

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 981**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**C12P 21/02** (2006.01)  
**C12P 21/08** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 16/24** (2006.01)  
**C07K 16/10** (2006.01)  
**C12N 15/85** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2011 PCT/JP2011/078935**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2012 WO12081628**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2011 E 11848424 (5)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018 EP 2653540**

54 Título: **Procedimiento de producción de una proteína**

30 Prioridad:

**15.12.2010 JP 2010279849**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.04.2018**

73 Titular/es:

**INTER-UNIVERSITY RESEARCH INSTITUTE  
 CORPORATION RESEARCH ORGANIZATION OF  
 INFORMATION AND SYSTEMS (50.0%)  
 10-3, Midori-cho,  
 Tachikawa-shi, Tokyo 190-0014, JP y  
 KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KAWAKAMI KOICHI;  
 KUROKAWA MEGUMI;  
 YAMAGUCHI KEINA;  
 OGAWA RISA;  
 TSUKAHARA MASAYOSHI y  
 HAYASHI YOKO**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 661 981 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

Procedimiento de producción de una proteína.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento para integrar un fragmento génico insertado entre un par de secuencias de transposón en un cromosoma de una célula de mamífero, que comprende introducir por lo menos un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una proteína de interés y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, en una célula de mamífero en suspensión, y un procedimiento para producir la proteína que comprende cultivar en suspensión una célula de mamífero en suspensión que produce la proteína, una célula de mamífero en suspensión que expresa la proteína y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una proteína de interés y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico.

**Antecedentes de la técnica**

La producción de proteínas exógenas mediante técnicas de ADN recombinante se utiliza en diversas industrias, tales como la industria farmacéutica y la industria alimentaria. En la mayoría de casos, se lleva a cabo la producción de proteínas recombinantes mediante la introducción de un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés en un hospedador, tal como *Escherichia coli*, levadura, célula de insecto, célula vegetal y célula animal, la selección de un transformante en el que se integra el vector de expresión en el cromosoma, y el cultivo adicional de la línea celular transformadas bajo condiciones de cultivo apropiados.

Sin embargo, con el fin de desarrollar un hospedador que pueda producir una proteína exógena eficientemente, resulta necesario seleccionar una célula hospedadora que presente una buena productividad de cada proteína de interés, de manera que se desea una innovación técnica adicional de las técnicas de producción de proteínas exógenas para cada huésped.

En los sistemas bacterianos, tales como *Escherichia coli*, y en los sistemas de levaduras, los cuales son diferentes de las células animales, las modificaciones postraduccionales, tales como la modificación de las cadenas sacáridas, resultan difíciles de conseguir en muchos casos y de esta manera provocan un problema en la producción de una proteína que presente su actividad.

Debido a que la proteína producida se somete a una modificación postraducciona, tal como la fosforilación y la adición de cadenas sacáridas en el sistema de insecto, dicho sistema presenta el mérito de que puede expresarse la proteína que presenta su actividad fisiológica original.

Sin embargo, debido a que la estructura de cadenas sacáridas de la proteína secretada es diferente de la de las células derivadas de mamíferos, la antigenicidad y similares se tornan problemáticas al aplicar la proteína al uso farmacéutico.

Además, debido a que se utiliza un virus recombinante en el sistema de células de insecto al introducir un gen exógeno, existe el problema de que su inactivación y contención del virus resultan necesarios desde el punto de vista de la seguridad.

En el sistema de células animales, pueden llevarse a cabo modificaciones postraduccionales, tales como la fosforilación, la adición de cadenas sacáridas y el pliegue, en proteínas derivadas de animales superiores, incluyendo el ser humano, de manera más similar a las producidas en el cuerpo in vivo. Dichas modificaciones postraduccionales exactas resultan necesarias para recrear la actividad fisiológica que presenta originalmente una proteína en su proteína recombinante, y habitualmente se aplica un sistema de producción de proteínas en el que se utiliza una célula de mamífero como huésped a productos farmacéuticos y similares que requieren dicha actividad fisiológica.

Sin embargo, un sistema de expresión de proteínas en el que se utiliza una célula de mamífero como huésped presenta generalmente una productividad baja y también provoca un problema de estabilidad de los genes introducidos en muchos casos. La mejora de la productividad de una proteína utilizando una célula de mamífero en cultivo como huésped no sólo resulta muy importante para producir medicamentos destinados al tratamiento, agentes diagnósticos y similares, sino que también contribuye en gran medida a la investigación y al desarrollo de los mismos. De esta manera, resulta urgente desarrollar un sistema de expresión génica que posibilite la fácil obtención de una línea celular de elevada productividad utilizando una célula de mamífero en cultivo, en particular una célula de ovario de hámster chino (célula CHO), a modo de huésped.

Un transposón es un elemento genético transponible que puede desplazarse de un locus a otro locus en el

cromosoma. Un transposón es una herramienta potente para el estudio en biología molecular y genética y se utiliza con un propósito, tal como la mutagénesis, la captura génica y la preparación de individuos transgénicos, en insectos o nemátodos (por ejemplo *Drosophila melanogaster* o *Caenorhabditis elegans*) y plantas. Sin embargo, se ha desarrollado dicha técnica para los animales vertebrados, incluyendo las células de mamífero.

5 Sin embargo, en los últimos años se ha informado de transposones que también presentan actividades en los animales vertebrados y se ha demostrado que algunos de ellos presentan una actividad en las células de mamífero, tales como las células derivadas de ratón y del ser humano. Entre los ejemplos típicos se incluyen los transposones Tol1 (referencia de patente nº 1) y Tol2 (referencia no de patente nº 1) que se clonan a partir de un medaka (afanio), Sleeping Beauty reconstruido a partir de un transposón no autónomo existente en genoma de peces *Onchorhynchus* (referencia no de patente nº 2), un transposón artificial Frog Prince (referencia no de patente nº 3) que se deriva de la rana y el transposón piggyBac (referencia no de patente nº 4) que se deriva de insectos.

15 Dichos transposones de ADN han sido utilizados para la mutagénesis, la captura génica, la preparación de individuos transgénicos, la expresión de proteínas resistentes a fármacos y similares, como herramienta de introducción génica para producir un nuevo fenotipo en un genoma de una célula de mamífero (referencias no de patente nº 5 a nº 12).

20 En el caso de los insectos, se ha estudiado un procedimiento en el que se introduce un gen exógeno en el cromosoma del gusano de la seda utilizando el transposón piggyBac derivado de un insecto lepidóptero para expresar la proteína codificada por dicho gen exógeno y se ha dado a conocer un procedimiento de producción de proteínas utilizando las técnicas anteriormente indicadas (referencia de patente nº 2).

25 Sin embargo, debido a que la proteína de interés no se expresa a niveles suficientes y se produce en todo el cuerpo del gusano de la seda, provoca un problema económico debido a la necesidad de una técnica avanzada de purificación para recuperar la proteína exógena expresada en una forma altamente purificada a partir del líquido corporal, incluyendo una gran cantidad de proteínas contaminadas.

30 Además, es conocido un ejemplo en el que se expresa una proteína relacionada con la resistencia a G418 en una célula de mamífero utilizando el transposón Tol2 derivado de medaka (referencias no de patente nº 12 y nº 13).

35 En el caso de la producción de un fármaco de proteínas para el uso médico utilizando una célula en cultivo derivada de mamífero, resulta importante que un componente de origen animal no se encuentre contenido durante su procedimiento de producción con el fin de evitar la contaminación inesperada por un virus desconocido o polipéptido patogénico. La célula de CHO se utiliza más frecuentemente como célula animal para la producción de un fármaco de proteínas y gracias a los estudios realizados en los últimos años, también se ha establecido una línea de células de CHO en suspensión capaz de cultivar en un medio seguro que no utiliza un suero componente de origen animal. Sin embargo, la productividad de una línea celular en la que se ha introducido un gen bajo condiciones libres de suero o libres de proteínas se encuentra limitada a la mitad de la de la línea celular en la que un gen ha sido introducido bajo las condiciones de utilización de suero (literatura no de patente nº 14). Se demuestra que la transducción génica bajo condiciones libres de suero o libres de proteínas resulta técnicamente difícil.

45 En general se introduce un marcador seleccionable para cribar una célula que expresa una proteína de interés en el mismo vector de expresión génica. Lo anterior se basa en la hipótesis de que existe una región en la que un gen existente en el genoma se expresa fácilmente y una región en la que un gen presente en el genoma prácticamente no se expresa (denominados 'efectos de posición', literatura no de patente nº 15) y de que la proteína de interés también se expresa al expresarse el marcador seleccionable.

50 Por otra parte, en el caso de que una proteína de interés comprenda dos o más polipéptidos, tal como un anticuerpo y similares, es conocido además que cada polipéptido se expresa utilizando diferentes vectores. En el caso de un anticuerpo, se ha demostrado que la productividad es más alta en el caso de que la expresión de la cadena pesada del anticuerpo sea más elevada que la expresión de la cadena ligera (literatura no de patentes nº 16). Debido a que se predice que las expresiones de las cadenas pesada y ligera sean constantes en el mismo vector, resulta posible obtener una línea celular que expresa las cadenas pesada y ligera utilizando diferentes vectores con el fin de obtener una productividad elevada. Sin embargo, en el caso de que se exprese una proteína utilizando dos o más vectores diferentes, también resultan necesarios dos o más genes marcadores seleccionables.

60 Como medio para superar lo anterior, se informa de un caso en el que un gen *dhfr* originalmente consistente en una cadena polipeptídica se dividió en dos cadenas polipeptídicas y una de ellas se dispuso en un vector de expresión de cadena pesada y la otra se dispuso en un vector de expresión de cadena ligera (literatura no de patentes nº 17).

Sin embargo, la célula indicada en la literatura no de patentes nº 17 es una célula de CHO que es dependiente del componente proteína añadido al medio y, tal como se ha indicado anteriormente, existe la posibilidad de que la eficiencia de introducción génica sea elevada, diferente del caso de la introducción génica bajo condiciones libres de suero o libres de proteínas. Se predice que la selección de una célula de alta productividad seguirá resultando difícil al introducir un gen bajo condiciones libres de suero o libres de proteínas con elevada seguridad y libres del peligro de infección vírica y similares.

#### [Listado de referencias]

#### 10 [Literatura de patentes]

[Literatura de patentes nº 1] Documento nº WO 2008/072540.  
[Literatura de patentes nº 2] Solicitud publicada de patente japonesa no examinada nº 2001-532188.

#### 15 [Literatura no de patentes]

[Literatura no de patentes nº 1] Nature 383:30, 1996.  
[Literatura no de patentes nº 2] Cell 91, 501-510 (1997)  
[Literatura no de patentes nº 3] Nucleic Acids Res, 31, 6873-6881 (2003)  
20 [Literatura no de patentes nº 4] Insect Mol.Biol.5, 141-151 (1996)  
[Literatura no de patentes nº 5] Genetics.166, 895-899 (2004)  
[Literatura no de patentes nº 6] PLoS Genet, 2, e169 (2006)  
[Literatura no de patentes nº 7] Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 10769-10773 (1998)  
[Literatura no de patentes nº 8] Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:6759-6764 (2001)  
25 [Literatura no de patentes nº 9] Nature 436,221-22 6 (2005)  
[Literatura no de patentes nº 10] Nucleic Acids Res., 31, 6873-6881 (2003)  
[Literatura no de patentes nº 11] Nucleic Acids Res., 35, e87 (2007)  
[Literatura no de patentes nº 12] Proc Natl. Acad. Sci. USA, 103, 15008-15013 (2006)  
[Literatura no de patentes nº 13] Plos Genetics, 2,1715-1724(2006)  
30 [Literatura no de patentes nº 14] Biotech. Bioeng. 96, 1118-1126 (2007)  
[Literatura no de patentes nº 15] Nature Biotech. 22, 1393-1398 (2004)  
[Literatura no de patentes nº 16] Biotech. Bioeng. 96, 337-348 (2007)  
[Literatura no de patentes nº 17] Biotech. Bioeng. 84,439-444 (2003)

#### 35 **Exposición de la invención**

##### Problemas que debe resolver la invención

40 Con el fin de producir y analizar una proteína de interés, resulta necesario seleccionar una línea celular que exprese establemente y a nivel elevado una proteína de interés utilizando una célula de cultivo derivada de mamífero. Sin embargo, la preparación y cultivo de la célula que produce la proteína de interés requiere considerable esfuerzo y tiempo.

45 Además, aunque es conocida la expresión de una proteína de interés en una célula de mamífero utilizando una secuencia de transposón, no se conoce la preparación de una célula que pueda expresar a nivel elevado una proteína de interés y que de esta manera pueda utilizarse como sistema de producción de proteínas mediante la utilización de una secuencia de transposón, no se conoce un procedimiento de preparación de una célula de mamífero que pueda producir a nivel elevado una proteína de interés mediante la utilización de una secuencia de transposón y no se conoce un procedimiento de producción de una proteína utilizando la célula.

50 Tal como se ha indicado anteriormente, existe la necesidad de expresar una proteína de interés en gran cantidad mediante el establecimiento de un sistema de producción de proteínas que pueda producir a nivel elevado la proteína de interés utilizando un cultivo celular de mamífero de manera eficiente y en un corto periodo de tiempo. Además, se ha deseado el establecimiento de una célula productora que no requiera ningún componente de origen animal entre la introducción génica y el establecimiento de la célula productora.

55 De esta manera, los objetivos de la invención son proporcionar una célula capaz de expresar a nivel elevado una proteína de interés que pueda establecerse eficientemente y un procedimiento para producir la proteína de interés utilizando la célula.

#### 60 Medios para resolver los problemas

65 Con el fin de resolver los problemas anteriormente indicados, los presentes inventores han llevado a cabo estudios intensivos y han encontrado como resultado que puede producirse eficientemente una proteína de interés mediante la introducción de por lo menos un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica la proteína de interés y que comprende además un par de secuencias de

transposón en ambos extremos del fragmento génico en una célula de mamífero en suspensión y la integración del fragmento génico insertado entre un par (dos) de secuencias de transposón en un cromosoma de la célula de mamífero. Además, se ha encontrado que la proteína de interés puede producirse eficientemente mediante la utilización de la célula y de esta manera se ha llevado a cabo la invención.

5

Específicamente, la invención se refiere a lo siguiente:

1. Un procedimiento para producir un anticuerpo, que comprende introducir en una célula de CHO en suspensión:

10

(a) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, o

15

20

(b) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, o

25

30

(c) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico,

35

en el que cada par de secuencias de transposón son secuencias de nucleótidos de Tol1 o secuencias de nucleótidos de Tol2, permitiendo que actúe una transposasa sobre las secuencias de transposón, integrando de esta manera los fragmentos génicos en un cromosoma de la célula de CHO con el fin de obtener una célula de CHO que expresa el anticuerpo y cultivando en suspensión la célula de CHO.

2. Un procedimiento para producir un anticuerpo, que comprende las etapas (A) a (C) a continuación:

40

(A) introducir simultáneamente en una célula de CHO en suspensión:

45

(a) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, o

50

55

(b) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un AND codificante de una cadena L de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, o

60

(c) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico,

65

en el que cada par de secuencias de transposón son secuencias de nucleótidos de Tol1 o secuencias de nucleótidos de Tol2, y un vector de expresión que comprende un ADN que codifica una transposasa que

reconoce las secuencias de transposón y presenta actividad de transferencia de un fragmento génico insertado entre un par de secuencias de transposón en un cromosoma,

5 (B) obtener una célula de CHO en suspensión que expresa el anticuerpo mediante la expresión transitoria de la transposasa a partir del vector de expresión que se introduce en la célula de CHO en suspensión en la etapa (A) para integrar los fragmentos génicos en un cromosoma de la célula de CHO, y

10 (C) cultivar en suspensión la célula de CHO en suspensión que expresa el anticuerpo obtenido en la etapa (B) para producir el anticuerpo,

3. Un procedimiento para obtener una célula de CHO en suspensión que expresa un anticuerpo, que comprende introducir en una célula de CHO en suspensión:

15 (a) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, o

20 (b) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, o

25 (c) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico,

30 en el que cada par de secuencias de transposón son secuencias de nucleótidos de Tol1 o secuencias de nucleótidos de Tol2, y que permite que actúe una transposasas sobre las secuencias de transposón, integrando de esta manera los fragmentos génicos en un cromosoma de la célula de CHO.

35 4. El procedimiento descrito en cualquiera de los ítems 1 a 3, anteriormente, en el que las secuencias de nucleótidos de Tol2 son las secuencias de nucleótidos mostradas en la SEC ID nº 2 y la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID nº 3.

40 5. El procedimiento descrito en cualquiera de los ítems 1 a 3, anteriormente, en el que las secuencias de nucleótidos de Tol1 son las secuencias de nucleótidos mostradas en la SEC ID nº 14 y las secuencias de nucleótidos mostradas en la SEC ID nº 15.

45 6. El procedimiento descrito en cualquiera de los ítems 1 a 5, anteriormente, en el que la célula de CHO en suspensión es una célula capaz de sobrevivir y proliferar en un medio libre de suero.

50 7. El procedimiento descrito en cualquiera de los ítems 1 a 6, anteriormente, en el que la célula de CHO en suspensión es una célula de CHO adaptada para el cultivo en suspensión.

55 8. El procedimiento descrito en cualquiera de los ítems 1 a 7, anteriormente, en el que la célula de CHO es por lo menos una seleccionada de entre CHO-K1, CHO-K1SV, DUKXB11, CHO/DG44, Pro-3 y CHO-S.

9. El procedimiento descrito en cualquiera de los ítems 1 a 8, anteriormente, en el que el gen marcador seleccionable es un gen de resistencia a la cicloheximida.

60 10. El procedimiento descrito en el ítem 9, anteriormente, en el que el gen de resistencia a la cicloheximida es un gen codificante de un mutante de la proteína ribosómica humana L36.

65 11. El procedimiento descrito en cualquiera de los ítems 1 a 10, anteriormente, en el que el anticuerpo es un anticuerpo que reconoce un antígeno de tipo tumoral, un antígeno relacionado con una alergia o inflamación, un antígeno relacionado con una enfermedad cardiovascular, un antígeno que se relaciona con una enfermedad autoinmunitaria o un antígeno que relaciona con una infección bacteriana.

12. Una célula de CHO en suspensión que presenta un cromosoma en el que se ha integrado:

- 5 (a) un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y que presenta un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y que presenta un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un fragmento génico que comprende un gen marcador seleccionable y que presenta un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, o
- 10 (b) un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y que presenta un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y que presenta un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, o
- 15 (c) un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y que presenta un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y que presenta un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico,
- 20

25 en el que cada par de secuencias de transposón son secuencias de nucleótidos de Tol1 o secuencias de nucleótidos de Tol2 y que produce el anticuerpo y es capaz de sobrevivir y proliferar en un medio libre de suero.

13. La célula de CHO indicada en el ítem 12, anteriormente, en la que la célula de CHO en suspensión es una célula de CHO adaptada para el cultivo en suspensión.
- 30 14. La célula de CHO indicada en cualquiera de los ítems 12 y 13, anteriormente, en la que la célula de CHO es cualquier célula seleccionada de entre CHO-K1, CHO-K1SV, DUKXB11, CHO/DG44, Pro-3 y CHO-S.
15. La célula de CHO indicada en cualquiera de los ítems 12 a 14, anteriormente, en la que el gen marcador seleccionable es un gen de resistencia a la cicloheximida.
- 35 16. La célula de CHO indicada en el ítem 15, anteriormente, en la que el gen de resistencia a cicloheximida es un gen codificante de un mutante de la proteína ribosómica humana L36a.
- 40 17. La célula de CHO indicada en cualquiera de los ítems 12 a 16, anteriormente, en la que el anticuerpo es un anticuerpo que reconoce un antígeno de tipo tumoral, un antígeno relacionado con una alergia o inflamación, un antígeno relacionado con una enfermedad cardiovascular, un antígeno que se relaciona con una enfermedad autoinmunitaria o un antígeno que relaciona con una infección bacteriana.
- 45 18. La célula de CHO indicada en cualquiera de los ítems 12 a 17, anteriormente, en la que las secuencias de nucleótidos de Tol2 son la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID nº 2 y la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID nº 3.
- 50 19. La célula de CHO indicada en cualquiera de los ítems 12 a 17, anteriormente, en la que las secuencias de nucleótidos de Tol1 son la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID nº 14 y la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID nº 15.

20. Utilización en un procedimiento para producir un anticuerpo de:

- 55 (a) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, o
- 60 (b) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento
- 65

génico, o

(c) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico,

en el que cada par de secuencias de transposón son secuencias de nucleótidos de Tol1 o secuencias de nucleótidos de Tol2.

21. La utilización indicada en el ítem 20, anteriormente, en el que las secuencias de nucleótidos de Tol2 son la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID nº 2 y la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID nº 3, y

22. La utilización indicada en el ítem 20, anteriormente, en el que las secuencias de nucleótidos de Tol1 son las secuencias de nucleótidos mostrada en la SEC ID nº 14 y la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID nº 15.

### Efecto de la invención

Según el procedimiento de producción de proteínas de la invención, puede producirse eficientemente una proteína de interés mediante la utilización de una célula de mamífero en suspensión. Además, la célula de la presente invención puede utilizarse como célula de producción para producir una proteína recombinante o un polipéptido recombinante con una elevada eficacia.

### Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La figura 1 muestra una ilustración esquemática de un vector transposón para expresar un anticuerpo anti-M2 de influenza humano. Tol2-L representa un transposón Tol2 de extremo izquierdo (SEC ID nº 2), Tol2-R representa un transposón Tol2 de extremo derecho (SEC ID nº 3), CMV representa un promotor del CMV; poliA representa un sitio de poliadenilación; Hc representa un ADNc de cadena H de anticuerpo humano; Lc representa un ADNc de cadena L de anticuerpo humano y CHX-r representa un gen de resistencia a la cicloheximida.

[Figura 2] La figura 2 muestra una ilustración esquemática de un vector de expresión de anticuerpo anti-M2 de influenza humano. CMV representa un promotor del CMV; poliA representa un sitio de poliadenilación; Hc representa un ADNc de cadena H de anticuerpo humano; Lc representa un ADNc de cadena L de anticuerpo humano y CHX-r representa un gen de resistencia a cicloheximida.

[Figura 3] La figura 3 muestra una ilustración esquemática de un vector de expresión de transposasa Tol2. CAGGS representa un promotor de CAGGS; poliA representa un sitio de poliadenilación, y ADNc de TPasa representa un ADNc de la transposasa Tol2.

[Figura 4] La figura 4 muestra el resultado de examinar el nivel de expresión del anticuerpo anti-M2 de influenza humano en una suspensión de células de CHO-K1 y células de CHO-K1 adhesivas al utilizar un vector de transposón Tol2 para expresar el anticuerpo anti-M2 de influenza humano. La figura 4A representa el resultado de una suspensión de células de CHO-K1 y la figura 4B representa el resultado de células de CHO-K1 adhesivas. En ambas figuras, la ordenada muestra el nivel de producción de anticuerpo (µg/ml) y la abscisa muestra el número de clones transgénicos de cada célula.

[Figura 5] La figura 5 muestra una ilustración esquemática de un vector de transposón Tol1 para expresar el anticuerpo anti-M2 de influenza humana. Tol1-L representa un transposón Tol1 en el extremo izquierdo (SEC ID nº 14), Tol1-R representa un transposón Tol1 del extremo derecho (SEC ID nº 15); CMV representa un promotor del CMV; poliA representa un sitio de poliadenilación; Hc representa un ADNc de cadena H de anticuerpo humano; Lc representa un ADNc de cadena L de anticuerpo humano, y CHX-r representa un gen de resistencia a la cicloheximida.

[Figura 6] La figura 6 muestra una ilustración esquemática de un vector de expresión de la transposasa Tol1. CAGGS presenta un promotor CAGGS; poliA representa un sitio de poliadenilación y ADNc de TPasa representa un ADNc de la transposasa Tol1.

[Figura 7] La figura 7 muestra el resultado de examinar el nivel de expresión de un anticuerpo anti-M2 de influenza humano en una suspensión de células de CHO-K1 al utilizar un vector de transposón Tol1 para la expresión del anticuerpo anti-M2 de influenza. La ordenada muestra el nivel de producción de anticuerpos



( $\mu\text{g/ml}$ ) y la abscisa muestra el número de clones transgénicos de cada célula.

[Figura 8] La figura 8 muestra una ilustración esquemática de un vector transposón para la expresión de una cadena pesada de anticuerpo anti-CD98 humano. Tol2-L representa un transposón Tol2 de extremo izquierdo (SEC ID nº 2); Tol2-R representa un transposón Tol2 de extremo derecho (SEC ID nº 3); Pmo representa un promotor del virus de la leucemia murina de Moloney; poliA representa un sitio de poliadenilación y Hc representa un ADNc de cadena pesada de anticuerpo anti-CD98 humano (SEC ID nº 18).

[Figura 9] La figura 9 muestra una ilustración esquemática de un vector transposón para expresar cadena ligera de anticuerpo anti-CD98 humano. Tol2-L representa un transposón Tol2 de extremo izquierdo (SEC ID nº 2); Tol2-R representa un transposón Tol2 de extremo derecho (SEC ID nº 3); CMV representa un promotor del CMV; poliA representa un sitio de poliadenilación y Lc representa un ADNc de cadena ligera de anticuerpo anti-CD98 humano (SEC ID nº 21).

[Figura 10] La figura 10 muestra una ilustración esquemática de un vector transposón para la expresión de un gen de resistencia a la cicloheximida. Tol2-L representa un transposón Tol2 de extremo izquierdo (SEC ID nº 2); Tol2-R representa un transposón Tol2 de extremo derecho (SEC ID nº 3); CMV representa un promotor del CMV; poliA representa un sitio de poliadenilación y CHX-r representa un gen de resistencia a la cicloheximida (SEC ID nº 7).

