing heterologous protein using said cell. Patente: KR 1020000070503-A2 24-NOV-2000

5 Xu Z, Mizuguchi H, Ishii-Watabe A, Uchida E, Mayumi T, Hayakawa T: Strength evaluation of transcriptional regulatory elements for transgene expression by adenovirus vector. Journal of Controlled Release, 81,2002: 155-163

6 Komiya E, Kondoh M, Mizuguchi H, Fujii M, Utoguchi N, Nakanishi T, Watanabe Y: Characteristics of Transcription-regulatory Elements for Gene Expression from Plasmid Vectors in Human Trophoblast Cell Lines. Placenta, 27, 2006: 934-938

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Lek Pharmaceuticals d.d.

<120> Vector de expresión de mamíferos

<130> HEX-001 PCT

<140> ..

<141> 18-12-2009

<150> 08 172 630.9

<151> 22-12-2008

<150> 09 158 118.1

<151> 17-04-2009

<160>3

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 870

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

<400> 1

gaacttcagg gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccccttctt ttctatggtt 60

aagttcatgt cataggaagg ggagaagtaa cagggtacag tttagaatgg gaaacagacg 120

aatgattgca tcagtgtgga agtctcagga tcgttttagt ttcttttatt tgctgttcat 180

aacaattgtt ttcttttgtt taattcttgc tttctttttt tttcttctcc gcaattttta 240

ctattatact taatgcctta acattgtgta taacaaaagg aaatatctct gagatacatt 300

aagtaactta aaaaaaaact ttacacagtc tgcctagtac attactattt ggaatatatg 360

tgtgcttatt tgcatattca taatctccct actttatttt cttttatttt taattgatac 420

ataatcatta tacatattta tgggttaaag tgtaatgttt taatatgtgt acacatattg 480

accaaatcag ggtaattttg catttgtaat tttaaaaaat gctttcttct tttaatatac 540

ttttttgttt atcttatttc taatactttc cctaatctct ttctttcagg gcaataatga 600

tacaatgtat catgcctctt tgcaccattc taaagaataa cagtgataat ttctgggtta 660

aggcaatagc aatatttctg catataaata tttctgcata taaattgtaa ctgatgtaag 720

aggtttcata ttgctaatag cagctacaat ccagctacca ttctgctttt attttatggt 780

tgggataagg ctggattatt ctgagtccaa gctaggccct tttgctaatc atgttcatac 840

ctcttatctt cctcccacag ctcctgggca 870

<210>2

<211> 9555

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

<400>2

aattcggatc tgcgcagcac catggcctga aataacctct gaaagaggaa cttggttagg 60

taccttctga ggcggaaaga accagctgtg gaatgtgtgt cagttagggt gtggaaagtc 120

cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt cagcaaccag 180

gtgtggaaag tccccaggct ccccagcagg cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta 240

gtcagcaacc atagtcccgc ccctaactcc gcccatcccg cccctaactc cgcccagttc 300

cgcccattct ccgccccatg gctgactaat ttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc 360

ctcggcctct gagctattcc agaagtagtg aggaggcttt tttggaggcc taggcttttg 420

caaaaagctt ctcgaggaac ttcagggtga gtctatggga cccttgatgt tttctttccc 480

cttcttttct atggttaagt tcatgtcata ggaaggggag aagtaacagg gtacagttta 540

gaatgggaaa cagacgaatg attgcatcag tgtggaagtc tcaggatcgt tttagtttct 600

tttatttgct gttcataaca attgttttct tttgtttaat tcttgctttc ttttttttc 660

ttctccgcaa tttttactat tatacttaat gccttaacat tgtgtataac aaaaggaaat 720

atctctgaga tacattaagt aacttaaaaa aaaactttac acagtctgcc tagtacatta 780

ctatttggaa tatatgtgtg cttatttgca tattcataat ctccctactt tattttcttt 840

tatttttaat tgatacataa tcattataca tatttatggg ttaaagtgta atgttttaat 900

atgtgtacac atattgacca aatcagggta attttgcatt tgtaatttta aaaaatgctt 960

tcttctttta atatactttt ttgtttatct tatttctaat actttcccta atctctttct 1020

ttcagggcaa taatgataca atgtatcatg cctctttgca ccattctaaa gaataacagt 1080

gataatttct gggttaaggc aatagcaata tttctgcata taaatatttc tgcatataaa 1140

ttgtaactga tgtaagaggt ttcatattgc taatagcagc tacaatccag ctaccattct 1200

gcttttattt tatggttggg ataaggctgg attattctga gtccaagcta ggccctttg 1260

ctaatcatgt tcatacctct tatcttcctc ccacagctcc tgggcagtgt ccactcccag 1320

gtccaactgc acctcggttc tatcgaaaac gcgtgtcgac ccgggcggcc gcttccctttt 1380

agtgagtcga cccgggcggc cgcttcccttt agtgagggt taatgcttcg agcagacatg 1440

ataagatata ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt 1500

atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaacaa 1560

gttaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcaggttc aggggagat gtgggaggtt 1620

