

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 843**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.09.2005 PCT/US2005/031081**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.03.2006 WO06028889**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2005 E 05807248 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 1784490**

54 Título: **Sistemas y procedimientos de producción de proteínas**

30 Prioridad:

02.09.2004 US 606439 P

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

09.02.2018

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017-5755, US**

72 Inventor/es:

**GAO, YIJIE;
PICHE, NICOLE, M.;
GENG, MEI;
HERRMANN, STEPHEN, H.;
ZHONG, XIAOTIAN;
KRIZ, RONALD y
LU, ZHIJIAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 653 843 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

Sistemas y procedimientos de producción de proteínas

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 60/606.439 presentada el 2 de septiembre de 2004.

5 Campo técnico

La invención se refiere a sistemas de expresión y procedimientos de uso de los mismos para la producción de proteínas de interés.

Antecedentes

10 Las proteínas secretadas y de membrana se someten a plegado y a otras modificaciones post-traduccionales en el sistema de Golgi y retículo endoplásmico (RE). La perturbación de la homeostasis de este sistema causa estrés celular que puede ocasionar apoptosis. La homeostasis del RE puede ser alterada por los cambios en la concentración de Ca^{2+} o estado redox, en la glicosilación alterada o en la acumulación de proteínas desplegadas o plegadas incorrectamente en el lumen del RE. Para superar el estrés, el sistema secretor ha desarrollado un mecanismo de respuesta adaptativa al estrés conocido como la respuesta de proteínas desplegadas (RPD). La activación de la RPD da lugar a al menos tres respuestas: (1) la cantidad de nuevas proteínas translocadas en el lumen del RE se reduce mediante la reducción de la traducción; (2) la proteína acumulada en el lumen del RE se retransloca en el citosol y se degrada; y (3) el sistema secretor de Golgi y RE se remodela de manera que se potencian las capacidades de plegado y procesamiento de proteínas en el sistema.

20 La potenciación de la capacidad del sistema de RE y Golgi en respuesta al estrés implica la regulación positiva de plegado y procesamiento de enzimas. Estas enzimas incluyen chaperonas del RE, enzimas implicadas en la glicosilación y formación del enlace disulfuro y las enzimas que participan en el transporte de vesículas. En células de mamíferos, las proteínas IRE1 y ATF6 son los principales transductores de esta rama de la vía de RPD. La proteína IRE1 es una glicoproteína transmembranal del RE con actividades quinasa y endonucleasas en su dominio citosólico C-terminal. Al menos dos genes IRE1 se han identificado en ratones, IRE1 α e IRE1 β . IRE1 α es esencial para la viabilidad y se expresa ampliamente. IRE1 β se ha detectado solo en la mucosa gastrointestinal. El estrés del RE conduce a la oligomerización de las proteínas IRE1 y a la transautofosforilación de sus dominios citosólicos. La fosforilación de IRE1 activa su actividad endonucleasa que escinde un intrón a partir del ARNm del factor de transcripción como la proteína 1 de unión a X-box (XBP1). Este evento de corte y empalme provoca la conversión de una isoforma de XBP1 transcripcionalmente inactiva (es decir, XBP1u) a una isoforma XBP1 transcripcionalmente activa (es decir, XBP1s o XBP1p). XBP1p se desplaza entonces en el interior del núcleo, en el que se une a sus secuencias objetivo, incluyendo un elemento de respuesta al estrés del RE (ERERE) y un elemento RPD (ERPD), en las regiones reguladoras de las chaperonas/genes enzimáticos del RE y Golgi, para inducir su transcripción. Numerosos genes objetivo de RPD cuentan con una o más copias de la secuencia de ERERE o ERPD en sus regiones promotoras.

35 ATF6 (factor activador de la transcripción 6) es otra proteína transmembranal del RE. El estrés del RE conduce al tránsito de la proteína ATF6 al compartimento de Golgi en el que su dominio citosólico se escinde por las proteasas de sitio 1 y sitio 2. El dominio citosólico escindido viaja al núcleo y actúa como un factor de transcripción mediante la unión a secuencias de ERERE, que a su vez, regula positivamente una variedad de chaperonas y enzimas de procesamiento en la vía de secreción.

40 La activación de la vía de RPD en células de mamífero también conduce a una inhibición transitoria de la traducción de proteínas por la vía de señalización PERK. PERK es una quinasa transmembranal del RE que puede fosforilar el factor de iniciación de la traducción en eucariotas eIF2 α en respuesta al estrés del RE. La fosforilación de eIF2 α impide el montaje del complejo de pre-iniciación 43S ribosomal y por lo tanto origina la atenuación de la traducción. Paradójicamente, la fosforilación de eIF2 α también se traduce en una rápida síntesis del factor de transcripción ATF4, que a su vez, potencia la expresión de un factor de transcripción proapoptótico CHOP. CHOP potencia la muerte celular cuando los efectos perjudiciales del estrés del RE ya no se puedan superar.

50 La expresión excesiva de proteínas recombinantes secretadas en células de mamífero conduce a menudo a un bajo rendimiento de producción. Un procedimiento comúnmente utilizado para mejorar la producción de proteínas es aumentar índices transcripcionales, tales como el uso de promotores más fuertes o aumentando el número de copias de genes. No obstante, el aumento de los índices transcripcionales puede exacerbar el estrés del RE y, por lo tanto, a menudo no logra mejorar de manera significativa el rendimiento. En algunos casos, puede reducir aún más el rendimiento de producción.

Sumario de la divulgación

55 La presente divulgación proporciona sistemas de expresión con una mejora de los rendimientos de producción correspondientes a proteínas secretadas o de membrana. Los sistemas emplean células animales o vegetales modificadas por ingeniería genética que han modificado, y en muchos casos, potenciado las capacidades de

plegado o procesamiento de proteínas.

En un aspecto, la presente divulgación presenta células animales o vegetales modificadas por ingeniería genética que comprenden uno o más casetes de expresión recombinantes que codifican (1) una proteína de interés y (2) un componente o modulador de una vía de RPD. Los componentes o moduladores de RPD adecuados incluyen, entre otros, moléculas sin IRE1 que son funcionales en las vías de RPD. Pueden ser componentes endógenos de RPD de las células huésped o variantes o equivalentes funcionales de los mismos. También pueden ser moléculas de origen natural o de origen no natural que modulan, ya sea directa o indirectamente, la actividad o expresión de un componente de RPD endógeno. En muchos casos, los componentes/moduladores de RPD se seleccionan de tal manera que su expresión o activación aumente la capacidad de plegado o procesamiento de proteínas de las células huésped.

Los componentes/moduladores de RPD a modo de ejemplo incluyen, entre otros, factores de transcripción, tales como XBP1 o ATF6 o sus fragmentos o variantes biológicamente activos. Otros componentes en las vías de RPD mediadas por XBP1 o ATF6 también se pueden utilizar. Además, se pueden utilizar chaperonas o enzimas de procesamiento residentes en el RE.

Las proteínas que se pueden producir de acuerdo con la presente divulgación incluyen, entre otros, eritropoyetinas, hormonas de crecimiento, insulinas, interferones, factores de crecimiento, proteínas de membrana u otras proteínas terapéuticas, profilácticas o de diagnóstico. En muchas realizaciones, las proteínas de interés se expresan por las células huésped como proteínas secretadas o de membrana.

Las células modificadas por ingeniería genética de la divulgación se pueden derivar de estirpes celulares, cultivos primarios u otras células aisladas o cultivadas. Las células modificadas por ingeniería genética también pueden ser células híbridas. En muchos casos, las células híbridas se generan mediante la fusión de una célula animal y una célula cancerosa (tal como una célula de mieloma). Los casetes de expresión recombinantes que codifican una proteína de interés o un componente/modulador de RPD se pueden incorporar o introducir en las células híbridas antes o después del evento de fusión. Además, las células modificadas por ingeniería genética de la presente invención pueden ser células de animales o plantas transgénicos. En una realización, la célula modificada por ingeniería genética es una célula de mamífero.

Un casete de expresión recombinante puede ser incorporado en una célula huésped mediante una variedad de medios. Por ejemplo, un casete de expresión puede ser integrado de forma estable en un cromosoma o en el genoma de una célula huésped. La integración puede ser aleatoria u orientada selectivamente (p. ej., utilizando el sistema de recombinación Cre-*lox* del bacteriófago P1). Un casete de expresión también puede ser introducido en una célula huésped a través de un vector de expresión no integrado.

Un casete de expresión recombinante puede ser controlado por un promotor constitutivo o inducible. También puede ser controlado por un promotor específico del tejido o regulado durante el desarrollo. Otros tipos de promotores también se pueden utilizar para la presente invención.

En otro aspecto, la presente divulgación presenta células animales o vegetales modificadas por ingeniería genética que comprenden uno o más casetes de expresión recombinantes que codifican (1) una proteína de interés y (2) un polipéptido capaz de unirse a ERPD o ERERE de las células huésped. En una realización, el polipéptido de unión a ERPD o ERERE es un factor de transcripción, tal como XBP1 o ATF6. En otra realización, el polipéptido de unión a ERPD o ERERE puede reclutar otra proteína a las regiones promotoras de los genes de RPD, y la segunda proteína comprende un dominio de transactivación capaz de activar la transcripción de los genes de RPD (p. ej., el dominio de activación de la transcripción de XBP1 o ATF6).

Una célula modificada por ingeniería genética de la divulgación puede expresar una proteína de interés y un componente/modulador de RPD a partir de casetes de expresión recombinantes idénticos o diferentes. La proteína de interés y el componente/modulador de RPD pueden ser controlados por los mismos o diferentes promotores.

En una realización, una célula modificada por ingeniería genética de la divulgación comprende (1) un primer casete de expresión recombinante que codifica una proteína de interés y (2) un segundo casete de expresión recombinante que codifica un componente o modulador de RPD o una proteína de unión a ERPD o ERERE (p. ej., XBP1 o ATF6). La relación entre el número total del primer casete de expresión recombinante y el número total del segundo casete de expresión recombinante en la célula puede variar, sin limitación, entre no más de 0,1:1 a al menos 10:1. En muchos casos, el promotor empleado por el primer casete recombinante puede tener la misma fuerza o una fuerza similar al promotor empleado por el segundo casete recombinante, y la relación entre el número total del primer casete recombinante y el número total del segundo casete recombinante varía de 0,5:1 a 10:1 (tal como al menos 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 o 9:1). Los promotores del primer y segundo casetes recombinantes también pueden tener fuerzas diferentes. Por ejemplo, el promotor en el primer casete recombinante puede ser más fuerte que el promotor en el segundo casete recombinante, tal como en al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces.

En otro aspecto, la presente divulgación presenta animales o plantas que incluyen una célula modificada por ingeniería genética de la presente invención. Los procedimientos de incorporación de una célula modificada por ingeniería genética en un animal o planta son muy conocidos en la técnica. En muchas realizaciones, los animales o

plantas son animales o plantas transgénicos.

En otro aspecto, la presente divulgación presenta cultivos celulares que son transfectados o transducidos con uno o más vectores de expresión que codifican (1) una proteína de interés y (2) un componente o modulador sin IRE1 de una vía de RPD. En muchas realizaciones, el vector o vectores de expresión comprenden un primer casete de expresión recombinante que codifica la proteína de interés y un segundo casete de expresión recombinante que codifica el componente o modulador de RPD (p. ej., XBP1 o ATF6). El primer y segundo casetes de expresión pueden ser transportados por vectores de expresión idénticos o por vectores de expresión diferentes. La relación molar entre el primer casete de expresión recombinante y el segundo casete de expresión recombinante en el cultivo celular puede variar, por ejemplo, entre no más de 0,1:1 a al menos 10:1, tal como al menos 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 o más. El cultivo celular puede ser un cultivo de células de mamífero, un cultivo de células de insecto, un cultivo de células vegetales u otro cultivo que sea adecuado para la producción de la proteína de interés.

La presente divulgación también presenta procedimientos de uso de células modificadas por ingeniería genética, animales, plantas o cultivos celulares para la producción de proteínas de interés.

Además, la presente divulgación presenta un vector de expresión que codifica (1) una proteína de interés y (2) un componente o modulador sin IRE1 de una vía de RPD.

Sumario de la invención

En base a la divulgación presentada en la presente memoria, la presente invención proporciona en un primer aspecto:

Un cultivo celular animal o vegetal transfectado o transducido con uno o más vectores de expresión que comprende:

- (a) al menos un casete de expresión recombinante que codifica dicha proteína de interés; y
- (b) al menos otro casete de expresión recombinante que codifica:

- (i) una proteína XBP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6 o un fragmento de la misma, en el que dicha proteína o fragmento de la misma se une a un elemento RPD (ERPD) o a un elemento de respuesta al estrés del RE (ERERE) de dicha célula; o

- (ii) una proteína ATF6 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 o los restos de aminoácidos 1-366 de SEQ ID NO:9, en el que dicha proteína se une a un elemento RPD (ERPD) o a un elemento de respuesta al estrés del RE (ERERE) de dicha célula;

en el que la relación entre el número total de dicho al menos un casete de expresión recombinante y el número total de dicho al menos otro casete de expresión recombinante es al menos 3:1.

La invención proporciona además, en un segundo aspecto, un procedimiento de aumento del rendimiento de una proteína de interés en una célula animal o vegetal que comprende transfectar o transducir la célula con uno o más vectores de expresión que comprende casetes que se definen en el primer aspecto, en el que la relación entre el número total de dicho al menos un casete de expresión recombinante y el número total de dicho al menos un casete de expresión recombinante es al menos 3:1.

Otras características, objetos y ventajas de la presente invención resultan evidentes en la descripción detallada que sigue. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada, aunque indica realizaciones preferentes de la invención, se da a título indicativo, no de limitación. Diversos cambios y modificaciones dentro del ámbito de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos se presentan de forma indicativa, no de limitación.

La Figura 1 demuestra que la sobreexpresión de BMP6 en las células PA DUKX causa estrés del RE.

La Figura 2 indica la expresión de XBP1 exógena en estirpes celulares transfectadas de forma estable bajo condiciones no estresadas o estresadas.

La Figura 3 muestra un aumento de la secreción de BMP6 en varias estirpes celulares XBP1 que en las células parentales de CHO DUKX.

La Figura 4 ilustra un aumento de la secreción de IL11RFc en varias estirpes celulares XBP1 que en las células parentales de CHO DUKX.

La Figura 5 demuestra que la eficacia de transfección de PFV es similar en estirpes celulares seleccionadas de XBP1 y parentales de CHO DUKX.

La Figura 6 muestra que la eficacia de la transcripción y de la traducción de PFV es similar en estirpes celulares seleccionadas de XBP1 y parentales de CHO DUKX.

La Figura 7 ilustra la expresión exitosa de la proteína ATF6 inducible en células COS-1.

La Figura 8 representa los efectos de XBP1 o ATF6 en diferentes relaciones con ADNcs de proteína objetivo en

la producción de proteínas objetivo.

La Figura 9 demuestra los efectos de XBP1 o ATF6 en la expresión de diferentes proteínas objetivo.