[Figura 11] La figura 11 muestra el nivel de producción de anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano al introducir génicamente en una célula de CHO-K1 el vector en tándem TNF $\alpha$ -CHX o vector TNF $\alpha$ H-CHX y vector TNF $\alpha$ L. La ordenada muestra la concentración del anticuerpo ( $\mu\text{g/ml}$ ) que es producida en el medio; el gráfico de control se indica como Control y el gráfico de ensayo se indica como Exp.

[Figura 12] La figura 12 muestra el nivel de producción de anticuerpo anti-CD20 humano al introducir génicamente en una célula de CHO-K1 el vector en tándem CD20-CHX o vector CH20H-CHX y vector CD20L. La ordenada muestra la concentración del anticuerpo ( $\mu\text{g/ml}$ ) que se produce en el medio; el gráfico de control se indica como Control y el gráfico de ensayo se indica como Exp.

[Figura 13] La figura 13 muestra la estructura del vector A de expresión de anticuerpo. En la figura 13, Tol2-L representa un fragmento de ADN que comprende la secuencia de Tol2-L (SEC ID nº 2) y Tol2-R representa un fragmento de ADN que comprende la secuencia de Tol2-R (SEC ID nº 3); CMV representa un promotor del CMV; poliA representa un sitio de poliadenilación; Hc representa un gen de cadena pesada de anticuerpo de CD98; Lc representa un gen de cadena ligera de anticuerpo anti-CD98 humano; SO representa un promotor del SV40; SV representa un sitio de poliadenilación del SV40 y Neo-r representa un gen de resistencia a la neomicina.

#### Formas de realización para poner en práctica la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de una proteína de interés, que comprende introducir por lo menos un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una proteína de interés y que comprende además secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, en una célula de mamífero en suspensión; integrar el fragmento génico insertado entre un par (dos) de secuencias de transposón en un cromosoma de la célula de mamífero con el fin de obtener una célula de mamífero en suspensión que expresa dicha proteína de interés y cultivar en suspensión la célula de mamífero.

Los ejemplos del procedimiento para la producción de una proteína de interés en la presente invención (en adelante denominados procedimiento de la presente invención) comprenden un procedimiento para la producción de una proteína de interés, que comprende las etapas (A) a (C) siguientes.

(A) una etapa de introducción simultánea de los vectores de expresión (a) y (b) siguientes en una célula de mamífero en suspensión:

(a) por lo menos un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una proteína de interés y que comprende además secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico,

(b) un vector que comprende un ADN que codifica una transposasa que reconoce las secuencias de transposón y presenta actividad de transferencia de un fragmento génico insertado entre un par de secuencias de transposón al interior de un cromosoma,

(B) una etapa de expresión transitoria de la transposasa a partir del vector de expresión (b) que se introduce en la célula de mamífero en suspensión en la etapa (a) para integrar el fragmento génico insertado entre un par de las secuencias de transposón en un cromosoma de la célula de mamífero con el fin de obtener

una célula de mamífero en suspensión que expresa la proteína de interés y

(C) una etapa de cultivo en suspensión de la célula de mamífero en suspensión que expresa la proteína de interés obtenida en la etapa (B) con el fin de producir la proteína de interés.

5

Además, la presente invención se refiere a una célula de mamífero en suspensión, en la que se introduce por lo menos un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una proteína de interés y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión, con el fin de integrar el fragmento génico insertado entre el par de secuencias de transposón en el cromosoma, y que produce la proteína de interés.

10

En la presente invención, la proteína de interés es una proteína que comprende uno o más polipéptidos, y según el procedimiento de la invención, puede llevar a cabo la expresión de la proteína de interés.

15

El vector o vectores de expresión que comprenden un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una proteína de interés y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico se refiere a una o dos o más especies del vector de expresión. En particular, con el fin de expresar una proteína de interés que comprende dos o más polipéptidos, resulta necesario utilizar dos o más vectores que comprenden un fragmento génico que incluye un ADN que codifica los polipéptidos respectivos y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico.

20

Más particularmente, la proteína de interés anteriormente indicada que comprende dos o más polipéptidos es un anticuerpo. La cadena H y la cadena L del anticuerpo pueden expresarse utilizando un vector de expresión o pueden expresarse utilizando dos vectores de expresión: un vector que expresa la cadena H y un vector que expresa la cadena L, respectivamente.

25

Según el procedimiento de la presente invención, puede producirse una proteína de interés utilizando una célula de mamífero en suspensión que produce la proteína de interés, en la que un fragmento génico insertado entre un par de secuencias de transposón se integra en el cromosoma, mediante la introducción del vector de expresión que comprende un fragmento génico que incluye un ADN que codifica la proteína de interés y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico.

30

El gen marcador seleccionable que debe utilizarse como índice de inserción génica puede integrarse en el mismo vector como el vector de expresión que comprende el ADN que codifica la proteína de interés o puede integrarse en un vector diferente.

35

Es decir, por lo menos uno de los vectores de expresión que comprenden un fragmento génico que incluye un ADN que codifica una proteína de interés y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico puede utilizarse como el vector de expresión que comprende un fragmento génico que incluye un ADN que codifica una proteína de interés y un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico.

40

Adicionalmente, además del vector de expresión que comprende un fragmento génico que incluye un ADN que codifica la proteína de interés y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, puede introducirse adicionalmente en una célula de mamífero un vector de expresión que comprende un fragmento génico que incluye un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico.

45

Específicamente, entre los ejemplos del procedimiento para producir una proteína de interés de la presente invención se incluye un procedimiento que comprende las etapas (A) a (C) a continuación:

50

(A) una etapa de introducción simultánea de los vectores de expresión (a) y (b) a continuación en una célula de mamífero en suspensión:

55

(a) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una proteína de interés y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico,

60

(b) un vector que comprende un ADN que codifica una transposasa que reconoce las secuencias de transposón y que presenta actividad de transferencia del fragmento génico insertado entre un par de secuencias de transposón en un cromosoma,

65

(B) una etapa de expresión transitoria de la transposasa a partir del vector de expresión (b) que se ha introducido en la célula de mamífero en suspensión en la etapa (A) con el fin de integrar el fragmento génico insertado entre un par de secuencias de transposón en un cromosoma de la célula de mamífero y obtener una célula de mamífero en suspensión que expresa la proteína de interés, y

(C) una etapa de cultivo en suspensión de la célula de mamífero en suspensión que expresa la proteína de interés obtenida en la etapa (B) con el fin de producir la proteína de interés.

5 Además, entre los ejemplos del procedimiento para producir una proteína de interés de la presente invención se incluye un procedimiento que comprende las etapas (A) a (C) a continuación:

(A) una etapa de introducción simultánea de los vectores de expresión (a), (b) y (c), a continuación, en una célula de mamífero en suspensión:

10

(a) por lo menos un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una proteína de interés y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico,

15

(b) un vector de expresión que comprende un marcador seleccionable y un par de secuencias de transposón en ambos extremos del marcador seleccionable,

20

(c) un vector que comprende un ADN que codifica una transposasa que reconoce las secuencias de transposón y que presenta actividad de transferencia del fragmento génico insertado entre un par de las secuencias de transposón al interior de un cromosoma,

25

(B) una etapa de expresión transitoria de la transposasa a partir del vector de expresión (c) que se introduce en la célula de mamífero en suspensión en la etapa (A) para integrar el fragmento génico insertado entre un par de secuencias de transposón en un cromosoma de la célula de mamífero y obtener una célula de mamífero en suspensión que expresa la proteína de interés, y

30

(C) una etapa de cultivo en suspensión de la célula de mamífero en suspensión que expresa la proteína de interés obtenido en la etapa (B) para producir la proteína de interés.

35

La presente invención se refiere a una célula de mamífero en suspensión, en la que se introduce por lo menos un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una proteína de interés y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un marcador seleccionable y un par de secuencias de transposón en ambos extremos del marcador seleccionable, para integrar el fragmento génico y el marcador seleccionable insertado entre un par de secuencias de transposón en un cromosoma, y que produce una proteína de interés.

40

Además, la presente invención se refiere a una célula de mamífero en suspensión en la que se introduce un vector de expresión de proteína que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una proteína de interés y un marcador seleccionable, y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, a fin de integrar el fragmento génico insertado entre un par de secuencias de transposón en un cromosoma, y que produce una proteína de interés.

45

Además, entre los ejemplos de la célula de mamífero en suspensión que produce una proteína de interés de la presente invención se incluyen una célula de mamífero en suspensión en la que un vector de expresión (a) que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una proteína de interés y un gen marcador seleccionable y que comprende además secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector (b) que comprende un ADN que codifica una transposasa (una transferasa) que reconoce las secuencias de transposón y que presenta actividad de transferencia del fragmento génico insertado entre un par de las secuencias de transposón en un cromosoma para integrar el fragmento génico insertado entre un par de secuencias de transposón en el cromosoma se introducen simultáneamente y producen la proteína de interés.

50

Según la presente invención, el número de vectores de expresión que comprende un fragmento génico que incluye un ADN que codifica la proteína de interés y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, que debe introducirse en una célula de mamífero en suspensión, no se encuentra particularmente limitado con la condición de que la expresión y producción de la proteína de interés puedan ser llevadas a cabo por la célula de mamífero, y entre los ejemplos se incluye preferentemente 1 a 20 especies de vectores de expresión, más preferentemente pueden indicarse 2 a 10 especies de vectores de expresión y, por ejemplo, resultan preferentes 3 a 8 especies de vectores de expresión, 4 a 7 especies de vectores de expresión, 1 a 6 especies de vectores de expresión, 1 a 5 especies de vectores de expresión, 1 a 4 especies de vectores de expresión y 1 a 3 especies de vectores de expresión.

55

Además, entre los ejemplos de la puesta en práctica de la presente invención se incluye un procedimiento para incrementar la integración de un fragmento génico insertado entre un par de secuencias de transposón en un cromosoma de la célula de mamífero, mediante la introducción simultánea en la célula de mamífero en suspensión de por lo menos uno de entre (a) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una proteína de interés y que comprende además un par de secuencias de

60

transposón en ambos extremos del fragmento génico y (b) un vector que comprende un ADN que codifica una transposasa capaz de reconocer las secuencias de transposón y que presenta la actividad de introducir el fragmento génico insertado entre el par de secuencias de transposón en un cromosoma, un procedimiento para integrar un ADN que codifica una proteína de interés en un cromosoma de la célula de mamífero a una frecuencia elevada y una célula de mamífero en suspensión que se obtiene mediante dichos procedimientos y que puede producir una proteína de interés.

El término "transposón" en la presente memoria es un elemento genético transponible y se refiere a una unidad génica que se desplaza dentro de un cromosoma o de un cromosoma a otro cromosoma (transposición) manteniendo simultáneamente una determinada estructura.

El transposón comprende secuencias de transposón repetitivas (también denominadas secuencias repetidas invertidas (secuencias RI) o secuencias repetidas invertidas terminales (secuencias RIT)) que se sitúa en la misma dirección o en dirección inversa en ambos extremos de una unidad génica y una secuencia de nucleótidos codificante de una transposasa que reconoce la secuencia de transposón para introducir un gen existente entre las secuencias de transposón.

La transposasa traducida a partir del transposón puede introducir un ADN mediante el reconocimiento de secuencias de transposón de ambos extremos del transposón, extrayendo el fragmento de ADN insertado entre un par de secuencias de transposón e insertando el fragmento en el sitio en que debe introducirse.

La expresión "secuencia de transposón" en la presente memoria se refiere a la secuencia de nucleótidos de un transposón reconocido por una transposasa y que presenta el mismo significado que la secuencia RI o la secuencia RIT. Un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos puede comprender una fracción repetida imperfecta con la condición de que pueda introducirse (insertarse en otra posición del genoma) mediante la actividad de una transposasa y exista una secuencia de transposón específica de una transposasa.

Como secuencia de transposón que debe utilizarse en la invención, se utiliza una secuencia de nucleótidos derivada de un par de transposones de tipo ADN naturales o artificiales que pueden ser reconocidos por una transposasa y transponerse en células de mamífero.

Las secuencias de nucleótidos derivadas de un transposón de tipo ADN son las secuencias de nucleótidos de Tol1 o las secuencias de nucleótidos de Tol2 derivadas del pez medaka.

En particular, entre ellos, las secuencias de nucleótidos derivadas del transposón Tol2 derivado del pez medaka que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 6 y el transposón Tol2 derivada del pez medaka que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 13 resultan preferidas.

Entre los ejemplos de la secuencia de nucleótidos derivada de un par de transposones Tol2 se incluyen la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1 y 2.229 y la secuencia de nucleótidos en las posiciones 4.148 a 4.682 en la secuencia de nucleótidos del transposón Tol2 mostrada en la SEC ID nº 6 del Listado de secuencias.

Como secuencia de nucleótidos derivada de un par de transposones Tol2, la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 200 (SEC ID nº 2) (en adelante denominada "secuencia Tol2-L") y la secuencia de nucleótidos en las posiciones 2.285 a 2.788 (SEC ID nº 3) (en adelante denominada "secuencia Tol2-R") de la secuencia de nucleótidos del transposón Tol2 mostrada en la SEC ID nº 1 del Listado de secuencias resultan más preferentes.

Como secuencia de transposón derivada de un par de transposones Tol1, entre los ejemplos se incluye la secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 157 y la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1.748 a 1.855 en la secuencia de nucleótidos del transposón Tol1 mostrada en la SEC ID nº 13 del Listado de secuencias.

Como secuencia de transposón derivada de un par de transposones Tol1, la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 200 (SEC ID nº 14) (en adelante denominada "secuencia Tol1-L") y la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1.351 a 1.855 (SEC ID nº 15) (en adelante denominada "secuencia Tol1-R") de la secuencia de nucleótidos del transposón Tol1 mostrada en la SEC ID nº 13 del Listado de secuencias resultan preferentes.

Entre los ejemplos de la secuencia de transposón que debe utilizarse en la invención se incluyen secuencias de transposón en las que las reacciones de transposición se controlan mediante la utilización de una secuencia parcial de una secuencia de transposón derivada del transposón anteriormente indicado, mediante el ajuste de la longitud de la secuencia de nucleótidos y mediante la modificación de la secuencia de nucleótidos mediante adición, delección o sustitución.

Como procedimiento para producir la proteína de interés de la presente invención, entre los ejemplos se incluye además un procedimiento en el que se produce por lo menos una de las proteínas de interés utilizando por lo menos dos secuencias de transposón y por lo menos dos transposasas.

Específicamente, entre los ejemplos se incluye un procedimiento de producción de proteínas que comprende las etapas de introducir un vector que comprende un ADN que codifica una primera proteína de interés insertada entre dos secuencias de transposón Tol1, un vector que comprende un ADN que codifica una segunda proteína de interés insertada entre dos secuencias de transposón Tol2, un vector de expresión de transposasa Tol1 y un vector de expresión de transposasa Tol2, simultáneamente o en orden dentro del cromosoma de la célula de mamífero, obteniendo de esta manera una célula de mamífero que produce las dos proteínas de interés.

Además, la primera proteína de interés y la segunda proteína de interés pueden ser iguales y la productividad de la proteína de interés también puede mejorarse mediante el incremento del número de copias del gen que debe introducirse en la célula.

Con respecto al control de la reacción de transposición de un transposón, la reacción de transposición puede acelerarse o suprimirse mediante la aceleración o supresión del reconocimiento de la secuencia de transposón por una transposasa, respectivamente. Además, con respecto a la reacción de transposición del transposón, la reacción de transposición puede potenciarse mediante acortamiento de la longitud de la secuencia de nucleótidos insertada entre un par (dos) de las secuencias de transposón y la reacción de transposición puede reducirse mediante el alargamiento de la longitud. Por lo tanto, en el caso de que se exprese y se prepare una proteína de interés que comprenda una pluralidad de proteínas, las proteínas de interés pueden prepararse mediante la inserción de ADN que codifica cada proteína en un vector de expresión diferente, integrando el ADN en el cromosoma de la célula hospedadora y preparando una célula de mamífero en suspensión que sea capaz de preparar la proteína de interés con el fin de producir la proteína de interés mediante la utilización de la célula.

El término "transposasa" en la presente memoria se refiere a un enzima que reconoce secuencias de nucleótidos que presentan secuencias de transposón y que transfieren un fragmento génico existente entre las secuencias de nucleótidos en un cromosoma o de un cromosoma a otro cromosoma.

Entre los ejemplos de la transposasa se incluyen los enzimas derivados de Tol1 y Tol2, los cuales se derivan del pez medaka, Sleeping Beauty (SB) reconstruido a partir de un transposón no autónomo existente en el genoma de un pez *Onchorhynchus*, Sleeping Beauty 11 (SB11), el transposón artificial Frog Prince (FP), que se deriva de la rana, y el transposón PiggyBac (PB), que se deriva de un insecto.

Como transposasa, puede utilizarse un enzima nativo y puede utilizarse cualquier transposasa en la que se haya sustituido, eliminado, insertado y/o añadido una parte de sus aminoácidos, con la condición de que se mantenga la misma actividad de transposición que la transposasa. Mediante el control de la actividad enzimática de la transposasa puede controlarse la reacción de transposición del ADN existente entre las secuencias del transposón.

Con el fin de analizar si presenta o no una actividad de transposición similar a la de la transposasa, puede medirse mediante el sistema de análisis de 2 componentes dado a conocer en la solicitud publicada de patente japonesa no examinada nº 235575/2003.

En particular, si un elemento Tol2 no autónomo puede transferirse e insertarse en un cromosoma de la célula de mamífero o no mediante la actividad de una transposasa puede analizarse mediante la utilización separada de un plásmido que comprende un transposón Tol2 con eliminación de transposasa Tol2 (transposón no autónomo derivado de Tol2) y un plásmido que comprende la transposasa Tol2.

La expresión "transposón no autónomo" en la presente memoria se refiere a un transposón que ha perdido una transposasa existente dentro del transposón y, por lo tanto, no puede llevarse a cabo su transposición autónoma. El transposón no autónomo puede transferir el ADN insertado entre las secuencias de transposón desde el transposón no autónomo hasta el interior del cromosoma de la célula hospedadora, al permitir que una proteína transposasa, un ARNm codificante de la proteína transposasa o un ADN que codifica la proteína transposasa, se encuentren presentes simultáneamente en la célula.

El gen de transposasa se refiere a un gen codificante de una transposasa. Con el fin de mejorar su eficiencia de expresión en una célula de mamífero, una secuencia que ajusta un espacio entre la secuencia de consenso de Kozak (Kozak M., *Nucleic Acids Res.* 12:857-872, 1984) o una secuencia de unión a ribosoma, una secuencia de Shine-Dalgarno y el codón de inicio, a una distancia apropiada (por ejemplo entre 6 y 18 bases) puede conectarse a un sitio cadena arriba del codón de inicio de traducción ATG del gen.

Según el procedimiento de la invención, con el fin de integrar un fragmento génico que comprende un ADN que codifica la proteína de interés en por lo menos un vector de expresión en el cromosoma de una célula hospedadora, un vector de expresión que comprende el fragmento génico que comprende un ADN que codifica la proteína de interés y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico se introduce en la célula hospedadora, y se permite la acción de una transposasa sobre las secuencias de transposón comprendidas en el vector de expresión que se ha introducido en la célula.

- 5 Con el fin de permitir que actúe una transposasa sobre las secuencias de transposón comprendidas en el vector de expresión que se ha introducido en la célula, la transposasa puede ser inyectada en la célula, o puede introducirse un vector de expresión que comprende un ADN que codifica por lo menos una proteína de interés o un ADN que codifica una proteína de interés, en la célula hospedadora junto con un vector de expresión que comprende un ADN que codifica la proteína de interés y un gen marcador seleccionable. Además, mediante la introducción de un ARN codificante de un gen de transposasa en la célula hospedadora puede expresarse la transposasa en la célula.
- 10 El vector de expresión no se encuentra particularmente limitado. Puede utilizarse cualquier vector de expresión mediante la selección opcional de entre los vectores de expresión conocidos por el experto en la materia, dependiendo de la célula hospedadora en la que se introduce un vector de expresión que comprende un gen de transposasa, y similares.
- 15 En el caso de que se produzca mediante el procedimiento de la invención una proteína de interés que comprende dos o más polipéptidos o dos o más proteínas de interés, puede prepararse una célula productora de proteína en la que se integra un ADN que codifica cada proteína en un cromosoma de la célula hospedadora, mediante la inserción del ADN que codifica cada proteína en el mismo vector de expresión o insertando el ADN en vectores de expresión diferentes respectivos e introduciendo los vectores de expresión en una célula hospedadora.
- 20 La transposasa puede insertarse en un vector de expresión para expresarse junto con la proteína de interés o puede insertarse en un vector diferente del vector de expresión. La transposasa puede dejarse que actúe transitoriamente o puede dejarse actuar continuamente, aunque preferentemente se deja que la transposasa actúe transitoriamente con el fin de preparar la célula para la producción estable.
- 25 Como procedimiento para permitir que la transposasa actúe transitoriamente, entre los ejemplos se incluyen un procedimiento que comprende preparar un vector de expresión que comprende un ADN que codifica la transposasa y un vector de expresión que comprende un ADN que codifica una proteína de interés, seguido de la introducción de ambos plásmidos de expresión simultáneamente en la célula hospedadora.
- 30 La expresión "vector de expresión" en la presente memoria se refiere a un vector de expresión para la utilización en la introducción en una célula de mamífero y la expresión de una proteína de interés. El vector de expresión utilizado en la invención presenta una estructura en la que se encuentra presente por lo menos un par de secuencias de transposón en ambos lados de un casete de expresión.
- 35 La expresión "casete de expresión" en la presente memoria se refiere a una secuencia de nucleótidos que presenta una región de control de la expresión génica necesaria para expresar una proteína de interés y una secuencia codificante de la proteína de interés. Entre los ejemplos de la región de control de la expresión génica se incluyen un intensificador, un promotor y un terminador. El casete de expresión puede incluir un gen marcador seleccionable.
- 40 Puede utilizarse cualquier promotor, con la condición de que pueda funcionar en una célula animal. Entre los ejemplos se incluyen un promotor de gen TI (temprano inmediato) del citomegalovirus (CMV), el promotor temprano de SV40, un promotor de retrovirus, un promotor metalotioneína, un promotor de choque térmico, el promotor SR $\alpha$ , el virus de la leucemia murina de Moloney, un intensificador y similares. Además, puede utilizarse el intensificador del gen TI del CMV humano junto con el promotor.
- 45 El "gen marcador seleccionable" se refiere a otro gen marcador opcional que puede utilizarse para distinguir una célula en la que se ha introducido un vector plásmido respecto de una célula que no presenta el vector.
- 50 Entre los ejemplos del gen marcador seleccionable se incluyen un gen de resistencia a fármaco (un gen de resistencia a la neomicina, un gen de dihidrofolato reductasa (DHFR), un gen de resistencia a la puomicina, un gen de resistencia a la blasticidina, un gen de resistencia a la zeocina, un gen de resistencia a la higromicina y un gen de resistencia a la cicloheximida (solicitud publicada de patente japonesa no examinada n° 262879/2002), genes marcadores de fluorescencia y bioluminiscencia (tales como la proteína fluorescente verde, PFV) y similares.
- 55 En la invención, el marcador seleccionable preferente es un gen de resistencia a fármaco y un marcador seleccionable particularmente preferente es un gen de resistencia a la cicloheximida. Además, la propiedad de resistencia a fármaco y la propiedad de luminiscencia de la proteína marcadora seleccionable también pueden modificarse mediante la preparación de una variante con aminoácidos modificados mediante la modificación genética del gen marcador seleccionable o mediante el control de la transcripción o traducción del gen marcador seleccionable (por ejemplo, la modificación de un promotor, la modificación de un codón de aminoácidos y similares). Además, también puede seleccionarse células en las que se ha introducido un gen marcador seleccionable que presentan diferentes niveles de resistencia a fármaco mediante el ajuste de la concentración
- 60
- 65

del fármaco.

Para el control de la propiedad de resistencia a fármaco y la propiedad de luminiscencia de la proteína marcadora seleccionable, resulta preferente utilizar un gen marcador seleccionable atenuado. El gen marcador seleccionable atenuado es un gen marcador seleccionable que se modifica de manera que se reduce la actividad de la proteína codificada por el gen marcador seleccionable dentro de la célula.

Entre los ejemplos del gen marcador seleccionable que se modifica de manera que la actividad en la célula sea baja se incluyen: (A) un gen marcador seleccionable en el que se modifica la secuencia de aminoácidos de una proteína codificada por un gen marcador seleccionable de manera que se reduce la actividad de la proteína en la célula, y (B) un gen marcador seleccionable en el que se modifica una secuencia de nucleótidos que controla la expresión del gen marcador seleccionable o se modifica una secuencia de nucleótidos dentro del ORF (marco de lectura abierto, por el inglés 'Open Reading Frame') de manera que se reduce la expresión del gen marcador seleccionable.

Entre los ejemplos del gen marcador seleccionable en el que se ha modificado la secuencia de aminoácidos de una proteína codificada por el gen marcador seleccionable de manera que la actividad de la proteína en la célula se haya reducido se incluyen el gen de resistencia a la neomicina descrito por Sauter et al. [Biotech. Bioeng. 89:530-538, 2005] o Chen et al. [Journal of Immunological Methods 295:49-56, 2004].

Entre los ejemplos del procedimiento para reducir el nivel de expresión de una proteína en la célula mediante la modificación de una secuencia de nucleótidos que controla la expresión del gen marcador seleccionable se incluyen un procedimiento para modificar la secuencia del promotor, la secuencia de terminador, la secuencia de intensificador, la secuencia de consenso de Kozak o la secuencia de Shine-Dalgarno, que controla la expresión del gen marcador seleccionable. Más específicamente entre los ejemplos se incluye un procedimiento en el que una secuencia de promotor que controla la expresión de un gen marcador seleccionable es sustituida por una secuencia de promotor más débil.