ttttaaagca agtaaaacct ctacaaatgt ggtaaaatcc gataaggatc gatccgggct 1680

ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg 1740

gcgaatggac gcgccctgta gcggcgcatt aagcgcggcg ggtgtggtgg ttacgcgcag 1800

cgtgaccgct acacttgcca gcgccctagc gcccgctcct ttcgctttct tcccttcctt 1860

tctcgccacg ttcgccggct ttccccgtca agctctaaat cgggggctcc ctttagggtt 1920

ccgatttaga gctttacggc acctcgaccg caaaaaactt gatttgggtg atggttcacg 1980

atctgcgcag caccatggcc tgaaataacc tctgaaagag gaacttggtt aggtaccttc 2040

tgaggcggaa agaaccagct gtggaatgtg tgtcagttag ggtgtggaaa gtccccaggc 2100

tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac caggtgtgga 2160

aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca tgcatctcaa ttagtcagca 2220

accatagtcc cgcccctaac tccgcccatc ccgcccctaa ctccgcccag ttccgcccat 2280

tctccgcccc atggctgact aatttttttt atttatgcag aggccgaggc cgcctcggcc 2340

tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttggag gcctaggctt ttgcaaaaag 2400

cttctcgagg aacttcaggg tgagtctatg ggacccttga tgttttcttt ccccttcttt 2460

tctatggtta agttcatgtc ataggaaggg gagaagtaac agggtacagt ttagaatggg 2520

aaacagacga atgattgcat cagtgtggaa gtctcaggat cgttttagtt tcttttattt 2580

gctgttcata acaattgttt tcttttgttt aattcttgct ttctttttt ttcttctccg 2640

caatttttac tattatactt aatgccttaa cattgtgtat aacaaaagga aatatctctg 2700

agatacatta agtaacttaa aaaaaaactt tacacagtct gcctagtaca ttactatttg 2760

gaatatatgt gtgcttattt gcatattcat aatctcccta ctttattttc ttttatttt 2820

aattgataca taatcattat acatatttat gggttaaagt gtaatgtttt aatatgtgta 2880

cacatattga ccaaatcagg gtaattttgc atttgtaatt ttaaaaaatg ctttcttctt 2940

ttaatatact tttttgttta tcttatttct aatactttcc ctaatctctt tctttcaggg 3000

caataatgat acaatgtatc atgcctcttt gcaccattct aaagaataac agtgataatt 3060

tctgggttaa ggcaatagca atatttctgc atataaatat ttctgcatat aaattgtaac 3120

tgatgtaaga ggtttcatat tgctaatagc agctacaatc cagctaccat tctgctttta 3180

ttttatggtt gggataaggc tggattattc tgagtccaag ctaggccctt ttgctaatca 3240

tgttcatacc tcttatcttc ctcccacagc tcctgggcag tgtccactcc caggtccaac 3300

tgcacctcgg ttctatcgaa aggcgcgtac tagtcatatg ggcgcgccgg gcggccgctt 3360

ccctttagtg agggttaatg cttcgagcag acatgataag atacattgat gagtttggac 3420

aaaccacaac tagaatgcag tgaaaaaaat gctttatttg tgaaatttgt gatgctattg 3480

ctttatttgt aaccattata agctgcaata aacaagttaa caacaacaat tgcattcatt 3540

ttatgtttca ggttcagggg gagatgtggg aggtttttta aagcaagtaa aacctctaca 3600

aatgtggtaa aatccgataa ggatcgatcc gggctggcgt aatagcgaag aggcccgcac 3660

cgatcgccct tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tggacgcgcc ctgtagcggc 3720

gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgcc 3780

ctagcgcccg ctcctttcgc tttcttccct tcctttctcg ccacgttcgc cggctttccc 3840

cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta gggttccgat ttagagcttt acggcacctc 3900

gaccgcaaaa aacttgattt gggtgatggt tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg 3960

gtttttcgcc ctttgacgtt ggagtccacg ttctttaata gtggactctt gttccaaact 4020

ggaacaacac tcaaccctat ctcggtctat tcttttgatt tataagggat tttgccgatt 4080

tcggcctatt ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaatat ttaacgcgaa ttttaacaaa 4140

atattaacgt ttacaatttc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcatc tgtgcggtat 4200

ttcacaccgc atacgcggat ctgcgcagca ccatggcctg aaataacctc tgaaagagga 4260

acttggttag gtaccttctg aggcggaaag aaccagctgt ggaatgtgtg tcagttaggg 4320

tgtggaaagt ccccaggctc cccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag 4380

tcagcaacca ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg 4440

catctcaatt agtcagcaac catagtcccg cccctaactc cgcccatccc gcccctaact 4500

ccgcccagtt ccgcccattc tccgccccat ggctgactaa ttttttttat ttatgcagag 4560

gccgaggccg cctcggcctc tgagctattc cagaagtagt gaggaggctt ttttggaggc 4620

ctaggctttt gcaaaaagct tgattcttct gacacaacag tctcgaactt aaggctagag 4680

ccaccatgat tgaacaagat ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg gtggagaggc 4740

tattcggcta tgactgggca caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcc gtgttccggc 4800

tgtcagcgca ggggcgcccg gttctttttg tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg 4860

aactgcagga cgaggcagcg cggctatcgt ggctggccac gacgggcgtt ccttgcgcag 4920

ctgtgctcga cgttgtcact gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg 4980