Descripción detallada

5 La presente divulgación proporciona sistemas y procedimientos de producción de proteínas de interés. Los sistemas de expresión de la presente invención emplean células animales o vegetales modificadas por ingeniería genética que han modificado o mejorado las capacidades de plegado o procesamiento de proteínas. En muchas realizaciones, las células modificadas por ingeniería genética de la presente invención comprenden uno o más casetes de expresión recombinantes que codifican una proteína de interés y un componente o modulador de una vía de RPD. La co-expresión del componente/modulador de RPD aumenta de manera significativa el rendimiento de la proteína de interés. Los componentes/moduladores de RPD adecuados para la presente invención incluyen, entre otros, factores de transcripción, tales como XBP1 o ATF6, o sus fragmentos o variantes biológicamente activos. Asimismo se pueden utilizar chaperonas o enzimas asociadas al RE.

15 Varios aspectos de la presente divulgación, incluyendo la presente invención, se describen con más detalle en las siguientes subsecciones. El uso de las subsecciones no tiene por objeto limitar la invención. Cada subsección puede aplicarse a cualquier aspecto de la invención. Como se utiliza en la presente memoria, el término "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario.

A. Proteínas de interés

20 Las proteínas que se pueden producir de acuerdo con la presente invención incluyen, entre otros, proteínas terapéuticas, profilácticas o de diagnóstico, tales como eritropoyetinas, hormonas de crecimiento, insulinas, interleucinas, factores de crecimiento, interferones, factores estimulantes de colonias, factores de la sangre, vacunas, colágenos, fibrinógenos, seroalbúminas humanas, activadores de plasminógeno tisular, glucosidasas, alglucerasas, proteínas básicas de mielina, hipoxantina guanina fosforribosiltransferasas, tirosina hidroxilasas, dopadecarboxilasas o anticuerpos. Los anticuerpos susceptibles a modo de ejemplo de la presente invención incluyen, entre otros, anticuerpos monoclonales, anticuerpos mono-específicos, anticuerpos poliespecíficos, anticuerpos no específicos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos quiméricos, anticuerpos sintéticos, anticuerpos recombinantes, anticuerpos híbridos, Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, dAb o fragmentos funcionales de los mismos. Aglutinantes de alta afinidad seleccionados utilizando tecnologías de visualización *in vitro* o estrategias evolutivas también pueden ser producidos de acuerdo con la presente invención. Estos aglutinantes de alta afinidad incluyen, entre otros, péptidos, anticuerpos y miméticos de anticuerpos. Véase, p. ej., Binz, y col., *NAT BIOTECHNOL.*, 22:575-582 (2004); y Lipovsek y Pluckthun, *J IMMUNOL METHODS*, 290:51-67 (2004). Otras proteínas de interés, tales como quinasas, fosfatasa, receptores acoplados a proteína G, receptores de factores de crecimiento, receptores de citoquinas, receptores de quimiocinas, anticuerpos de la superficie celular (inmunoglobulina unida a la membrana), receptores de BMP/GDF, receptores neuronales, canales iónicos, proteasas, factores de transcripción o polimerasas, también pueden ser producidas por la presente invención.

35 En muchas realizaciones, las proteínas producidas por la presente invención son proteínas recombinantes. Como se usa en la presente memoria, una proteína recombinante se refiere a una proteína que se construye o produce utilizando tecnología de ADN recombinante. Una proteína recombinante puede tener una secuencia de origen natural o una secuencia modificada por ingeniería genética. Se puede expresar, por ejemplo, a partir de un vector recombinante o a partir de un gen que es endógeno a las células huésped, pero que tiene una secuencia reguladora modificada por ingeniería genética. Por ejemplo, una proteína recombinante puede ser producida a partir de un gen endógeno pero con un promotor viral modificado por ingeniería genética.

40 En muchos casos, las proteínas recombinantes son proteínas de fusión que incluyen una etiqueta polipeptídica para facilitar el aislamiento, la purificación, la detección, la inmovilización, la estabilización, el plegado o la orientación selectiva de los productos expresados.

45 En muchos otros casos, las proteínas recombinantes incluyen péptidos señal. Un péptido señal puede ser endógeno o heterólogo a la proteína que está siendo producida. Un péptido señal suele determinar si una proteína se ha de formar en el RE rugoso o en ribosomas libres. Un péptido señal puede interactuar con una partícula de reconocimiento de señales y dirigir el ribosoma hacia el RE en el que tiene lugar la inserción co-traduccional. Muchos péptidos señal son altamente hidrófobos con residuos positivamente cargados. Un péptido señal puede ser eliminado de la cadena peptídica en crecimiento por una peptidasa señal, una proteasa específica ubicada en la cara cisternal del RE.

50 Las proteínas orientadas selectivamente al RE por secuencias señal pueden ser liberadas en el espacio extracelular como proteínas secretadas. Por ejemplo, las vesículas que contienen proteínas secretadas pueden fusionarse con la membrana celular y luego liberar su contenido en el espacio extracelular - un proceso llamado exocitosis. La exocitosis puede ocurrir de forma constitutiva o después de la recepción de una señal de activación. En el último caso, las proteínas se almacenan en vesículas secretoras (o gránulos secretores) hasta que se desencadena la exocitosis. Del mismo modo, las proteínas que residen en la membrana celular pueden ser secretadas en el espacio

extracelular mediante una escisión proteolítica de un “enlazador” que retiene la proteína en la membrana.

Una proteína de interés se puede aislar de un sistema de expresión por una variedad de medios. Los ejemplos de materiales iniciales para el aislamiento de proteínas incluyen, entre otros, medio de cultivo o lisado celular. Los procedimientos de aislamiento adecuados incluyen, entre otros, cromatografía de afinidad (incluyendo cromatografía de inmunofinidad), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de exclusión por tamaños, HPLC, precipitación de proteínas (incluyendo inmunoprecipitación), solubilización diferencial, electroforesis, centrifugación, cristalización o una combinación de las mismas. Una etiqueta polipeptídica, tal como una etiqueta de estreptavidina, una etiqueta FLAG, una etiqueta de polihistidina, una glutatión S-transferasa o un fragmento Fc, puede fusionarse con una proteína de interés para facilitar su aislamiento o purificación. En un ejemplo, la etiqueta polipeptídica se escinde a partir de la proteína de interés por una proteasa.

En muchas realizaciones, una proteína de interés aislada de acuerdo con la presente invención está esencialmente libre de otras proteínas o contaminantes. Por ejemplo, una proteína aislada puede ser al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % pura a partir de otras proteínas. En un ejemplo, una proteína aislada contiene no más de una cantidad insignificante de contaminantes que podrían interferir con su uso previsto.

Una proteína de interés aislada de acuerdo con la presente invención se puede verificar mediante el uso de técnicas convencionales tales como SDS-PAGE o inmunoensayos. Una SDS-PAGE se puede teñir con azul Coomassie, plata u otros agentes adecuados para visualizar la proteína aislada. Los inmunoensayos adecuados incluyen, entre otros, membranas Western, ELISAs, RIAs, ensayos tipo sándwich o inmunométricos, aglutinación en látex u otra aglutinación de partículas o chips proteómicos. La secuenciación de proteínas y espectrometría de masas también se pueden usar para verificar o analizar una proteína aislada.

B. Componentes/moduladores de RPD

Los componentes/moduladores de RPD que son susceptibles a la presente divulgación incluyen moléculas que son funcionales en las vías de RPD. Pueden ser de origen natural o de origen no natural. Pueden ser genéticamente modificados, sintetizados químicamente o aislados biológicamente. Un componente/modulador de RPD se puede derivar de las mismas especies o de diferentes especies como las células huésped. La expresión del componente/modulador de RPD mejora la secreción o la capacidad de procesamiento del RE de las células huésped. En muchos casos, la co-expresión de un componente/modulador de RPD con una proteína de interés en las células huésped mejora el rendimiento de la proteína de interés en al menos 2, 3, 4, 5, 10, o más veces.

Ejemplos de componentes/moduladores de RPD que son adecuados para la presente invención incluyen factores de transcripción, tales como XBP1 o ATF6. Los equivalentes funcionales de estos factores de transcripción, tales como fragmentos de XBP1 o ATF6, también se pueden utilizar. Estos fragmentos retienen al menos una porción sustancial de la actividad de la transcripción de la proteína XBP1 o ATF6 activada de manera transcripcional. Los efectores corriente abajo de XBP1 o ATF6, tales como chaperonas o enzimas del RE implicadas en la glicosilación de proteínas o en la translocación de vesículas, también se pueden utilizar.

Además, los moduladores sin IRE1 que pueden activar la expresión o la función biológica de un componente de una vía de RPD mediada por XBP1 o ATF6 pueden ser utilizados. Dicho modulador puede modular la vía de RPD por un mecanismo distinto de autosobreexpresión. Por ejemplo, tal modulador puede activar la función de un componente de RPD uniéndose directamente al componente o modular la expresión del componente mediante la unión a una secuencia reguladora en el gen que codifica el componente.

Además, los moduladores que pueden inhibir la expresión o las funciones biológicas de los componentes de la vía de señalización PERK pueden ser utilizados. Estos moduladores incluyen, sin limitación, anticuerpos, ARN antisentido, o secuencias de ARNi. Además, los mutantes dominantes negativos de los componentes de la vía PERK pueden ser utilizados. Un ejemplo de tales mutantes negativos dominantes es un mutante eIF2a S51A con el reemplazo de serina en la posición 51 (secuencia murina) a alanina. Esta sustitución elimina la capacidad de la proteína para ser fosforilada y por lo tanto suprime su efecto inhibitorio sobre el índice de traducción de la proteína durante el estrés del RE. Del mismo modo, se pueden introducir mutaciones en el dominio quinasa de PERK para eliminar o reducir su actividad quinasa para fosforilar eIF2a, evitando de este modo la inducción de atenuación traduccional o apoptosis durante el estrés del RE.

En una realización, la proteína XBP1 o un fragmento biológicamente activo de la misma se emplea para aumentar el rendimiento de una proteína de interés en las células huésped. La proteína XBP1 incluye dos dominios que se encuentran comúnmente en los factores de transcripción que confieren capacidad de unión y dimerización de ADN. XBP1 se conoce como un factor de transcripción que regula genes del CMH clase II mediante la unión a un elemento promotor referido como X-box. XBP1 también se une a un potenciador en el promotor del virus de la leucemia de células T tipo 1.

La activación de la vía de RPD da lugar a un corte y empalme dependiente de IRE1 de un pequeño intrón de ARNm de XBP1 tanto en *Caenorhabditis elegans* como en sistemas de modelo de mamífero. Los exones obtenidos como resultado se unen por una ligasa ARNt. Este evento de corte y empalme resulta en un marco de lectura en ARNm de XBP1, que produce una proteína que tiene un dominio de unión a ADN en el extremo N-terminal original aunque con

un nuevo dominio de transactivación en el extremo C-terminal. En las células murinas, el evento de corte y empalme convierte una isoforma de XBP1 de 267 aminoácidos a una isoforma de XBP1 de 371 aminoácidos (XBP1s o XBP1p). Véase Calfon, y col., *NATURE*, 415:92-96 (2002).

5 La proteína XBP1p se une a las secuencias de EREERE o ERPD en las regiones promotoras de numerosas chaperonas del RE o genes de RPD, activando la transcripción de estos genes. En los mamíferos, al menos dos secuencias EREERE han sido identificadas, EREERE-I y EREERE-II. EREERE-I tiene una secuencia conservada como se muestra en SEQ ID NO:1 (CCAATNNNNNNCCACG). EREERE-II tiene una secuencia conservada como se representa en SEQ ID NO:2 (ATTGGNCCACG). Además, al menos dos secuencias de ERPD de mamíferos han sido identificadas, una por tener una secuencia conservada como se representa en SEQ ID NO:3 (TGACGTGG) y la otra por tener una secuencia conservada como se ilustra en SEQ ID NO:4 (TGACGTGA).

10 Las secuencias codificantes de la proteína XBP1 pueden ser obtenidas a partir de una variedad de fuentes. Por ejemplo, las secuencias codificantes para las proteínas XBP1 de humano, ratón, rata, pollo, mosca de la fruta y pez cebra se pueden obtener de la base de datos de nucleótidos Entrez en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (CNIB) (Bethesda, Md.). Estas secuencias tienen números de acceso a Entrez NM_005080, NM_013842, NM_001004210, NM_001006192, NM_079983 o NM_131874, respectivamente.

15 Un fragmento biológicamente activo de una proteína XBP1 retiene al menos una porción sustancial de la actividad de activación de la transcripción de la proteína XBP1p. Por ejemplo, un fragmento de XBP1 empleado en la invención puede retener al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o más de la actividad de activación de la transcripción de XBP1p. Los fragmentos de XBP1 activos transcripcionalmente pueden ser seleccionados por numerosos medios. En un ejemplo, se selecciona un fragmento de XBP1 transcripcionalmente activo en base a su capacidad para activar la transcripción de genes corriente abajo de una secuencia EREERE o ERPD.

20 En otra realización, la proteína ATF6 o un fragmento biológicamente activo de la misma se utiliza para mejorar el rendimiento de una proteína de interés en las células huésped. ATF6 es una proteína transmembranal que incluye un dominio de "detección", ubicado en el lumen del RE y un dominio de transactivación de la transcripción citosólica. Tras el estrés del RE, el dominio citosólico de ATF6 se escinde y se transporta al núcleo en el que se une a las secuencias EREERE y de este modo activa los genes de RPD aguas abajo. Al menos dos proteínas ATF6 han sido identificadas, a saber, ATF6 α y ATF6 β . ATF6 α y ATF6 β están estructuralmente relacionadas y comparten similitud significativa en sus dominios b-zip. Las secuencias de codificación a modo de ejemplo para proteínas ATF6 de humano, ratón, ovejas y pollo tienen números de acceso a Entrez NM_007348, XM_129579, AY942654 y XM_422208, respectivamente.

25 De manera similar a los fragmentos XBP1 empleados en la invención, un fragmento biológicamente activo de una proteína ATF6 retiene al menos una porción sustancial de la actividad de activación de la transcripción de la proteína ATF6 activada o su dominio citosólico. Un fragmento de ATF6 biológicamente activo se puede seleccionar mediante el control de su unión a una secuencia EREERE y la capacidad del fragmento para activar la transcripción de genes corriente abajo de la secuencia EREERE.

30 En otra realización, una enzima o chaperona de procesamiento residente en RE se utiliza para aumentar el rendimiento de una proteína de interés en las células huésped. Ejemplos de enzimas/chaperonas ubicadas en el RE adecuados incluyen, entre otros, GRP78, GRP94, GRP58, la proteína disulfuro isomerasa, calnexina y calrecticulina. En un ejemplo, la contraparte endógena de una enzima (o chaperona) del RE empleada en la presente invención tiene una región promotora que incluye una o más secuencias EREERE-I o EREERE-II. En otro ejemplo, la contraparte endógena de una enzima (o chaperona) del RE empleada en la presente invención tiene una región promotora que incluye una o más secuencias ERPD.

35 La presente divulgación también presenta el uso de un componente de RPD que es una variante de una proteína endógena. Una variante de un componente de RPD endógeno puede ser de origen natural, tal como mediante la variación alélica o polimorfismo o modificada por ingeniería genética deliberadamente. La actividad de RPD de una variante no disminuye esencialmente en comparación con la proteína original (p. ej., una XBP1p, una proteína ATF6 transcripcionalmente activa o un fragmento biológicamente activo de la misma). En muchas realizaciones, las variantes empleadas en la presente invención retienen al menos el 50 % de la actividad de RPD de las proteínas originales correspondientes. Por ejemplo, una variante puede retener al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % de la actividad de RPD de la proteína original. En una realización, una variante empleada en la presente invención exhibe una actividad aumentada de RPD en comparación con la proteína original. Una variante deseable de un componente de RPD puede seleccionarse de manera que la expresión o la activación de la variante potencie la secreción de una proteína co-transfectada en las células huésped.