Entre los ejemplos del procedimiento para reducir el nivel de expresión de la proteína en la célula mediante la modificación de una secuencia de nucleótidos en el ORF de un gen marcador seleccionable se incluyen un procedimiento en el que un codón en el ORF es sustituido por un codón sinónimo que presenta una frecuencia todavía más baja de uso de codones en la célula.

Entre los ejemplos del gen marcador seleccionable atenuado de la invención se incluyen un marcador seleccionable en el que el codón anteriormente indicado en el ORF del gen es sustituido por un codón sinónimo que presenta una frecuencia todavía más baja de uso de codones en la célula.

En las células de diversas especies biológicas, el codón sinónimo que presenta una frecuencia todavía más baja de uso entre cada codón sinónimo puede seleccionarse basándose en la literatura y bases de datos conocidos y similares.

Entre los ejemplos de dicha sustitución por un codón sinónimo que presenta una frecuencia más baja de uso, específicamente en el caso de una célula HO, se incluyen la sustitución del codón de la leucina por TTA, la sustitución del codón de la arginina por CGA o CGT, la sustitución del codón de la alanina por GCG, la sustitución del codón de la valina por GTA, la sustitución del codón de la serina por TCG, la sustitución del codón de la isoleucina por ATA, la sustitución del codón de la treonina por ACG, la sustitución del codón de la prolina por CCG, la sustitución del codón del ácido glutámico por GAA, la sustitución del codón de la tirosina por TAT, la sustitución del codón de la lisina por AAA, la sustitución del codón de la fenilalanina por TTT, la sustitución del codón de la histidina por CAT, la sustitución del codón de la glutamina por CAA, la sustitución del codón de la asparagina por AAT, la sustitución del codón del ácido aspártico por GAT, la sustitución del codón de la cisteína por TGT y la sustitución del codón de la glicina por GGT.

En un gen marcador seleccionable atenuado, el número de codones que debe introducirse en comparación con el gen marcador seleccionable antes de la modificación no se encuentra particularmente limitado, con la condición de que pueda obtenerse eficientemente una célula productora de proteínas, aunque resulta preferente sustituir los codones correspondientes a 20 o más residuos aminoácidos.

En un gen marcador seleccionable atenuado, el número de bases que debe modificarse en comparación con el gen marcador seleccionable antes de la modificación no se encuentra particularmente limitado, aunque resulta preferente modificar 10% o más de la secuencia de nucleótidos codificante del gen marcador seleccionable.

Además, en un gen marcador seleccionable atenuado, los residuos aminoácidos codificados por los codones que deben sustituirse no se encuentran particularmente limitados, aunque entre los ejemplos preferentes se incluyen leucina, alanina, serina y valina.

En el caso de un gen marcador seleccionable atenuado los codones correspondientes a la leucina son

sustituídos sin particular limitación, aunque resulta preferente sustituir los codones que corresponden a 70% o más de los residuos de leucina de los codones respecto al total de residuos de leucina contenidos en el gen marcador seleccionable.

5 Además, en el caso de un gen marcador seleccionable atenuado en el que se sustituyan los codones que corresponden a alanina sin particular limitación, resulta preferente sustituir los codones que corresponden a 70% o más de los residuos de alanina de los codones respecto al total de residuos de alanina contenidos en el gen marcador seleccionable.

10 Entre los ejemplos específicos del gen marcador seleccionable atenuado obtenido mediante dicha modificación en la que se sustituyen codones por codones sinónimos con una frecuencia más baja de uso se incluyen un gen de resistencia a la neomicina que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 37, 38 o 39, un gen de resistencia a puromicina que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 41, 43 o 44, un gen de resistencia a zeocina que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 45 o 46 y un gen de resistencia a higromicina que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 47 o 48.

Además, resulta posible atenuar un gen marcador seleccionable también mediante el incremento considerable de la concentración de un fármaco en comparación con la concentración utilizada convencionalmente al seleccionar una célula resistencia al fármaco en la preparación de una célula productora de anticuerpos o mediante la realización de una administración adicional antes de que el gen de resistencia a fármaco metabolice y degrade el fármaco.

25 La cicloheximida (en adelante en ocasiones denominada CHX) es un inhibidor de la síntesis de proteínas y entre los ejemplos de utilización de un gen de resistencia a CHX como gen marcador seleccionable se incluyen casos conocidos de levadura [Kondo K., J. Bacteriol. 177(24):7171-7177, 1995] y células animales (documento nº JP-A-2002-262879).

30 En el caso de las células animales, se ha revelado que un transformante que expresa una proteína codificada por la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 7 del LISTADO DE SECUENCIAS en la que la prolina en la posición 54 de la subunidad L36a de la proteína ribosómica humana codificada por la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 5 del LISTADO DE SECUENCIAS es sustituida por glutamina, proporciona resistencia a la cicloheximida. Además, entre los ejemplos del marcador de resistencia a la cicloheximida se incluye la subunidad L44 de la proteína ribosómica humana mutante en la que la prolina en la posición 54 de la subunidad L44 de la proteína ribosómica humana es sustituida por glutamina.

El procedimiento para introducir el vector de expresión de proteínas anteriormente indicado que comprende una secuencia de transposón, una secuencia de transposón, un vector plásmido para expresar una transposasa o ARN no se encuentra particularmente limitado. Entre los ejemplos se incluyen la transfección con fosfato de calcio, la electroporación, un procedimiento de liposomas, un procedimiento de pistola génica, la lipofección y similares.

45 Entre los ejemplos del procedimiento para introducir directamente una transposasa en forma de una proteína se incluyen una técnica de microinyección o suministro a una célula mediante endocitosis. La introducción génica puede llevarse a cabo mediante el procedimiento descrito en Shin Idenshi Kogaku Handbook (New Genetic Engineering Handbook), editado por Masami Muramatsu y Tadashi Yamamoto, publicado por Yodo-sha, ISBN 9784897063737.

50 La célula hospedadora es una célula de mamífero en suspensión. La célula de mamífero es una célula de CHO, ovárica de hámster chino (Journal of Experimental Medicine 108, 945, 1958; Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 60:1275, 1968; Genetics 55:513, 1968; Chromosoma 41:129, 1973; Methods in Cell Science 18:115, 1996; Radiation Research 148:260, 1997; Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77:4216, 1980; Proc. Natl. Acad. Sci. 60:1275, 1968; Cell 6:121, 1975; Molecular Cell Genetics, apéndices I y II (páginas 883 a 900)). Entre los ejemplos de las células de CHO en suspensión se incluyen CHO/DG44, CHO-K1 (ATCC nº CCL-61), DUKXB11 (ATCC nº CCL-9096), Pro-5 (ATCC nº CCL-1781), CHO-S (Life Technologies, nº de cat. 11619), Pro-3 y la línea celular subclonal de las células de CHO.

60 Adicionalmente, la célula hospedadora anteriormente indicada también puede utilizarse en el procedimiento de producción de proteínas de la invención mediante la modificación de la célula de manera que resulte adecuada para la producción de proteínas, debido a la modificación del ADN cromosómico, la introducción de un gen exógeno y similares.

Además, con el fin de controlar la estructura de la cadena sacárida unida a la proteína de interés que debe producirse, también pueden utilizarse como célula hospedadora, Lec13 con resistencia adquirida a lectina [Somatic Cell and Molecular Genetics 12:55, 1986] y una célula de CHO de la que se ha delecionado el gen de  $\alpha$ 1,6-fucosiltransferasa (documentos nº WO2005/35586 y nº WO2002/31140), una célula deficiente en GDP-



manosa 4,6-deshidratasa (GDM) y una célula deficiente en proteína Fx.

En la presente invención, la proteína de interés es una proteína compleja que consiste en dos o más polipéptidos. Además, proteína y polipéptido son sinónimos en la invención pero una molécula de proteína con un peso molecular relativamente bajo o una proteína que constituye una proteína compleja puede definirse en ocasiones como un polipéptido.

La proteína de interés en la invención es un anticuerpo. En particular, entre los ejemplos de la proteína de interés se incluyen un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal.

El anticuerpo es una molécula que comprende un polipéptido cadena pesada (cadena H) de anticuerpo y dos polipéptidos cadena ligera (cadena L) de anticuerpo, y como subclase se conocen las subclases IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Además, IgG se clasifica en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

El anticuerpo IgG es una molécula heterotetramérica que consiste en dos polipéptidos cadena H y dos polipéptidos cadena L. Cada una de las cadenas H y de las cadenas L consiste en una región variable (V) que se relaciona con la unión de antígenos y una región constante (C), y cada una de ellas se denomina VH, CH, VL o CL, respectivamente. La región CH se clasifica adicionalmente en regiones CH1, CH2 y CH3, y las regiones CH2 y CH3 se denominan, en combinación, región Fc o simplemente Fc.

El anticuerpo incluye un anticuerpo monoclonal que reacciona con un único epítipo, un anticuerpo policlonal que reacciona con dos o más epítopos y un anticuerpo recombinante.

El anticuerpo monoclonal es un anticuerpo que es secretado por células productoras de anticuerpos de un solo clon y reconoce únicamente un epítipo (también denominado determinante antigénico) y la secuencia de aminoácidos (la estructura primaria) que constituye un anticuerpo monoclonal es uniforme.

El anticuerpo policlonal es una mezcla de anticuerpos monoclonales y puede reaccionar con dos o más epítopos.

Entre los ejemplos del anticuerpo recombinante se incluyen un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, una proteína de fusión de Fc, un anticuerpo con modificación de aminoácidos de Fc y un anticuerpo multivalente y un fragmento parcial de los mismos. Un anticuerpo con modificación de aminoácidos puede presentar una modificación de aminoácido en una región variable o en una región constante y la actividad del anticuerpo se encuentra controlada.

El anticuerpo multivalente incluye un anticuerpo multivalente que reacciona con dos o más epítopos diferentes en un antígeno, un anticuerpo multivalente que reacciona con dos o más antígenos diferentes, y similares, pero puede incluir cualquier anticuerpo multivalente. Además, el anticuerpo multivalente puede ser cualquier anticuerpo multivalente que presente cualquier estructura con la condición de que conserve la actividad de unión al antígeno (documentos nº WO2001/77342, patente nº US 7.612.181 y documento nº WO2009/131239).

Según el procedimiento de producción de la presente invención, puede expresarse y producirse cualquiera de entre la proteína de interés y/o el péptido de interés anteriormente indicados.

Entre los ejemplos de la célula en la que se introduce un ADN que codifica por lo menos una proteína de interés de la presente invención se incluye una célula productora de anticuerpos preparada mediante las etapas (A) y (B) a continuación.

En la etapa (A) se introducen simultáneamente una combinación de vector de expresión seleccionado de entre (a) a (c) a continuación o vector de expresión (d) y vector de expresión (e) en una célula de mamífero en suspensión:

(a) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico,

(b) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico,

- (c) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, y
- (d) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H y una cadena L de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico,
- (e) un vector que comprende un ADN que codifica una transposasa que reconoce las secuencias de transposón y presenta actividad de transferencia de un fragmento génico insertado entre el par de secuencias de transposón al interior de un cromosoma, y

la Etapa (B), en la que se selecciona una célula de mamífero en suspensión que expresa un anticuerpo en la que los genes de la cadena H, cadena L y marcador seleccionable anteriormente indicados que se han insertado entre un par de secuencias de transposón, se integran en un cromosoma de la célula de mamífero anteriormente indicada mediante la expresión transitoria de la transposasa del vector de expresión (e) que se ha introducido en la célula de mamífero en suspensión en la etapa (A).

Entre los ejemplos del procedimiento para producir un anticuerpo de la presente invención se incluye un procedimiento para producir una proteína de interés, que comprende las etapas (A) a (C) a continuación.

En la etapa (A) se introducen simultáneamente una combinación de vector de expresión seleccionado de entre (a) a (c), a continuación, o vector de expresión (d) y vector de expresión (e), en una célula de mamífero en suspensión:

- (a) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y que además comprende un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico,
- (b) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico,
- (c) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, y
- (d) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H y una cadena L de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico,
- (e) un vector que comprende un ADN que codifica una transposasa que reconoce las secuencias de transposón y presenta actividad de transferencia de un fragmento génico insertado entre un par de secuencias de transposición al interior de un cromosoma,

En la etapa (B) se obtiene una célula de mamífero en suspensión que expresa un anticuerpo en el que los genes de la cadena H, cadena L y marcador seleccionable anteriormente indicados que han sido insertados entre un par de secuencias de transposón se integran en un cromosoma de la célula de mamífero anteriormente indicada mediante la expresión transitoria de la transposasa a partir del vector de expresión (e) que ha sido introducido en la célula de mamífero en suspensión en la etapa (A), y

en la etapa C, se produce el anticuerpo mediante el cultivo en suspensión de una célula de mamífero obtenida en la etapa (B), que expresa un anticuerpo.

Además, la presente invención incluye un procedimiento para producir una línea celular que presenta una elevada productividad de anticuerpos y un procedimiento para el cribado de la línea celular que comprende las etapas (A) y (B) a continuación.

En la etapa (A), se introduce simultáneamente una combinación de vector de expresión seleccionado de entre (a) a (c), a continuación, o vector de expresión (d) y vector de expresión (e) en una célula de mamífero en suspensión:

- 5 (a) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un AND codificante de una cadena L de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico,
- 10
- 15 (b) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico,
- 20 (c) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, y
- 25 (d) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H y una cadena L de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico,
- 30 (e) un vector que comprende un ADN que codifica una transposasa que reconoce las secuencias de transposón y presenta actividad de transferencia de un fragmento génico insertado entre un par de secuencias de transposón al interior de un cromosoma, y

en la etapa (B), se selecciona una célula de mamífero en suspensión de expresión elevada de un anticuerpo en la que los genes de la cadena H, cadena L y marcador seleccionable anteriormente indicados que están insertados entre un par de secuencias de transposón, se integran en un cromosoma de la célula de mamífero anteriormente indicada mediante la expresión transitoria de la transposasa a partir del vector de expresión (e) que ha introducido en la célula de mamífero en suspensión en la etapa (A).

Además, la presente invención incluye un procedimiento para producir un anticuerpo que comprende las etapas (A), (B) y (C) a continuación.

En la etapa (A) se introduce simultáneamente una combinación de vector de expresión seleccionado de entre (a) a (c) a continuación o vector de expresión (d) y vector de expresión (e) en una célula de mamífero en suspensión:

- 45 (a) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico,
- 50
- 55 (b) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico,
- 60 (c) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, y
- 65 (d) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una

cadena H y una cadena L de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y que comprende además un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico,

- 5 (e) un vector que comprende un ADN que codifica una transposasa que reconoce las secuencias de transposón y presenta actividad de transferencia de un fragmento génico insertado entre un par de secuencias de transposición al interior de un cromosoma,

10 en la etapa (B), se obtiene una célula de mamífero en suspensión que expresa un anticuerpo en el que los genes de la cadena H, la cadena L y el marcador seleccionable anteriormente indicados que han sido insertados entre un par de secuencias de transposón, se insertan en un cromosoma de la célula de mamífero anteriormente indicada mediante la expresión transitoria de la transposasa a partir del vector de expresión (e) que ha sido introducido en la célula de mamífero en suspensión en la etapa (A), y

15 en la etapa (C) se produce el anticuerpo mediante el cultivo en suspensión de una célula de mamífero en suspensión obtenida en la etapa (B) que expresa un anticuerpo.

20 Entre los ejemplos de la célula de mamífero en la que se ha introducido un ADN que codifica por lo menos una proteína de interés de la presente invención se incluye una célula productora de anticuerpos policlonales en la que se han introducido varios genes de anticuerpo diferentes, una célula productora de una molécula de complejo y similares.

25 Entre los ejemplos de una célula productora de anticuerpos policlonales se incluye una célula en la que se han introducido por lo menos dos o más genes de anticuerpo monoclonal diferentes, una célula en la que se han introducido genes de varios anticuerpos monoclonales contra varios antígenos, una célula que ha sido inmunizada con un antígeno y en la que se ha introducido una biblioteca génica de un anticuerpo no humano, una célula en la que se ha introducido una biblioteca génica de un anticuerpo derivado de un paciente, y similares.

30 La célula productora de una molécula compleja puede ser cualquier célula con la condición de que se hayan introducido los ADN codificantes de las proteínas respectivas que se coexpresan en una célula para formar una molécula compleja. Entre los ejemplos específicos se incluyen una célula cotransfectada con FcγRIII (CD16) y cadena γ común, una célula en la que se coexpresan el receptor de Fc neonatal (FcRn) y la macroglobulina β<sub>2</sub>, una célula cotransfectada con CD98 y LAT1 (documento n° WO2007/114496) y similares.

35 El anticuerpo que se produce mediante el procedimiento de producción de anticuerpos de la presente invención puede ser cualquier anticuerpo y entre los ejemplos se incluye un anticuerpo que reconoce un antígeno de tipo tumoral, un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con una alergia o inflamación, un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con una enfermedad cardiovascular, un anticuerpo que reconoce un antígeno que se relaciona con enfermedades autoinmunitarias, un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con la infección vírica o bacteriana y similares.

40 Entre los ejemplos del antígeno de tipo tumoral se incluyen CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD9, CD10, CD13, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD28, CD30, CD32, CD33, CD38, CD40, ligando de CD40 (CD40L), CD44, CD45, CD46, CD47, CD52, CD54, CD55, CD55, CD59, CD63, CD64, CD66b, CD69, CD70, CD74, CD80, CD89, CD95, CD98, CD105, CD134, CD137, CD138, CD147, CD158, CD160, CD162, CD164, CD200, CD227, adrenomedulina, proteína 4 de tipo angiopoyetina (ARP4), aurora, B7-H1, B7-DC, integrina, antígeno 2 del estroma de la médula ósea (BST2), CA125, CA19.9, anhídrido carbónico 9 (CA9), cadherina, receptor de quimiocina cc (CCR) 4, CCR7, antígeno carcinoembrionario (CEA), receptor 1 del factor de crecimiento fibroblástico rico en cisteína (CFR-1), c-Met, c-Myc, colágeno, CTA, factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), CTLA-4, citoqueratina-18, DF3, E-cadherina, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), EGFRvIII, EGFR2 (HER2), EGFR3 (HER3), EGFR4 (HER4), endoglina, molécula de adhesión de las células epiteliales (EpCAM), receptor endotelial de la proteína C (EPCR), efrina, receptor de la efrina (Eph), EphA2, endoteliasa-2 (ET2), FAM3D, proteína activadora de los fibroblastos (FAP), homólogo 1 de receptor de Fc (FcRH1), ferritina, factor-8 de crecimiento fibroblástico (FGF-8), receptor del FGF8, FGF básico (bFGF), receptor de bFGF, receptor de FGF (FGFR) 3, FGFR4, FLT1, FLT3, receptor de folato, homólogo 10 de Frizzled (FZD10), receptor 4 de Frizzled (FZD-4), G250, receptor de G-CSF, gangliósido (tal como GD2, GD3, GM2 y GM3), globo H, gp75, gp88, GPR-9-6, heparanasa I, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), receptor de HGF, antígeno HLA (tal como HLA-DR), HM1.24, glóbulo de grasa láctea humana (HMFG), hRS7, proteína 90 de choque térmico (hsp90), epítipo idiotipo, factor de crecimiento similar a insulina (IGF), receptor de IGF (IGFR), interleucina (tal como IL-6 e IL-15), receptor de interleucina (tal como IL-6R e IL-15R), integrina, receptor inmunológico 4 asociado a la traslocación (IRTA-4), caliceína 1, KDR, KIR2DL1, KIR2DL2/3, KS1/4, lamp-1, lamp-2, laminina-5, Lewis y, sialil-Lewis x, receptor de linfotoxina-beta (LTBR), LUNX, proteoglicano condroitín-sulfato asociado al melanoma (MCSP), mesotelina, MICA, receptor de tipo II de la sustancia inhibidora mulleriana (MISIIR), mucina, molécula de adhesión de células neurales (NCAM), Necl-5, Notch1, osteopontina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), receptor de PDGF, factor plaquetario 4 (PF-4), fosfatidilserina, antígeno específico de la próstata (PSA), antígeno de las células madre prostáticas (PSCA), antígeno

membranario específico de la próstata (PSMA), proteína/péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP), activador receptor del ligando de NF-kappaB (RANKL), receptor de motilidad mediada por el ácido hialurónico (RHAMM), ROBO1, SART3, semaforina 4B (SEMA4B), inhibidor secretorio de proteasa de leucocitos (SLPI), SM5-1, esfingosina-1-fosfato, glucoproteína-72 asociada a tumor (TAG-72), receptor de transferrina (TfR), TGF-beta, Thy-1, Tie-1, receptor de Tie2, dominio de inmunoglobulina de células T y dominio-1 de mucina (TIM-1), factor tisular humano (hTF), antígeno Tn, factor de necrosis tumoral (TNF), antígeno de Thomsen-Friedenreich (antígeno TF), receptor de TNF, ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL), receptor de TRAIL (tal como DR4 y DR5), sistema ASC de transporte de aminoácidos 2 (ASCT2), trkC, TROP-2, receptor Fn14 de TWEAK, colagenasa de tipo IV, receptor de uroquinasa, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), receptor de VEGF (tal como VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3), vimentina, VLA-4 y similares, y anticuerpos contra los antígenos anteriormente indicados.

Adicionalmente, entre los ejemplos del anticuerpo que reconoce un antígeno de tipo tumoral se incluyen [AntiCancer Res. 13:331, 1993], anticuerpo anti-GD3 [Cancer Immunol. Immunother. 36:260, 1993], anticuerpo anti-GM2 [Cancer Res. 54:1511, 1994], anticuerpo anti-CD52 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285, 1992], anticuerpo anti-MAGE [British J. Cancer 83:493, 2000], anticuerpo anti-HM1.24 [Molecular Immunol. 36:387, 1999], anticuerpo relacionado con la hormona anti-paratiroidea (PTHrP) [Cancer 88:2909, 2000], anticuerpo anti-bFGF, anticuerpo anti-FGF-8 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9911, 1989], anticuerpo anti-bFGFR, anticuerpo anti-FGFR1 (documento nº WO2005/037235), anticuerpo anti-FGF-8R [J. Biol. Chem. 265:16455, 1990], anticuerpo anti-IGF [J. Neurosci. Res., 40:647, 1995], anticuerpo anti-IGF-IR [J. Neurosci. Res. 40:647, 1995], anticuerpo anti-PSMA [J. Urology 160:2396, 1998], anticuerpo anti-VEGF [Cancer Res. 57:4593, 1997, Avastin®], anticuerpo anti-VEGFR [Oncogene 19:2138, 2000; documento nº WO96/30046], anticuerpo anti-CD20 [Curr. Opin. Oncol. 10:548, 1998; US5, 736, 137, Rituxan®, Ocrelizumab, Ofatumumab], anticuerpo anti-EGFR (Erbix®), anticuerpo anti-HER2 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285, 1992; US5, 725, 856, Herceptin®, Pertuzumab), anticuerpo anti-HER3 (documento nº US2008/0124345), anticuerpo c-Met (US6, 468, 529), anticuerpo anti-CD10, anticuerpo anti-EGFR (documento nº WO96/402010), anticuerpo anti-Apo-2R (documento nº WO98/51793), anticuerpo anti-ASCT2 (documento nº WO2010/008075), anticuerpo anti-CEA [Cancer Res. 55 (23 supl.):5935s-5945s, 1995], anticuerpo anti-CD38, anticuerpo anti-CD33, anticuerpo anti-CD22, anticuerpo anti-CD20 con modificación de aminoácidos [Immunology 115:4393, 2010], anticuerpo anti-EpCAM, anticuerpo anti-A33, anticuerpo anti-receptor del folato (MRAb-003) y similares.

Entre los ejemplos del anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con una alergia o con la inflamación se incluyen el anticuerpo anti-interleucina-6 [Immunol. Rev. 127:5, 1992], el anticuerpo anti-receptor de interleucina-6 [Molecular Immunol. 31:371, 1994], anticuerpo anti-interleucina-5 [Immunol. Rev. 127:5, 1992], anticuerpo anti-receptor de interleucina-5, anticuerpo anti-interleucina-4 [Cytokine 3:562, 1991], anticuerpo anti-receptor de interleucina-4 [J. Immunol. Meth. 217:41, 1998], anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral [Hybridoma 13:183, 1994], anticuerpo anti-receptor de factor de necrosis tumoral [Molecular Pharmacol. 58:237, 2000], anticuerpo anti-CCR4 [Nature 400:776, 1999], anticuerpo anti-quimiocina [Peri et al., J. Immunol. Meth. 174:249-257, 1994], anticuerpo anti-receptor de quimiocina [J. Exp. Med. 186:1373, 1997] y similares. Entre los ejemplos del anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con una enfermedad cardiovascular se incluye anticuerpo anti-GpIb/IIIa [J. Immunol. 152:2968, 1994], anticuerpo anti-factor de crecimiento derivado de plaquetas [Science 253:1129, 1991], anticuerpo anti-receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas [J. Biol. Chem. 272:17400, 1997], anticuerpo anti-factor de coagulación sanguínea [Circulation 101:1158, 2000], anticuerpo anti-IgE, anticuerpo anti- $\alpha$ v $\beta$ 3, anticuerpo anti- $\alpha$ 4 $\beta$ 7 y similares.

Entre los ejemplos del anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con una infección vírica o bacteriana se incluye el anticuerpo anti-gp120 [Structure 8:385, 2000], anticuerpo anti-CD4 [J. Rheumatology 25:2065, 1998], anticuerpo anti-CCR5, anticuerpo anti-verotoxina [J. Clin. Microbiol. 37:396, 1999], anticuerpo anti-M2 (documento nº JP2003-235575) y similares.