ggcaggatct cctgtcatct caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg 5040

caatgcggcg gctgcatacg cttgatccgg ctacctgccc attcgaccac caagcgaaac 5100

atcgcatcga gcgagcacgt actcggatgg aagccggtct tgtcgatcag gatgatctgg 5160

acgaagagca tcaggggctc gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgcgcatgc 5220

ccgacggcga ggatctcgtc gtgacccatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg 5280

aaaatggccg cttttctgga ttcatcgact gtggccggct gggtgtggcg gaccgctatc 5340

aggacatagc gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc 5400

gcttcctcgt gctttacggt atcgccgctc ccgattcgca gcgcatcgcc ttctatcgcc 5460

ttcttgacga gttcttctga gcgggactct ggggttcgaa atgaccgacc aagcgacgcc 5520

caacctgcca tcacgatggc cgcaataaaa tatctttatt ttcattacat ctgtgtgttg 5580

gtttttttgtg tgaatcgata gcgataagga tccgcgtatg gtgcactctc agtacaatct 5640

gctctgatgc cgcatagtta agccagcccc gacacccgcc aacacccgct gacgcgccct 5700

gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct 5760

gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gagacgaaag ggcctcgtga 5820

tacgcctatt tttataggtt aatgtcatga taataatggt ttcttagacg tcaggtggca 5880

cttttcgggg aaatgtgcgc ggaaccccta tttgtttatt tttctaaata cattcaaata 5940

tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aaatgcttca ataatattga aaaaggaaga 6000

gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc 6060

ctgtttttgc tcacccagaa acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg 6120

cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc 6180

ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat 6240

cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgcat acactattct cagaatgact 6300

tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat 6360

tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata acactgcggc caacttactt ctgacaacga 6420

tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc 6480

ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga 6540

tgcctgtagc aatggcaaca acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag 6600

cttcccggca acaattaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc 6660

gctcggccct tccggctggc tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt 6720

ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct 6780

acacgacggg gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg 6840

cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagttta ctcatatata ctttagattg 6900

atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca 6960

tgaccaaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga 7020

tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa 7080

aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga 7140

aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagtg tagccgtagt 7200

taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt 7260

taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat 7320

agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct 7380

tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca 7440

cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag 7500

agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc 7560

gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc agggggggcgg agcctatgga 7620

aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca 7680

tggctcgaca gatccattta aattttcacc gtcatcaccg aaacgcgcga ggcagctgtg 7740

gaatgtgtgt cagttagggt gtggaaagtc cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca 7800

aagcatgcat ctcaattagt cagcaaccag gtgtggaaag tccccaggct ccccagcagg 7860

cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc atagtcccgc ccctaactcc 7920

gcccatcccg cccctaactc cgcccagttc cgcccattct ccgccccatg gctgactaat 7980

ttttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc ctcggcctct gagctattcc agaagtagtg 8040

aggaggcttt tttggaggcc taggcttttg caaaaagctt tatccccgct gccatcatgg 8100

ttcgaccatt gaactgcatc gtcgccgtgt cccaagatat ggggattggc aagaacggag 8160

acctaccctg gcctccgctc aggaacgagt tcaagtactt ccaaagaatg accacaacct 8220

cttcagtgga aggtaaacag aatctggtga ttatgggtag gaaaacctgg ttctccattc 8280

ctgagaagaa tcgaccttta aaggacagaa ttaatatagt tctcagtaga gaactcaaag 8340

aaccaccacg aggagctcat tttcttgcca aaagtttgga tgatgcctta agacttattg 8400

aacaaccgga attggcaagt aaagtagaca tggtttggat agtcggaggc agttctgttt 8460

accaggaagc catgaatcaa ccaggccacc tcagactctt tgtgacaagg atcatgcagg 8520

aatttgaaag tgacacgttt ttcccagaaa ttgatttggg gaaatataaa cttctcccag 8580

aatacccagg cgtcctctct gaggtccagg aggaaaaagg catcaagtat aagtttgaag 8640

tctacgagaa gaaagactaa caggaagatg ctttcaagtt ctctgctccc ctcctaaagc 8700

tatgcatttt tataagacca tgggactttt gctggcttta gatctttgtg aaggaacctt 8760

acttctgtgg tgtgacataa ttggacaaac tacctacaga gatttaaagc tctaaggtaa 8820

atataaaatt tttaagtgta taatgtgtta aactactgat tctaattgtt tgtgtatttt 8880

agattccaac ctatggaact gatgaatggg agcagtggtg gaatgccttt aatgaggaaa 8940

acctgttttg ctcagaagaa atgccatcta gtgatgatga ggctactgct gactctcaac 9000

attctactcc tccaaaaaag aagagaaagg tagaagaccc caaggacttt ccttcagaat 9060

tgctaagttt tttgagtcat gctgtgttta gtaatagaac tcttgcttgc tttgctattt 9120

acaccacaaa ggaaaaagct gcactgctat acaagaaaat tatggaaaaa tattctgtaa 9180

cctttataag taggcataac agttataatc ataacatact gtttttttctt actccacaca 9240

ggcatagagt gtctgctatt aataactatg ctcaaaaatt gtgtaccttt agctttttaa 9300

tttgtaaagg ggttaataag gaatatttga tgtatagtgc cttgactaga gatcataatc 9360

agccatacca catttgtaga ggttttactt gctttaaaaa acctcccaca cctccccctg 9420

aacctgaaac ataaaatgaa tgcaattgtt gttgttaact tgtttattgc agcttataat 9480

ggttacaaat aaagcaatag catcacaaat ttcacaaata aagcattttt ttcactgcat 9540

tctagttgtg gtttg 9555

<210>3

<211> 3830

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

<400>3

gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca 60

cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct 120

cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat 180

tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatcga tgcgcagcac catggcctga 240