40 La secuencia de aminoácidos de una variante es esencialmente idéntica a la de la proteína original. En muchos casos, la secuencia de aminoácidos de una variante tiene al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia global o similar a la proteína original. La identidad de secuencia o similitud puede ser determinada por una variedad de procedimientos. En una realización, la identidad o similitud de secuencia se determina usando un algoritmo de alineamiento de secuencias. Los algoritmos adecuados para este fin incluyen, entre otros, la herramienta básica de búsqueda por alineamiento local (BLAST) descrita en Altschul, y col., *J. MOL. BIOL.*, 215:403-

410 (1990), el algoritmo de Needleman, y col, *J. MOL. BIOL.*, 48:444-453 (1970), el algoritmo de Myers y Miller, *COMPUTER. APPLE. BIOSCI.*, 4:11-17 (1988), y el análisis de la matriz de puntos. Los programas informáticos adecuados para este fin incluyen, entre otros, los programas BLAST proporcionados por CNIB, MegAlign proporcionado por DNASTAR (Madison, WI), y el programa GAP de Genetics Computer Group (GCG) (algoritmo de Needleman-Wench). Para el programa GAP, se pueden utilizar valores por defecto (p. ej., la penalización por apertura de huecos en una de las secuencias es 11 y por extensión de huecos es 8). Aminoácidos similares pueden ser definidos por la matriz de sustitución BLOSSOM.

Existen numerosos procedimientos disponibles para la preparación de una variante deseable de un componente de RPD. Por ejemplo, una variante puede derivarse de la proteína original en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 o más sustituciones, deleciones, inserciones, u otras modificaciones de aminoácidos. Las sustituciones pueden ser conservadoras o no conservadoras. En muchos casos, las sustituciones conservativas de aminoácidos se pueden introducir en una secuencia de proteínas sin cambiar significativamente la estructura o la actividad biológica de la proteína. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos pueden efectuarse sobre la base de similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad o la naturaleza anfipática de los residuos. Por ejemplo, pueden efectuarse sustituciones conservadoras de aminoácidos entre aminoácidos con cadenas laterales básicas, tales como lisina (Lys o K), arginina (Arg o R) e histidina (His o H); aminoácidos con cadenas laterales ácidas, tales como ácido aspártico (Asp o D) y ácido glutámico (Glu o E); aminoácidos con cadenas laterales polares sin carga, tales como asparagina (Asn o N), glutamina (Gln o Q), serina (Ser o S), treonina (Thr o T), y tirosina (Tyr o Y); o aminoácidos con cadenas laterales no polares, tales como alanina (Ala o A), glicina (Gly o G), valina (Val o V), leucina (Leu o L), isoleucina (Ile o I), prolina (Pro o P), fenilalanina (Phe o F), metionina (Met o M), triptófano (Trp o W) o cisteína (Cys o C). Ejemplos de sustituciones de aminoácidos comúnmente utilizados se ilustran en la Tabla 1.

Tabla 1. Ejemplo de sustituciones de aminoácidos

Residuos originales	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones más conservadoras
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, ácido 1,4 diamino-butírico, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

Otras sustituciones deseables de aminoácidos también se pueden introducir en un componente de RPD. Por ejemplo, la sustitución o sustituciones de aminoácidos pueden introducirse en un componente de RPD para aumentar su estabilidad. Para otro ejemplo, la sustitución o sustituciones de aminoácidos pueden introducirse para aumentar o disminuir la actividad de RPD de un componente de RPD.

Además, la presente divulgación presenta el uso de polipéptidos que pueden unirse a las secuencias ERPD o ERERE de las células huésped. Estos polipéptidos, solos o en combinación con otra proteína o proteínas, pueden funcionar como factores de transcripción para activar la transcripción de los genes que tienen las regiones promotoras ERPD o ERERE.

C. Casetes de expresión recombinantes y células huésped

Un casete de expresión recombinante típico empleado en la presente invención comprende una secuencia codificante de la proteína unida operativamente a una región reguladora no traducida en 5' y a una región reguladora no traducida en 3'. La secuencia codificante de la proteína puede ser una secuencia genómica, una secuencia de ADNc, una combinación de las mismas u otras secuencias expresables.

En una realización, un casete de expresión recombinante incluye todos los elementos reguladores necesarios para dirigir la expresión de la proteína codificada. Los ejemplos de elementos reguladores no traducidos en 5' adecuados incluyen promotores, potenciadores o las secuencias de Kozak. Los ejemplos de elementos reguladores no traducidos en 3' adecuados incluyen secuencias de poliadenilación u otras secuencias de terminación de la traducción/transcripción. La selección de promotores adecuados, potenciadores u otros elementos reguladores para un casete de expresión es una cuestión de diseño rutinario dentro del nivel de experiencia ordinaria en la técnica. Muchos de estos elementos se describen en la literatura y están disponibles a través de proveedores comerciales.

Los promotores adecuados para la presente invención incluyen promotores constitutivos o inducibles. Estos promotores pueden ser endógenos o heterólogos en las células huésped. En una realización, se usa un promotor específico del tejido. Los promotores específicos del tejido adecuados incluyen, entre otros, promotores específicos del hígado, promotores específicos linfoides, promotores específicos de linfocitos T, promotores específicos de neuronas, promotores específicos del páncreas o promotores específicos de glándulas mamarias. Un promotor regulado durante el desarrollo también se puede utilizar. Un casete de expresión recombinante que tiene un promotor específico del tejido o regulado durante el desarrollo se puede utilizar para preparar animales o plantas transgénicos. La proteína o proteínas codificadas por dicho casete de expresión recombinante se pueden producir en tejido o tejidos específicos o en etapa o etapas de desarrollo específicas de los animales o plantas transgénicos.

En otra realización, un sistema de expresión inducible se utiliza para producir una proteína de interés o un componente/modulador de RPD. Sistemas adecuados para este fin incluyen, entre otros, el sistema Tet-on/off, el sistema de ecdisona y el sistema de rapamicina. El sistema Tet-on/off se basa en dos elementos reguladores derivados del operón resistente a tetraciclina del transposón Tn10 de *E. coli*. El sistema incluye dos componentes, un casete regulador y un casete indicador. En un formato del sistema Tet-off, el casete regulador codifica una proteína híbrida que comprende un represor Tet (tetR) fusionado al dominio de activación VP16 del virus del herpes simple (VHS). El casete indicador incluye un elemento sensible a tet (EST) unido operativamente a un gen marcador. El gen marcador puede codificar, por ejemplo, una proteína de interés o un componente/modulador de RPD. En ausencia de inductor (p. ej., tetraciclina o doxiciclina), la proteína de fusión tetR-VP16 se une a EST, activando de este modo la transcripción del gen marcador. En un formato del sistema Tet-on, el casete indicador codifica una proteína híbrida que comprende un represor de Tet mutado (rtetR) fusionado al dominio de activación VP16 de VHS. El rtetR es un represor de Tet inverso que se une y activa el EST en presencia del inductor (p. ej., tetraciclina o doxiciclina).

El sistema de ecdisona se basa en el sistema de inducción por muda en *Drosophila*. En un formato, el sistema incluye un casete regulador que codifica un receptor de ecdisona funcional y un casete indicador que incluye un promotor sensible a ecdisona unido operativamente a un gen marcador. En presencia de un inductor (tal como ponasterona A o muristerona A), el receptor de ecdisona se une al promotor sensible a ecdisona, activando la transcripción del gen marcador.

El sistema de rapamicina, también conocido como el sistema IQD ("inductores químicos de dimerización"), emplea dos proteínas quiméricas. La primera proteína quimérica incluye FKBP12 fusionado a un dominio de unión a ADN que se une a un elemento de respuesta de ADN. La segunda proteína quimérica incluye FRAP fusionado a un dominio de activación transcripcional. La adición de rapamicina provoca la dimerización de las dos proteínas quiméricas, activando de este modo la expresión de genes controlados por el elemento de respuesta de ADN.

En un ejemplo, un casete de expresión recombinante empleado en la presente invención comprende SEQ ID NO:5. La transcripción de la SEQ ID NO:5 produce un ARNm de XBP1 humano sin cortar y empalmar. El estrés del RE activa IRE1, que escinde un intrón a partir del ARNm no cortado y empalmado. La traducción del ARNm cortado y empalmado produce una proteína XBP1 madura y funcional, cuya secuencia de aminoácidos se representa en SEQ ID NO:6.

En otro ejemplo, un casete de expresión recombinante empleado en la presente invención comprende SEQ ID NO:7. SEQ ID NO:7 no incluye secuencia alguna de intrones escindibles. La expresión de SEQ ID NO:7 produce una proteína XBP1 humana madura y funcional (SEQ ID NO:6). Otras secuencias de ácido nucleico que codifican la SEQ ID NO:6 o un equivalente funcional de las mismas también se pueden utilizar para preparar un casete de expresión recombinante de la invención. Estas secuencias de ácido nucleico pueden o no incluir intrones u otras secuencias extraíbles.

En otro ejemplo, un casete de expresión recombinante empleado en la presente invención comprende SEQ ID NO:8. La transcripción y traducción de SEQ ID NO:8 produce una proteína ATF6 humana, cuya secuencia de aminoácidos se ilustra en SEQ ID NO:9.

En un ejemplo adicional, un casete de expresión recombinante empleado en la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica restos de aminoácidos 1-366 de SEQ ID NO:9. Un ejemplo de dicha secuencia de ácido nucleico es los nucleótidos 1-1.098 de SEQ ID NO:8. Los restos de aminoácidos 1-366 de SEQ ID NO:9 incluyen toda la región de base y la mayoría de la región de cremallera de leucina de la proteína ATF6 humana. Este fragmento ATF6 ha demostrado ser capaz de activar genes GRP78 endógenos. Véase Haze, y col., *MOL. BIOL. CELL*, 10:3787-3799 (1999).

Los casetes recombinantes que codifican proteínas XBP1 o ATF6 derivados de especies no humanas también pueden ser utilizados en la presente invención. Por ejemplo, las proteínas XBP1 o ATF6 de roedores u otras especies de animales se pueden usar. Estas proteínas XBP1 o ATF6 pueden seleccionarse de manera que la co-expresión de estas proteínas con una proteína de interés mejora el rendimiento de la última proteína en las células huésped.

Un casete de expresión recombinante puede ser incorporado en células huésped mediante una variedad de medios. En una realización, un casete de expresión recombinante se introduce en una célula huésped eucariota mediante el uso de un vector de transfección o transducción. Los vectores adecuados para este fin incluyen, entre otros, vectores de expresión de células de insectos (p. ej., vectores de expresión de baculovirus) o vectores de expresión de mamíferos. Estos vectores se pueden derivar de una variedad de fuentes, tales como episomas, cósmidos, virus, o combinaciones de los mismos. En muchos casos, estos vectores incluyen marcadores seleccionables para facilitar su incorporación en las células huésped.

En otra realización, un casete de expresión recombinante empleado en la presente invención se construye mediante la modificación de un gen endógeno en las células huésped. El gen endógeno puede codificar una proteína de interés o un componente/modulador de RPD. Muchas porciones en el gen endógeno se pueden modificar para conseguir un efecto de la expresión o la regulación deseada. Por ejemplo, el promotor original de un gen endógeno puede ser reemplazado por un promotor viral para aumentar el nivel de expresión del gen.

Un casete de expresión recombinante puede incorporarse en una célula huésped de diversas formas. Por ejemplo, un casete de expresión recombinante se puede integrar en un cromosoma o en el genoma de una célula huésped. Un casete de expresión recombinante también puede ser transportado por un vector de expresión no integrado en una célula huésped. Los procedimientos de introducción de manera estable o transitoria de un vector o casete de expresión en una célula huésped son conocidos en la técnica. En un ejemplo, el vector o casete de expresión se incorpora en un cromosoma de la célula huésped mediante integración dirigida. Procedimientos adecuados para este fin incluyen, entre otros, el sistema de recombinación Cre-lox y los descritos en las patentes de Estados Unidos n.º 6.656.727, 6.537.542 y 6.541.231.

En muchas realizaciones, una célula modificada por ingeniería genética de la presente invención incluye (1) un primer casete de expresión recombinante que codifica una proteína de interés y (2) un segundo casete de expresión recombinante que codifica un componente/modulador de RPD (p. ej., XBP1 o ATF6). La relación entre el número total del primer casete de expresión recombinante y el número total del segundo casete de expresión recombinante en la célula puede variar, por ejemplo, entre no más de 0,1:1 a al menos 10:1. Los ejemplos no limitantes de relaciones adecuadas incluyen de 0,2:1 a 5:1, de 0,5:1 a 5:1, de 1:1 a 2:1, de 1:1 a 3:1, de 1:1 a 4:1, de 1:1 a 5:1, de 2:1 a 3:1, de 2:1 a 4:1 y de 2:1 a 5:1. El primer y el segundo casetes de expresión recombinantes pueden ser transportados por vectores idénticos o por diferentes vectores y estimulados por los mismos promotores o diferentes promotores que tienen fuerzas idénticas o diferentes fuerzas. En un ejemplo, el promotor en el primer casete de expresión recombinante tiene la misma fuerza o una similar fuerza que el del segundo casete de expresión recombinante, y la relación del número total del primer casete recombinante con respecto al número total del segundo casete recombinante en la célula es al menos 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 o más.

Las células huésped adecuadas para la presente invención incluyen células animales o vegetales. Las células huésped pueden ser células cultivadas, tales como estirpes celulares o cultivos primarios. También pueden ser células de animales o vegetales transgénicos. La selección de células huésped adecuadas y los procedimientos para el cultivo, transfección/transducción, amplificación, selección, producción de producto y purificación son conocidos en la técnica.

En una realización, las células huésped empleadas en la presente invención son células de mamífero. Los ejemplos de células de mamífero adecuados incluyen, entre otros, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células COS, células 293, células CV-1, y otras estirpes celulares de mamífero recogidas por la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, Virginia). En ciertos casos, es deseable producir proteínas terapéuticas o profilácticas en células humanas, que proporcionan a menudo modificaciones post-traduccionales deseadas en las proteínas expresadas.

Las células huésped empleadas en la presente invención también pueden ser células híbridas creadas a través de la fusión de dos o más células. En muchos casos, una célula híbrida empleada en la presente invención se genera mediante la fusión de una célula animal (p. ej., una célula de mamífero) y una célula cancerosa/inmortal (p. ej., una célula de mieloma o blastoma). La célula animal y la célula cancerosa/inmortal se pueden derivar de la misma especie. También se pueden derivar de diferentes especies. Cualquier procedimiento conocido en la técnica puede

ser utilizado para producir células híbridas. Estos procedimientos incluyen, entre otros, electrofusión o fusión química (p. ej., fusión de polietilenglicol).

5 Un casete de expresión recombinante puede ser introducido o incorporado en el interior de una célula híbrida antes o después del evento de fusión. Por ejemplo, un casete de expresión recombinante que codifica una proteína de interés puede ser incorporado en una célula de mamífero antes de que la célula se fusione con una célula cancerosa que expresa un componente o modulador de RPD exógeno. Para otro ejemplo, una célula de mamífero se puede transfectar o transducir en primer lugar con un vector o vectores de expresión recombinantes que codifican una proteína de interés y un componente o modulador de RPD, y luego se fusiona con una célula cancerosa. Otros procedimientos también pueden usarse para preparar células híbridas de la presente invención.