La actividad efectora de un anticuerpo monoclonal producido mediante el procedimiento de la presente invención puede controlarse mediante diversos procedimientos. Entre los ejemplos de los procedimientos conocidos se incluye un procedimiento para controlar la cantidad de fucosa (en adelante denominada "fucosa nuclear") que se encuentra unida a N-acetilglucosamina (GlcNAc) mediante enlace  $\alpha$ 1,6 en un extremo reductor de una cadena sacárida unida mediante N de tipo complejo que se encuentra unida a asparagina (Asn) en la posición 297 de una región Fc de un anticuerpo (documentos nº WO2005/035586, nº WO2002/31140 y nº WO00/61739), un procedimiento para controlar una actividad efectora mediante la modificación de uno o más residuos aminoácidos de una región Fc del anticuerpo y similares. La actividad efectora del anticuerpo monoclonal producido mediante el procedimiento de la presente invención puede controlarse mediante la utilización de cualquiera de los procedimientos.

La expresión "actividad efectora" se refiere a una actividad dependiente de anticuerpos que resulta inducida por una región Fc de un anticuerpo. Como actividad efectora, se conoce la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (actividad ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (actividad CDC), la fagocitosis dependiente de anticuerpos (actividad ADP) por células fagocíticas, tales como macrófagos o células dendríticas, y similares.

Además, mediante el control del contenido de fucosa nuclear de una cadena sacárida unida a N de tipo complejo de un anticuerpo monoclonal que es producido mediante el procedimiento de la presente invención, puede incrementarse o reducirse una actividad efectora del anticuerpo.

5

Como procedimiento para la reducción del contenido de fucosa que se encuentra unido a una cadena sacárida unida a N de tipo complejo unida a la región Fc del anticuerpo, puede obtenerse un anticuerpo al que la fucosa no se encuentra unida mediante la expresión de un anticuerpo utilizando una célula de CHO que es deficiente en un gen codificante de  $\alpha$ 1,6-fucosiltransferasa. El anticuerpo al que no se encuentra unido la fucosa presenta una elevada actividad de ADCC.

10

Por otra parte, como procedimiento para incrementar el contenido de fucosa que se encuentra unida a una cadena sacárida unida mediante N de tipo complejo unida a Fc de un anticuerpo, puede obtenerse un anticuerpo al que se encuentra unido la fucosa mediante la expresión de un anticuerpo utilizando una célula hospedadora en la que se ha introducido un gen codificante de  $\alpha$ 1,6-fucosiltransferasa. El anticuerpo al que se encuentra unido la fucosa presenta una actividad de ADCC más baja que el anticuerpo al que no se encuentra unido la fucosa.

15

Además, mediante la modificación de uno o más residuos aminoácidos en una región Fc de un anticuerpo, puede incrementarse o reducirse la actividad de ADCC o de CDC. Por ejemplo, puede incrementarse la actividad de CDC de un anticuerpo mediante la utilización de la secuencia de aminoácidos de la región Fc del anticuerpo descrito en el documento nº US2007/0148165.

20

Además, la actividad de ADCC o la actividad de CDC de un anticuerpo puede incrementarse o reducirse realizando las modificaciones de aminoácidos indicadas en las patentes US nº 6.737.056, nº 7.297.775 o nº 7.317.091.

25

La expresión "célula de mamífero en suspensión" en la presente invención se refiere a una célula que no se adhiere a un anclaje de cultivo celular recubierto para facilitar la adhesión de las células en cultivo, tal como microperlas, un recipiente de cultivo para el cultivo de tejidos (también denominado cultivo tisular o recipiente de cultivo de adhesión y similares) y similares, y puede sobrevivir y crecer bajo suspensión en la solución de cultivo.

30

Con la condición de que la célula no se adhiere al anclaje de cultivo celular, la célula puede sobrevivir y crecer en un estado unicelular en la solución de cultivo o sobrevivir y crecer en un estado de masa de células formado por agregación de dos o más células.

35

Además, como célula de mamífero en suspensión que debe utilizarse en la presente invención, resulta preferente una célula que pueda sobrevivir y crecer en un medio libre de suero que no contenga suero de feto bovino (en adelante denominado FCS) y similares, bajo suspensión en la solución de cultivo sin adherencia al anclaje de cultivo celular, y resulta más preferente una célula de mamífero que pueda sobrevivir y crecer bajo suspensión en un medio libre de proteínas que no contenga proteínas.

40

El recipiente de cultivo para el cultivo de tejidos puede ser cualquiera, tal como un matraz, una placa Petri y similares, con la condición de que se encuentre recubierto para el cultivo de adhesión. En particular, por ejemplo, puede confirmarse que es o no es una célula de mamífero en suspensión utilizando un matraz de cultivo tisular disponible comercialmente (fabricado por Greiner), un matraz de cultivo de adhesión (fabricado por Sumitomo Bakelite) y similares.

45

Como célula de mamífero en suspensión que debe utilizarse en la presente invención, puede utilizarse una célula de CHO preparada mediante la adaptación adicional de una célula de CHO que originalmente presenta una propiedad de suspensión al cultivo en suspensión, o una célula de CHO en suspensión preparada mediante la adaptación de una célula de CHO adhesiva a las condiciones de cultivo en suspensión.

50

Entre los ejemplos de la célula que originalmente presenta una propiedad de suspensión se incluye la célula de CHO-S (preparada por Invitrogen).

55

La "célula de mamífero en suspensión preparada mediante la adaptación de una célula de mamífero adhesiva a las condiciones de cultivo en suspensión" puede prepararse mediante el procedimiento descrito en Mol. Biotechnol. 15(3):249-57, 2000, o mediante el procedimiento mostrado a continuación, y puede prepararse mediante el establecimiento de una célula que muestra una propiedad de proliferación y una propiedad de supervivencia similares a las anteriores a la adaptación del cultivo en suspensión o superiores a las anteriores a la adaptación al cultivo en suspensión (J. Biotechnol. 130(3):282-90, 2007).

60

La expresión "similar a las anteriores a la adaptación al cultivo en suspensión" se refiere a que la proporción de supervivencia, la tasa de proliferación (tiempo de duplicación) y similares de la célula adaptada al cultivo en suspensión son sustancialmente iguales a las de la célula antes de la adaptación del cultivo en suspensión.

65

5 En la presente invención, entre los ejemplos del procedimiento para adaptar una célula de mamífero adhesiva a las condiciones de cultivo en suspensión se incluye el procedimiento siguiente. El contenido en suero de un medio que contiene suero se reduce a 1710 y el subcultivo se repite a una densidad relativamente elevada de células. En el momento en que la célula de mamífero es capaz de sobrevivir y proliferar, se reduce adicionalmente el contenido de suero y se repite el subcultivo. Mediante este procedimiento puede prepararse una célula de mamífero en suspensión que puede sobrevivir y proliferar bajo condiciones libres de suero.

10 Además, también puede prepararse una célula de mamífero en suspensión mediante un procedimiento que comprende el cultivo con la adición de un surfactante no iónico apropiado, tal como Pluronic-F68 o similar, en la solución de cultivo.

15 En la presente invención, como propiedad que presenta la célula de mamífero en suspensión, se lleva a cabo el cultivo en suspensión bajo la condición de  $2 \times 10^5$  células/ml y después la densidad celular tras el cultivo durante 3 o 4 días preferentemente es de  $5 \times 10^5$  células/ml o superior, más preferentemente de  $8 \times 10^5$  células/ml o superior, particularmente preferentemente es de  $1 \times 10^6$  células/ml o superior, más preferentemente de  $1,5 \times 10^6$  células/ml o superior.

20 Además, el tiempo de duplicación de la célula de mamífero en suspensión de la presente invención preferentemente es de 48 horas o inferior, más preferentemente de 24 horas o inferior, particularmente preferentemente de 18 horas o inferior, más preferentemente de 11 horas o inferior.

25 Entre los ejemplos del medio para el cultivo en suspensión se incluye medio disponible comercialmente, tal como medio CD-CHO (Invitrogen), medio EX-CELL 325-PF (SAFC Biosciences), medio SFM4CHO (HyClone) y similares. Además, también puede obtenerse mediante la mezcla de sacáridos, aminoácidos y similares, los cuales resultan necesarios para el cultivo de las células de mamífero.

30 La célula de mamífero en suspensión puede cultivarse utilizando un recipiente de cultivo que puede utilizarse para el cultivo en suspensión bajo condiciones de cultivo que permiten el cultivo en suspensión. Entre los ejemplos del recipiente de cultivo se incluyen una placa de 96 pocillos para el cultivo celular en suspensión (fabricada por Corning), un matraz T (fabricado por Becton Dickinson), un matraz cónico (fabricado por Corning) y similares.

35 Con respecto a las condiciones de cultivo puede, por ejemplo, cultivarse en estático en una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  a una temperatura de cultivo de  $37^\circ\text{C}$ . También puede utilizarse un equipo de cultivo de agitación, tal como equipo de cultivo para el uso exclusivo en el cultivo en suspensión, por ejemplo Wave Bioreactor (fabricado por GE Healthcare Biosciences).

40 Con respecto a las condiciones de cultivo en suspensión para una célula de mamífero en suspensión utilizando el equipo Wave Bioreactor, la célula puede cultivarse mediante el procedimiento descrito en la página inicial de GE Healthcare Bioscience [http://www.gelifesciences.co.jp/tech\\_support/manual/pdf/cellcult/wave\\_03\\_16.pdf](http://www.gelifesciences.co.jp/tech_support/manual/pdf/cellcult/wave_03_16.pdf).

45 Además del cultivo de agitación, también puede realizarse el cultivo mediante un equipo de rotación-agitación, tal como un biorreactor. El cultivo con un biorreactor puede llevarse a cabo mediante el procedimiento descrito en Cytotechnology 52:199-207, 2006, y similares.

50 En la presente invención, en el caso de que se utilice una línea celular diferente de las células de mamífero en suspensión, puede utilizarse cualquier línea celular con la condición de que sea una línea celular de mamífero adaptada al cultivo en suspensión mediante el procedimiento anteriormente indicado y sea una línea celular que pueda utilizarse en el procedimiento de producción de proteínas de la presente invención.

55 La purificación de la proteína de interés producida mediante la célula de mamífero en suspensión se lleva a cabo mediante la separación de la proteína de interés respecto de impurezas aparte de la proteína de interés en una solución de cultivo u homogeneizado celular que contiene la proteína de interés. Entre los ejemplos del procedimiento de separación se incluyen la centrifugación, la diálisis, la precipitación con sulfato amónico, la cromatografía de columna, la filtración y similares. La separación puede llevarse a cabo basándose en la diferencia en propiedades físicoquímicas de la proteína de interés y de las impurezas o de diferencias en su avidéz para el portador de columna mismo.

60 Como procedimiento para la purificación de la proteína de interés, la purificación se lleva a cabo mediante el procedimiento descrito en Protein Experimentation Note (el primer volumen) - Extraction, Separation and Expression of Recombinant Protein (traducción de un libro de texto escrito en japonés) (editado por Masato Okada y Kaori Miyazaki, publicado por Yodo-sha, ISBN 9784897069180) y similares.

65 La presente invención ha sido descrita anteriormente mostrando formas de realización preferentes de la misma en aras de una fácil comprensión. A continuación en la presente memoria se describe adicionalmente la presente

invención basándose específicamente en ejemplos, aunque las explicaciones anteriormente indicadas y los ejemplos siguientes se proporcionan meramente a título ejemplar y no se proporcionan con fines limitativos de la invención. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el alcance de la invención no se encuentra limitado a las formas de realización y ejemplos que se describen específicamente en la presente memoria, sino que se encuentra limitado únicamente por las reivindicaciones.

Se llevaron a cabo diversas técnicas experimentales relacionadas con la recombinación descritas a continuación, tales como la clonación y similares, de acuerdo con las técnicas de ingeniería genética descritas en Molecular Cloning, 2a edición, editada por J. Sambrook, E.F. Frisch y T. Maniatis, Current Protocols in Molecular Biology, editado por Frederick M. Ausubel et al., publicado por Current Protocols, y similares.

## Ejemplos

### [Ejemplo 1]

#### Preparación de vector transposón para la expresión de anticuerpo anti-M2 de influenza humano

Se utilizó como vector plásmido para la expresión de proteínas un plásmido que comprendía un casete de expresión génica para células de mamífero que comprendía un gen de anticuerpo humano arbitrario y un gen marcador de resistencia a fármaco insertado entre un par de secuencias de transposón Tol2.

Cada ADN de los genes utilizados se sintetizó química y artificialmente basándose en una secuencia de nucleótidos conocida u obtenida mediante la preparación de cebadores para ambas secuencias terminales y después llevar a cabo la PCR utilizando una fuente de ADN apropiada como molde. Con el fin de llevar a cabo la manipulación génica posteriormente, se añadió un sitio de restricción para un enzima de restricción al extremo del cebador.

En la secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 1) del transposón Tol2 no autónomo dado a conocer en la solicitud publicada de patente japonesa no examinada nº 235575/2003, se utilizó la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 200 (secuencia Tol2-L) (SEC ID nº 2) y la secuencia de nucleótidos en las posiciones 2.285 a 2.788 (secuencia Tol2-R) (SEC ID nº 3) como las secuencias de transposón.

Cada fragmento de ADN sintético que comprende un par de secuencias de transposón (fabricados por TAKARA BIO INC.) se preparó mediante el procedimiento siguiente. Se preparó un fragmento de ADN que comprendía una secuencia de nucleótidos en la que se unió una secuencia de reconocimiento de un enzima de restricción NruI a ambos extremos, 3' y 5', de la secuencia Tol2-R. A continuación, se preparó un fragmento de ADN que comprendía una secuencia de nucleótidos en la que se unió una secuencia de reconocimiento del enzima de restricción FseI al extremo 5'-terminal de la secuencia Tol2-L y se unió un sitio de enzima de restricción AseI al extremo 3'-terminal de la misma.

A continuación, los fragmentos de ADN preparados de esta manera que comprendía secuencia Tol2-R y secuencia Tol2-L se insertaron en un vector de expresión N5LG1\_M2\_Z3 (documento nº WO2006/061723) que comprendía una secuencia de nucleótidos codificante de una secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-M2 de influenza humano Z3G1.

Se utilizó el vector N5LG1\_M2\_Z3 (documento nº WO2006/061723) en que se había insertado una secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 9) codificante de la cadena H (SEC ID nº 10) y una secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 11) codificante de la cadena L (SEC ID nº 12) del anticuerpo anti-M2 de influenza humano Z3G1 (ATCC depósito nº PTA-5968, depositado el 13 de marzo de 2004, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) bajo el control del intensificador/promotor del CMV a modo de casete de expresión génica de anticuerpo.

El fragmento de ADN que comprendía la secuencia Tol2-R se insertó en el sitio de enzima de restricción NruI en el lado 5'-terminal de un fragmento génico que comprendía el casete de expresión génica de anticuerpo y un gen marcador seleccionable en el vector N5LG1\_M2\_Z3. A continuación, se insertó el fragmento de ADN que comprendía la secuencia Tol2-L en los sitios de restricción de enzima FseI y AseI situados en el lado 3'-terminal.

Además, se construyó un vector transposón para la expresión de un anticuerpo anti-M2 de influenza humano (figura 1) mediante la inserción de un casete de expresión de gen de resistencia a la cicloheximida en el que se conectó una secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 5) codificante de un gen de resistencia a la cicloheximida (un gen en el que la prolina en la posición 54 de la proteína ribosómica humana L36a se había sustituido por glutamina) bajo el control de intensificador/promotor del CMV en el sitio de reconocimiento FseI del vector N5LG1\_M2\_Z3 conectado con la secuencia de transposón Tol2.

Por otra parte, un vector que no comprendía secuencias de transposón se denominó vector de expresión de anticuerpo anti-M2 de influenza humano y se utilizó a modo de vector de control (figura 2).



**[Ejemplo 2]**

Preparación de vector de expresión de transposasa

5 Se expresó la transposasa utilizando un vector de expresión independiente del vector de expresión del anticuerpo de interés. Es decir, se insertó un gen que era codificante de una transposasa Tol2 derivada de pez medaka (SEC ID nº 4) cadena abajo del promotor CAGGS de un vector pCAGGS (Gene 108:193-200, 1991) con el fin de preparar un vector de expresión de transposasa Tol2 (en adelante denominado vector Tol2) (figura 3).

10 **[Ejemplo 3]**

Preparación de transformante utilizando células animales de mamífero

(1) Preparación de células de CHO en suspensión

15 Una célula de CHO adherente que había sido cultivado en medio  $\alpha$ -MEM (Invitrogen) que contenía 10% de suero (FCS) se desprendió mediante un tratamiento de tripsina y después se recuperó, seguido del cultivo bajo agitación a 37°C en un incubador con 5% de CO<sub>2</sub> utilizando el medio  $\alpha$ -MEM fresco que contenía 10% de FCS. Varios días después, se confirmó el crecimiento de estas células y después se llevó a cabo el cultivo de agitación mediante la inoculación de las mismas en medio  $\alpha$ -MEM que contenía 5% de FCS a una densidad de 2x10<sup>5</sup> células/ml, seguido del cultivo bajo agitación.

20 Varios días adicionales después, se llevó a cabo de manera similar la inoculación utilizando medio  $\alpha$ -MEM que contenía 5% de FCS. Finalmente, se preparó una célula adaptada al cultivo en suspensión mediante subcultivo repetido y cultivo bajo agitación utilizando el medio  $\alpha$ -MEM libre de suero, confirmando que las células presentaban la misma capacidad de crecimiento que con el cultivo en presencia de suero.

(2) Preparación de células de CHO productoras de anticuerpo

30 Como vector de expresión, se utilizó el vector transposón para la expresión del anticuerpo anti-M2 de influenza humano preparado en los Ejemplos 1 y 2 (en adelante denominado vector transposón) y el vector de Tol2 pCAGGS-T2TP (figura 3, Kawakami K. y Noda T., Genetics 166:895-899, 2004). Además, a modo de control se utilizó vector de expresión de anticuerpo anti-M2 de influenza humano que no presentaba secuencias de transposón.

35 Mediante la introducción de los vectores de expresión anteriormente indicados en las células de CHO-K1 (American Type Culture Collection, nº de cat. CCL-61) o HEK293 (Invitrogen, células FreeStyle 293F) adaptadas al cultivo en suspensión, se compararon las frecuencias de obtención de clones resistentes a cicloheximida.

40 Cada célula (4x10<sup>6</sup> células) se suspendió en 400  $\mu$ l de PBS y el vector transposón para la expresión del anticuerpo anti-M2 de influenza humano (10  $\mu$ g) y el vector Tol2 (25  $\mu$ g) se cotransfectaron directamente en forma de ADN circular mediante electroporación. En este aspecto, con el fin de expresar la transposasa Tol2 transitoriamente, se introdujo el vector Tol2 directamente en forma de ADN circular con el fin de evitar su integración en el cromosoma del hospedador.

45 Además, a modo de control, se linealizó el vector de expresión del anticuerpo anti-M2 de influenza humano (10  $\mu$ g) mediante un enzima de restricción y después se introdujo en cada célula, de acuerdo con el procedimiento estándar de introducción génica mediante electroporación.

50 La electroporación se llevó a cabo utilizando una cubeta de 4 mm de anchura de hueco (fabricada por Bio-Rad) utilizando un electroporador (Gene Pulser Xcell System (fabricado por Bio-Rad)) bajo condiciones de 300 V de voltaje, 500  $\mu$ F de capacidad electrostática y temperatura ambiente.

55 Tras la introducción génica mediante electroporación, se sembró cada célula en tres placas de 96 pocillos y se cultivó en un incubador de CO<sub>2</sub> durante 3 días utilizando el medio EX-CELL 325-PF fabricado por SAFC Biosciences para las células de CHO y el medio FreeStyle-293 (fabricado por Invitrogen) para las células HEK293.

60 A continuación, desde el día de intercambio del medio el 4º día desde la introducción génica, se añadieron 3  $\mu$ g/ml de cicloheximida al medio de manera que se cultivasen las células en presencia de cicloheximida, seguido del cultivo durante 3 semanas, llevando a cabo el intercambio del medio cada semana.

Tras el cultivo durante 3 semanas, se identificaron y contaron los pocillos en los que se observaban colonias resistentes a cicloheximida. Se muestran los resultados en las Tablas 1 y 2.

65

[Tabla 1]

Tabla 1. Comparación de los números de células resistentes a cicloheximida (células CHO)		
	Vector transposón	Vector convencional
Ensayo 1	155 / 288	0 / 288
Ensayo 2	100 / 288	0 / 288
Ensayo 3	94 / 288	0 / 288

Tabla 2. Comparación de los números de células resistentes a cicloheximida (células HEK293)		
	Vector transposón	Vector convencional
Ensayo 1	0 / 288	0 / 288
Ensayo 2	0 / 288	0 / 288
Ensayo 3	0 / 288	0 / 288

5 Tal como se muestra en la Tabla 1, se introdujo en las células de CHO-K1 en suspensión el vector transposón de expresión de anticuerpo anti-M2 de influenza humano o el vector de expresión de anticuerpo anti-M2 de influenza humano. Como resultado, no se obtuvieron transformantes resistentes a cicloheximida a partir de las células en las que se había introducido el vector de expresión de anticuerpo anti-M2 de influenza humano, tal como en otras líneas celulares, aunque se obtuvieron transformantes resistentes a cicloheximida a partir de las células en las que se había introducido el vector transposón para la expresión de anticuerpo anti-M2 de influenza humano a alta frecuencia.

10 Por otra parte, tal como se muestra en la Tabla 2, no se obtuvieron transformantes resistentes a cicloheximida al introducir en las células HEK293, vector transposón para la expresión de anticuerpo anti-M2 de influenza humana o vector de expresión anticuerpo anti-M2 de influenza humana.

15 Basándose en dichos resultados, se encontró que el gen codificante de una proteína de interés y un gen de resistencia a cicloheximida insertados entre un par de secuencias de transposón se habían introducido eficientemente en el cromosoma de la célula hospedadora en la célula de mamífero en suspensión.

### 20 (3) Examen de la producción de anticuerpos en células de CHO en suspensión y células de CHO adherentes

Con el fin de examinar la eficiencia de producción de anticuerpos en células de CHO en suspensión o en células de CHO adherentes, se examinaron las cantidades de anticuerpos producidos por cada línea celular. Como célula de CHO en suspensión, se utilizó una célula de CHO-K1 en suspensión adaptada para el cultivo en suspensión. Además, como célula de CHO adherente, se utilizó una célula de CHO-K1 adherente antes de la adaptación al cultivo en suspensión.

30 El vector transposón de expresión de anticuerpo anti-M2 de influenza humano (10 µg) y el vector Tol2 (25 µg) se introdujeron en las células de CHO-K1 en suspensión y en las células de CHO-K1 adherentes mediante electroporación, respectivamente. Después, se inocularon las células de CHO-K1 en suspensión y las células de CHO-K1 adherentes en tres placas de 96 pocillos para cada célula.

35 Se utilizó un medio para las células en suspensión (EX-CELL 325-PF, fabricado por SAFC Biosciences) para las células de CHO-K1 en suspensión y se utilizó el medio  $\alpha$ -MEM que contenía 10% de suero para las células de CHO-K1 adherentes. Se cultivó cada célula en un incubador de CO<sub>2</sub> durante 3 días. Desde el día del intercambio de medio el 4º día desde la electroporación, se añadieron 3 µg/ml de cicloheximida al medio de manera que se cultivasen las células en presencia de cicloheximida y las células se cultivaron adicionalmente durante 3 semanas. En este caso, se intercambiaba el medio cada semana.

40 Para las células de CHO-K1 en suspensión, se sembraron  $1 \times 10^6$  células en una placa de 6 pocillos, seguido del cultivo bajo agitación en un incubador de CO<sub>2</sub> durante 3 días y se midió la cantidad de proteínas anticuerpo mediante HPLC utilizando el sobrenadante de cultivo.

45 Para las células de CHO-K1 adherentes, se intercambiaba el medio al alcanzar las células la confluencia en una placa de 6 pocillos ( $2 \times 10^6$  células) y tras el cultivo estático durante 3 días, se midió la cantidad de proteínas anticuerpo mediante HPLC utilizando el sobrenadante de cultivo.

50 Se midió la concentración de anticuerpo en el sobrenadante de cultivo de acuerdo con el procedimiento descrito en Yeast Res. 7:1307-1316, 2007. Se muestran los resultados en la figura 4.

55 Tal como se muestra en la figura 4A, se obtuvo un gran número de células que mostraba un nivel de expresión de anticuerpos marcadamente elevado al utilizar células de CHO-K1 adaptadas al cultivo en suspensión. Por otra parte, tal como se muestra en la figura 4B, sólo se utilizaron células que mostraban un nivel de expresión igual al límite de detección de HPLC (5 µg/ml) o inferior al utilizar células de CHO-K1 adherentes.

Basándose en estos resultados, se encontró que, para expresar una proteína de interés utilizando un vector transposón, la proteína de interés pudo expresarse a nivel elevado al utilizar células de mamífero en suspensión.

- 5 Además, se encontró a partir de los resultados de los Ejemplos 1 a 3 que el procedimiento de la invención podía utilizarse como nuevo procedimiento para la producción de una proteína de interés, mediante la preparación eficiente de una célula productora que podía expresar a nivel elevado un gen exógeno utilizando una célula de mamífero en suspensión adaptada al cultivo en suspensión.

#### 10 **[Ejemplo 4]**

##### Preparación de células de expresión de anticuerpos utilizando transposón Tol1 y preparación de anticuerpos

###### (1) Preparación de vector de transposón Tol1 para la expresión de anticuerpo anti-M2 de influenza humano

15 De la misma manera que en el Ejemplo 1, se utilizó un plásmido que comprendía un casete de expresión génica para las células de mamífero, que comprendía un gen de anticuerpo humano arbitrario y un gen marcador de resistencia a fármaco insertados entre un par de secuencias de transposón Tol1, como vector plásmido de expresión de proteína.