aataacctct gaaagaggaa cttggttagg taccttctga ggcggaaaga accagctgtg 300

gaatgtgtgt cagttagggt gtggaaagtc cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca 360

aagcatgcat ctcaattagt cagcaaccag gtgtggaaag tccccaggct ccccagcagg 420

cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc atagtcccgc ccctaactcc 480

gcccatcccg cccctaactc cgcccagttc cgcccattct ccgccccatg gctgactaat 540

ttttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc ctcggcctct gagctattcc agaagtagtg 600

aggaggcttt tttggaggcc taggcttttg caaaaagctt acgcgtgaac ttcagggtga 660

gtctatggga cccttgatgt tttctttccc cttctttttct atggttaagt tcatgtcata 720

ggaaggggag aagtaacagg gtacagttta gaatgggaaa cagacgaatg attgcatcag 780

tgtggaagtc tcaggatcgt tttagtttct tttatttgct gttcataaca attgttttct 840

tttgtttaat tcttgctttc ttttttttttc ttctccgcaa tttttactat tatacttaat 900

gccttaacat tgtgtataac aaaaggaaat atctctgaga tacattaagt aacttaaaaa 960

aaaactttac acagtctgcc tagtacatta ctatttggaa tatatgtgtg cttatttgca 1020

tattcataat ctccctactt tattttcttt tatttttaat tgatacataa tcattataca 1080

tatttatggg ttaaagtgta atgttttaat atgtgtacac atattgacca aatcagggta 1140

attttgcatt tgtaatttta aaaaatgctt tcttctttta atatactttt ttgtttatct 1200

tatttctaat actttcccta atctctttct ttcagggcaa taatgataca atgtatcatg 1260

cctctttgca ccattctaaa gaataacagt gataatttct gggttaaggc aatagcaata 1320

tttctgcata taaatatttc tgcatataaa ttgtaactga tgtaagaggt ttcatattgc 1380

taatagcagc tacaatccag ctaccattct gcttttattt tatggttggg ataaggctgg 1440

attattctga gtccaagcta ggccctttttg ctaatcatgt tcatacctct tatcttcctc 1500

ccacagctcc tgggcagaat tcgggcccgg atccctcgag tctagaaact tgtttattgc 1560

agcttataat ggttacaaat aaagcaatag catcacaaat ttcacaaata aagcattttt 1620

ttcactgcat tctagttgtg gtttgtccaa actcatcaat gtatcttatc atgtctggtc 1680

gacttaagcc agccccgaca cccgccaaca cccgctgacg cgccctgacg ggcttgtctg 1740

ctcccggcat ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg 1800

ttttcaccgt catcaccgaa acgcgcgaga cgaaagggcc tcgtgatacg cctatttttа 1860

taggttaatg tcatgataat aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat 1920

gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg 1980

agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa 2040

catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac 2100

ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac 2160

atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt 2220

ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc 2280

gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggt tgagtactca 2340

ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgctgcc 2400

ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag 2460

gagctaaccg ctttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctcgccttga tcgttgggaa 2520

ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg 2580

gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa 2640

ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg 2700

gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt 2760

gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt 2820

caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag 2880

cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat 2940

ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct 3000

taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct 3060

tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca 3120

gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc 3180

agcagagcgc agataccaaa tactgttctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc 3240

aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct 3300

gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag 3360

gcgcagcggt cgggctgaac gggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc 3420

tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg 3480

agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgagggag 3540

cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt 3600

gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac 3660

gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc tggccttttg ctcacatgtt ctttcctgcg 3720

ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc 3780

cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 3830

REIVINDICACIONES

1. Un vector de expresión de mamíferos que comprende los siguientes elementos reguladores:

(a) el potenciador del virus del simio 40 y la región promotora temprana y

(b) el intrón II de la Hbb humana,

en donde el vector de expresión comprende al menos un gen de interés bajo el control de los elementos reguladores definidos en (a) y (b), y en donde el intrón II de la Hbb humana se localiza entre la secuencia que codifica el al menos un gen de interés y el potenciador de SV40 y una región promotora temprana.

2. El vector de la reivindicación 1, en donde el intrón II de la Hbb humana presenta la secuencia de SEQ ID NO:1.

3. El vector de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el vector además comprende al menos un gen que codifica un marcador de selección eucariota y/o procariota, en particular en donde el al menos un gen de marcador de selección eucariota es el gen de la neomicina fosfotransferasa de Tn5 y/o el gen de la dihidrofolato reductasa.