10 En muchas realizaciones, las células cancerosas/inmortales utilizadas para la preparación de células híbridas son sensibles a uno o más agentes selectivos. Por ejemplo, las células cancerosas/inmortales pueden ser sensibles a un medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina, que se conoce como "medio HAT." Estas células sensibles a HAT se fusionan a células insensibles a medio HAT. Las células híbridas producidas de este modo se seleccionan contra HAT, que mata las células no fusionadas. Las células fusionadas se identifican sistemáticamente por las características deseadas.

15 La presente invención también presenta animales o plantas que comprenden una célula huésped eucariota de la presente invención. Los procedimientos de incorporación de una célula recombinante en un animal o una planta son muy conocidos en la técnica. En muchas realizaciones, los animales o plantas son animales o plantas transgénicos que incluyen uno o más transgenes que codifican una proteína de interés y un componente/modulador de RPD. Los animales o plantas transgénicos se pueden preparar mediante el uso de técnicas convencionales. En una realización, los animales transgénicos son animales no humanos.

20 La presente invención presenta además cultivos celulares animales o vegetales que son transfectados o transducidos con uno o más vectores de expresión que codifican (1) una proteína de interés y (2) un componente/modulador de RPD. Los cultivos celulares pueden ser cultivos de células de mamífero, cultivos de células de insectos, cultivos de células vegetales u otros cultivos adecuados para la producción de proteínas de interés. El vector o vectores de expresión se pueden transfectar o transducir de forma transitoria o estable. En una realización, el vector o vectores de expresión empleados comprenden un primer casete de expresión recombinante que codifica una proteína de interés y un segundo casete de expresión recombinante que codifica un componente/modulador de RPD (por ejemplo, XBP1 o ATF6). Los primeros y segundos casetes de expresión pueden ser transportados por los mismos vectores o diferentes vectores. Pueden ser estimulados por los mismos promotores o diferentes promotores. La relación molar entre el primer casete de expresión recombinante y el segundo casete de expresión recombinante puede oscilar, por ejemplo, entre no más de 0,1:1 a al menos 10:1.

30 En un ejemplo, el promotor empleado por el primer casete recombinante tiene la misma fuerza o una similar fuerza que el promotor empleado por el segundo casete recombinante, y la relación molar entre el primer casete recombinante y el segundo casete recombinante en el cultivo celular oscila de 0,5:1 a 10:1, tal como al menos 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 o más.

D. Composiciones farmacéuticas

40 Una proteína terapéutica o profiláctica producida por la presente invención se puede utilizar para preparar una composición farmacéutica para el tratamiento de un paciente o animal en necesidad del mismo. Una composición farmacéutica de la presente divulgación incluye normalmente una cantidad eficaz de una proteína terapéutica o profiláctica y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen disolventes, solubilizantes, materiales de relleno, estabilizantes, aglutinantes, absorbentes, bases, agentes tamponantes, lubricantes, vehículos de liberación controlada, diluyentes, agentes emulsionantes, humectantes, lubricantes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos o antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, y similares, que son compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Los agentes suplementarios también se pueden incorporar en la composición.

50 Una composición farmacéutica de la presente divulgación puede formularse para ser compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, por inhalación, transdérmica, rectal, transmucosal, tópica y sistémica. En un ejemplo, la administración se lleva a cabo mediante un implante.

55 Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina; propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfato de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o

viales de múltiples dosis fabricados de vidrio o plástico.

Una composición farmacéutica de la presente divulgación se puede administrar a un paciente o animal en una dosificación deseada. Una dosificación adecuada puede oscilar, por ejemplo, de 5 mg a 100 mg, de 15 mg a 85 mg, de 30 mg a 70 mg o de 40 mg a 60 mg. Las dosificaciones inferiores a 5 mg o superiores a 100 mg también se pueden utilizar. La composición farmacéutica se puede administrar en una dosis o dosis múltiples. Las dosis pueden administrarse a intervalos tal como una vez al día, una vez por semana o una vez al mes.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de una proteína terapéutica pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o modelos de animales experimentales. Por ejemplo, se pueden determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, y puede expresarse como la relación de DL_{50}/DE_{50} . En muchos casos, se seleccionan proteínas terapéuticas que exhiben grandes índices terapéuticos.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificaciones para su uso en seres humanos. En una realización, la dosificación se encuentra dentro de un intervalo que exhibe eficacia terapéutica en al menos 50 % de la población con escasa o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada.

El régimen de dosificación para la administración de una proteína terapéutica producida por la presente invención puede ser determinada por el médico tratante en base a varios factores tales como la acción de la proteína, el sitio de la patología, la gravedad de la enfermedad, la edad del paciente, el sexo y la dieta, la gravedad de cualquier inflamación, el tiempo de administración y otros factores clínicos. En un ejemplo, la administración sistémica o inyectable se inicia con una dosis que es mínimamente efectiva, y la dosis se aumenta durante un transcurso temporal pre-seleccionado hasta que se observa un efecto positivo. Posteriormente, los aumentos graduales en la dosificación se limitan a niveles que producen un aumento correspondiente en efecto, teniendo en cuenta que puede aparecer cualquier efecto adverso.

El progreso de un tratamiento se puede controlar mediante la evaluación periódica de una progresión de la enfermedad. El progreso puede monitorizarse, por ejemplo, por rayos X, IRM u otras modalidades de formación de imágenes, análisis de líquido sinovial o examen clínico.

Una proteína terapéutica o profiláctica de interés también se puede introducir en un humano o animal mediante el uso de un vector de administración de genes. Los vectores adecuados para este fin incluyen, entre otros, vectores virales tales como vectores de retrovirus, lentiviral, adenoviral, viral adenoasociado (AAV), herpes viral, alfavirus, astrovirus, coronavirus, ortomixovirus, papovavirus, paramixovirus, parvovirus, picornavirus, poxvirus o togavirus. Los vectores de expresión encapsulados en liposomas también se pueden utilizar para la administración génica. En muchas realizaciones, el vector de administración de genes codifica tanto la proteína de interés como un modulador de RPD. La co-expresión del modulador de RPD potencia la producción de la proteína de interés en las células objetivo (p. ej., células tumorales u otras células disfuncionales). La proteína de interés y el modulador de RPD también se pueden administrar a las células objetivo mediante el uso de diferentes vectores. La administración de genes puede llevarse a cabo *in vivo* o *ex vivo*.

En una realización, se emplean procedimientos de administración de genes específicos de células para la introducción de una proteína terapéutica/profiláctica de interés o un modulador de RPD en las células objetivo. Muchos procedimientos de administración de genes específicos de células conocidos en la técnica se pueden usar para la presente invención. Por ejemplo, un ligando específico de célula (p. ej., un anticuerpo específico a un antígeno de superficie de la célula objetivo) se puede incorporar o conjugar en la envoltura de un vector viral que codifica una proteína terapéutica/profiláctica o un modulador de RPD. Este ligando puede mediar la entrada del vector viral en un tipo celular específico. Los liposomas conjugados con anticuerpo también se pueden utilizar para la administración de vectores de terapia génica a células objetivo específicas.

Queda entendido que las realizaciones descritas anteriormente y los siguientes ejemplos se dan a modo de ilustración, no de limitación. Diversos cambios y modificaciones dentro del ámbito de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la presente descripción.

E. Ejemplos

Ejemplo 1. Estirpes celulares COS-1 y DUKX

Las células COS-1 se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (CACT), Manassas, VA, con el número CACT CRL-1650. Las células CHO DUKX y las células PA DUKX se derivaron de CHO-K1 (número CACT CCL-61), que es un derivado de células de ovario de hámster chino (CHO).

Las células CHO DUKX, que también se refieren como células DUKX B11 o DXB11, son deficientes en la producción de la dihidrofolato reductasa (dhfr), una enzima crítica en el proceso de replicación del ADN. Para

seleccionar células en las que ambos alelos de dhfr fueron mutados, Urlaub y Chasin, *PROC. NATL. ACAD. SCI. EE.UU.*, 77:4216-4220 (1980), llevaron a cabo la mutagénesis y la selección en dos etapas. El agente selectivo utilizado contra células dhfr⁺ era desoxiuridina tritiada. La desoxiuridina tritiada es tóxica para las células debido a su incorporación en el ADN y la desintegración radiactiva posterior. La incorporación de desoxiuridina en ADN requiere su conversión a ácido timilídico, un proceso para el que DHFR es esencial. Las células mutantes dhfr⁻ no son capaces de incorporar desoxiuridina en su ADN y por lo tanto son capaces de sobrevivir en presencia de desoxiuridina tritiada. Una determinada cantidad de células dhfr⁺, así como mutantes deficientes en alguna otra enzima necesaria para la incorporación de desoxiuridina en ADN, puede sobrevivir también. Los mutantes dhfr⁻ se pueden distinguir ya que no son capaces de llevar a cabo la biosíntesis de glicina *de novo*, hipoxantina y timidina; por lo que requieren nucleósidos exógenos para el crecimiento.

En la primera etapa de selección tal como se utiliza por Urlaub y Chasin, *supra*, las células de tipo natural fueron sometidas a mutagénesis por etil metano sulfonato (EMS) y se seleccionaron con desoxiuridina tritiada en presencia de metotrexato (MTX) que inhibe dhfr para aislar un presunto heterocigoto (d+/d-). Al usar una concentración de MTX que fue suficiente para inactivar toda la DHFR en el heterocigoto (d+/d-), pero no en el homocigoto (d+/d+), el homocigoto tenía actividad DHFR residual y desoxiuridina tritiada incorporada. En virtud de esta incorporación, las células (d+/d+) se seleccionaron contra y solo los heterocigotos capaces de sobrevivir. Después de tres rondas de selección, agrupamiento y expansión de las células supervivientes, se aisló la presunta estirpe celular heterocigota, UKB25. Las células UKB25 fueron mutagenizadas adicionalmente con irradiación gamma y seleccionadas en desoxiuridina tritiada en ausencia de MTX. Las colonias supervivientes mostraron auxotrofia triple para glicina, hipoxantina y timidina, lo que indica un fenotipo dhfr⁻. Las colonias que exhiben esta auxotrofia triple se clonaron y mostraron por ser deficientes en actividad dhfr. El análisis de uno de estos clones por hibridación de membrana Southern reveló que los genes dhfr no se sometieron a ningún reordenamiento en bruto. Este clon fue designado como DXB11.

Las células DXB11 así generadas se examinaron para confirmar las características predichas de la estirpe celular. Se descubrió que las células DUKX B11 eran genotípicamente similares a la estirpe celular CHO-K1 de la que se derivaron. Son células CHO hipodiploides, con 20 cromosomas que han sido ampliamente estudiados de forma citogenética. El bandeo con Giemsa en la metafase de los cromosomas DUKX B11 demostró que las células DUKX B11 son derivados de CHO-K1. Las células DUKX B11 son deficientes de DHFR y por lo tanto auxotróficas para glicina, nucleósidos de purina y timidina. Este fenotipo deficiente de DHFR de las células DUKX B11 es la base de la selección genética utilizada para la transferencia de plásmidos de expresión de proteínas heterólogas recombinantes en las células.

En algunos experimentos, el medio utilizado para cultivar células DUKX B11 no contiene hipoxantina o timidina. Sin actividad dihidrofolato reductasa, el único medio para que las células sobrevivan y repliquen se debía a la suplementación de nucleósidos en el medio de crecimiento para compensar la incapacidad en crear células. Por lo tanto, adenosina, desoxiadenosina y timidina se añadieron al medio de crecimiento para las células DUKX B11. Estas se añadieron cada una a una concentración de 10 µg/ml. Esta concentración era superior de lo que las células requieren en condiciones rutinarias de crecimiento a pequeña escala.

Las células DUKX B11 son útiles para la introducción de plásmidos de expresión que contienen ADNc para las proteínas deseadas. Debido a que carecen de actividad DHFR endógena que puede ser utilizada como un marcador seleccionable y amplificable al generar estirpes celulares para producir proteínas heterólogas. Por medio de la co-transfección de otro vector de expresión que contiene un ADNc para dhfr, o poniendo el ADNc de dhfr en estrecha proximidad con el ADNc de interés en el mismo vector de expresión, se puede utilizar la actividad de dhfr como un marcador para el que las células han asumido el plásmido de expresión que contiene el gen deseado, y son susceptibles de producir la proteína deseada. Al retener nucleósidos exógenos después de la transfección, solamente las células que incorporan un vector que contiene el gen dhfr serán capaces de producir dhfr y de ese modo sobrevivir. Las células supervivientes pueden producir ahora la proteína deseada. Esto se puede lograr en virtud de un mensaje bicistrónico cuando el ADNc deseado y la dhfr estén en el mismo plásmido, o por mensajes individuales cuando los genes estén en diferentes plásmidos, que generalmente se co-localizan en el cromosoma durante un evento de transfección. Cuando se utilizan dos plásmidos separados, alterando la relación de plásmido que contiene dhfr⁻ con respecto al plásmido que contiene ADNc puede potenciar la capacidad de uno para seleccionar células que contienen ambos.

Las células DUKX B11 son deficientes de dhfr⁻ en virtud de una mutación puntual en el gen dhfr y por lo tanto la reversión a un fenotipo dhfr⁺ es posible. Se observó esta reversión y capacidad de crecer sin nucleósidos exógenos durante un esfuerzo de adaptación a la suspensión libre de suero. La población de células DUKX en cultivo permaneció en dhfr⁻ en aproximadamente 154 duplicaciones de población acumulativas (DPA) desde el inicio de un cultivo en suspensión. Sin embargo, cuando la población se comprobó de nuevo para la dependencia de los nucleósidos exógenos en 190 DPA, una reversión fenotípica era evidente. Coincidiendo con el fenotipo dhfr⁺ se produce un aumento significativo en la tasa de crecimiento media de estas células. Debido a que el fenotipo dhfr⁻ es deseable para las estrategias de transfección y de amplificación génica, una suspensión libre de suero de células DUKX adaptadas se efectuó después de 153,8 DPA. Debido a que estas células se adaptaron para cultivarse en un cultivo en suspensión libre de suero antes de introducirse a un vector de expresión, se llamaron "pre-adaptadas" y se denominan como "PA DUKX".

Las monocapas DUKX dependientes de SFB no adaptadas se pueden utilizar para la transfección de vectores de expresión. Una vez que se logra la expresión de un gen heterólogo y dhfr, cada nueva estirpe celular puede ser adaptada a un crecimiento en suspensión libre de SFB. El periodo de adaptación después de la transfección utilizando células de la monocapa es a menudo largo. Las células DUKX "pre-adaptadas" también se pueden utilizar como células huésped para la transfección. Estas células PA DUKX ofrecen a menudo ventajas desde una perspectiva de tiempo y esfuerzo, ya que el periodo de readaptación al cultivo en suspensión libre después de la transfección suele ser más corto. Véase Sinacore, y col., *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING*, 52:518-528 (1996).