20 Se sintetizó químicamente cada ADN de los genes utilizados basándose en la información de secuencia conocida u obtenida mediante la preparación de cebadores de ambas secuencias terminales y se llevó a cabo una PCR utilizando una fuente de ADN apropiada como molde. Para la manipulación génica que debía realizarse posteriormente, se añadió un sitio para la digestión con enzima de restricción al extremo del cebador.

25 En la secuencia de nucleótido del transposón Tol1 no autónomo representada por la SEC ID n° 13 en el Listado de secuencias (documento n° WO2008/072540), se utilizó la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 200 (secuencia Tol1-L) (SEC ID n° 14) y la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1.351 a 1.855 (secuencia Tol1-R) (SEC ID n° 15) como secuencias de transposón.

30 Cada uno de los fragmentos de ADN sintéticos que comprendía un par de secuencias de transposón mediante el procedimiento siguiente. Un fragmento de ADN que comprendía una secuencia de nucleótidos en el que una secuencia de reconocimiento de un enzima de restricción NruI se conectó tanto el extremo 5'-terminal como al extremo 3'-terminal de la secuencia Tol1-R. A continuación, un fragmento de ADN que comprendía una secuencia de nucleótidos con una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción FseI se conectó con el extremo 5'-terminal de la secuencia Tol1-L y un sitio de enzima de restricción AclI se conectó con el extremo 3'-terminal de la misma.

35 A continuación, los fragmentos de ADN preparados de esta manera que comprendía la secuencia Tol1-R y la secuencia Tol1-L se insertaron en el vector de expresión N5LG1\_M2\_Z3. El fragmento de ADN que comprendía la secuencia Tol1-R se insertó en el sitio de enzima de restricción NruI, presente en el lado 5'-terminal de un fragmento génico que comprende el casete de expresión génica de anticuerpo y un gen marcador seleccionable en el vector N5LG1\_M2\_Z3, y el fragmento de ADN que comprendía la secuencia Tol1-L se insertó en los sitios de enzima de restricción FseI y AclI en el lado 3'-terminal.

40 Además, se construyó el vector del transposón Tol1 para la expresión de anticuerpo anti-M2 de influenza humano (figura 5) mediante la inserción de un casete de expresión de gen de resistencia a cicloheximida en el que se conectó un gen de resistencia a cicloheximida (un gen en el que la prolina de la posición 54 en la proteína ribosómica humana L36a había mutado en glutamina) bajo el control del intensificador/promotor del CMV en el sitio de reconocimiento FseI del vector N5LG1\_M2\_Z3 conectado con la secuencia del transposón Tol1.

###### (2) Preparación de vector de expresión de transposasa To1-L

45 La transposasa se expresó utilizando un vector de expresión independiente del vector de expresión del anticuerpo de interés. Es decir, un casete de expresión de gen de transposasa Tol1 en el que un fragmento de ADN que codifica una transposasa Tol1 derivada de pez medaka (SEC ID n° 17) comprendía la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID n° 16 se conectó bajo el control del intensificador/promotor del CMV en pBluescriptII SK (+) (fabricado por Stratagene) y se utilizó como vector de expresión de la transposasa Tol1 pTol1ase (figura 6).

###### (3) Preparación de células de CHO que producen anticuerpo

50 Utilizando los vectores de expresión preparados en (1) a (3), anteriormente, se examinó la eficiencia de introducción del vector de expresión por el transposón Tol1 de la misma manera que en el Ejemplo 3. Se muestra el resultado en la Tabla 3.

[Tabla 3]

	Vector de transposón Tol1
Ensayo 1	133 / 192
Ensayo 2	67 / 192
Ensayo 3	122 / 192

5 Tal como se muestra en la Tabla 3, al introducir el vector de transposón Tol1 para la expresión del anticuerpo anti-M2 de influenza humano en células de CHO-K1 en suspensión, se obtuvieron transformantes resistentes a cicloheximida a una frecuencia elevada tal como en el Ejemplo 3 en el que se había introducido el vector de transposón Tol2 para la expresión de anticuerpo anti-M2 de influenza humano.

10 Se encontró, basándose en los resultados, que el gen de anticuerpo y el gen de resistencia a cicloheximida insertados entre un par de secuencias de transposón resultan transducidos eficientemente al interior del cromosoma de la célula hospedadora, es decir la célula de mamífero en suspensión, también en el caso de la utilización del transposón Tol1.

15 (4) Examen de la producción de anticuerpos en células de CHO en suspensión

Se examinó la eficiencia de producción de anticuerpos de las células de CHO en suspensión utilizando el transposón Tol1 de la misma manera que en el Ejemplo 3(3).

20 La concentración de anticuerpos en el sobrenadante de cultivo se midió de acuerdo con el procedimiento descrito en FEMS Yeast Res. 7:1307-1316, 2007. Se muestran los resultados en la figura 7.

25 Tal como se muestra en la figura 7, también se obtuvo un gran número de células que mostraba un nivel de expresión de anticuerpos marcadamente elevado en el caso de la utilización del transposón Tol1. A partir de este resultado, se encontró que, de manera similar al caso de utilización de la secuencia de nucleótidos derivada del transposón Tol2, también podía obtenerse una célula de mamífero en suspensión capaz de expresar a nivel elevado la proteína de interés al utilizar una secuencia de nucleótidos derivada del transposón Tol1 como secuencia de transposón.

30 **[Ejemplo 5] Preparación de anticuerpos anti-CD98 humanos**

(1) Preparación de vector transposón de expresión de cadena pesada de anticuerpo anti-CD98 humano y vector transposón de expresión de cadena ligera de anticuerpo anti-CD98 humano

35 Con el fin de preparar un anticuerpo anti-CD98 humano que presenta la cadena H y la cadena L de la región variable presentadas por las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 20 y nº 23, respectivamente, las secuencias e aminoácidos de las cadenas H y L se prepararon mediante la conexión de la secuencia de aminoácidos de la región constante del anticuerpo IgG1 humano con cada región variable de anticuerpo.

40 Mediante la utilización de las secuencias integradas en un vector (N5KG1-Val C2IgG1NS/I117L) dado a conocer en la patente japonesa nº 4324637 como secuencias génicas (SEC ID nº 18 y nº 21, respectivamente) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD98 humano y la región variable de cadena ligera a la que se había conectado una secuencia de señal, y utilizando una secuencia de transposón y un promotor similares a los utilizados en el Ejemplo 1, se construyó respectivamente un vector transposón de expresión de cadena pesada de anticuerpo anti-CD98 humano (en adelante, denominado vector CD98H) y un vector transposón de expresión de cadena ligera de anticuerpo anti-CD98 humano (en adelante denominado vector CD98L) (figs. 8 y 9).

45 El fragmento de ADN que debía utilizarse se sintetizó químicamente de manera artificial basándose en la secuencia conocida convencionalmente u obtenido mediante la preparación de cebadores de ambas secuencias terminales y llevando a cabo la PCR utilizando una fuente de ADN apropiada como molde. Se unió un sitio de digestión con enzima de restricción a un extremo de cada cebador para las últimas operaciones de recombinación génica.

50 (2) Preparación de vector transposón de expresión gen de resistencia a cicloheximida

55 Se construyó un vector transposón de expresión de gen de resistencia a cicloheximida (en adelante denominado vector CHX) mediante la conexión de la secuencia codificante de un gen de resistencia a cicloheximida (SEC ID nº 7) bajo el control del intensificador/promotor del CMV descrito en el Ejemplo 1 e insertando un par de secuencias de transposón (Tol-2R, Tol2-R) en ambos extremos del casete de expresión de gen de resistencia a cicloheximida (figura 10).

60 El fragmento de ADN que debía utilizarse se sintetizó químicamente de manera artificial basándose en la

secuencia convencionalmente conocida o se obtuvo mediante la preparación de cebadores de ambas secuencias terminales y realizando después una PCR utilizando una fuente de ADN apropiada como molde. Se unió un sitio de digestión con enzima de restricción a un extremo de cada cebador para las últimas operaciones de recombinación génica.

5

(3) Preparación de células de CHO que producen anticuerpo anti-CD98 humano

Se introdujo el vector CD98H (figura 8), el vector CD98L (figura 9) y el vector CHX (figura 10) preparados en (1) y (2) anteriormente indicados y el vector de Tol2 (figura 3) preparado en el Ejemplo 2, en células de CHO-K1 que se adaptó al cultivo en suspensión y se comparó el número de células que aparecían que eran capaces de expresar a nivel elevado el anticuerpo.

10

En el diseño experimental, se suspendieron  $4 \times 10^6$  células de CHO-K1 en 400  $\mu$ l de PBS y se cotransfectaron directamente el vector CD98H (10  $\mu$ g), el vector CD98L (10  $\mu$ g), el vector CHX (10  $\mu$ g) y el vector de Tol2 (10  $\mu$ g) en forma de ADN circular mediante electroporación. Con el fin de expresar la transposasa Tol1 transitoriamente y para evitar la integración en el cromosoma huésped, se introdujo directamente el vector de Tol2 en forma de ADN circular. La electroporación se llevó a cabo utilizando un electroporador (sistema Gene Pulser Xcell, fabricado por Bio-Rad) bajo condiciones de voltaje de 300 V, capacidad electrostática de 500  $\mu$ F y temperatura ambiente y utilizando una cubeta de 4 mm de anchura de hueco (fabricado por Bio-Rad).

15

Además, en el diseño experimental, se linealizó cada uno de los vectores CD98H (10  $\mu$ g), CD98L (10  $\mu$ g) y CHX (10  $\mu$ g) utilizando un enzima de restricción PciI (Takara Bio Inc.) y después se llevó a cabo la electroporación de la misma manera que anteriormente.

20

Tras la introducción génica mediante electroporación, las células en cada cubeta se suspendieron en medio CD OptiCHO complementado con 0,5% de hidrolizado de soja (en adelante denominado medio 0.5CD), se inocularon en una placa de 96 pocillos y se cultivaron durante 4 días en un incubador de CO<sub>2</sub>. A continuación, desde el intercambio de medio 5 días después de la introducción génica, se llevó a cabo el cultivo en presencia de cicloheximida utilizando el medio 0.5CD complementado con 3  $\mu$ g/ml de cicloheximida (C4859, Sigma-Aldrich) seguido del cultivo durante 4 semanas, realizando el intercambio de medio a intervalos de una semana.

25

30

Tras 4 semanas de cultivo, se determinó la expresión del anticuerpo mediante un procedimiento de tipo sándwich (LENCE™, Perkin-Elmer Corp.) utilizando FRET (transferencia de energía por resonancia fluorescente). Con respecto a las células con nivel alto de expresión de anticuerpo, se contaron los clones que expresaban el anticuerpo a una concentración en el sobrenadante de cultivo de 5,0  $\mu$ g/ml o superior como células expresantes de anticuerpo; se muestran los resultados en la Tabla 4.

35

[Tabla 4]

	Diseño de control	Diseño experimental
Placa 1	10/96	29/96
Placa 1	20/96	49/96

40

Tal como se muestra en la Tabla 4, se encontró un gran número de células de expresión de anticuerpo anti-CD98 humano en el diseño experimento, en el que se cotransfectó vector de Tol2 en las células de CHO-K1 en suspensión con vector transposón de expresión de cadena pesada de anticuerpo anti-CD98 humano, vector transposón de expresión de cadena ligera de anticuerpo anti-CD98 humano y vector de gen de resistencia a cicloheximida mientras que las células de expresión de anticuerpo anti-CD98 humano no se encontraron en el diseño experimental en el que no se cotransfectó vector de Tol2 a pesar de convertir los vectores en cadenas lineales.

45

**[Ejemplo 6] Producción de anticuerpo anti-CD98 humano**

50

(1) Preparación de vector transposón de expresión que comprende fragmento génico de cadena pesada de anticuerpo anti-CD98 humano, fragmento génico de cadena ligera de anticuerpo anti-CD98 humano y gen de resistencia a cicloheximida

Se construyó un vector transposón de expresión que contenía fragmento génico de cadena pesada de anticuerpo anti-CD98 humano, fragmento génico de cadena ligera de anticuerpo anti-CD98 humano y gen de resistencia a cicloheximida (en adelante denominado vector en tándem CD98-CHX) utilizando ADN sintético y un procedimiento de PCR de la misma manera que anteriormente, mediante la conexión del vector transposón de expresión de cadena pesada de anticuerpo anti-CD98 humano preparado en el Ejemplo 5(1) con el casete génico de expresión de cadena ligera de anticuerpo anti-CD98 humano preparado en el Ejemplo 5(1) y el casete génico de resistencia a la cicloheximida preparado en el Ejemplo 5(2).

60

(2) Preparación de vector transposón de expresión que comprende fragmento génico de cadena pesada de

anticuerpo anti-CD98 humano y gen de resistencia a cicloheximida

Se construyó un vector transposón de expresión que comprendía fragmento génico de cadena pesada de anticuerpo anti-CD98 humano y gen de resistencia a cicloheximida (en adelante denominado vector transposón de expresión CD98H-CHX) utilizando ADN sintético y un procedimiento de PCR de la misma manera que anteriormente, mediante la conexión del vector transposón de expresión de cadena pesada de anticuerpo anti-CD98 humano preparado en el Ejemplo 5(1) con el casete génico de resistencia a cicloheximida preparado en el Ejemplo 5(2).

(3) Preparación de células de CHO productoras de anticuerpo anti-CD98 humano

Mediante la utilización de los vectores transposón de expresión preparados en los Ejemplos 5(1) y (2) anteriormente y los Ejemplos 6(1) y (2), anteriormente, se comparó la presencia de células capaces de expresar a nivel elevado anticuerpo anti-CD98 con el caso de transferencia génica de cadenas H y L de anticuerpo anti-CD98 humano utilizando el mismo vector de expresión (diseño de control), en el caso de transferencia génica de cadena H o L de gen de anticuerpo anti-CD98 humano o de resistencia a cicloheximida, respectivamente, utilizando diferentes vectores de expresión (diseño experimental 1) y con el caso de transferencia génica de cadena H o L utilizando diferentes vectores de expresión (diseño experimental 2).

En el diseño experimental 1, se suspendieron  $4 \times 10^6$  células de CHO-K1 en 400  $\mu$ l de PBS y se cotransfectaron directamente vector CD98H (10  $\mu$ g), vector CD98L (10  $\mu$ g), vector CHX (10  $\mu$ g) y vector de Tol2 (10  $\mu$ g) como ADN circular mediante electroporación.

En el diseño experimental, se suspendieron  $4 \times 10^6$  células de CHO-K1 en 400  $\mu$ l de PBS y se cotransfectaron directamente vector CD98H-CHX (10  $\mu$ g), vector CD98L (10  $\mu$ g) y vector de Tol2 (10  $\mu$ g) como ADN circular mediante electroporación.

En el diseño experimental, se suspendieron  $4 \times 10^6$  células de CHO-K1 en 400  $\mu$ l de PBS y se cotransfectaron directamente vector en tándem CD98H-CHX (10  $\mu$ g) y vector de Tol2 (20  $\mu$ g) como ADN circular mediante electroporación. Además, en todos los ensayos, con el fin de expresar transposasa Tol2 transitoriamente y evitar la integración en el cromosoma del huésped, se introdujo el vector de Tol2 directamente en forma de ADN circular.

En el procedimiento a continuación, se confirmó la presencia de células productoras de anticuerpo de la misma manera que en el Ejemplo 5(3). Con respecto a las células productoras de anticuerpos, se contaron como células expresantes de anticuerpo los clones en los que la concentración de anticuerpo en el sobrenadante de cultivo era de 3,0  $\mu$ g/ml o superior. Se muestran los resultados en la Tabla 5.

[Tabla 5]

	Diseño de control	Diseño experimental 1	Diseño experimental 2
Placa 1	18/96	82/96	95/96
Placa 2	21/96	85/96	96/96
Total	39/192	167/192	191/192

En el diseño experimental 1 en el que se había introducido vector CD98H, vector CD98L y vector CHX y en el diseño experimental 2 en el que se había introducido vector CD98H y CD98L, se incrementó marcadamente la incidencia de células capaces de expresar a nivel elevado el anticuerpo anti-CD98 humano.

Los resultados anteriormente proporcionados demuestran que las células que presentan una productividad elevada de anticuerpo pueden obtenerse y producirse fácilmente al cotransfectar diferentes vectores de expresión en los que se han insertado, respectivamente, el gen de cadena pesada de anticuerpo y el gen de cadena ligera de anticuerpo entre las secuencias de transposón, en las células de CHO en suspensión, en comparación con el caso en que un vector de expresión preparado mediante la integración del gen de cadena pesada de anticuerpo y el gen de cadena ligera de anticuerpo en el mismo vector de expresión se introduce en las células de CHO en suspensión. Además, se reveló a partir de los resultados del diseño experimental 1 y del diseño experimental 2 que incluso en el caso de que fuesen dos o más los vectores que debían introducirse, resultaba suficiente un gen de resistencia a fármaco (gen marcador seleccionable). Además, se reveló que el gen de resistencia a fármaco puede encontrarse presente en un vector de expresión en el que se ha integrado el gen de cadena pesada de anticuerpo o en un vector independiente diferente.

Los resultados anteriormente proporcionados demuestran que un vector transposón resulta eficaz como medio para introducir eficientemente genes situados en dos o más vectores en una suspensión de células de mamífero, lo que resultaba difícil de conseguir convencionalmente. Además, se demuestra que para el propósito de conseguir una productividad elevada de una proteína que comprende más de un polipéptido o de más de una proteína, resulta eficaz introducir polipéptidos y proteínas utilizando diferentes vectores transposones.

(4) Cultivo de células de CHO que producen anticuerpo anti-CD98 humano

5 Se seleccionaron las tres líneas celulares que presentaban la productividad más elevada de anticuerpos de entre las células en las que se había introducido el vector en tándem CD98-CHX obtenido en el Ejemplo 6(3) anteriormente indicado y se compararon los niveles de expresión de anticuerpos de las células en las que se había introducido el vector CD98H-CHX y el vector CD98L. A continuación se proporciona la información de los ensayos.

10 La célula de CHO-K1 obtenida en el Ejemplo 6(3) se seleccionó basándose en la resistencia a la cicloheximida y que también expresaba el anticuerpo anti-CD98; se expandió el cultivo utilizando una placa de 96 pocillos, una placa de 24 pocillos y una placa de 6 pocillos (Corning Glassworks), en este orden. Tras expandir los cultivos, se midió la concentración de anticuerpo en cada sobrenadante de cultivo y se seleccionaron las tres líneas celulares de CHO con los niveles más elevados de expresión de anticuerpo anti-CD98. A continuación, cada una de las tres líneas celulares seleccionadas de esta manera se suspendió en 3 ml de medio CD al 0,5% (Invitrogen), es decir medio 0.5 CD, hasta una densidad de  $2 \times 10^5$  células/ml y se cultivaron en un agitador durante 5 días en una atmósfera a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub> utilizando una placa de 6 pocillos. Se determinó la cantidad de anticuerpo en el medio tras 5 días de cultivo, mediante HPLC (Waters Associates, Inc.). Se muestran los resultados en la Tabla 6.

20 [Tabla 6]

Nivel de expresión de anticuerpo (mg/l)	Células derivadas de diseño de control			Células derivadas de diseño experimental 2		
		70	67	41	196	87

25 Tal como se muestra en la Tabla 6, las células de CHO-K1 cotransfectadas con vector CD98H y vector CD98L presentaba un nivel elevado de producción de anticuerpos en comparación con las células de CHO-K1 en las que se había introducido vector en tándem CD98-CHX.

30 Los resultados anteriores demuestran que no sólo puede obtenerse y producirse fácilmente una línea celular de alta producción de anticuerpos sino que también las células obtenidas de esta manera presentan una elevada productividad de anticuerpos, al cotransfectar en las células de CHO en suspensión diferentes vectores de expresión en los que se han insertado el gen de cadena pesada de anticuerpo y el gen de cadena ligera de anticuerpo, respectivamente, entre un par de secuencias de transposón.

35 **[Ejemplo 7] Producción de anticuerpo anti-factor alfa de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) humano**

(1) Preparación de vector transposón de expresión que contiene un fragmento génico de cadena pesada de anticuerpo de TNF $\alpha$ , fragmento génico de cadena ligera de anticuerpo de TNF $\alpha$  y gen de resistencia a cicloheximida

40 Con el fin de preparar anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano con la secuencia de aminoácidos SEC ID n° 26 y SEC ID n° 29, se construyó un fragmento génico de cadena pesada de anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano, un fragmento génico de cadena ligera de anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano y un vector transposón de expresión de gen de resistencia a cicloheximida (en adelante denominado vector en tándem TNF $\alpha$ -CHX) mediante la sustitución de los fragmentos génicos de VH y VL del vector transposón de expresión que comprendía el fragmento génico de cadena pesada de anticuerpo anti-CD98 humano y el fragmento génico de cadena ligera y el gen de resistencia a cicloheximida preparados en el Ejemplo 6(1) (vector en tándem CD98-CHX) por VH y VL derivados del anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano, respectivamente.

50 Se prepararon las secuencias del gen de cadena pesada del anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano y del gen de la cadena ligera utilizando un ADN sintético, mediante la preparación de secuencias de aminoácidos (SEC ID n° 26 y n° 29) en las que se había conectado una secuencia de señal a las secuencias de aminoácidos (SEC ID n° 25 y n° 28) de la subunidad de región variable de cadena pesada o de la subunidad de región variable de cadena ligera de Adalimumab (recombinante), descrito en las figs. 1 y 2, respectivamente, del informe de inspección de HUMIRA® 40 mg para inyección subcutánea (Agencia de Dispositivos Farmacéuticos y Médicos, 14 de febrero de 2008) y se determinaron las secuencias de nucleótidos de manera que las secuencias de aminoácidos no cambiasen (SEC ID n° 24 y n° 27). Para las manipulaciones génicas posteriores se añadió un sitio de digestión con enzima de restricción al extremo de las secuencias artificiales.

(2) Preparación de vector transposón de expresión que comprende fragmento de cadena pesada de anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano y gen de resistencia a cicloheximida

5 Se construyó un vector transposón de expresión que contenía fragmento de cadena pesada de anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano y gen de resistencia a cicloheximida (en adelante denominado vector TNF $\alpha$ H-CHX) mediante la modificación de una región de fragmento génico de VH del vector transposón de expresión que contenía fragmento de cadena pesada de anticuerpo anti-CD98 humano y gen de resistencia a cicloheximida (vector CD98H-CHX) preparado en el Ejemplo 6(2) en un fragmento génico de VH de anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano. Como gen de cadena pesada de anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano, se utilizó una secuencia de la misma secuencia mostrada en dicho ítem 81).

(3) Preparación de vector transposón de vector de gen de cadena ligera de anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano

15 Se construyó un vector transposón de expresión de gen de cadena ligera de anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano (en adelante denominado vector CD98L) mediante la modificación de la región génica de la cadena ligera del vector transposón de expresión de gen de cadena ligera del anticuerpo anti-CD98 humano en el Ejemplo 6(1) en cadena ligera de anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano. Como gen de VL del anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano, se utilizó la misma secuencia que la mostrada en dicho ítem (1).

20 (4) Preparación de células de CHO que producen anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano

Con el fin de preparar células de CHO-K1 que produjesen anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano, se introdujo el vector en tándem TNF $\alpha$ -CHX (20  $\mu$ g) preparado en (1) indicado anteriormente y el vector de expresión de la transposasa Tol2 (vector Tol2) (10  $\mu$ g) preparado en el Ejemplo 2, en células de CHO-K1 adaptadas para el cultivo en suspensión preparada en el Ejemplo 3 (diseño de control).

De la misma manera, se cotransfectaron directamente en la forma de ADN circular (diseño experimental) el vector TNF $\alpha$ H-CHX (10  $\mu$ g), el vector TNF $\alpha$ L (10  $\mu$ g) y el vector Tol2 (10  $\mu$ g) preparados en el Ejemplo 2, en células de CHO-K1 adaptadas para el cultivo en suspensión preparadas en el Ejemplo 3 (diseño de control). Se comparó la presencia de células capaces de expresar a nivel elevado el anticuerpo llevando a cabo la introducción génica, el cultivo celular y similares de la misma manera que en el Ejemplo 6, excepto en que el cultivo de las células con introducción génica se llevó a cabo en cinco placas de 96 pocillos. Con respecto a las células con una elevada productividad de anticuerpos, se contaron como células expresantes de anticuerpo los clones en los que la concentración de anticuerpo en el sobrenadante de cultivo era de 3,0  $\mu$ g/ml o superior. Se muestran los resultados en la Tabla 7.

[Tabla 7]

	Diseño de control	Diseño experimental
	Número de pocillos en los que se expresa el anticuerpo	
Placa 1	20/96	83/96
Placa 2	22/96	76/96
Placa 3	21/96	82/96
Placa 4	20/96	79/96
Placa 5	27/96	81/96
Total	110/480	401/480

40 Tal como se muestra en la Tabla 7, tal como en el caso de las células productoras de anticuerpo anti-CD98 humano preparadas en el Ejemplo 6, las células de CHO-K1 cotransfectadas con vector TNF $\alpha$ H-CHX y vector TNF $\alpha$ L mostraron una presencia aproximadamente 4 veces superior de células en las que se expresaba a nivel elevado el anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano, en comparación con células de CHO-K1 en las que se había introducido vector en tándem TNF $\alpha$ -CHX.

45 Dicho resultado muestra que, respecto a cualquier anticuerpo, puede obtenerse y producirse fácilmente una línea celular con una elevada productividad de anticuerpos mediante la cotransfección del gen de cadena pesada de anticuerpo y el gen de cadena ligera de anticuerpo, los cuales son insertados, respectivamente, entre un par de secuencias de transposón introducidas en diferentes vectores de expresión en las células de CHO en suspensión.