4. El vector de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el vector es circular.

5. El vector de la reivindicación 4, en donde dicho al menos un gen codifica la cadena ligera de una inmunoglobulina y/o la cadena pesada de una inmunoglobulina.

6. El vector de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el orden de los elementos reguladores, el(los) gen(es) de interés y los genes que codifican un marcador de selección es tal como sigue: potenciador de SV40 5'-/región promotora temprana, intrón II de la Hbb humana, gen que codifica la cadena ligera de una inmunoglobulina, secuencia de señal de poliadenilación del SV40; potenciador del SV40/región promotora temprana, intrón II de la Hbb humana, gen que codifica la cadena pesada de una inmunoglobulina, secuencia de señal de poliadenilación del SV40; potenciador del SV40/región promotora temprana, gen de la neomicina fosfotransferasa de Tn5, una secuencia de señal de poliadenilación sintética; promotor temprano del SV40, gen de la dihidrofolato reductasa, secuencia de señal de poliadenilación del SV40-3'.

7. El vector de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el vector es el vector pDGPΔGOI que presenta una secuencia de 9555 pb, cuya una hebra se representa mediante la SEQ ID NO:2.

8. Un sistema de vectores, que comprende al menos dos vectores tal como se define en las reivindicaciones 3 o 4, en donde cada uno de los al menos dos vectores comprende al menos un gen de interés.

9. El sistema de vectores de la reivindicación 8, en donde un primer gen de interés localizado en un primer vector codifica la cadena ligera de una inmunoglobulina, y un segundo gen de interés localizado en un segundo vector codifica la cadena pesada de una inmunoglobulina.

10. Un sistema de vectores, que comprende al menos dos vectores, en donde un primer vector se define tal como en la reivindicación 1 o 2 y en donde un segundo vector comprende al menos un gen que codifica un marcador de selección que confiere resistencia a una célula transfectada.

11. El sistema de vectores de la reivindicación 10, en donde el primer vector es el vector pDGP-AΔGOI que presenta una secuencia de 3830 pb, cuta una hebra se representa mediante la SEQ ID NO:3.

12. Una célula de mamífero aislada que comprende un vector de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, o que comprende un sistema de vectores de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11.

13. La célula de la reivindicación 12, en donde la célula es una célula COP, una célula L, una célula C127, una célula Sp2/0, una célula NS-0, una célula NS-1, una célula NIH3T3, una célula PC12, una célula PC12h, una célula BHK, una célula CHO, una célula COS1, una célula COS3, una célula COS7, una célula CV1, una célula Vero, una célula HeLa, una célula HEK-293, una célula PER C6, o una célula derivada de fibroblastos diploides, células de mieloma y HepG2.

14. Un método *ex vivo* para producir una célula de la reivindicación 12, comprendiendo el método la etapa de proporcionar una célula de mamífero con un vector de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, o con un sistema de vectores de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11.

15. Un método para producir al menos un polipéptido de interés, en donde dicho método comprende la etapa de

cultivar una célula de la reivindicación 12 en un medio de cultivo celular en condiciones que permitan la expresión de dicho al menos un polipéptido de interés.

16. El método de la reivindicación 15, en donde dicho al menos un polipéptido de interés es/son secretado(s) en el medio de cultivo celular y dicho método además comprende la etapa de aislar del medio de cultivo celular dicho al menos un polipéptido de interés.