Ejemplo 2. Inducción de estrés del RE por la sobreexpresión de BMP6 en células PA DUKX

- 10 El vector pSMED2/XBP1 y pSMED2/BMP6 (+) o pSMED2 vacío (-) se co-transfectaron en células PA DUKX. Los vectores de expresión pSMED2/XBP1 y pSMED2/BMP6 codifican XBP1 y BMP6, respectivamente. Ambos vectores son estimulados por un promotor CMV. Las transfecciones se llevaron a cabo en placas de 6 pocillos usando Fugene6 (Roche, Indianápolis, IN). El medio de crecimiento para las células fue el medio Alfa (Gibco) suplementado con nucleósidos y SFB al 10 % (inactivado por calor y dializado) y penicilina/estreptomina/glutamina (Gibco).
- 15 Las células se lisaron en tampón de lisis celular (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) con la adición de NaCl 400 mM y 1 *Complete Mini* (un comprimido de cóctel inhibidor de la proteasa de Roche, Indianápolis, IN). Los lisados se recogieron a los 7, 24, 31 y 48 h después de la transfección y se ejecutaron en un gel de tricina al 10 %, seguido por análisis de membrana Western (Figura 1). El análisis de membrana Western se realizó usando un tampón de bloqueo de leche en polvo sin grasa al 4 %, ASB al 1 % y Tween 20 al 0,1 % en TFS, y un tampón de lavado de 0,1 % de Tween 20 en TFS. Los anticuerpos se diluyeron en el tampón de bloqueo. La titulación para Western fue anti-XBP1 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology) seguido de anticuerpo anti-conejo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante 1:5000 (The Jackson Laboratory). La Figura 1 indica que la sobreexpresión de BMP6 en células PA DUKX causó estrés del RE, tal como se mide por el aumento de la proteína XBP1p (aproximadamente 54 kD).

Ejemplo 3. Estirpes celulares transfectadas de manera estable con XBP1

- 25 El vector pSMED2/XBP1 se transfectó en células CHO DUKX para crear estirpes celulares estables. El gen DFHR en el vector pSMED2 permite la resistencia a metotrexato (MTX). Las células transfectadas se sembraron en placas en concentraciones de MTX 5, 10, o 20 nM. Se aislaron tres colonias de MTX 5 nM (5-2, 5-4, 5-5), una colonia 10 nM (10-3), y una colonia 20 nM (20-10). Las células de cada colonia se trataron con (+) o sin (-) tunamicina (Tu), una sustancia química conocida por causar estrés del RE. Los lisados se ejecutaron en un gel de tricina al 10 %, seguido por análisis de membrana Western (Figura 2) utilizando el anticuerpo policlonal de conejo anti-Xbp1 (Santa Cruz Biotechnology). La Figura 2 demuestra que se produjo una XBP1 más madura en estirpes celulares estables cuando las células se estresaron por medio del tratamiento con Tu.

- 35 pSMED2/BMP6 se transfectó de manera transitoria a estirpes celulares estables XBP1 (5-2,5-4, y 20-10) y parentales (CHO DUKX). Los medios acondicionados recogidos 48 h después de la transfección se ejecutaron en un gel de tricina al 10 %, seguido por análisis de membrana Western. La membrana Western (Figura 3) se sondó con un anticuerpo monoclonal anti-BMP5 de ratón (1:2000), que reacciona de forma cruzada fuertemente con BMP6. El anticuerpo secundario fue un anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (1:5000) (The Jackson Laboratory). Cada carril en la Figura 3 representa un experimento separado para una estirpe celular respectiva. Como se demuestra en la Figura 3, se secretó más BMP6 en estirpes celulares estables XBP1 seleccionadas con MTX 5 nM y 10 nM que en las células parentales.

- 40 pSMED2/IL11RFc, que codifica una proteína IL11RFc, también se transfectó transitoriamente en estirpes celulares estables XBP1y parentales. Los medios acondicionados recogidos 48 h después de la transfección se ejecutaron en un gel de tricina al 10 %, seguido por análisis de membrana Western. Las membranas Western (Figura 4) se sondaron con anticuerpo Fc anti-humano de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (The Jackson Laboratory). Se secretó más IL11RFc en la mayoría de estirpes celulares XBP1 seleccionadas con MTX 5 nM que en las células CHO DUKX.

Ejemplo 4. Comparación de la transfección, eficiencias transcripcionales y traduccionales entre estirpes celulares estables XBP1 y sus células parentales CHO

- 50 Las células CHO DUKX 5-2, 20-10 se contaron y cantidades iguales se transfectaron transitoriamente con una construcción que codifica la proteína fluorescente verde (PFV). Las células se visualizaron en un aumento 10 x 10 y la eficiencia de la transfección (% de células que expresan PFV) se determinó comparando las células fluorescentes PFV con respecto a las células totales en tres campos visuales por estirpe celular. El resultado de la comparación indica que la eficiencia de la transfección de PFV es similar en todas las estirpes celulares XBP1 y CHO DUKX ensayadas (Figura 5).

- 55 En un experimento adicional, las construcciones que codifican (+) o no codifican (-) PFV se transfectaron transitoriamente en estirpes celulares estables XBP1 y parentales. El lisado celular recogido 48 h después de la transfección se llevó a cabo en un gel de tricina al 10 %, seguido por análisis de membrana Western (Figura 6). Cada carril de la Figura 6 representa un experimento separado. La membrana Western se sondó con un anticuerpo

policlonal de conejo anti-PFV y anticuerpo monoclonal de ratón anti-actina para el control de carga. Como se ha demostrado en la Figura 6, la suma de las eficiencias de transcripción y traducción para PFV es similar en todas las estirpes celulares investigadas.

Ejemplo 5. Células transfectadas transitoriamente con ATF6

5 El ADNc etiquetado con Flag del dominio soluble activo de ATF6 se clonó en un vector de expresión inducible Tet/off ptTATOP6 y se transfectó transitoriamente en células COS-1. El vector ptTATOP6 incluye un promotor inducible que controla la expresión de la proteína de fusión que comprende ATF6 y la etiqueta Flag. El lisado celular recogido a las 18, 48 y 60 h después de la transfección se llevó a cabo en un gel de tricina al 10 %, seguido por análisis de membrana Western. La membrana Western (Figura 7) se sondó con un anticuerpo anti-Flag. "V" indica un vector ptTATOP6 vacío, y "P" representa un control positivo de flag. Como se ilustra en la Figura 7, la proteína ATF6 se expresó con éxito en células COS-1 en ausencia de doxiciclina.

Ejemplo 6. La co-expresión de los genes objetivo con XBP1 o ATF6 en relaciones adecuadas potencia la secreción de los genes objetivo en células HEK293

15 HEK293-FT y HEK293-EBNA se cultivaron y mantuvieron en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % a 37 °C en medio 293 estilo libre (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con suero fetal bovino al 5 %.

La expresión transitoria se realizó en centrifugadoras de 50 ml o placas de 24 pocillos, o centrifugadoras de 1 l. Para el volumen de cultivo de 50 ml (o 1 l), se mezclaron 25 µg (o 0,5 mg para 1 l) de ADN plásmido con 400 µg (8 mg para 1 l) de polietilenimina (PEI, 25 kDa, lineal, neutralizada a pH 7,0 por HCl, 1 mg/ml, Polysciences, Warrington, PA) en 2,5 ml (50 ml para 1 l) de medio 293 libre de suero. Las centrifugadoras se incubaron a 37 °C con una velocidad de rotación de 170 rpm en un agitador P2005 (Bellco) durante 72-144 horas antes de la recogida. Para un formato de placa de 24 pocillos, se mezcló 1 µg de ADN con 8 µg de PEI en 0,5 ml de medio 293 libre de suero. A continuación, las mezclas se mezclaron con 0,5 ml de células HEK293 en medio 293 con SFB al 10 % en la densidad celular de 0,5 x 10⁶ células/ml. Las placas se incubaron a 37 °C en un agitador orbital (BellCo) con una velocidad de rotación de 300 rpm durante 72 horas antes de la recogida.

25 pSMED2 y pSMEDA se utilizaron para la construcción de ADN. La proteína 1 relacionada con la familia frizzled secretada y etiquetada con His6 en el extremo C-terminal (sFRP-1) y agrecanasa-2 etiquetada con Flag en el extremo C-terminal (Agg-2) se subclonaron en pSMEDA. El receptor tipo 2 de tirosina quinasa neurotrófico etiquetado con His6 en el extremo C-terminal (TrkB) se subclonó en pSMED2. Estos genes subclonados no tenían ningún dominio transmembranal o citoplásmico, permitiendo de este modo la secreción de los productos expresados.

30 Prop1 y Prop34-LBD etiquetados con His6 en el extremo C-terminal se subclonaron en pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Prop1 y Prop34-LBD se derivaron de la proteína 5 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP5) con delección de los dominios transmembranales y citoplásmicos. Las secuencias de aminoácidos de Prop1 y Prop34-LBD se representan en SEQ ID NOs:10 y 11, respectivamente. SEQ ID NO:10 incluye una etiqueta His6 en los aminoácidos 342-347 y una etiqueta Flag en los aminoácidos 348-356. SEQ ID NO:11 incluye una etiqueta His6 en los aminoácidos 795-800 y una etiqueta V5 en los aminoácidos 778-794.

40 1 µg de Prop1-his6-Flag en pcDNA3.1 se co-transfectó con 0,3 µg (1:3) o 1 µg (1:1) de XBP1p en un vector pSMED2 en células HEK293T. Tanto pcDNA3.1 como pSMED2 son estimulados por un promotor CMV. Los medios acondicionados se recogieron a las 72 h después de la transfección de ADN. Las muestras se separaron por SDS-PAGE y se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpos anti-His4. Se llevaron a cabo experimentos duplicados (conjunto n.º 1 y conjunto n.º 2). Como se demuestra en la Figura 8A, la co-transfección de XBP1 con Prop1 en las relaciones de 1:1 o 1:3 mejoró drásticamente la expresión de Prop1.

45 En otro experimento, 1 µg de Prop34-LBD-V5-his6 en pcDNA3.1 se co-transfectó con 0,3 µg (1:3) o 1 µg (1:1) de ATF6 en un vector ptTATOP6 en células HEK293T. Al igual que pSMED2, ptTATOP6 también es estimulado por un promotor CMV. Los medios acondicionados recogidos a las 72 h después de transfección de ADN se analizaron por SDS-PAGE e inmunotransferencia con anticuerpo anti-His4. La Figura 8B muestra que la co-transfección de ATF6 con Prop34-LBD-V5-his6 en la relación de 1:1 o 1:3 potenció significativamente la expresión de Prop34-LBD.

50 La Figura 9 ilustra los efectos de XBP1p o ATF6 en la expresión de diferentes proteínas objetivo. Prop1-his6-Flag o Prop34-LBD-V5-His6 en pcDNA3.1 se co-transfectaron con XBP1p en un vector pSMED2 o ATF-6 en un vector ptTATOP6 en células HEK293T. Los medios acondicionados recogidos a las 72 h después de la transfección de ADN se analizaron por SDS-PAGE e inmunotransferencia con anticuerpo anti-His4. Las señales se cuantificaron por densitometría como se muestra en la Figura 9. Los resultados indican que XBP1p y ATF-6 tienen diferentes efectos sobre la expresión de Prop1 y Prop34-LBD. Diferentes efectos de potenciación también se observaron para TrkB, sFRP1 y Agg-2 cuando estas proteínas se co-expresaron con XBP1p frente a ATF-6. Por ejemplo, la co-expresión con XBP1p aumentó el rendimiento de TrkB en aproximadamente 5 veces, mientras que solo se observó un aumento de aproximadamente 2 veces cuando TrkB se co-expresó con ATF6.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Wyeth
 Gao, Yijie Piche, Nicole M
 Geng, Mei
 Herrmann, Stephen H
 Zhong, Xiaotian
 Kriz, Ronald
 Lu, Zhijian
 10 <120> SISTEMAS Y PROCEDIMIENTOS DE PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS

 <130> 031896-085001 (AM101741)

 15 <150> US 60/606.439
 <151> 02-09-2004

 <160> 11

 20 <170> PatentIn versión 3.3

 <210> 1
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> mamífero
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(14)
 <223> n es a, c, g o t
 30
 <400> 1
 ccaatnnnnn nnnccacg 19

 35 <210> 2
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> mamífero

 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n es a, c, g o t

 45 <400> 2
 attggnccac g 11

 50 <210> 3
 <211> 8
 <212> ADN
 <213> mamífero

 <400> 3
 tgacgtgg 8
 55
 <210> 4
 <211> 8
 <212> ADN
 <213> mamífero

 60 <400> 4
 tgacgtga 8

 65 <210> 5
 <211> 1154
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 653 843 T3

<400> 5

atggtggtgg tggcagccgc gccgaacccg gccgacggga cccctaaagt tctgcttctg 60
 tcggggcagc ccgcctccgc cgccggagcc ccggccggcc aggccctgcc gctcatggtg 120
 ccagcccaga gaggggcccag cccggaggca gcgagcgggg ggctgccccca ggcgcgcaag 180
 cgacagcgc tcacgcacct gagccccgag gagaaggcgc tgaggaggaa actgaaaaac 240
 agagtagcag ctcagactgc cagagatcga aagaaggctc gaatgagtga gctggaacag 300
 caagtggtag atttagaaga agagaaccaa aaacttttgc tagaaaatca gcttttacga 360
 gagaaaactc atggccttgt agttgagaac caggagttaa gacagcgcct ggggatggat 420
 gccctggttg ctgaagagga ggcggaagcc aaggggaatg aagtgaggcc agtggccggg 480
 tctgctgagt ccgcagcact cagactacgt gcacctctgc agcagggtgca ggcccagttg 540
 tcacccctcc agaacatctc cccatggatt ctggcggtat tgactcttca gattcagagt 600
 ctgatatacct gttgggcatt ctggacaact tggaccagc catgttcttc aatgcccctt 660
 ccccagagcc tgccagcctg gaggagctcc cagaggtcta cccagaagga cccagttcct 720
 taccagcctc cttttctctg tcagtgggga cgctatcagc caagctggaa gccattaatg 780
 aactaattcg ttttgaccac atatatacca agcccctagt cttagagata ccctctgaga 840
 cagagagcca agctaattgtg gtagtgaaaa tcgaggaagc acctctcagc ccctcagaga 900
 atgatcacc tgaattcatt gtctcagtga aggaagaacc tgtagaagat gacctcgttc 960
 cggagctggg tatctcaaat ctgctttcat ccagccactg cccaaagcca tcttctgcc 1020
 tactggatgc ttacagtgac tgtggatacg ggggttcctt tccccattc agtgacatgt 1080
 cctctctgct tgggtgtaaac cattcttggg aggacacttt tgccaatgaa ctcttcccc 1140
 agctgattag tgtc 1154

5 <210> 6
 <211> 376
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 6

Met Val Val Val Ala Ala Ala Pro Asn Pro Ala Asp Gly Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Val Leu Leu Leu Ser Gly Gln Pro Ala Ser Ala Ala Gly Ala Pro Ala
 20 25 30
 Gly Gln Ala Leu Pro Leu Met Val Pro Ala Gln Arg Gly Ala Ser Pro
 35 40 45