(5) Cultivo de células de CHO que producen anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano

55 Las células seleccionadas basándose en la resistencia a la cicloheximida a partir de las células en las que se había introducido vector en tándem TNF $\alpha$ -CHX obtenidas en (4) indicado anteriormente y las células que habían sido cotransfectadas con vector TNF $\alpha$ H-CHX y vector TNF $\alpha$ L, y que también expresaban el anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano, se seleccionaron y se expandieron en cultivo en placa de 96 pocillos, placa de 24 pocillos y placa de 6 pocillos, en ese orden. Con respecto a las 4 líneas celulares de células en las que se había introducido vector en



tándem TNF $\alpha$ -CHX que pudieron expandirse en cultivo y 52 líneas celulares que habían sido cotransfectadas con vector TNF $\alpha$ H-CHX y vector TNF $\alpha$ L, estas células fueron cultivadas de la misma manera que en el Ejemplo 6(4), excepto en que el periodo de cultivo fue de 7 días, y se midieron los niveles de expresión de los anticuerpos. Se muestran los resultados en la figura 11.

Como resultado, las células de CHO-K1 que habían sido cotransfectadas con vector TNF $\alpha$ H-CHX y vector TNF $\alpha$ L mostraron una productividad de anticuerpos aproximadamente 2,4 veces superior a la de las células de CHO-K1 en las que se había introducido el vector en tándem TNF $\alpha$ -CHX.

Dicho resultado muestra que, tal como en el caso del Ejemplo 6(4), no sólo pueden obtenerse y producirse células que presentan una elevada productividad de anticuerpo sino que las células obtenidas de esta manera presentan una elevada productividad de anticuerpos al cotransfectarlas en células de CHO en suspensión con diferentes vectores de expresión en los que se ha insertado el gen de cadena pesada de anticuerpo y el gen de cadena ligera de anticuerpo entre un par de secuencias de transposón.

### **[Ejemplo 8] Producción de anticuerpo anti-CD20 humano**

#### (1) Preparación de vector transposón de expresión que comprende fragmento génico de cadena pesada de anticuerpo anti-CD20 humano, fragmento génico de cadena ligera de anticuerpo anti-CD20 humano y gen de resistencia a cicloheximida

Con el fin de preparar un anticuerpo anti-CD20 humano que comprendía VH y VL representado por las secuencias de aminoácidos de SEC ID n° 32 y n° 35, respectivamente, se construyó un vector transposón de expresión que comprendía un fragmento génico de cadena pesada de anticuerpo anti-CD20 humano, un fragmento génico de cadena ligera de anticuerpo anti-CD20 humano y un gen de resistencia a cicloheximida (en adelante denominado vector en tándem CD98-CHX) mediante la sustitución de las regiones génicas de VH y VL de anticuerpo del vector en tándem CD98-CHX preparado en el Ejemplo 6(1) por VH y VL, respectivamente, derivados de anticuerpo anti-CD20 humano.

Se prepararon las secuencias génicas de la región VH y la región VL de anticuerpo anti-CD20 humano utilizando un ADN sintético, mediante la preparación de la secuencia de nucleótidos indicada en GenBank n° de acceso AR000013 y las secuencias de aminoácidos (SEC ID n° 31 y n° 34, respectivamente) en las que una secuencia de señal había sido conectada con las secuencias de aminoácidos (SEC ID n° 32 y n° 35, respectivamente) de la VH y la VL del rituximab, indicado en la hoja adjunta del informe de inspección del Rituxan® para inyección 10 mg/ml (informado por el Instituto Nacional de Ciencias de la Salud, n° 3395, 28 de agosto de 2003) y se determinaron las secuencias de nucleótidos de manera que las secuencias de aminoácidos no cambiasen (SEC ID n° 30 y n° 33). Para estas últimas manipulaciones génicas, se añadió un sitio de digestión con enzima de restricción al extremo de las secuencias artificiales.

#### (2) Preparación de vector transposón de expresión que comprende fragmento génico de cadena pesada de anticuerpo anti-CD20 humano y gen de resistencia a cicloheximida

Se construyó un vector transposón de expresión que comprendía fragmento génico de cadena pesada de anticuerpo anti-CD20 humano y gen de resistencia a cicloheximida (en adelante denominado vector CD20H-CHX) mediante la modificación de la región génica de VH de anticuerpo del vector CD98H-CHX preparado en el Ejemplo 6(2) en una VH derivada de anticuerpo anti-CD20 humano. Como gen de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD20 humano, se utilizó la misma secuencia que la mostrada en (1), anteriormente indicado.

#### (3) Preparación de vector transposón de expresión de gen de cadena ligera de anticuerpo anti-CD20 humano

Se construyó un vector transposón de expresión de gen de cadena ligera de anticuerpo anti-CD20 humano (en adelante denominado vector CD20L) mediante la modificación de las regiones génicas de VL del anticuerpo anti-CD98 humano preparado en el Ejemplo 6(1) en la VL derivada de anticuerpo anti-CD20 humano. Como genes de cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-CD20 humano, se utilizaron las mismas secuencias que las mostradas en (1), anteriormente indicado.

#### (4) Preparación de células de CHO que producen anticuerpo anti-CD20 humano

Con el fin de preparar células de CHO-K1 que produjesen anticuerpo anti-CD20 humano, se introdujeron en las células de CHO-K1 adaptadas para el cultivo en suspensión preparadas en el Ejemplo 3(1) (diseño de control) el vector en tándem CD20-CHX preparado en (1), anteriormente indicado, y el vector de expresión de la transposasa Tol2 (vector Tol2) preparado en el Ejemplo 2.

De la misma manera, el vector CD20H-CHX (10  $\mu$ g) y el vector CD20L (10  $\mu$ g) preparados en (2) y (3), anteriormente, se cotransfectaron en células de CHO-K1 junto con el vector Tol2 (10  $\mu$ g) (diseño experimental). Se comparó la presencia de células capaces de expresar a nivel elevado el anticuerpo mediante la realización de

la introducción génica, el cultivo celular y similares de la misma manera que en el Ejemplo 6, excepto en que el cultivo de las células con introducción génica se llevó a cabo en cinco placas de 96 pocillos. Además, se consideraron pocillos expresantes de anticuerpos las concentraciones de anticuerpos de 3,0 µg/ml o superior. Se muestran los resultados en la Tabla 8.

5

[Tabla 8]

	Diseño de control	Diseño experimental
	Número de pocillos en los que se expresa el anticuerpo	
Placa 1	2/96	4/96
Placa 2	2/96	9/96
Placa 3	4/96	4/96
Placa 4	1/96	8/96
Placa 5	2/96	5/96
Total	11/480	30/480

10 Como resultado, las células de CHO-K1 que habían sido cotransfectadas con vector CD20-H-CHX y vector CD20L mostraron 3 veces más células con nivel alto de expresión de anticuerpo anti-CD20 humano que las células de CHO-K1 en las que se había introducido el vector en tándem CD20-CHX.

15 Dicho resultado es similar al resultado de anticuerpo anti-CD98 humano y anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano del Ejemplo 6(3) o del Ejemplo 7(3) y muestra que la línea celular productora de un nivel elevado de anticuerpos puede obtenerse y producirse con facilidad para cada caso de anticuerpo al cotransfectar células de CHO en suspensión con vectores de expresión diferentes en los que se han integrado gen de cadena pesada de anticuerpo y gen de cadena ligera de anticuerpo, respectivamente, entre secuencias de transposón.

#### 20 (5) Cultivo de células de CHO que producen anticuerpo anti-CD20 humano

25 Las células que habían sido seleccionadas basándose en la resistencia a la cicloheximida a partir de las células en las que se había introducido el vector en tándem CD20-CHX obtenidas en (3), anteriormente, y las células que habían sido cotransfectadas con el vector CD20H-CHX y el vector CD20L, y que también expresaban el anticuerpo anti-CD20 humano, se seleccionaron y expandieron en cultivo utilizando una placa de 96 pocillos, una placa de 24 pocillos y una placa de 6 pocillos, en ese orden. Con respecto a las 4 líneas celulares del diseño de control, las células que pudieron expandirse en cultivo y las 50 líneas celulares del diseño experimental, se cultivaron de la misma manera que en el Ejemplo 6(4), excepto en que el periodo de cultivo era de 7 días, y se midieron sus niveles de expresión de anticuerpos. Se muestran los resultados en la figura 12.

30 Tal como se muestra en la figura 12, se reveló que las células de CHO-K1 que habían sido cotransfectadas con vector CD20H-CHX y vector CD20L presentaban una productividad de anticuerpos aproximadamente 1,6 veces superior que las células de CHO-K1 en las que se había introducido el vector en tándem CD20-CHX.

35 Dicho resultado es similar al resultado de anticuerpo anti-CD98 humano y anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano del Ejemplo 6(4) o del Ejemplo 7(5) y muestra que no sólo puede obtenerse y producirse con facilidad una línea celular productora de un nivel elevado de anticuerpos para cada caso de anticuerpo al cotransfectar células de CHO en suspensión con vectores de expresión diferentes en los que se han integrado gen de cadena pesada de anticuerpo y gen de cadena ligera de anticuerpo, respectivamente, entre secuencias de transposón, sino también las células obtenidas de esta manera presentan una elevada productividad de anticuerpos.

#### 40 [Ejemplo 9] Preparación de un vector transposón que expresa gen de resistencia a la neomicina y anticuerpo anti-CD98 humano

##### 45 (1) Preparación de un vector transposón que expresa gen de resistencia a neomicina de tipo salvaje y anticuerpo anti-CD98 humano

50 Se utilizó un plásmido que comprendía un casete de expresión génica para el uso en células de mamífero que comprendía un gen de anticuerpo humano arbitrario y un gen marcador de resistencia a fármaco insertados entre un par de secuencias de nucleótidos derivadas de Tol2 como vector plásmido para la expresión de proteínas.

55 El ADN del gen que debía utilizarse se obtuvo llevando a cabo una síntesis química de modo artificial basándose en la secuencia de nucleótidos conocida convencionalmente o mediante la preparación de cebadores de las dos secuencias terminales y llevando a cabo de esta manera una PCR utilizando una fuente de ADN apropiada. Para las manipulaciones génicas posteriores, se añadió un sitio de digestión con enzima de restricción al extremo del cebador.

En la secuencia de nucleótidos del transposón Tol2 no autónomo (SEC ID nº 1) dada a conocer en el documento nº JP-A-2003-235575, se utilizó una secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 200 (secuencia Tol2-L) (SEC

ID nº 2) y una secuencia de nucleótidos en las posiciones 2.285 a 2.788 (secuencia Tol2-R) (SEC ID nº 3) como las secuencias de transposón.

Se sintetizó un fragmento de ADN que comprendía la secuencia Tol2-R y la secuencia Tol2-L.

Se preparó un fragmento de ADN que incluía una secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 18) que codificaba la cadena H del anticuerpo bajo el control del promotor del CMV, amplificado basándose en el vector N5KG1-Val C2lgG1NS/1117L del anticuerpo anti-CD98 humano (patente japonesa nº 4324637), como casete génico de la cadena pesada del anticuerpo y se amplificó un fragmento de ADN que comprendía una secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 21) que codificaba la cadena ligera de anticuerpo bajo el control del promotor del SV40, amplificada basándose en el vector N5KG1-Val C2lgG1NS/1117L del anticuerpo anti-CD98 humano, como casete génico de la cadena ligera del anticuerpo.

Como casete génico de resistencia a la neomicina, se preparó un fragmento de ADN que comprendía un ADN que comprendía una secuencia de nucleótidos codificante de un gen de resistencia a la neomicina bajo el control del promotor del SV40 (un ADN que codifica una neomicina fosfotransferasa que consiste en la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 36 y GenBank nº de acceso U47120.2).

Se preparó un vector A de expresión del anticuerpo anti-CD98 mediante la conexión del casete de expresión génica de la cadena pesada del anticuerpo anteriormente indicado, el casete de expresión génica de la cadena ligera del anticuerpo y el casete de expresión génica de resistencia a la neomicina y conectando adicionalmente sus dos extremos con un fragmento de ADN que comprendía una secuencia Tol2-R y un fragmento de ADN que comprendía una secuencia Tol2-L (figura 13).

(2) Preparación de vector transposón de expresión de anticuerpo anti-CD98 humano que comprende un gen 1 de resistencia a neomicina de tipo modificado

Se preparó un vector transposón B de expresión de anticuerpo anti-CD98 humano en el que se había sustituido el gen de resistencia a neomicina del vector transposón A de expresión de anticuerpo anti-CD98 humano obtenido en (1) que comprendía un gen de resistencia a neomicina de tipo salvaje por un gen 1 de resistencia a neomicina de tipo modificado que comprendía la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 37.

El gen 1 de resistencia a neomicina de tipo modificado codifica una secuencia de aminoácidos idéntica a la del gen de resistencia a neomicina de tipo salvaje y fue modificada para que presentase una secuencia de nucleótidos en la que 167 bases correspondientes a 22% de la secuencia completa fuesen modificados. Específicamente, de entre el total de 32 residuos de leucina, se modificaron los codones correspondientes a 25 residuos de leucina para que fuesen TTA.

(3) Preparación de vector transposón de expresión de anticuerpo anti-CD98 humano que comprende un gen 2 de resistencia a neomicina de tipo modificado

Un vector transposón C de expresión de anticuerpo anti-CD98 humano en el que el gen de resistencia a neomicina del vector transposón A de expresión de anticuerpo anti-CD98 humano obtenido en (1) que comprende un gen de resistencia a neomicina de tipo salvaje fue sustituido por un gen 2 de resistencia a neomicina de tipo modificado que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 38.

El gen 2 de resistencia a neomicina de tipo modificado codificado por una secuencia de aminoácidos idéntica a la del gen de resistencia a neomicina de tipo salvaje y que presentaba una secuencia de nucleótidos en la que las 180 bases correspondientes a 23% del total habían sido modificados. Específicamente, de entre el total de 32 residuos de leucina, los codones correspondientes a 28 residuos de leucina se modificaron para ser TTA.

(4) Preparación de vector transposón de expresión de anticuerpo anti-CD98 humano que presenta un gen 3 de resistencia a neomicina de tipo modificado

Un vector transposón D de expresión de anticuerpo anti-CD98 humano en el que el gen de resistencia a neomicina del vector transposón A de expresión de anticuerpo anti-CD98 humano obtenido en (1) que comprende un gen de resistencia a neomicina de tipo salvaje fue sustituido por un gen 3 de resistencia a neomicina de tipo modificado que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 39.

El gen 3 de resistencia a neomicina de tipo modificado codificaba una secuencia de aminoácidos idéntica a la del gen de resistencia a neomicina de tipo salvaje y presentaba una secuencia de nucleótidos en la que 203 bases, correspondientes a 26% del total, habían sido modificados. Específicamente, de entre el total de 32 residuos de leucina, los codones correspondientes a 30 residuos de leucina se modificaron para ser TTA.

**[Ejemplo 10] Producción de anticuerpos por células de CHO productoras de anticuerpos que expresan un gen de resistencia a neomicina de tipo modificado**

5 Se prepararon las células A a D productoras de anticuerpos mediante la introducción en cada célula de los vectores transposones A a D de expresión de anticuerpo anti-CD98 humano preparados en los Ejemplos 9(1) a (4) en las células de CHO-K1 en suspensión junto con el vector pCAGGS-T2TP, que expresaba una transposasa Tol2 que comprendía la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID n° 40 [Kwakami K. y Noda T., Genetics 166:895-899, 2004].

10 La introducción de vectores en las células de CHO en suspensión se llevó a cabo mediante la suspensión de las células de CHO ( $4 \times 10^6$  células) en 400  $\mu$ l de tampón PBS y cotransfectando el vector transposón de expresión de anticuerpo anti-CD98 humano (10  $\mu$ g) y el vector de expresión de transposasa Tol2 pCAGGS-T2TP (20  $\mu$ g) directamente en forma de ADN circular mediante electroporación.

15 En dicho caso también se introdujo el vector de expresión de transposasa Tol2 directamente como ADN circular con el fin de expresar transitoriamente la transposasa Tol2.

20 Además, como control que no utilizaba transposasa Tol2, el vector transposón D de expresión del anticuerpo anti-CD98 humano (10  $\mu$ g) del Ejemplo 19(4) se linealizó utilizando el enzima de restricción PciI (TARA BIO INC.) y después se introdujo en las células de CHO-K1 en suspensión mediante electroporación.

25 La electroporación se llevó a cabo utilizando un electroporador [sistema Gene Pulser Xcell (fabricado por Bio-Rad)] bajo condiciones de voltaje de 300 V, capacidad electrostática de 500  $\mu$ F y a temperatura ambiente, utilizando una cubeta de 4 mm de anchura de hueco (fabricada por Bio-Rad).

Tras la introducción génica mediante electroporación, las células en cada cubeta fueron inoculadas en una placa de 96 pocillos y cultivadas durante 3 días en un incubador de CO<sub>2</sub> utilizando medio CD OptiCHO (Invitrogen) complementado con hidrolizado de soja al 5%.

30 A continuación, a partir del intercambio de medio 4 días después de la introducción génica, se llevó a cabo el cultivo en presencia de G418 (Geneticin®, Invitrogen), mediante la adición de G418 hasta proporcionar una concentración final de 500  $\mu$ g/ml, y se llevó a cabo el cultivo durante 3 semanas cambiando el medio a intervalos de una semana.

35 Tras el cultivo, se determinó la expresión del anticuerpo utilizando el ensayo LANCE® (Perkin-Elmer Corp.) mediante un procedimiento de tipo sándwich al que se aplicó FRET (transferencia de energía mediante resonancia de fluorescencia). Se muestran los resultados en la Tabla 9.

[Tabla 9]

40

	Células productoras de anticuerpos				Células de control
	A (tipo salvaje)	B (tipo modificado 1)	C (tipo modificado 2)	D (tipo modificado 3)	
Nivel de expresión de anticuerpos (mg/l) de células que mostraban la expresión máxima	0,5	2,0	1,6	5,1	-
Nivel de expresión medio de anticuerpos (mg/l) de las 10 células superiores	0,5	0,7	0,7	1,7	-

45 Tal como se muestra en la Tabla 9, los niveles de expresión de anticuerpo anti-CD98 humano de las células B a D que expresaban los genes de resistencia a neomicina de tipo modificado eran superiores a los de la célula A, que expresaba el gen de resistencia a neomicina de tipo salvaje.

50 En particular, en el caso de la célula D productora de anticuerpo anti-CD98 humano, que expresa el gen 3 de resistencia a neomicina de tipo modificado, se obtuvo una línea celular que mostraba un nivel de expresión 10 veces más elevado que el de la célula A productora de anticuerpo anti-CD98 humano, que expresa el gen de resistencia a neomicina de tipo salvaje.

Además, ni siquiera utilizando el gen 3 de resistencia a neomicina de tipo modificado, resultó posible obtener una célula que expresase el anticuerpo anti-CD98 humano a partir de células de control en las que no se había cotransfectado el vector de expresión de transposasa Tol2 a pesar de haber linealizado el vector.

**[Ejemplo 11] Preparación de vector transposón que expresa gen de resistencia a puromicina y anticuerpo anti-CD98 humano**5 (1) Preparación de vector transposón de expresión de anticuerpo anti-CD98 humano que comprende gen 1 de resistencia a puromicina de tipo modificado

Se preparó un vector transposón E de expresión de anticuerpo anti-CD98 humano en el que el gen de resistencia a neomicina del vector transposón A de expresión de anticuerpo anti-CD98 humano obtenido en el ejemplo 9(1) que comprendía el gen de resistencia a neomicina de tipo salvaje, se había sustituido por un gen 1 de resistencia a puromicina de tipo modificado consistente en la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 41.

El gen 1 de resistencia a puromicina de tipo modificada codificaba una secuencia de aminoácidos idéntica a la del gen de resistencia a puromicina de tipo salvaje que consistía en la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 42 (un gen de puromicín-N-acetiltransferasa que consiste en la secuencia de nucleótidos dada a conocer en GenBank nº de acceso U07648.1) y presentaba una secuencia de nucleótidos en la que 17 bases, correspondientes a 3% del total de bases, habían sido modificadas. Específicamente, de entre el total de 28 residuos de alanina contenidos en el gen de resistencia a puromicina, los codones correspondientes a 17 residuos de alanina habían sido modificados a GCG mediante la modificación y, junto con los codones que ya eran GCG en el tipo salvaje, los codones que correspondían a todos los residuos de alanina se modificaron a GCG.

25 (2) Preparación de vector transposón de expresión de anticuerpo anti-CD98 humano que comprende gen 2 de resistencia a puromicina de tipo modificado

Se preparó un vector transposón F de expresión de anticuerpo anti-CD98 humano en el que el gen de resistencia a neomicina del vector transposón A de expresión de anticuerpo anti-CD98 humano obtenido en el Ejemplo 9(1) que comprendía el gen de resistencia a neomicina de tipo salvaje se había sustituido por un gen 2 de resistencia a puromicina de tipo modificado que comprendía la secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 43. El gen 2 de resistencia a puromicina de tipo modificado codifica una secuencia de aminoácidos idéntica a la del gen de resistencia a puromicina de tipo salvaje y presenta una secuencia de nucleótidos en la que 79 bases correspondientes a 14% del total de bases han sido modificadas. Específicamente, además de la modificación de codones que corresponden a los residuos de alanina del gen 1 de resistencia a puromicina de tipo modificado, se modificaron los codones correspondientes a los residuos de leucina para que fuesen TTA, y los codones correspondientes a los residuos de valina se modificaron para que fuesen GTA y el codón de la serina se modificó para que fuese TCG.

**[Ejemplo 12] Producción de anticuerpos por células de CHO productoras de anticuerpos que expresan gen 1 de resistencia a puromicina de tipo modificado**

Se prepararon las células E y F productoras de anticuerpos mediante la introducción de vector transposón E de expresión de anticuerpo anti-CD98 humano del Ejemplo 11(1) que comprendía el gen 1 de resistencia a puromicina de tipo modificado, el vector transposón F de expresión de anticuerpo anti-CD98 humano del Ejemplo 11(2) que comprendía el gen 2 de resistencia a puromicina de tipo modificado y el vector de expresión de la transposasa Tol2 pCAGGS-T2TP en células de CHO-K1 en suspensión.

La introducción de los vectores en las células en suspensión se llevó a cabo mediante la suspensión de células de CHO en suspensión ( $4 \times 10^6$  células) en 400  $\mu$ l de tampón PBS y la cotransfección del vector transposón de expresión de anticuerpo anti-CD98 humano que comprendía el gen de resistencia a puromicina de tipo modificado en forma de ADN circular (10  $\mu$ g) y pCAGGS-T2TP (20  $\mu$ g) directamente mediante electroporación.

En dicho caso, el vector de expresión de la transposasa Tol2 pCAGGS-T2TP también se introdujo directamente en forma de ADN circular con el fin de expresar transitoriamente la transposasa Tol2.

La electroporación se llevó a cabo utilizando un electroporador [sistema Gene Pulser Xcell (fabricado por Bio-Rad)] bajo las condiciones de voltaje de 300 V, capacidad electrostática de 500  $\mu$ F y temperatura ambiente y utilizando una cubeta de 4 mm de anchura de hueco (fabricada por Bio-Rad).

Tras la introducción génica mediante electroporación, se inocularon las células de cada cubeta en una placa de 96 pocillos y se cultivaron durante 3 días en un incubador de CO<sub>2</sub> utilizando medio CD OptiCHO (Invitrogen) complementado con hidrolizado de soja al 5%.

A continuación, desde el intercambio de medio 2 días después de la introducción génica, se llevó a cabo el cultivo durante 4 semanas, añadiendo simultáneamente puromicina (P9620, Sigma-Aldrich), proporcionando una concentración final de 5  $\mu$ g/ml y realizando el intercambio de medio por el medio que contenía puromicina a intervalos de una semana.

Tras el cultivo, se determinó el nivel de expresión de anticuerpos utilizando el ensayo LANCE® (Perkin-Elmer Corp.) mediante un procedimiento de tipo sándwich al que se aplicó FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia). Se muestran los resultados en la Tabla 2.

5

[Tabla 10]

	Células productoras de anticuerpos	
	E (Modificación 1)	F (Modificación 2)
Nivel de expresión de anticuerpos (mg/l) de las células que mostraban la expresión máxima	1,0	2,2
Nivel medio de expresión de anticuerpos (mg/l) de las 10 células superiores	0,7	1,6

10 Tal como se muestra en la Tabla 10, la célula F productora de anticuerpos que expresaba el gen 2 de resistencia a puromicina de tipo modificada mostraba una productividad de anticuerpos dos veces superior o más a la de la célula E productora de anticuerpos que expresa el gen 1 de resistencia a puromicina de tipo modificado.

**[Ejemplo 13] Producción de anticuerpos por célula productora de anticuerpos que expresa gen 2 de resistencia a puromicina de tipo modificado**

15

La célula F productora de anticuerpos obtenida en el Ejemplo 12 que expresa el gen 2 de resistencia a puromicina de tipo modificado se cultivó en un matraz cónico para producir anticuerpo anti-CD98 humano.

20 Específicamente, la célula F productora de anticuerpos se expandió en cultivo utilizando una placa de 96 pocillos, una placa de 24 pocillos y una placa de 6 pocillos, en este orden. Se seleccionaron dos líneas celulares de la célula F productora de anticuerpos en la que se había incrementado suficientemente el número de células (línea celular 1 y línea celular 2) y cada una de ellas se suspendió en 35 ml del medio CD OptiCHO (Invitrogen) complementado con hidrolizado de soja al 5%, proporcionando una densidad celular de  $2 \times 10^5$  células/ml y se cultivaron durante 1 semana en un agitador utilizando un matraz cónico de 125 ml de capacidad (con tapón acodado, Corning Glassworks) en una atmósfera a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>, produciendo de esta manera el anticuerpo anti-CD98 humano.

25

Se determinó la cantidad de anticuerpo en el medio tras el cultivo mediante HPLC (Waters Associates, Inc.). Se muestran los resultados en la Tabla 11.