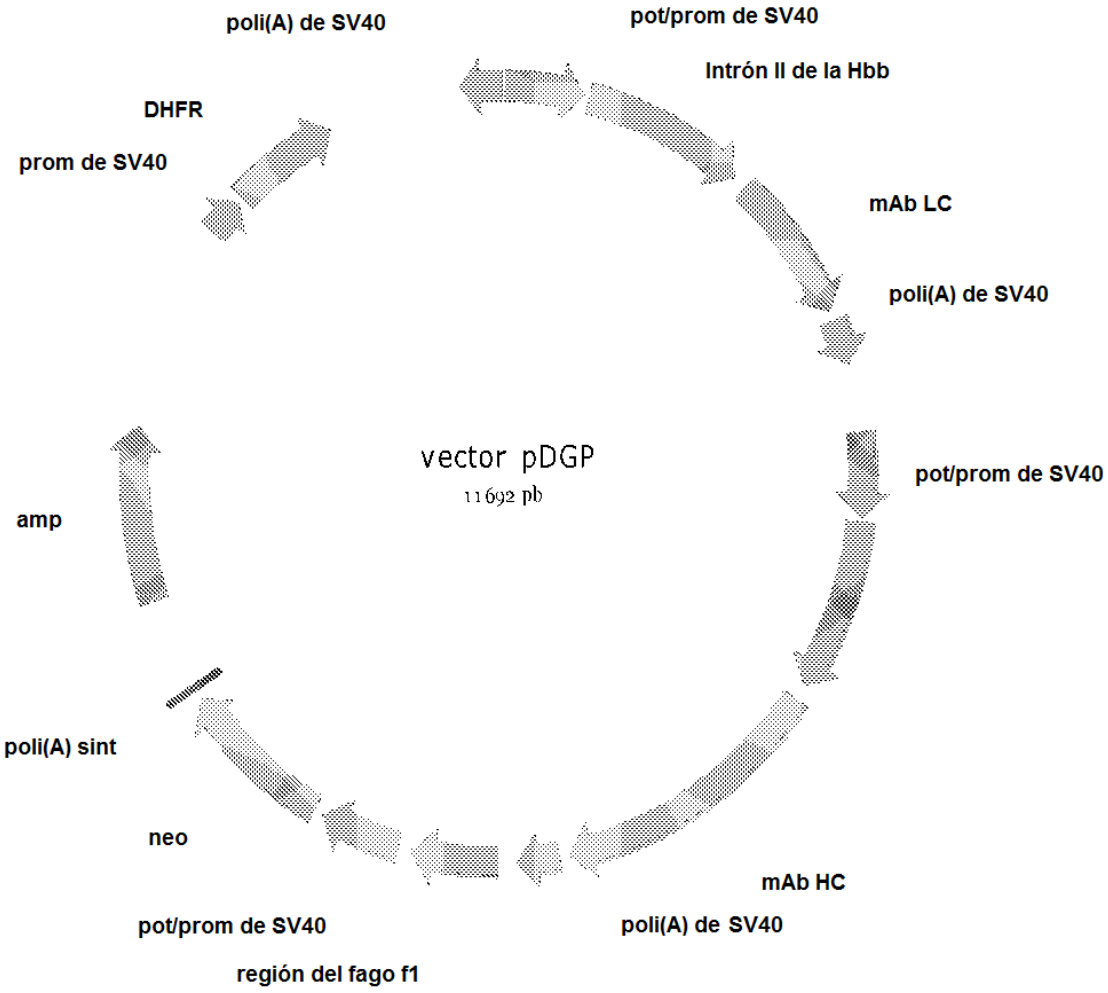
poli(A) de SV40
pot/prom de SV40
Intrón II de la Hbb
DHFR
prom de SV40
mAb LC
poli(A) de SV40
vector pDGP
11692 pb
pot/prom de SV40
amp
poli(A) sint
neo
mAb HC
pot/prom de SV40
poli(A) de SV40
región del fago f1

Fig. 1

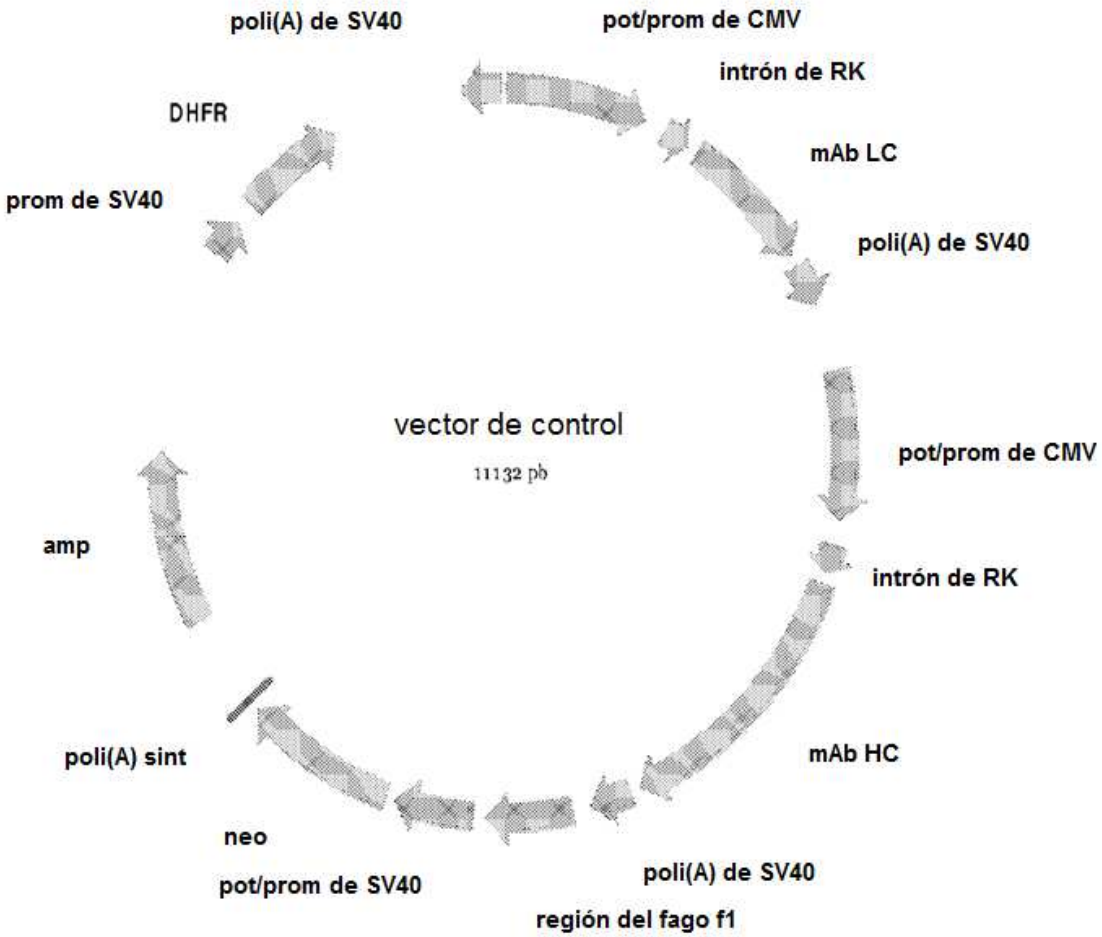
poli(A) de SV40
pot/prom de CMV
intrón de RK
DHFR
mAb LC
prom de SV40
poli(A) de SV40
vector de control
11132 pb
pot/prom de CMV
amp
intrón de RK
poli(A) sint
mAb HC
neo
poli(A) de SV40
pot/prom de SV40
región del fago f1