ES 2 653 843 T3

Glu Ala Ala Ser Gly Gly Leu Pro Gln Ala Arg Lys Arg Gln Arg Leu
 50 55 60
 Thr His Leu Ser Pro Glu Glu Lys Ala Leu Arg Arg Lys Leu Lys Asn
 65 70 75 80
 Arg Val Ala Ala Gln Thr Ala Arg Asp Arg Lys Lys Ala Arg Met Ser
 85 90 95
 Glu Leu Glu Gln Gln Val Val Asp Leu Glu Glu Glu Asn Gln Lys Leu
 100 105 110
 Leu Leu Glu Asn Gln Leu Leu Arg Glu Lys Thr His Gly Leu Val Val
 115 120 125
 Glu Asn Gln Glu Leu Arg Gln Arg Leu Gly Met Asp Ala Leu Val Ala
 130 135 140
 Glu Glu Glu Ala Glu Ala Lys Gly Asn Glu Val Arg Pro Val Ala Gly
 145 150 155 160
 Ser Ala Glu Ser Ala Ala Gly Ala Gly Pro Val Val Thr Pro Pro Glu
 165 170 175
 His Leu Pro Met Asp Ser Gly Gly Ile Asp Ser Ser Asp Ser Glu Ser
 180 185 190
 Asp Ile Leu Leu Gly Ile Leu Asp Asn Leu Asp Pro Val Met Phe Phe
 195 200 205
 Lys Cys Pro Ser Pro Glu Pro Ala Ser Leu Glu Glu Leu Pro Glu Val
 210 215 220
 Tyr Pro Glu Gly Pro Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Ser Leu Ser Val
 225 230 235 240
 Gly Thr Ser Ser Ala Lys Leu Glu Ala Ile Asn Glu Leu Ile Arg Phe
 245 250 255
 Asp His Ile Tyr Thr Lys Pro Leu Val Leu Glu Ile Pro Ser Glu Thr
 260 265 270
 Glu Ser Gln Ala Asn Val Val Val Lys Ile Glu Glu Ala Pro Leu Ser
 275 280 285
 Pro Ser Glu Asn Asp His Pro Glu Phe Ile Val Ser Val Lys Glu Glu
 290 295 300
 Pro Val Glu Asp Asp Leu Val Pro Glu Leu Gly Ile Ser Asn Leu Leu
 305 310 315 320

ES 2 653 843 T3

Ser Ser Ser His Cys Pro Lys Pro Ser Ser Cys Leu Leu Asp Ala Tyr
 325 330 335
 Ser Asp Cys Gly Tyr Gly Gly Ser Leu Ser Pro Phe Ser Asp Met Ser
 340 345 350
 Ser Leu Leu Gly Val Asn His Ser Trp Glu Asp Thr Phe Ala Asn Glu
 355 360 365
 Leu Phe Pro Gln Leu Ile Ser Val
 370 375

5 <210> 7
 <211> 1128
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

atggtggtgg tggcagccgc gccgaacccg gccgacggga cccctaaagt tctgcttctg 60
 tcggggcagc ccgcctccgc cgccggagcc ccggccggcc aggcctgcc gctcatggtg 120
 ccagcccaga gaggggccag cccggaggca gcgagcgggg ggctgcccga ggcgcgcaag 180
 cgacagcgc ccacgcacct gagccccgag gagaaggcgc tgaggaggaa actgaaaaac 240
 agagtagcag ctacgactgc cagagatcga aagaaggctc gaatgagtga gctggaacag 300
 caagtggtag atttagaaga agagaaccaa aaacttttgc tagaaaatca gcttttacga 360
 gagaaaactc atggccttgt agttgagaac caggagttaa gacagcgctt ggggatggat 420
 gccctggttg ctgaagagga ggcggaagcc aaggggaatg aagtgaggcc agtggccggg 480
 tctgctgagt ccgcagcagg tgcaggccca gttgtcacc ctcagaaca tctcccatg 540
 gattctggcg gtattgactc ttcagattca gagtctgata tctgtttggg cattctggac 600
 aacttggacc cagtcatgtt cttcaaatgc cttccccag agcctgccag cctggaggag 660
 ctcccagagg tctaccaga aggaccagt tcttaccag cctcccttc tctgtcagtg 720
 gggacgtcat cagccaagct ggaagccatt aatgaactaa ttcgttttga ccacatatat 780
 accaagcccc tagtcttaga gataccctct gagacagaga gccaagctaa tgtggtagtg 840
 aaaatcgagg aagcacctct cagccccca gagaatgatc accctgaatt cattgtctca 900
 gtgaaggaag aacctgtaga agatgacctc gttccggagc tgggtatctc aaatctgctt 960
 tcatccagcc actgccc aaa gccatcttcc tgctactgg atgcttacag tgactgtgga 1020
 tacgggggtt cctttcccc attcagtgc atgtctctc tgcttgggtg aaaccattct 1080
 tgggaggaca cttttgcaa tgaactctt cccagctga ttagtgtc 1128

10
 15 <210> 8
 <211> 2010
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

ES 2 653 843 T3

atgggggagc cggctgggggt tgccggcacc atggagtcac cttttagccc gggactcttt 60
cacaggctgg atgaagattg ggattctgct ctctttgctg aacttggtta tttcacagac 120
actgatgagc tgcaattgga agcagcaaat gagacgtatg aaaacaattt tgataatctt 180
gattttgatt tggatttggt accttgggag tcagacattt gggacatcaa caaccaaatc 240
tgtacagtta aagatattaa ggcagaaccc cagccacttt ctccagcctc ctcaagttat 300
tcagtctcat ctctcgggtc agtggactct tattcttcaa ctcagcatgt tcctgaggag 360
ttggatttgt cttctagttc tcagatgtct cccctttcct tatatggtga aaactctaata 420
agtctctctt caccggagcc actgaaggaa gataagcctg tcaactggtc taggaacaag 480
actgaaaatg gactgactcc aaagaaaaaa attcaggtga attcaaaacc ttcaattcag 540
cccaagcctt tattgcttcc agcagcacc cagactcaaa caaactccag tgttccagca 600
aaaaccatca ttattcagac agtaccaacg cttatgccat tggcaaagca gcaaccaatt 660
atcagtttac aacctgcacc cactaaaggc cagacggttt tgctgtctca gcctactgtg 720
gtacaacttc aagcacctgg agttctgccc tctgctcagc cagtccttgc tgttgctggg 780
ggagtcacac agctccctaa tcacgtggtg aatgtggtac cagccccttc agcgaatagc 840
ccagtgaatg gaaaactttc cgtgactaaa cctgtcctac aaagtaccat gagaaatgtc 900
ggttcagata ttgctgtgct aaggagacag caacgtatga taaaaaatcg agaatccgct 960
tgtcagtctc gcaagaagaa gaaagaatat atgctagggg tagaggcgag attaaaggct 1020
gccctctcag aaaacgagca actgaagaaa gaaaatggaa cactgaagcg gcagctggat 1080
gaagttgtgt cagagaacca gaggcttaaa gtccctagtc caaagcgaag agttgtctgt 1140
gtgatgatag tattggcatt tataatactg aactatggac ctatgagcat gttggaacag 1200
gattccagga gaatgaaccc tagtgtggga cctgcaaadc aaaggaggca cttcttagga 1260
ttttctgcta aagaggcaca ggacacatca gatggtatta tccagaaaaa cagctacaga 1320
tatgatcatt ctgtttcaaa tgacaaagcc ctgatgggtc taactgaaga accattgctt 1380
tacattcccc cacctccttg tcagccccta attaatacaa cagagtctct caggttaaat 1440
catgaacttc gaggatgggt tcatagacat gaagtagaaa ggaccaagtc tagaagaatg 1500
acaataatc aacagaaaac ccgtattctt cagggtgttg tggaacaggg ctcaaattct 1560
cagctgatgg ctgttcaata cacagaaacc actagtagta tcagcaggaa ctcaaggagt 1620
gagctacaag tgtattatgc ttcaccaga agttatcaag acttttttga agccatccgc 1680
agaaggggag acacatttta tgttggtgca tttcgaaggg atcacctgct gttaccagct 1740
accaccata acaagaccac aagacaaaa atgtcaattg tgttaccagc aataaacata 1800
aatgagaatg tgatcaatgg gcaggactac gaagtgatga tgcagattga ctgtcaggtg 1860
atggacacca ggatcctcca tatcaaaagt tcgtcgggtc ctcttacct ccgagatcag 1920
cagaggaatc aaaccaacac cttctttggc tcccctccc cagccacaga ggcaaccac 1980
gttgctcagca ccatccctga gtcattacaa 2010

<210> 9

<211> 670

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

ES 2 653 843 T3

Met Gly Glu Pro Ala Gly Val Ala Gly Thr Met Glu Ser Pro Phe Ser
1 5 10 15

Pro Gly Leu Phe His Arg Leu Asp Glu Asp Trp Asp Ser Ala Leu Phe
20 25 30

Ala Glu Leu Gly Tyr Phe Thr Asp Thr Asp Glu Leu Gln Leu Glu Ala
35 40 45

Ala Asn Glu Thr Tyr Glu Asn Asn Phe Asp Asn Leu Asp Phe Asp Leu
50 55 60

Asp Leu Leu Pro Trp Glu Ser Asp Ile Trp Asp Ile Asn Asn Gln Ile
65 70 75 80

Cys Thr Val Lys Asp Ile Lys Ala Glu Pro Gln Pro Leu Ser Pro Ala
85 90 95

Ser Ser Ser Tyr Ser Val Ser Ser Pro Arg Ser Val Asp Ser Tyr Ser
100 105 110

Ser Thr Gln His Val Pro Glu Glu Leu Asp Leu Ser Ser Ser Gln
115 120 125

Met Ser Pro Leu Ser Leu Tyr Gly Glu Asn Ser Asn Ser Leu Ser Ser
130 135 140

Pro Glu Pro Leu Lys Glu Asp Lys Pro Val Thr Gly Ser Arg Asn Lys
145 150 155 160

Thr Glu Asn Gly Leu Thr Pro Lys Lys Lys Ile Gln Val Asn Ser Lys
165 170 175

Pro Ser Ile Gln Pro Lys Pro Leu Leu Leu Pro Ala Ala Pro Lys Thr
180 185 190

Gln Thr Asn Ser Ser Val Pro Ala Lys Thr Ile Ile Ile Gln Thr Val
195 200 205

Pro Thr Leu Met Pro Leu Ala Lys Gln Gln Pro Ile Ile Ser Leu Gln
210 215 220

Pro Ala Pro Thr Lys Gly Gln Thr Val Leu Leu Ser Gln Pro Thr Val
225 230 235 240

Val Gln Leu Gln Ala Pro Gly Val Leu Pro Ser Ala Gln Pro Val Leu

ES 2 653 843 T3

	515		520		525												
Glu	Thr	Thr	Ser	Ser	Ile	Ser	Arg	Asn	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Gln	Val		
	530					535					540						
Tyr	Tyr	Ala	Ser	Pro	Arg	Ser	Tyr	Gln	Asp	Phe	Phe	Glu	Ala	Ile	Arg		
545					550					555					560		
Arg	Arg	Gly	Asp	Thr	Phe	Tyr	Val	Val	Ser	Phe	Arg	Arg	Asp	His	Leu		
				565					570					575			
Leu	Leu	Pro	Ala	Thr	Thr	His	Asn	Lys	Thr	Thr	Arg	Pro	Lys	Met	Ser		
			580					585					590				
Ile	Val	Leu	Pro	Ala	Ile	Asn	Ile	Asn	Glu	Asn	Val	Ile	Asn	Gly	Gln		
		595					600					605					
Asp	Tyr	Glu	Val	Met	Met	Gln	Ile	Asp	Cys	Gln	Val	Met	Asp	Thr	Arg		
	610					615					620						
Ile	Leu	His	Ile	Lys	Ser	Ser	Ser	Val	Pro	Pro	Tyr	Leu	Arg	Asp	Gln		
625					630					635					640		
Gln	Arg	Asn	Gln	Thr	Asn	Thr	Phe	Phe	Gly	Ser	Pro	Pro	Ala	Ala	Thr		
				645					650					655			
Glu	Ala	Thr	His	Val	Val	Ser	Thr	Ile	Pro	Glu	Ser	Leu	Gln				
			660					665					670				

<210> 10
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 10

5

ES 2 653 843 T3

Met Glu Ala Ala Pro Pro Gly Pro Pro Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15
Leu Leu Leu Leu Ala Leu Cys Gly Cys Pro Ala Pro Ala Ala Ala Ser
20 25 30
Pro Leu Leu Leu Phe Ala Asn Arg Arg Asp Val Arg Leu Val Asp Ala
35 40 45
Gly Gly Val Lys Leu Glu Ser Thr Ile Val Val Ser Gly Leu Glu Asp
50 55 60
Ala Ala Ala Val Asp Phe Gln Phe Ser Lys Gly Ala Val Tyr Trp Thr
65 70 75 80
Asp Val Ser Glu Glu Ala Ile Lys Gln Thr Tyr Leu Asn Gln Thr Gly
85 90 95

ES 2 653 843 T3

Ala Ala Val Gln Asn Val Val Ile Ser Gly Leu Val Ser Pro Asp Gly
100 105 110

Leu Ala Cys Asp Trp Val Gly Lys Lys Leu Tyr Trp Thr Asp Ser Glu
115 120 125

Thr Asn Arg Ile Glu Val Ala Asn Leu Asn Gly Thr Ser Arg Lys Val
130 135 140

Leu Phe Trp Gln Asp Leu Asp Gln Pro Arg Ala Ile Ala Leu Asp Pro
145 150 155 160

Ala His Gly Tyr Met Tyr Trp Thr Asp Trp Gly Glu Thr Pro Arg Ile
165 170 175

Glu Arg Ala Gly Met Asp Gly Ser Thr Arg Lys Ile Ile Val Asp Ser
180 185 190

Asp Ile Tyr Trp Pro Asn Gly Leu Thr Ile Asp Leu Glu Glu Gln Lys
195 200 205

Leu Tyr Trp Ala Asp Ala Lys Leu Ser Phe Ile His Arg Ala Asn Leu
210 215 220

Asp Gly Ser Phe Arg Gln Lys Val Val Glu Gly Ser Leu Thr His Pro
225 230 235 240

Phe Ala Leu Thr Leu Ser Gly Asp Thr Leu Tyr Trp Thr Asp Trp Gln
245 250 255

Thr Arg Ser Ile His Ala Cys Asn Lys Arg Thr Gly Gly Lys Arg Lys
260 265 270

Glu Ile Leu Ser Ala Leu Tyr Ser Pro Met Asp Ile Gln Val Leu Ser
275 280 285

Gln Glu Arg Gln Pro Phe Phe His Thr Arg Cys Glu Glu Asp Asn Gly
290 295 300

Gly Cys Ser His Leu Cys Leu Leu Ser Pro Ser Glu Pro Phe Tyr Thr
305 310 315 320

Cys Ala Cys Pro Thr Gly Val Gln Leu Gln Asp Asn Gly Arg Thr Cys
325 330 335

Lys Ala Gly Ala Glu His His His His His His Asp Tyr Lys Asp Asp
340 345 350

Asp Asp Lys Ile
355

ES 2 653 843 T3

<210> 11
 <211> 800
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 11

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Gly Ser Thr Ser Pro Val Trp Trp Asn Ser Val
 20 25 30