30

[Tabla 11]

	Línea celular 1	Línea celular 2
Nivel de expresión de anticuerpos (mg/l)	15,6	14,8

35 Los resultados anteriormente proporcionados muestran que en las células de CHO en suspensión, el gen de anticuerpo insertado entre un par de secuencias de transposón y el gen de resistencia a fármaco de tipo modificado son introducidos eficientemente en el cromosoma del huésped y también resultan eficaces para la selección de una célula de elevado nivel de expresión. Además, se ha encontrado que la célula obtenida de esta manera puede expandirse en cultivo y que resulta posible la producción de la proteína de interés bajo condiciones de cultivo en suspensión.

40

Mediante el procedimiento de producción de la proteína de la presente invención puede producirse eficientemente una proteína de interés utilizando una célula de mamífero en suspensión. La célula de la presente invención puede utilizarse como célula productora de anticuerpos para la producción de una proteína recombinante.

45

[Listado de secuencias]

SEC ID nº 1 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos de transposón no autónomo Tol2

SEC ID nº 2 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de Tol2-L

50

SEC ID nº 3 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de Tol2-R

SEC ID nº 7 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos de gen de resistencia a la cicloheximida

55

SEC ID nº 8 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de proteína codificante de gen de resistencia a la cicloheximida

- SEC ID nº 9 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos codificante de cadena H del anticuerpo M2Z3
- 5 SEC ID nº 10 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de la cadena H del anticuerpo M2Z3
- SEC ID nº 11 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos codificante de cadena L del anticuerpo M2Z3
- 10 SEC ID nº 12 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de cadena L del anticuerpo M2Z3  
SEC ID nº 13 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos de Tol1 no autónomo  
SEC ID nº 14 - Descripción de secuencia artificial: secuencia Tol1-L  
SEC ID nº 15 - Descripción de secuencia artificial: secuencia Tol1-R
- 15 SEC ID nº 18 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos codificante de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD98
- SEC ID nº 19 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CD98
- 20 SEC ID nº 20 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de anticuerpo anti-CD98
- SEC ID nº 21 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos codificante de región variable de cadena ligera de anticuerpo anti-CD98
- 25 SEC ID nº 22 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de anticuerpo anti-CD98
- SEC ID nº 23 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de anticuerpo anti-CD98
- 30 SEC ID nº 24 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos codificante de región variable de cadena pesada de anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano
- 35 SEC ID nº 25 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano
- SEC ID nº 26 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano
- 40 SEC ID nº 27 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos codificante de región variable de cadena ligera de anticuerpo anti-TNF $\alpha$
- SEC ID nº 28 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano
- 45 SEC ID nº 29 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano
- 50 SEC ID nº 30 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos codificante de región variable de cadena pesada de anticuerpo anti-CD20 humano
- SEC ID nº 31 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de anticuerpo anti-CD20 humano
- 55 SEC ID nº 32 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de anticuerpo anti-CD20 humano
- SEC ID nº 33 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos codificante de región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CD20 humano
- 60 SEC ID nº 34 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de anticuerpo anti-CD20 humano
- 65 SEC ID nº 35 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera

de anticuerpo anti-CD20 humano

SEC ID nº 36 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos de gen de resistencia a neomicina de tipo salvaje

5

SEC ID nº 37 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos de Gen de resistencia a neomicina de tipo modificado

SEC ID nº 38 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos de gen de resistencia a neomicina de tipo modificado

10

SEC ID nº 39 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos de gen de resistencia a neomicina de tipo modificado

SEC ID nº 41 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos de gen de resistencia a puromicina de tipo modificado

15

SEC ID nº 42 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos de gen de resistencia a puromicina de tipo salvaje

20

SEC ID nº 43 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos de gen de resistencia a puromicina de tipo modificado

SEC ID nº 44 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos de gen de resistencia a puromicina de tipo modificado

25

SEC ID nº 45 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos de gen de resistencia a zeocina de tipo modificado

SEC ID nº 46 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos de gen de resistencia a zeocina de tipo modificado

30

SEC ID nº 47 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos de gen de resistencia a higromicina de tipo modificado

35

SEC ID nº 48 - Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos de gen de resistencia a higromicina de tipo modificado

**Listado de secuencias**

40

<110> Inter-University Research Institute Corporation Research Organization of Information and Systems Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.

<120> Procedimiento de producción de una proteína

45

<130> W503694

<150> JP2010-279849

50

<151> 2010-12-15

<160> 48

<170> PatentIn versión 3.3

55

<210> 1

<211> 2788

<212> ADN

<213> Artificial

60

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: transposón no autólogo

<400> 1



ES 2 661 981 T3

cagaggtgta aagtacttga gtaatthttac ttgattactg tacttaagta ttatthtttg 60  
 ggatthtttac ttactttgag tacaattaaa aatcaataact tttactthta cttaattaca 120  
 tthttttaga aaaaaagta cthtttactc cttacaattt tathttacagt caaaaagtac 180  
 ttatthtttg gagatcactt cattctatth tcccttgcta ttaccaaacc aattgaattg 240  
 cgctgatgcc cagthtaatt taaatgttat ttattctgcc tatgaaaatc gthttcacat 300  
 tatatgaaat tggtcagaca tgttcattgg tccthtgga gtgacgtcat gtcacatcta 360  
 ttaccacaat gcacagcacc ttgacctgga aattaggga attataacag tcaatcagtg 420  
 gaagaaaatg gaggaagtat gtgattcatc agcagctgcg agcagcacag tccaaaatca 480  
 gccacaggat caagagcacc cgtggccgta tcttcgcgaa thctthttctt taagtgggtg 540  
 aaataaagat tcattcaaga tgaaatgtgt cctctgtctc ccgcttaata aagaaatac 600  
 ggccttcaaa agttcgccat caaacctaag gaagcatatt gaggtaagta cattaagtat 660  
 thtgthttac tgatagthtt thttthtttt thttthtttt thtttggtg tgcathttt 720  
 gacgttgatg gcgcgcctth tatatgtgta gtaggcctat thtactaat gcatgcgatt 780  
 gacaatataa ggctcacgta ataaaatgct aaaatgcatt tgtaattggt aacgttaggt 840  
 ccacgggaaa thtggcgcct attgcagctt tgaataatca ttatcattcc gtgctctcat 900  
 tgtgtttgaa thcatgcaaa acacaagaaa accaagcgag aaathttttt ccaaacatgt 960  
 tgtattgtca aaacggtaac actthacaat gaggttgatt agthcatgta ttaactaaca 1020  
 ttaaataacc atgagcaata catttgthac tgtatctgth aatctthgtt aacgttagth 1080

ES 2 661 981 T3

aatagaaata cagatgttca ttgtttgttc atgttagttc acagtgcatt aactaatggt 1140  
aacaagatat aaagtattag taaatgttga aattaacatg tatacgtgca gttcattatt 1200  
agttcatggt aactaatgta gttaactaac gaaccttatt gtaaaagtgt taccatcaaa 1260  
actaatgtaa tgaaatcaat tcaccctgtc atgtcagcct tacagtcctg tgtttttgtc 1320  
aatataatca gaaataaaat taatgtttga ttgtcactaa atgctactgt atttctaaaa 1380  
tcaacaagta tttaacatta taaagtgtgc aattggctgc aaatgtcagt tttattaaag 1440  
ggtttagttca cccaaaaatg aaaataatgt cattaatgac tcgccctcat gtcggtccaa 1500  
gcccgtgaaga cctccgttca tcttcagaac acagtttaag atattttaga tttagtccga 1560  
gagctttctg tgccctcatt gagaatgtat gtacggtata ctgtccatgt ccagaaaggt 1620  
aataaaaaca tcaaagtagt ccatgtgaca tcagtgggtt agttagaatt ttttgaagca 1680  
tcgaatacat tttggtccaa aaataacaaa acctacgact ttattcggca ttgtattctc 1740  
ttccgggtct gttgtcaatc cgggttcacg acttcgcagt gacgctacaa tgctgaataa 1800  
agtcgtaggt tttgttattt ttggacccaa atgtattttc gatgcttcaa ataattctac 1860  
ctaaccctact gatgtcacat ggactacttt gatgttttta ttaccttctt ggacatggac 1920  
agtataccgt acatacattt tcagtggagg gacagaaagc tctcggacta aatctaaaaat 1980  
atcttaaact gtgttccgaa gatgaacgga ggtgttacgg gcttggaacg acatgaggggt 2040  
gagtcattaa tgacatcttt tcatttttgg gtgaactaac cctttaatgc tgtaatcaga 2100  
gagtgtatgt gtaattgtta catttattgc atacaatata aatatttatt tgttgttttt 2160  
acagagaatg cacccaaatt acctcaaaaa ctactctaaa ttgacagcac agaagagaaa 2220  
gatcgggaca gatctcatat gctcggggc ccatctggcc tgtgtttcag acaccagga 2280  
gtctctgctc acgtttcctg ctatttgcag cctctctatc aagactaata cacctcttcc 2340  
cgcatcggct gcctgtgaga ggcttttcag cactgcagga ttgcttttca gccccaaaag 2400  
agctaggctt gacactaaca attttgagaa tcagcttcta ctgaagtaa atctgaggtt 2460  
ttacaacttt gagtagcgtg tactggcatt agattgtctg tcttatagtt tgataattaa 2520  
atacaaacag ttctaaagca ggataaaacc ttgtatgcat ttcatttaat gttttttgag 2580  
attaaaagct taaacaagaa tctctagttt tctttcttgc ttttactttt acttccttaa 2640  
tactcaagta caattttaat ggagtacttt tttactttta ctcaagtaag attctagcca 2700  
gatactttta cttttaattg agtaaaattt tccctaagta cttgtacttt cacttgagta 2760  
aaatttttga gtacttttta cacctctg 2788

<210> 2  
<211> 200  
<212> ADN  
<213> Artificial

5

<220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: secuencia de transposón Tol2-L

10

<400> 2



ES 2 661 981 T3

tgg ccg tat ctt cgc gaa ttc ttt tct tta agt ggt gta aat aaa gat	207
Trp Pro Tyr Leu Arg Glu Phe Phe Ser Leu Ser Gly Val Asn Lys Asp	
30 35 40	
tca ttc aag atg aaa tgt gtc ctc tgt ctc ccg ctt aat aaa gaa ata	255
Ser Phe Lys Met Lys Cys Val Leu Cys Leu Pro Leu Asn Lys Glu Ile	
45 50 55	
tcg gcc ttc aaa agt tcg cca tca aac cta agg aag cat att gag aga	303
Ser Ala Phe Lys Ser Ser Pro Ser Asn Leu Arg Lys His Ile Glu Arg	
60 65 70	
atg cac cca aat tac ctc aaa aac tac tct aaa ttg aca gca cag aag	351
Met His Pro Asn Tyr Leu Lys Asn Tyr Ser Lys Leu Thr Ala Gln Lys	
75 80 85	
aga aag atc ggg acc tcc acc cat gct tcc agc agt aag caa ctg aaa	399
Arg Lys Ile Gly Thr Ser Thr His Ala Ser Ser Ser Lys Gln Leu Lys	
90 95 100 105	
ggt gac tca gtt ttc cca gtc aaa cat gtg tct cca gtc act gtg aac	447
Val Asp Ser Val Phe Pro Val Lys His Val Ser Pro Val Thr Val Asn	
110 115 120	
aaa gct ata tta agg tac atc att caa gga ctt cat cct ttc agc act	495
Lys Ala Ile Leu Arg Tyr Ile Ile Gln Gly Leu His Pro Phe Ser Thr	
125 130 135	
ggt gat ctg cca tca ttt aaa gag ctg att agt aca ctg cag cct ggc	543
Val Asp Leu Pro Ser Phe Lys Glu Leu Ile Ser Thr Leu Gln Pro Gly	
140 145 150	
att tct gtc att aca agg cct act tta cgc tcc aag ata gct gaa gct	591
Ile Ser Val Ile Thr Arg Pro Thr Leu Arg Ser Lys Ile Ala Glu Ala	
155 160 165	
gct ctg atc atg aaa cag aaa gtg act gct gcc atg agt gaa gtt gaa	639
Ala Leu Ile Met Lys Gln Lys Val Thr Ala Ala Met Ser Glu Val Glu	
170 175 180 185	
tgg att gca acc aca acg gat tgt tgg act gca cgt aga aag tca ttc	687
Trp Ile Ala Thr Thr Asp Cys Trp Thr Ala Arg Arg Lys Ser Phe	
190 195 200	
att ggt gta act gct cac tgg atc aac cct gga agt ctt gaa aga cat	735
Ile Gly Val Thr Ala His Trp Ile Asn Pro Gly Ser Leu Glu Arg His	
205 210 215	
tcc gct gca ctt gcc tgc aaa aga tta atg ggc tct cat act ttt gag	783
Ser Ala Ala Leu Ala Cys Lys Arg Leu Met Gly Ser His Thr Phe Glu	
220 225 230	
gta ctg gcc agt gcc atg aat gat atc cac tca gag tat gaa ata cgt	831
Val Leu Ala Ser Ala Met Asn Asp Ile His Ser Glu Tyr Glu Ile Arg	
235 240 245	
gac aag gtt gtt tgc aca acc aca gac agt ggt tcc aac ttt atg aag	879
Asp Lys Val Val Cys Thr Thr Thr Asp Ser Gly Ser Asn Phe Met Lys	
250 255 260 265	
gct ttc aga gtt ttt ggt gtg gaa aac aat gat atc gag act gag gca	927
Ala Phe Arg Val Phe Gly Val Glu Asn Asn Asp Ile Glu Thr Glu Ala	

ES 2 661 981 T3

270										275					280							
aga	agg	tgt	gaa	agt	gat	gac	act	gat	tct	gaa	ggc	tgt	ggt	gag	gga							975
Arg	Arg	Cys	Glu	Ser	Asp	Asp	Thr	Asp	Ser	Glu	Gly	Cys	Gly	Glu	Gly							
			285						290				295									
agt	gat	ggt	gtg	gaa	ttc	caa	gat	gcc	tca	cga	gtc	ctg	gac	caa	gac							1023
Ser	Asp	Gly	Val	Glu	Phe	Gln	Asp	Ala	Ser	Arg	Val	Leu	Asp	Gln	Asp							
		300					305					310										
gat	ggc	ttc	gaa	ttc	cag	cta	cca	aaa	cat	caa	aag	tgt	gcc	tgt	cac							1071
Asp	Gly	Phe	Glu	Phe	Gln	Leu	Pro	Lys	His	Gln	Lys	Cys	Ala	Cys	His							
	315					320					325											
tta	ctt	aac	cta	gtc	tca	agc	gtt	gat	gcc	caa	aaa	gct	ctc	tca	aat							1119
Leu	Leu	Asn	Leu	Val	Ser	Ser	Val	Asp	Ala	Gln	Lys	Ala	Leu	Ser	Asn							
	330				335					340					345							
gaa	cac	tac	aag	aaa	ctc	tac	aga	tct	gtc	ttt	ggc	aaa	tgc	caa	gct							1167
Glu	His	Tyr	Lys	Lys	Leu	Tyr	Arg	Ser	Val	Phe	Gly	Lys	Cys	Gln	Ala							
				350					355					360								
tta	tgg	aat	aaa	agc	agc	cga	tcg	gct	cta	gca	gct	gaa	gct	gtt	gaa							1215
Leu	Trp	Asn	Lys	Ser	Ser	Arg	Ser	Ala	Leu	Ala	Ala	Glu	Ala	Val	Glu							
			365				370						375									
tca	gaa	agc	cgg	ctt	cag	ctt	tta	agg	cca	aac	caa	acg	cgg	tgg	aat							1263
Ser	Glu	Ser	Arg	Leu	Gln	Leu	Arg	Pro	Asn	Gln	Thr	Arg	Trp	Asn								
		380				385						390										
tca	act	ttt	atg	gct	gtt	gac	aga	att	ctt	caa	att	tgc	aaa	gaa	gca							1311
Ser	Thr	Phe	Met	Ala	Val	Asp	Arg	Ile	Leu	Gln	Ile	Cys	Lys	Glu	Ala							
		395			400						405											
gga	gaa	ggc	gca	ctt	cgg	aat	ata	tgc	acc	tct	ctt	gag	gtt	cca	atg							1359
Gly	Glu	Gly	Ala	Leu	Arg	Asn	Ile	Cys	Thr	Ser	Leu	Glu	Val	Pro	Met							
	410				415				420					425								
ttt	aat	cca	gca	gaa	atg	ctg	ttc	ttg	aca	gag	tgg	gcc	aac	aca	atg							1407
Phe	Asn	Pro	Ala	Glu	Met	Leu	Phe	Leu	Thr	Glu	Trp	Ala	Asn	Thr	Met							
			430					435						440								
cgt	cca	gtt	gca	aaa	gta	ctc	gac	atc	ttg	caa	gcg	gaa	acg	aat	aca							1455
Arg	Pro	Val	Ala	Lys	Val	Leu	Asp	Ile	Leu	Gln	Ala	Glu	Thr	Asn	Thr							
			445				450						455									
cag	ctg	ggg	tgg	ctg	ctg	cct	agt	gtc	cat	cag	tta	agc	ttg	aaa	ctt							1503
Gln	Leu	Gly	Trp	Leu	Leu	Pro	Ser	Val	His	Gln	Leu	Ser	Leu	Lys	Leu							
		460				465							470									
cag	cga	ctc	cac	cat	tct	ctc	agg	tac	tgt	gac	cca	ctt	gtg	gat	gcc							1551
Gln	Arg	Leu	His	His	Ser	Leu	Arg	Tyr	Cys	Asp	Pro	Leu	Val	Asp	Ala							
		475				480					485											
cta	caa	caa	gga	atc	caa	aca	cga	ttc	aag	cat	atg	ttt	gaa	gat	cct							1599
Leu	Gln	Gln	Gly	Ile	Gln	Thr	Arg	Phe	Lys	His	Met	Phe	Glu	Asp	Pro							
	490				495				500					505								
gag	atc	ata	gca	gct	gcc	atc	ctt	ctc	cct	aaa	ttt	cgg	acc	tct	tgg							1647
Glu	Ile	Ile	Ala	Ala	Ala	Ile	Leu	Leu	Pro	Lys	Phe	Arg	Thr	Ser	Trp							
			510					515						520								
aca	aat	gat	gaa	acc	atc	ata	aaa	cga	ggc	atg	gac	tac	atc	aga	gtg							1695

ES 2 661 981 T3

Thr Asn Asp Glu Thr Ile Ile Lys Arg Gly Met Asp Tyr Ile Arg Val  
525 530 535

cat ctg gag cct ttg gac cac aag aag gaa ttg gcc aac agt tca tct 1743  
His Leu Glu Pro Leu Asp His Lys Lys Glu Leu Ala Asn Ser Ser Ser  
540 545 550

gat gat gaa gat ttt ttc gct tct ttg aaa ccg aca aca cat gaa gcc 1791  
Asp Asp Glu Asp Phe Phe Ala Ser Leu Lys Pro Thr Thr His Glu Ala  
555 560 565

agc aaa gag ttg gat gga tat ctg gcc tgt gtt tca gac acc agg gag 1839  
Ser Lys Glu Leu Asp Gly Tyr Leu Ala Cys Val Ser Asp Thr Arg Glu  
570 575 580 585

tct ctg ctc acg ttt cct gct att tgc agc ctc tct atc aag act aat 1887  
Ser Leu Leu Thr Phe Pro Ala Ile Cys Ser Leu Ser Ile Lys Thr Asn  
590 595 600

aca cct ctt ccc gca tcg gct gcc tgt gag agg ctt ttc agc act gca 1935  
Thr Pro Leu Pro Ala Ser Ala Ala Cys Glu Arg Leu Phe Ser Thr Ala  
605 610 615

gga ttg ctt ttc agc ccc aaa aga gct agg ctt gac act aac aat ttt 1983  
Gly Leu Leu Phe Ser Pro Lys Arg Ala Arg Leu Asp Thr Asn Asn Phe  
620 625 630

gag aat cag ctt cta ctg aag tta aat ctg agg ttt tac aac ttt gag 2031  
Glu Asn Gln Leu Leu Leu Lys Leu Asn Leu Arg Phe Tyr Asn Phe Glu  
635 640 645

tag cgtgtactgg cattagattg tctgtcttat agtttgataa ttaaatacaa 2084

acagttctaa agcaggataa aaccttgtat gcatttcatt taatgttttt tgagattaaa 2144

agcttaaaca ag 2156

<210> 5  
<211> 649  
5 <212> PRT  
<213> Oryzias latipes

<400> 5  
Met Glu Glu Val Cys Asp Ser Ser Ala Ala Ala Ser Ser Thr Val Gln  
1 5 10 15

Asn Gln Pro Gln Asp Gln Glu His Pro Trp Pro Tyr Leu Arg Glu Phe  
20 25 30

Phe Ser Leu Ser Gly Val Asn Lys Asp Ser Phe Lys Met Lys Cys Val  
35 40 45

Leu Cys Leu Pro Leu Asn Lys Glu Ile Ser Ala Phe Lys Ser Ser Pro  
50 55 60

Ser Asn Leu Arg Lys His Ile Glu Arg Met His Pro Asn Tyr Leu Lys  
65 70 75 80

10

ES 2 661 981 T3

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





ES 2 661 981 T3

Leu Ala Cys Val Ser Asp Thr Arg Glu Ser Leu Leu Thr Phe Pro Ala  
 580 585 590

Ile Cys Ser Leu Ser Ile Lys Thr Asn Thr Pro Leu Pro Ala Ser Ala  
 595 600 605

Ala Cys Glu Arg Leu Phe Ser Thr Ala Gly Leu Leu Phe Ser Pro Lys  
 610 615 620

Arg Ala Arg Leu Asp Thr Asn Asn Phe Glu Asn Gln Leu Leu Leu Lys  
 625 630 635 640

Leu Asn Leu Arg Phe Tyr Asn Phe Glu  
 645

- <210> 6
- <211> 4682
- <212> ADN
- <213> *Oryzias latipes*

5

<400> 6  
 cagagtgta aagtacttga gtaatnttac ttgattactg tacttaagta ttatnttttg 60  
 ggatnttttac tttacttgag tacaattaaa aatcaataact tttactnttta cttaattaca 120  
 tntnttttaga aaaaaagta cttntttactc cttacaatntt tntttacagt caaaaagtac 180  
 ttatntttttg gagatcactt cattctatntt tcccttgcta ttaccaaacc aattgaattg 240  
 cgctgatgcc cagtttaatt taaatgntat ttatntctgcc tatgaaaatc gntnttcacat 300  
 tatatgaaat tggtcagaca tggntcattgg tcctnttgaa gtgacgtcat gtcacatcta 360  
 ttaccacaat gcacagcacc ttgacctgga aattagggaa attataacag tcaatcagtg 420  
 gaagaaaatg gaggaagtat gtgattcatc agcagctgcg agcagcacag tccaaaatca 480  
 gccacaggat caagagcacc cgtggccgta tcttcgcaa tntctnttctt taagtggntg 540  
 aaataaagat tcattcaaga tgaaatgntg cctctgntc ccgnttaata aagaaatac 600  
 ggccttcaaa agntcgccat caaacctaag gaagcatatnt gagntaagta cattaagtat 660  
 tntgnttttac tgatagntntt tntntntntnt tntntntntnt tntntggntg tgcatgntnt 720  
 gacgntgatg gcgcntcctnt tatatgntga gtaggcctat tntcactaat gcatgcntgnt 780  
 gacaataaa ggntcacgta ataaaatgnt aaaaatgnt tgtaattgnt aacgntagnt 840  
 ccacgggaaa tntggcgcct attgcagcct tgaataatca ttatcattcc gntgntcctat 900  
 tgtgnttgaa tntcatgcaaa acacaagaaa accaagcag aaatntntnt ccaaacatgnt 960  
 tgtatntgca aaacggntaac actnttacaat gagnttgant agntcatgta ttaactaaca 1020  
 ttaataaacc atgagcaata cntntgnttac tgtatctgnt aatctntgnt aacgntagnt 1080  
 aatagaata cagatgntca tntgntnttc atgntagntc acagntcatt aactaatgnt 1140

10

ES 2 661 981 T3

aacaagatat aaagtattag taaatgttga aattaacatg tatacgtgca gttcattatt 1200  
agttcatggt aactaatgta gttaactaac gaaccttatt gtaaaagtgt taccatcaaa 1260  
actaatgtaa tgaaatcaat tcaccctgtc atgtcagcct tacagtcctg tgtttttgtc 1320  
aatataatca gaataaaaat taatgtttga ttgtcactaa atgctactgt atttctaaaa 1380  
tcaacaagta tttaacatta taaagtgtgc aattggctgc aatgtcagt tttattaaag 1440  
ggttagtcca cccaaaaatg aaaataatgt cattaatgac tcgccctcat gtcggtccaa 1500  
gcccgtgaaga cctcogttca tcttcagaac acagtttaag atatttttaga tttagtccga 1560  
gagctttctg tgccctccatt gagaatgtat gtacggata ctgtccatgt ccagaaaggt 1620  
aataaaaaca tcaaagtagt ccatgtgaca tcagtgggtt agttagaatt ttttgaagca 1680  
tcgaatacat tttggtccaa aaataacaaa acctacgact ttattcggca ttgtattctc 1740  
ttccgggtct gttgtcaatc cgcgttcacg acttcgcagt gacgctaca tgctgaataa 1800  
agtcgtaggt tttgttattt ttggaccaa atgtattttc gatgcttcaa ataattctac 1860  
ctaaccctact gatgtcacat ggactacttt gatgttttta ttacctttct ggacatggac 1920  
agtataccgt acatacattt tcagtggagg gacagaaagc tctcggacta aatctaaaat 1980  
atcttaact gtgttccgaa gatgaacgga ggtgttacgg gcttgaacg acatgagggt 2040  
gagtcattaa tgacatcttt tcatttttgg gtgaactaac cctttaatgc tgtaatcaga 2100  
gagtgatagt gtaattgta catttattgc atacaatata aatatttatt tgttgttttt 2160  
acagagaatg cacccaaatt acctcaaaaa ctactctaaa ttgacagcac agaagagaaa 2220  
gatcgggacc tccaccctag cttccagcag taagcaactg aaagttgact cagttttccc 2280  
agtcaaacat gtgtctccag tcactgtgaa caaagctata ttaaggtaca tcattcaagg 2340  
acttcatect ttcagcactg ttgatctgcc atcattttaa gagctgatta gtacactgca 2400  
gcctggcatt tctgtcatta caaggcctac tttacgctcc aagatagctg aagctgctct 2460  
gatcatgaaa cagaaagtga ctgctgccat gagtgaagtt gaatggattg caaccacaac 2520  
ggattgttgg actgcacgta gaaagtcatt cattggtgta actgctcact ggatcaaccc 2580  
tggaagtctt gaaagacatt ccgctgcact tgccctgcaa agattaatgg gctctcatal 2640  
ttttgaggtg ctggccagtg ccatgaatga tatccactca gagtatgaaa tacgtgacaa 2700  
ggttgtttgc acaaccacag acagtgggtc caactttatg aaggctttca gagtttttgg 2760  
tgtggaaaac aatgatatcg agactgaggc aagaaggtgt gaaagtgatg aactgattc 2820  
tgaaggctgt ggtgagggaa gtgatgggtgt ggaattccaa gatgcctcac gagtcctgga 2880  
ccaagacgat ggcttcgaat tccagctacc aaaacatcaa aagtgtgcct gtcacttact 2940  
taacctagtc tcaagcgttg atgccccaaa agctctctca aatgaacact acaagaaact 3000