Fig. 2

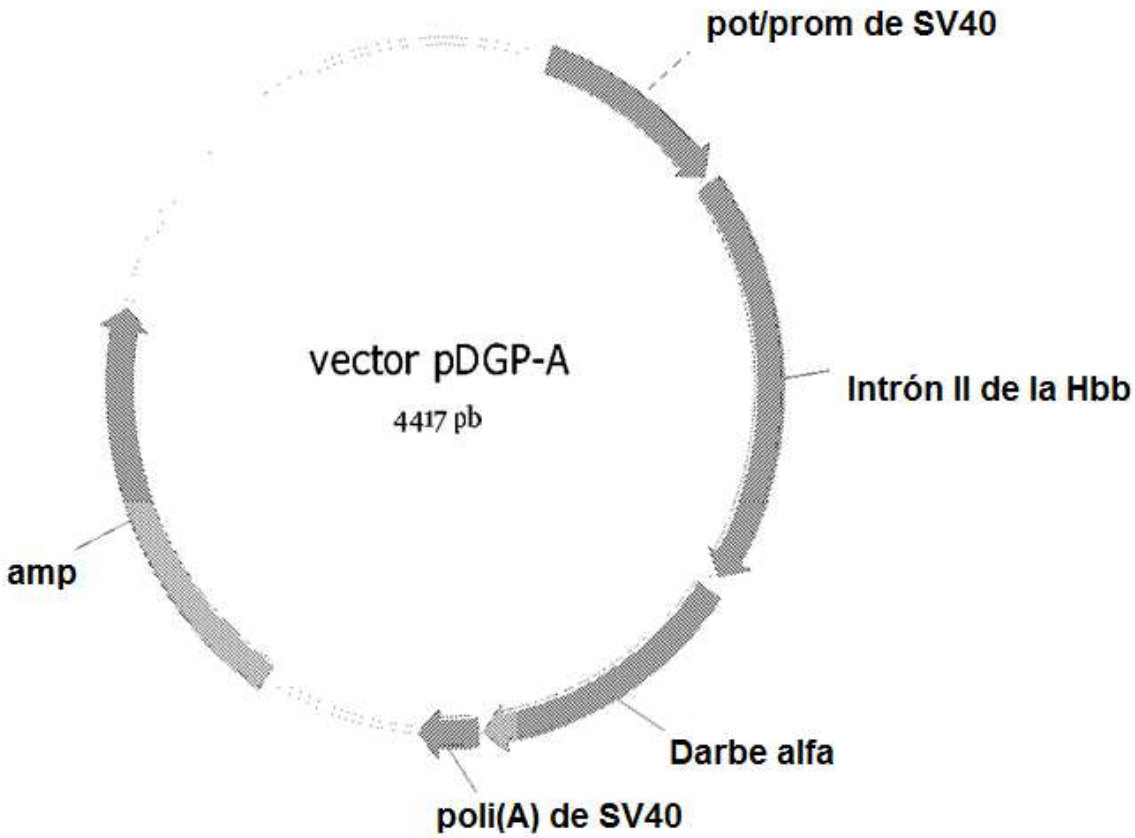
pot/prom de SV40
vector pDGP-A
4417 pb
Intrón II de la Hbb
amp
Darbe alfa
poli(A) de SV40