Pro Glu Ala Phe Leu Val Phe Thr Ser Arg Ala Ala Ile His Arg Ile
 35 40 45

Ser Leu Glu Thr Asn Asn Asn Asp Val Ala Ile Pro Leu Thr Gly Val
 50 55 60

Lys Glu Ala Ser Ala Leu Asp Phe Asp Val Ser Asn Asn His Ile Tyr
 65 70 75 80

Trp Thr Asp Val Ser Leu Lys Thr Ile Ser Arg Ala Phe Met Asn Gly
 85 90 95

Ser Ser Val Glu His Val Val Glu Phe Gly Leu Asp Tyr Pro Glu Gly
 100 105 110

Met Ala Val Asp Trp Met Gly Lys Asn Leu Tyr Trp Ala Asp Thr Gly
 115 120 125

Thr Asn Arg Ile Glu Val Ala Arg Leu Asp Gly Gln Phe Arg Gln Val
 130 135 140

Leu Val Trp Arg Asp Leu Asp Asn Pro Arg Ser Leu Ala Leu Asp Pro
 145 150 155 160

Thr Lys Gly Tyr Ile Tyr Trp Thr Glu Trp Gly Gly Lys Pro Arg Ile
 165 170 175

Val Arg Ala Phe Met Asp Gly Thr Asn Cys Met Thr Leu Val Asp Lys
 180 185 190

Val Gly Arg Ala Asn Asp Leu Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Gln Arg Leu
 195 200 205

Tyr Trp Thr Asp Leu Asp Thr Asn Met Ile Glu Ser Ser Asn Met Leu
 210 215 220

Gly Gln Glu Arg Val Val Ile Ala Asp Asp Leu Pro His Pro Phe Gly
 225 230 235 240

ES 2 653 843 T3

Leu Thr Gln Tyr Ser Asp Tyr Ile Tyr Trp Thr Asp Trp Asn Leu His
 245 250 255
 Ser Ile Glu Arg Ala Asp Lys Thr Ser Gly Arg Asn Arg Thr Leu Ile
 260 265 270
 Gln Gly His Leu Asp Phe Val Met Asp Ile Leu Val Phe His Ser Ser
 275 280 285
 Arg Gln Asp Gly Leu Asn Asp Cys Met His Asn Asn Gly Gln Cys Gly
 290 295 300
 Gln Leu Cys Leu Ala Ile Pro Gly Gly His Arg Cys Gly Cys Ala Ser
 305 310 315 320
 His Tyr Thr Leu Asp Pro Ser Ser Arg Asn Cys Ser Pro Pro Thr Thr
 325 330 335
 Phe Leu Leu Phe Ser Gln Lys Ser Ala Ile Ser Arg Met Ile Pro Asp
 340 345 350
 Asp Gln His Ser Pro Asp Leu Ile Leu Pro Leu His Gly Leu Arg Asn
 355 360 365
 Val Lys Ala Ile Asp Tyr Asp Pro Leu Asp Lys Phe Ile Tyr Trp Val
 370 375 380
 Asp Gly Arg Gln Asn Ile Lys Arg Ala Lys Asp Asp Gly Thr Gln Pro
 385 390 395 400
 Phe Val Leu Thr Ser Leu Ser Gln Gly Gln Asn Pro Asp Arg Gln Pro
 405 410 415
 His Asp Leu Ser Ile Asp Ile Tyr Ser Arg Thr Leu Phe Trp Thr Cys
 420 425 430
 Glu Ala Thr Asn Thr Ile Asn Val His Arg Leu Ser Gly Glu Ala Met
 435 440 445
 Gly Val Val Leu Arg Gly Asp Arg Asp Lys Pro Arg Ala Ile Val Val
 450 455 460
 Asn Ala Glu Arg Gly Tyr Leu Tyr Phe Thr Asn Met Gln Asp Arg Ala
 465 470 475 480
 Ala Lys Ile Glu Arg Ala Ala Leu Asp Gly Thr Glu Arg Glu Val Leu
 485 490 495
 Phe Thr Thr Gly Leu Ile Arg Pro Val Ala Leu Val Val Asp Asn Thr
 500 505 510

ES 2 653 843 T3

Leu Gly Lys Leu Phe Trp Val Asp Ala Asp Leu Lys Arg Ile Glu Ser
 515 520 525

Cys Asp Leu Ser Gly Ala Asn Arg Leu Thr Leu Glu Asp Ala Asn Ile
 530 535 540

Val Gln Pro Leu Gly Leu Thr Ile Leu Gly Lys His Leu Tyr Trp Ile
 545 550 555

Asp Arg Gln Gln Gln Met Ile Glu Arg Val Glu Lys Thr Thr Gly Asp
 565 570

Lys Arg Thr Arg Ile Gln Gly Arg Val Ala His Leu Thr Gly Ile His
 580 585 590

Ala Val Glu Glu Val Ser Leu Glu Glu Phe Ser Ala His Pro Cys Ala
 595 600 605

Arg Asp Asn Gly Gly Cys Ser His Ile Cys Ile Ala Lys Gly Asp Gly
 610 615 620

Thr Pro Arg Cys Ser Cys Pro Val His Leu Val Leu Leu Gln Asn Leu
 625 630 635

Leu Thr Cys Gly Glu Pro Pro Thr Cys Ser Pro Asp Gln Phe Ala Cys
 645 650

Ala Thr Gly Glu Ile Asp Cys Ile Pro Gly Ala Trp Arg Cys Asp Gly
 660 665 670

Phe Pro Glu Cys Asp Asp Gln Ser Asp Glu Glu Gly Cys Pro Val Cys
 675 680 685

Ser Ala Ala Gln Phe Pro Cys Ala Arg Gly Gln Cys Val Asp Leu Arg
 690 695 700

Leu Arg Cys Asp Gly Glu Ala Asp Cys Gln Asp Arg Ser Asp Glu Ala
 705 710 715 720

Asp Cys Asp Ala Ile Cys Leu Pro Asn Gln Phe Arg Cys Ala Ser Gly
 725 730 735

Gln Cys Val Leu Ile Lys Gln Gln Cys Asp Ser Phe Pro Asp Cys Ile
 740 745 750

Asp Gly Ser Asp Glu Leu Met Cys Glu Ile Thr Lys Pro Pro Ser Arg
 755 760 765

Pro Leu Glu Ser Arg Gly Pro Phe Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro
 770 775 780

Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr Gly His His His His His His
 785 790 795 800

REIVINDICACIONES

1. Un cultivo celular animal o vegetal transfectado o transducido con uno o más vectores de expresión que comprende:
- 5 (a) al menos un casete de expresión recombinante que codifica dicha proteína de interés; y
(b) al menos otro casete de expresión recombinante que codifica:
- (i) una proteína XBP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6 o un fragmento de la misma, en el que dicha proteína o fragmento de la misma se une a un elemento RPD (ERPD) o a un elemento de respuesta al estrés del RE (ERERE) de dicha célula; o
- 10 (ii) una proteína ATF6 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 o de los restos de aminoácidos 1-366 de SEQ ID NO:9, en el que dicha proteína se une a un elemento RPD (ERPD) o a un elemento de respuesta al estrés del RE (ERERE) de dicha célula;
- en el que la relación entre el número total de dicho al menos un casete de expresión recombinante y el número total de dicho al menos otro casete de expresión recombinante es al menos 3:1.
2. El cultivo celular de la reivindicación 1, en el que dicha célula es una célula de mamífero.
- 15 3. El cultivo celular de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha célula es una célula híbrida producida por la fusión de una célula animal y una célula cancerosa.
4. Un procedimiento de aumento del rendimiento de una proteína de interés en una célula animal o vegetal que comprende transfectar o transducir la célula con uno o más vectores de expresión que comprende los casetes de expresión definidos en la reivindicación 1, en el que la relación entre el número total de dicho al menos un casete de expresión recombinante y el número total de dicho al menos otro casete de expresión recombinante es al menos 3:1.
- 20