Fig. 3

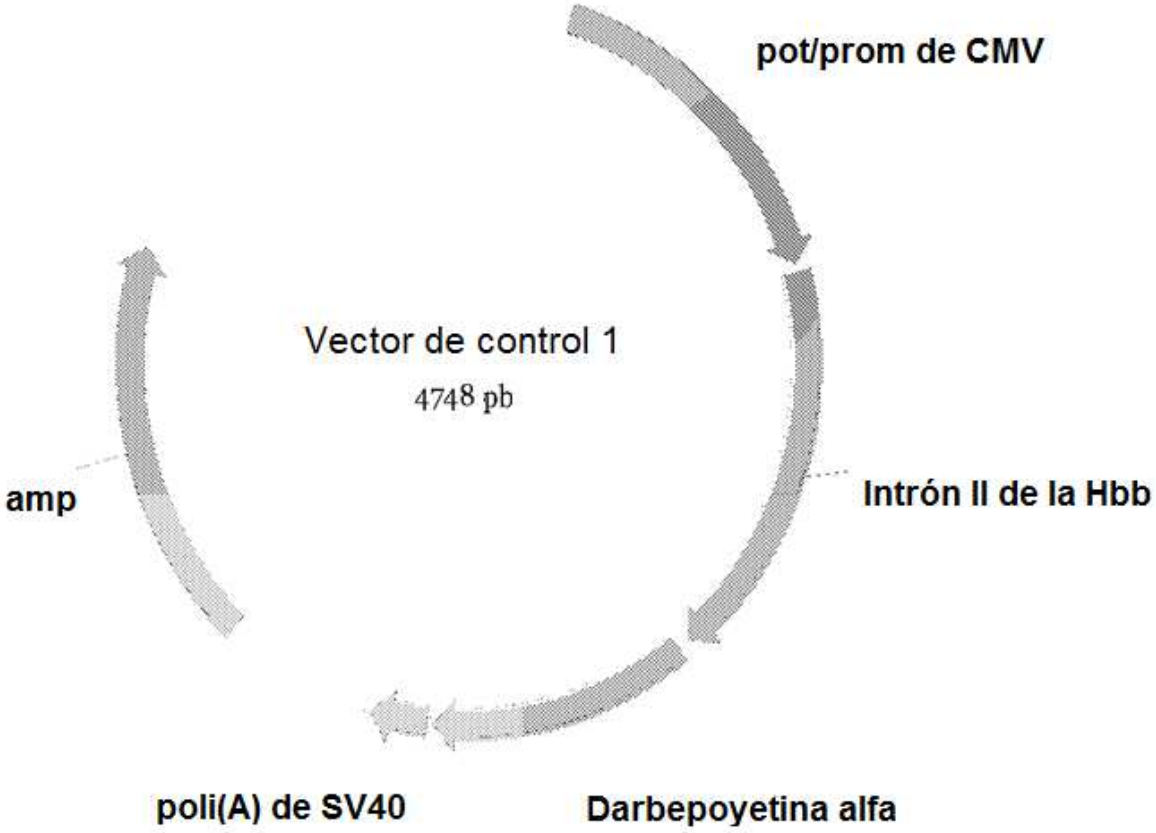
pot/prom de CMV
Vector de control 1
4748 pb
amp
Intrón II de la Hbb
poli(A) de SV40
Darbepoyetina alfa

Fig. 4

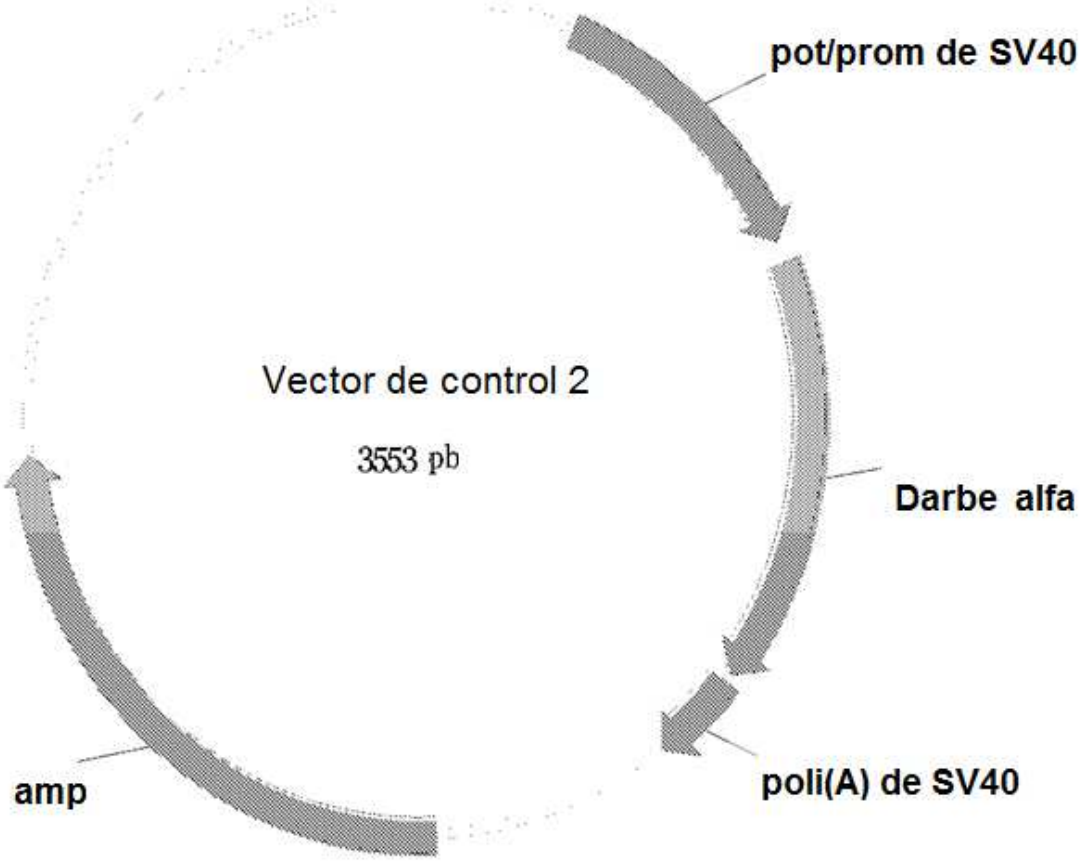
pot/prom de SV40
Vector de control 2
3553 pb
Darbe alfa
poli(A) de SV40
amp

Fig. 5