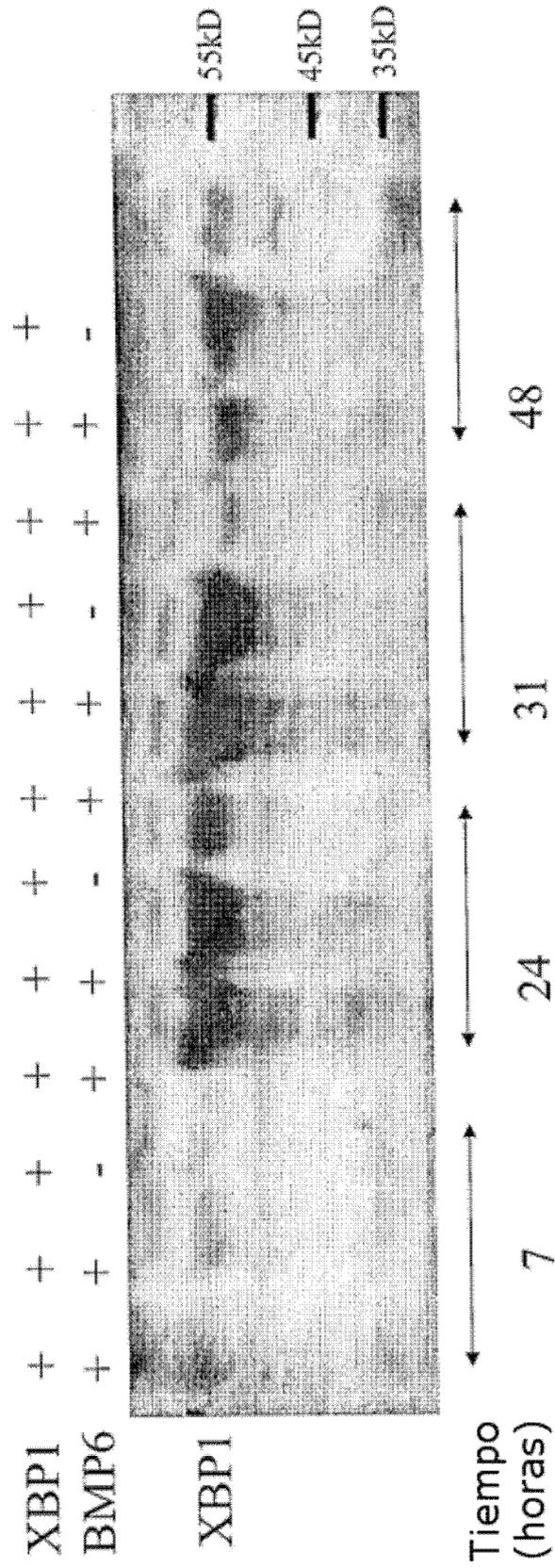


FIGURA 1

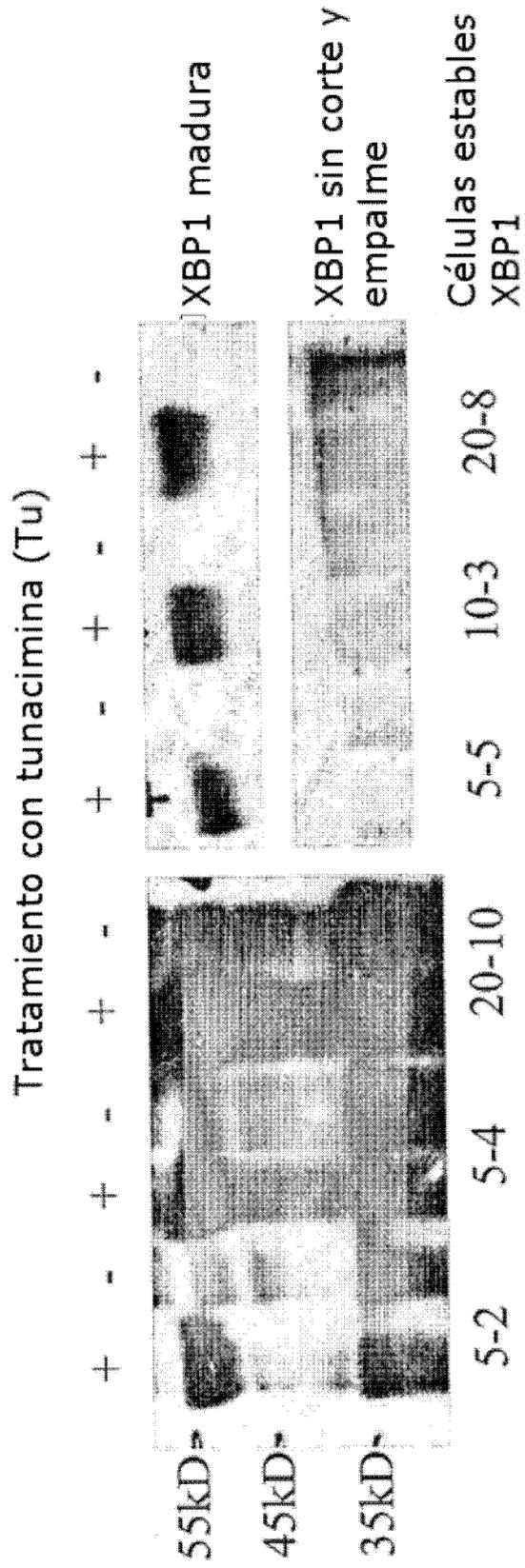


FIGURA 2

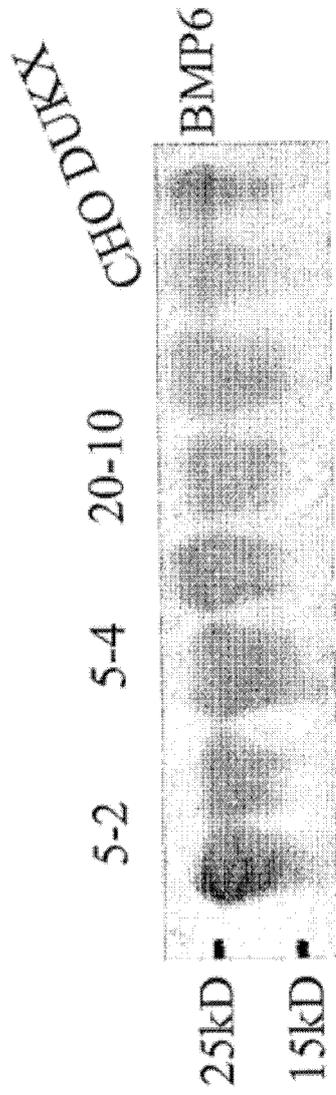


FIGURA 3

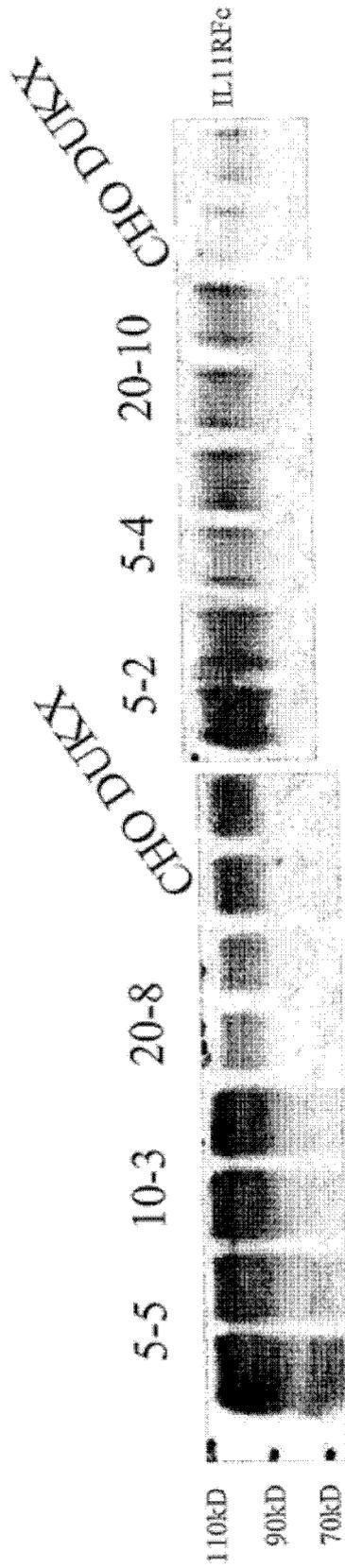


FIGURA 4

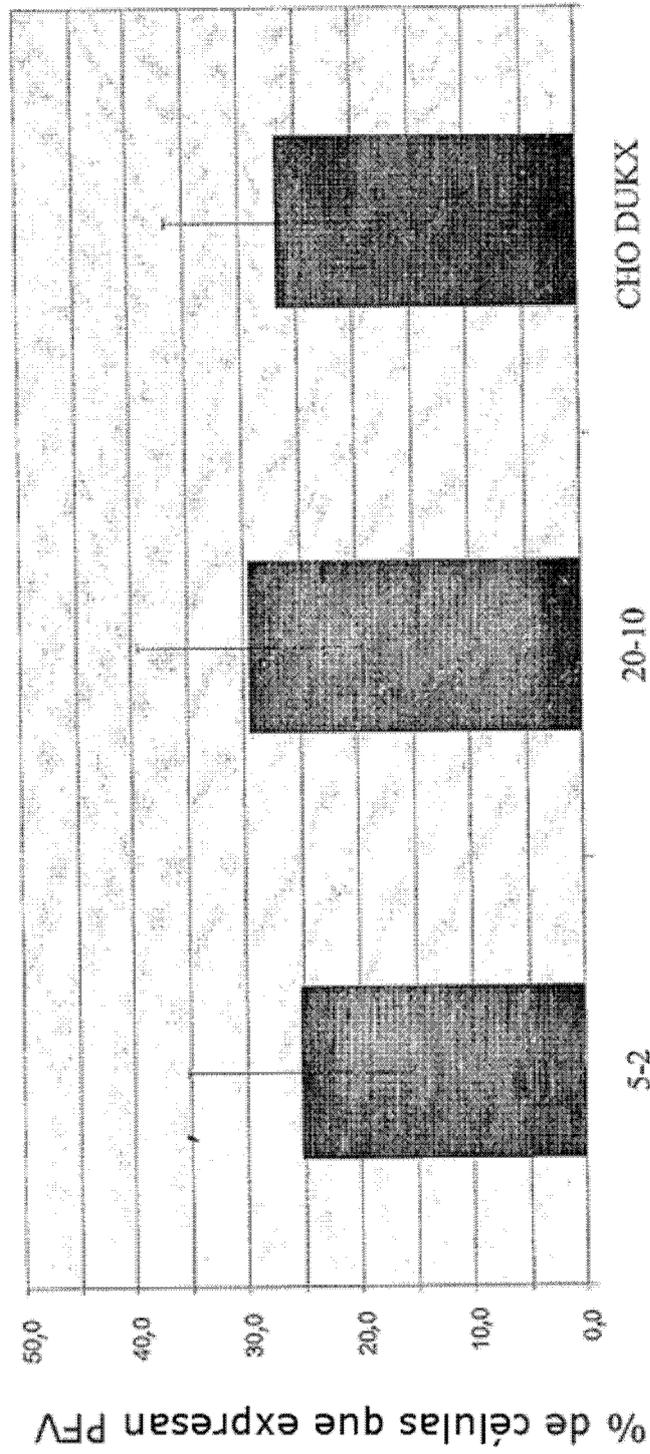


FIGURA 5

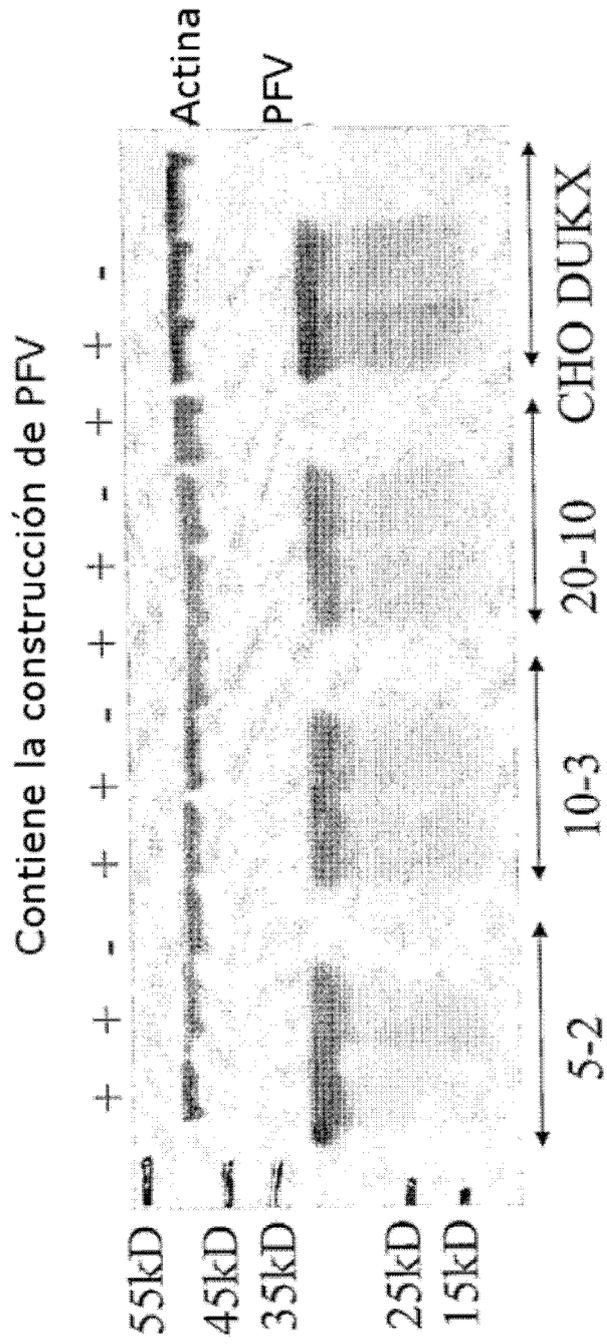


FIGURA 6

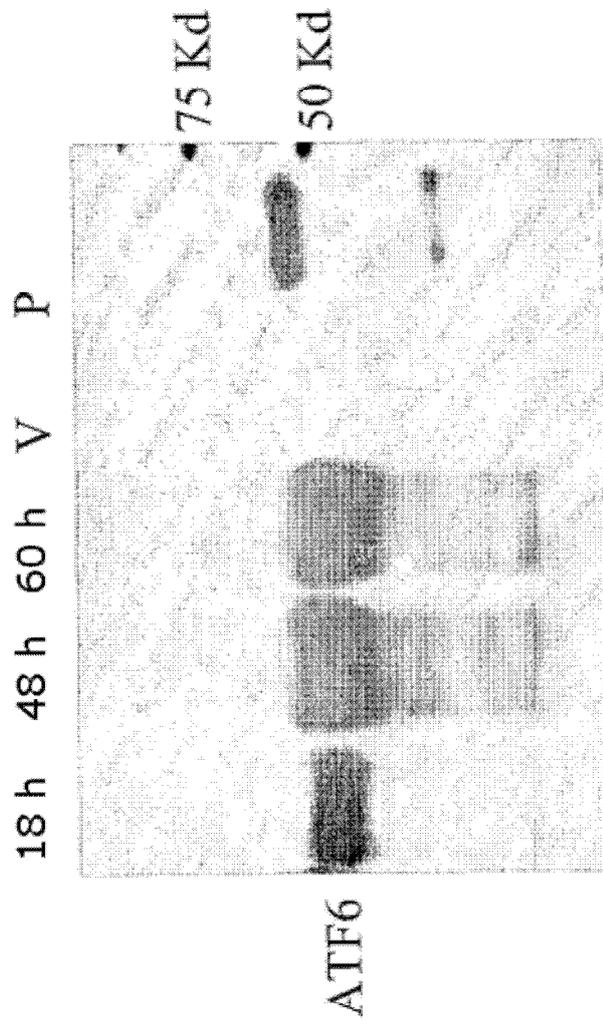


FIGURA 7

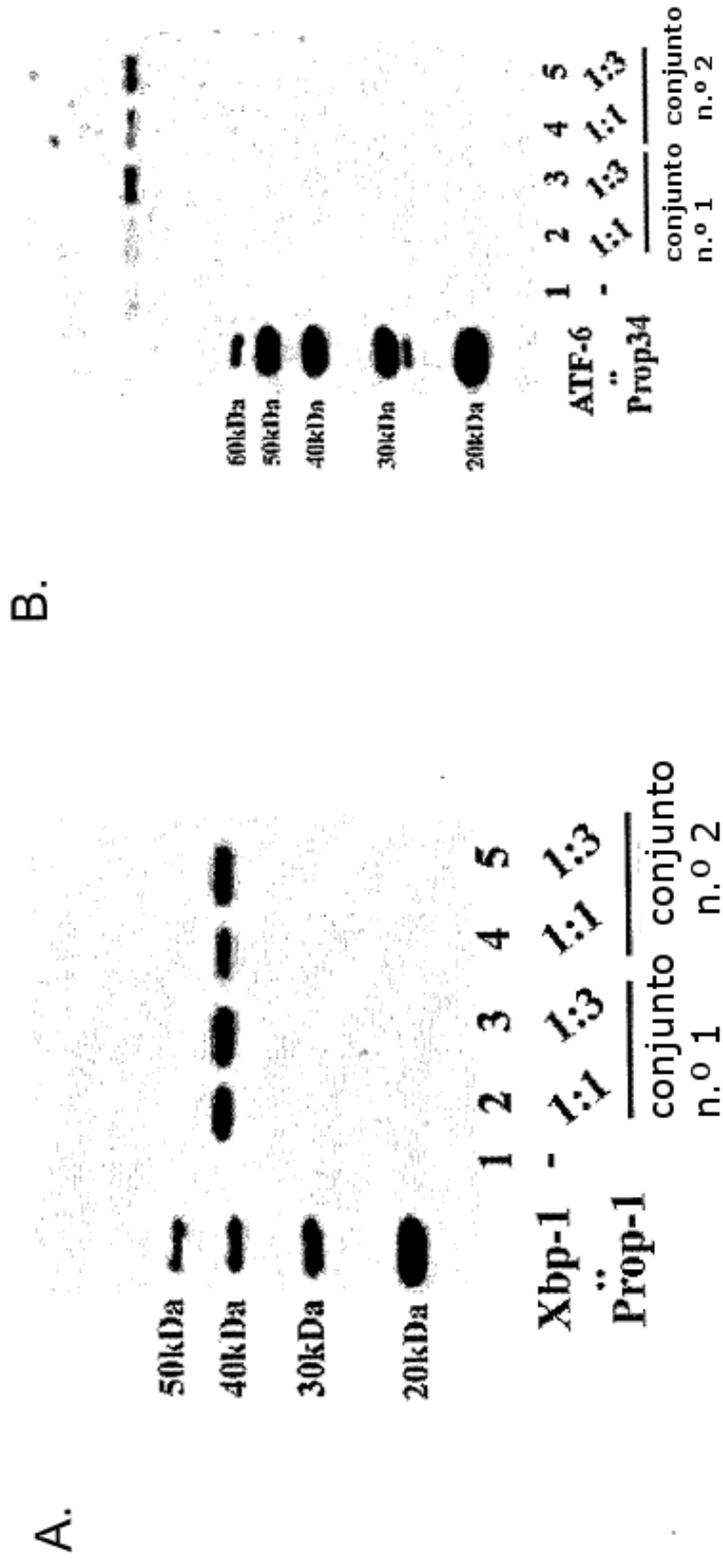


FIGURA 8

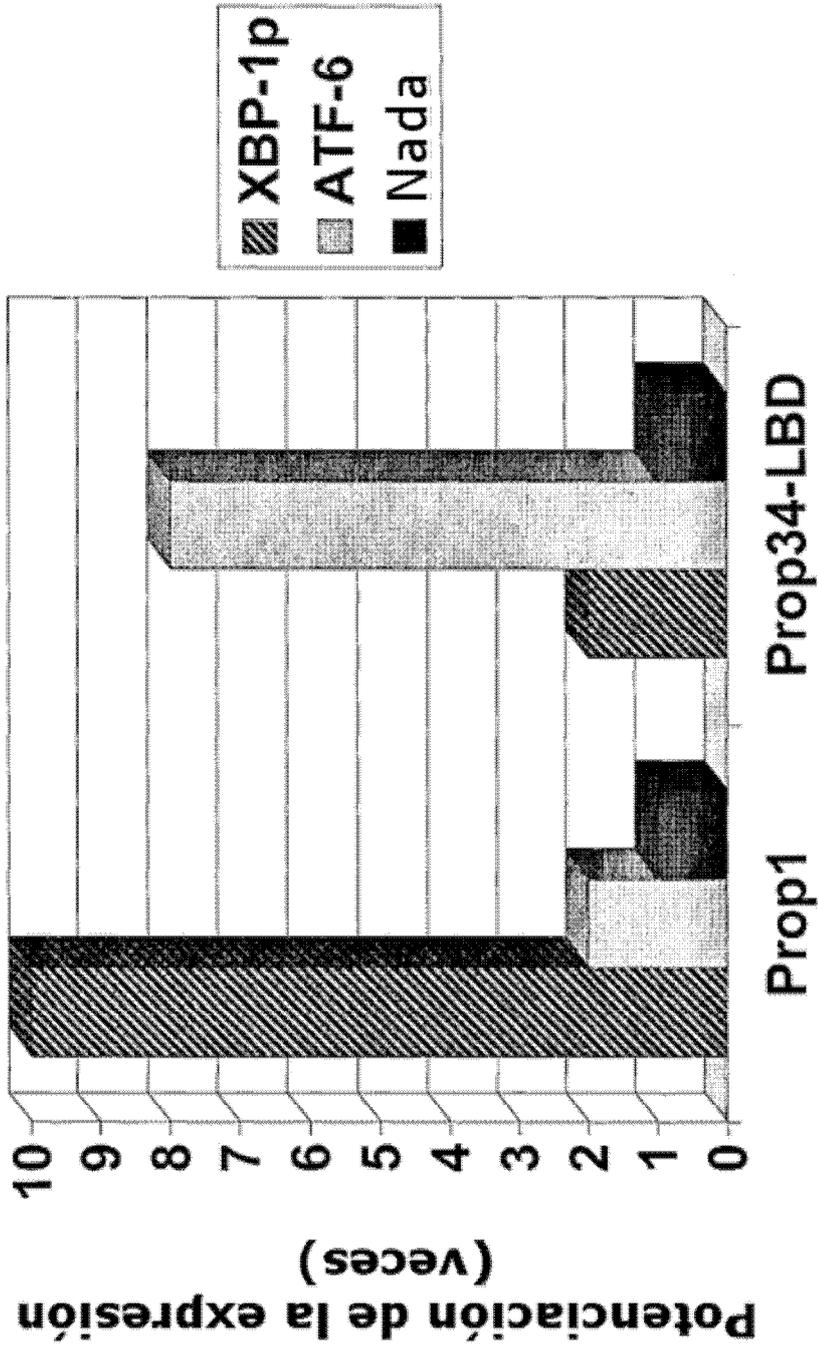


FIGURA 9