ES 2 661 981 T3

ctacagatct gtctttggca aatgccaagc tttatggaat aaaagcagcc gatcggctct 3060  
 agcagctgaa gctgttgaat cagaaaagcgg gcttcagctt ttaaggccaa accaaaacgcg 3120  
 gtggaattca acttttatgg ctggtgacag aattcttcaa atttgcaaag aagcaggaga 3180  
 agggcgcactt cggaatatat gcacctctct tgaggttcca atgtaagtgt tttcccctc 3240  
 tatcgatgta aacaaatgtg ggttggtttt gtttaatact ctttgattat gctgatttct 3300  
 cctgtaggtt taatccagca gaaatgctgt tcttgacaga gtgggccaac acaatgcgctc 3360  
 cagttgcaa aagtactcgac atcttgcaag cggaaaacgaa tacacagctg ggggtggctgc 3420  
 tgcctagtgt ccatcagtta agcttgaaac ttcagcgact ccaccattct ctcaggtact 3480  
 gtgacccact tgtggatgcc ctacaacaag gaatccaaac acgattcaag catatgtttg 3540  
 aagatcctga gatcatagca gctgccatcc ttctocctaa atttcggacc tcttgacaa 3600  
 atgatgaaac catcataaaa cgaggtaa atgaaagc aacatacact tgacgaattc 3660  
 taatctgggc aacctttgag ccataccaaa attattcttt tatttattta tttttgcaact 3720  
 ttttaggaat gttatatccc atctttggct gtgatctcaa tatgaatatt gatgtaaagt 3780  
 attcttgca caggtttag ttatccctca gtgttcttg aaaccaaact catatgtatc 3840  
 atatgtggtt tggaaatgca gttagatttt atgctaaaat aagggtttg catgatttta 3900  
 gatgtagatg actgcacgta aatgtagtta atgacaaaat ccataaaatt tgttcccagt 3960  
 cagaagcccc tcaaccaaac ttttctttgt gtctgtcac tgtgcttga ggcatggact 4020  
 acatcagagt gcatctggag cctttggacc acaagaagga attggccaac agttcatctg 4080  
 atgatgaaga ttttttcgct tctttgaaac cgacaacaca tgaagccagc aaagagttgg 4140  
 atggatatct ggctgtggtt tcagacacca gggagtctct gctcacgttt cctgctattt 4200  
 gcagcctctc tatcaagact aatacacctc ttcccgcatc ggctgcctgt gagaggcttt 4260  
 tcagcactgc aggattgctt ttcagcccca aaagagctag gcttgacact aacaattttg 4320  
 agaatcagct tctactgaag ttaaactgga ggttttacia ctttgagtag cgtgtactgg 4380  
 cattagattg tctgtcttat agtttgataa ttaaatacaa acagttctaa agcaggataa 4440  
 aaccttgtat gcatctcatt taatgttttt tgagattaaa agcttaacaa agaactctca 4500  
 gttttcttcc ttgcttttac ttttacttcc ttaatactca agtacaattt taatggagta 4560  
 cttttttact tttactcaag taagattcta gccagatact tttactttta attgagtaaa 4620  
 atttcccta agtacttgta ctttcacttg agtaaaattt ttgagtactt tttacacctc 4680  
 tg 4682

<210> 7  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: gen de resistencia a cicloheximida

10

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(321)

ES 2 661 981 T3

<400> 7  
atg gtc aac gta cct aaa acc cga aga acc ttc tgt aag aag tgt ggc 48  
Met Val Asn Val Pro Lys Thr Arg Arg Thr Phe Cys Lys Lys Cys Gly  
1 5 10 15  
aag cat cag cct cac aaa gtg aca cag tat aag aag ggc aag gat tct 96  
Lys His Gln Pro His Lys Val Thr Gln Tyr Lys Lys Gly Lys Asp Ser  
20 25 30  
ttg tat gcc cag gga agg agg cgc tat gat cgg aag cag agt ggc tat 144  
Leu Tyr Ala Gln Gly Arg Arg Arg Tyr Asp Arg Lys Gln Ser Gly Tyr  
35 40 45  
ggg ggg cag aca aag caa att ttc cgg aag aag gct aag acc aca aag 192  
Gly Gly Gln Thr Lys Gln Ile Phe Arg Lys Lys Ala Lys Thr Thr Lys  
50 55 60  
aag att gtg cta agg ctg gaa tgt gtt gag cct aac tgc aga tcc aag 240  
Lys Ile Val Leu Arg Leu Glu Cys Val Glu Pro Asn Cys Arg Ser Lys  
65 70 75 80  
agg atg ctg gcc att aag aga tgc aag cat ttt gaa ctg gga gga gat 288  
Arg Met Leu Ala Ile Lys Arg Cys Lys His Phe Glu Leu Gly Gly Asp  
85 90 95  
aag aag aga aag ggc caa gtg atc cag ttc taa 321  
Lys Lys Arg Lys Gly Gln Val Ile Gln Phe  
100 105

5 <210> 8  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Constructo sintético

<400> 8  
Met Val Asn Val Pro Lys Thr Arg Arg Thr Phe Cys Lys Lys Cys Gly  
1 5 10 15  
Lys His Gln Pro His Lys Val Thr Gln Tyr Lys Lys Gly Lys Asp Ser  
20 25 30  
Leu Tyr Ala Gln Gly Arg Arg Arg Tyr Asp Arg Lys Gln Ser Gly Tyr  
35 40 45  
Gly Gly Gln Thr Lys Gln Ile Phe Arg Lys Lys Ala Lys Thr Thr Lys  
50 55 60  
Lys Ile Val Leu Arg Leu Glu Cys Val Glu Pro Asn Cys Arg Ser Lys  
65 70 75 80  
Arg Met Leu Ala Ile Lys Arg Cys Lys His Phe Glu Leu Gly Gly Asp  
85 90 95  
Lys Lys Arg Lys Gly Gln Val Ile Gln Phe  
100 105

15 <210> 9  
<211> 1404  
<212> ADN  
20 <213> Artificial

ES 2 661 981 T3

<220>

<223> Cadena pesada de M2Z3

<220>

5 <221> CDS

<222> (1)..(1404)

<400> 9

atg gac tgg acc tgg agc atc ctt ttc ttg gtg gca gca gca aca ggt 48  
Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly  
1 5 10 15

gcc cac tcc cag gtt cag ctg gtg cag tct gga gct gag gtg aag aag 96  
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
20 25 30

cct ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct ggt tac acc ttt 144  
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
35 40 45

acc agc tat ggt atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192  
Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
50 55 60

gag tgg atg gga tgg atc agc gct tac aat ggt aac aca aac tat gca 240  
Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala  
65 70 75 80

cag aag ctc cag ggc aga gtc acc atg acc aca gac aca tcc acg agc 288  
Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser  
85 90 95

aca gcc tac atg gag ctg agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtg 336  
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val  
100 105 110

tat tac tgt gcg agg gca gca gct ggc gga tac ttc cag cac tgg ggc 384  
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Phe Gln His Trp Gly  
115 120 125

cag ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc acc aag ggc cca tcg 432  
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
130 135 140

10

ES 2 661 981 T3

gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala 145 150 155 160	480
gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val 165 170 175	528
tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala 180 185 190	576
gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val 195 200 205	624
ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His 210 215 220	672
aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys 225 230 235 240	720
gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly 245 250 255	768
gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met 260 265 270	816
atc tcc ccg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His 275 280 285	864
gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val 290 295 300	912
cat aat gcc aag aca aag ccg ccg gag gag cag tac aac agc acg tac His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr 305 310 315 320	960
cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly 325 330 335	1008
aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile 340 345 350	1056
gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val 355 360 365	1104
tac acc ctg ccc cca tcc ccg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser 370 375 380	1152
ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu	1200



ES 2 661 981 T3

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
 145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser



ES 2 661 981 T3

370

375

380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
450 455 460

Pro Gly Lys  
465

<210> 11  
<211> 708  
5 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> Cadena ligera de M2Z3

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(708)

15 <400> 11

atg gcc agc ttc cct ctc ctc ctc acc ctc ctc act cac tgt gca ggg	48
Met Ala Ser Phe Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Thr His Cys Ala Gly	
1 5 10 15	
tcc tgg gcc cag tct gtg ctg act cag cca ccc tca gcg tct ggg acc	96
Ser Trp Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr	
20 25 30	
ccc ggg cag agg gtc acc atc tct tgt tct gga agc aac tcc aac atc	144
Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile	
35 40 45	
gga agt aaa act gta aac tgg tac cag cag ctc cca gga acg gcc ccc	192
Gly Ser Lys Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro	
50 55 60	
aaa ctc ctc atc tct agt aat aat cag cgg ccc tca ggg gtc cct gac	240
Lys Leu Leu Ile Ser Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp	
65 70 75 80	
cga ttc tct ggc tcc aag tct ggc acc tca gcc tcc ctg gcc atc agt	288
Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser	



ES 2 661 981 T3

Lys Leu Leu Ile Ser Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp  
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser  
85 90 95

Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp  
100 105 110

Asp Ser Leu Asn Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val  
115 120 125

Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser  
130 135 140

Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser  
145 150 155 160

Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser  
165 170 175

Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn  
180 185 190

Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp  
195 200 205

Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr  
210 215 220

Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
225 230 235

<210> 13  
<211> 1855  
5 <212> ADN  
<213> artificial

<220>  
10 <223> transposón Tol1 no autólogo

<400> 13  
cagtagcggg tctaggcacg ggccgtccgg gcggtggcct ggggcgaaa actgaagggg 60  
ggcggcaccg gcggtcagc cctttgtaat atattaatat gcaccactat tggtttactt 120  
atgtcacagt ttgtaagttt gtaacagcct gaacctggcc gcgccgccgc cctcgccccg 180  
cagctgcgct ctctgtctt tgagaagtag acacaaatgt gtgtgaagaa ggagaagggg 240

ES 2 661 981 T3

gggggcgcgg ggtgagcacg gagcgtcgcc gcgtttgcgc atgcgcaaaa cctggctggc 300  
 tcatctttca ggggagggca cggtcgcggg cttgatgaaa aaaataaaaag taaaaactgc 360  
 gactgcgcgcg tcatgtagcg aatcagcgcc cctggctgta gctgcacgcg ctctctgctgg 420  
 aatgtgtga agaggggggg gggggggggg gctgcgggga atcagttcaa ttgtgggacg 480  
 cttccaaatt aagtggctag gtggggacaa gggcgggggt ttgaatctac ttcataaaac 540  
 ctttttata tataagtcag tcataaggtg acattctata acctacattt taataaaggt 600  
 ataaaaata tattctgctt tttttgggtt aattttgtgt gaaatgtcca aataaaaaaa 660  
 atggcaaac aaacaatgc tgtcactaag gtgacagttg gttcagtcga cggacttgat 720  
 gccttcttcg tgacgtgagc acatttatgc caaacaacg ccaataaaca tctaaaaat 780  
 ggaaaagaaa aggtcaaagc catctggtgc ccaatttaga aagaaaagaa aagaagaaga 840  
 ggagaaaaga gataaagaaa agggtaagtc ctacacagctt gatgcatgtt ttttctaaat 900  
 tctaattgta cctgcctac aacaacgttg ccgatgaaa ctttattttg gtcgatgacc 960  
 aacctgaat taggccaaa tgttgcaaat agcgtcattt tttttttttt ttttagattt 1020  
 tattcttaaa aatttgctct gccttaactt gtaacattag ttatgattca tgtgtctgtc 1080  
 tgctctgctg taacacaaag gttttgttg gttttgctgt tgtatactag ctcataatgt 1140  
 taaaaagct gtgatggta cacagcatgc tggctgctgcc ataagatgct aatggggcaa 1200  
 ataatttgag attggtcatt aatttaataa tcatttggg cagcctaac gttttcacia 1260  
 tgtttttttg acatttaact ggggatttag gggtaattt tgagcctgca tatgaagttt 1320  
 attttttatt tgttttacia atgtgggatt atatttttag ccaatagaat ttccataaat 1380  
 ctgtaggtag ttttaaaat gaatatttac catttactgc aactctatgg ggacaaaaca 1440  
 taatgtaaca ggtcataact aaaaatgtgc caatcaaagg attgaagacg gaaaacatga 1500  
 gttaattttt cttctctgaa gtagagatog atatagaaca tgacaattta aatttccaat 1560  
 tcataaatgt ttttaaaata tttattttat attatttatt taacattgag tttgattcaa 1620  
 tattttctta gctaactgta tttttgcat gcttatggtc ttttattttt tgtgttctga 1680  
 taacttttat aatgcttttc agaattttga catcttttgt atccacttct taatttcaat 1740  
 gacaataaaa catttcagtt gacgaagaca acaaaagttc tgttgtgact atgggggggg 1800  
 ggggcgcctg gggatggtct cgcccgggga gtaattcagc gtagaacccg cactg 1855

<210> 14  
 <211> 200  
 <212> ADN  
 <213> artificial

5

<220>  
 <223> secuencia de transposón Tol1-L

10

<400> 14  
 cagtgcgggt tctaggcacg ggccgtccgg gcggtggcct ggggcggaaa actgaagggg 60  
 ggcggcaccg gcggtcagc cctttgtaat atattaatat gcaccactat tggtttactt 120  
 atgtcacagt ttgtaagttt gtaacagcct gaacctggcc gcgccgccgc cctcgccccg 180  
 cagctgcgct ctctgtctt 200

ES 2 661 981 T3

<210> 15  
 <211> 505  
 <212> ADN  
 <213> artificial

5

<220>  
 <223> secuencia de transposón Tol1-R

<400> 15  
 atatttttag ccaatagaat ttccataaat ctgtaggtag ttttaaaaat gaatatttac 60  
 catttactgc aactctatgg ggacaaaaca taatgtaaca ggtcataact aaaaatgtgc 120  
 caatcaaagg attgaagacg gaaaacatga gttaatTTTT cttctctgaa gtagagatcg 180  
 atatagaaca tgacaattta aatttccaat tcataaatgt ttttaaaata tttattttat 240  
 attattttatt taacattgag tttgattcaa tattttctta gctaactgta tttttgccat 300  
 gcttatggtc ttttattttt tgtgttctga taacttttat aatgcttttc agaattttga 360  
 catcttttgt atccacttct taatttcaat gacaataaaa catttcagtt gacgaagaca 420  
 aacaaagttc tgttgtgact atgggggggg ggggcgcctg gggatggtct cgccccggga 480  
 10 gtaattcagg gtagaacgc cactg 505

<210> 16  
 <211> 2745  
 <212> ADN  
 15 <213> Oryzias latipes

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (30)..(2585)

20

<400> 16  
 gccaaacaaa cgccaaaac atctaaaat atg gag aaa aaa agg tca aag cca 53  
 Met Glu Lys Lys Arg Ser Lys Pro  
 1 5  
 tct ggt gcc caa ttt aga aag aaa aga aaa gaa gaa gag gag aaa aga 101  
 Ser Gly Ala Gln Phe Arg Lys Lys Arg Lys Glu Glu Glu Glu Lys Arg  
 10 15 20  
 gat aaa gaa aag ggg gca ctt cta aga tat ttt gga tcg tct acc act 149  
 Asp Lys Glu Lys Gly Ala Leu Leu Arg Tyr Phe Gly Ser Ser Thr Thr  
 25 30 35 40  
 gct caa gat gag aca tct acc tcc ctg cca gct atc tca tca gcc aca 197  
 Ala Gln Asp Glu Thr Ser Thr Ser Leu Pro Ala Ile Ser Ser Ala Thr



ES 2 661 981 T3

Thr	Ser	Ser	Asn	Gly	Asn	Phe	Leu	Lys	Glu	Val	Glu	Leu	Met	Ala	Arg		
			300					305					310				
ttt	gat	ccc	ata	atg	aaa	gat	cat	ctt	aac	cgt	gta	tta	aga	gga	aca	1013	
Phe	Asp	Pro	Ile	Met	Lys	Asp	His	Leu	Asn	Arg	Val	Leu	Arg	Gly	Thr		
		315					320					325					
gca	agt	cac	aac	agc	tac	ata	ggc	cat	cat	gtg	cag	aat	gaa	ctt	att	1061	
Ala	Ser	His	Asn	Ser	Tyr	Ile	Gly	His	His	Val	Gln	Asn	Glu	Leu	Ile		
	330					335					340						
gat	ttg	ttg	agc	agc	aaa	atc	cta	tcc	gct	ata	gtg	gat	gac	atc	aaa	1109	
Asp	Leu	Leu	Ser	Ser	Lys	Ile	Leu	Ser	Ala	Ile	Val	Asp	Asp	Ile	Lys		
	345				350					355					360		
aag	gca	aaa	tat	ttt	tca	ata	att	ctg	gac	tgc	act	ctg	gat	ata	agc	1157	
Lys	Ala	Lys	Tyr	Phe	Ser	Ile	Ile	Leu	Asp	Cys	Thr	Leu	Asp	Ile	Ser		
			365						370					375			
cac	aca	gaa	cag	ttg	tca	gtt	ata	att	aga	gtg	gtg	tca	ctg	atg	gag	1205	
His	Thr	Glu	Gln	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Val	Val	Ser	Leu	Met	Glu			
			380					385					390				
aag	cct	cag	atc	agg	gaa	cat	ttt	atg	ggg	ttt	ttg	gag	gca	gag	gag	1253	
Lys	Pro	Gln	Ile	Arg	Glu	His	Phe	Met	Gly	Phe	Leu	Glu	Ala	Glu	Glu		
		395					400					405					
tcc	aca	ggc	cag	cac	ttg	gca	tcc	atg	atc	tta	aac	aga	ctt	gag	gag	1301	
Ser	Thr	Gly	Gln	His	Leu	Ala	Ser	Met	Ile	Leu	Asn	Arg	Leu	Glu	Glu		
	410					415					420						
tta	gga	att	tct	ttt	gaa	gac	tgc	aga	gga	caa	tca	tat	gat	aat	ggg	1349	
Leu	Gly	Ile	Ser	Phe	Glu	Asp	Cys	Arg	Gly	Gln	Ser	Tyr	Asp	Asn	Gly		
	425				430					435					440		
gca	aat	atg	aaa	ggc	aaa	aat	aag	gga	gta	caa	gcc	agg	ctc	tta	gaa	1397	
Ala	Asn	Met	Lys	Gly	Lys	Asn	Lys	Gly	Val	Gln	Ala	Arg	Leu	Leu	Glu		
			445					450						455			
aag	aat	ccc	cgt	gct	ctg	ttt	ttg	cca	tgc	ggt	gca	cac	aca	ttg	aat	1445	
Lys	Asn	Pro	Arg	Ala	Leu	Phe	Leu	Pro	Cys	Gly	Ala	His	Thr	Leu	Asn		
		460						465					470				
tta	gtt	gtg	tgt	gat	gct	gct	aag	aga	tct	gtt	gat	gct	atg	agc	tac	1493	
Leu	Val	Val	Cys	Asp	Ala	Ala	Lys	Arg	Ser	Val	Asp	Ala	Met	Ser	Tyr		
		475					480					485					
ttt	ggt	gtc	ctg	caa	aag	ctt	tac	act	tta	ttt	tca	gcc	tct	gcc	caa	1541	
Phe	Gly	Val	Leu	Gln	Lys	Leu	Tyr	Thr	Leu	Phe	Ser	Ala	Ser	Ala	Gln		
	490					495					500						
cga	tgg	gcc	ata	ctg	aag	agt	cag	gtg	agc	atc	act	cta	aag	tcg	tgg	1589	
Arg	Trp	Ala	Ile	Leu	Lys	Ser	Gln	Val	Ser	Ile	Thr	Leu	Lys	Ser	Trp		
	505				510					515					520		
aca	gaa	aca	agg	tgg	gag	agc	aaa	atc	aaa	agc	atc	gag	ccc	atg	agg	1637	
Thr	Glu	Thr	Arg	Trp	Glu	Ser	Lys	Ile	Lys	Ser	Ile	Glu	Pro	Met	Arg		
			525						530					535			
tac	cag	gga	gct	gca	gtg	aga	gag	gct	tta	ata	gaa	gtg	aga	gac	aag	1685	
Tyr	Gln	Gly	Ala	Ala	Val	Arg	Glu	Ala	Leu	Ile	Glu	Val	Arg	Asp	Lys		
			540					545						550			

ES 2 661 981 T3

acc aaa gac cca gtt ata aag gct gag gcc cag tct ttg tct gaa gag	1733
Thr Lys Asp Pro Val Ile Lys Ala Glu Ala Gln Ser Leu Ser Glu Glu	
555 560 565	
gta ggg tcg tac cgc ttc aac atc tgc aca gtc gta tgg cat gac att	1781
Val Gly Ser Tyr Arg Phe Asn Ile Cys Thr Val Val Trp His Asp Ile	
570 575 580	
cta tct aca ata aag cat gtc agc aaa ctc atg cag tct cca aat atg	1829
Leu Ser Thr Ile Lys His Val Ser Lys Leu Met Gln Ser Pro Asn Met	
585 590 595 600	
cat gtg gac cta gct gtg agt ctt ttg aag aag act gaa caa agt ctc	1877
His Val Asp Leu Ala Val Ser Leu Leu Lys Lys Thr Glu Gln Ser Leu	
605 610 615	
cag agc tac agg gca aat ggc ttt gtg aat gca cag atg gca gcc aaa	1925
Gln Ser Tyr Arg Ala Asn Gly Phe Val Asn Ala Gln Met Ala Ala Lys	
620 625 630	
gaa atg tgc aag gaa atg aat gtc gag gct att ttg aaa caa aaa aga	1973
Glu Met Cys Lys Glu Met Asn Val Glu Ala Ile Leu Lys Gln Lys Arg	
635 640 645	
ata aga tcc aca aag tgc caa ttc tcg tat gaa tca cac gat gag cct	2021
Ile Arg Ser Thr Lys Cys Gln Phe Ser Tyr Glu Ser His Asp Glu Pro	
650 655 660	
ttc agt gac gca ctt aaa aag ttg gag gtt gaa ttt ttc aat gtt gtt	2069
Phe Ser Asp Ala Leu Lys Lys Leu Glu Val Glu Phe Phe Asn Val Val	
665 670 675 680	
gtt gat gaa gcc ttg tca gcc atc gcg gag agg ttt tcc aca ttg gaa	2117
Val Asp Glu Ala Leu Ser Ala Ile Ala Glu Arg Phe Ser Thr Leu Glu	
685 690 695	
gtt gta caa aac aga ttt ggg gtt ttg acc aat ttc cca agc ctt gga	2165
Val Val Gln Asn Arg Phe Gly Val Leu Thr Asn Phe Pro Ser Leu Gly	
700 705 710	
gac gag gag ctg acg gag caa tgc gag gca cta ggc aac ata ctc cat	2213
Asp Glu Glu Leu Thr Glu Gln Cys Glu Ala Leu Gly Asn Ile Leu His	
715 720 725	
ttt gag aag aac tgg gat ttg gac agt aga gag ctt gtt cag gaa atc	2261
Phe Glu Lys Asn Trp Asp Leu Asp Ser Arg Glu Leu Val Gln Glu Ile	
730 735 740	
aag aac ttg cct aac tta cca tca acg act cca agt ctc ctt gag ctc	2309
Lys Asn Leu Pro Asn Leu Pro Ser Thr Thr Pro Ser Leu Leu Glu Leu	
745 750 755 760	
atc tct ttc atg tct gat aag gat cta tca gaa atc tat ccg aac ttt	2357
Ile Ser Phe Met Ser Asp Lys Asp Leu Ser Glu Ile Tyr Pro Asn Phe	
765 770 775	
tgg act gct ctc agg att gca ctc acc ttg cca gtc act gtg gct caa	2405
Trp Thr Ala Leu Arg Ile Ala Leu Thr Leu Pro Val Thr Val Ala Gln	
780 785 790	
gca gag agg agc ttt tca aaa cta aaa ttg atc aag tcg tac ctg agg	2453
Ala Glu Arg Ser Phe Ser Lys Leu Lys Leu Ile Lys Ser Tyr Leu Arg	
795 800 805	



ES 2 661 981 T3

tca aca atg tca cag gag cga ctc act aac ctt gcc gtt gtt agc atc 2501  
 Ser Thr Met Ser Gln Glu Arg Leu Thr Asn Leu Ala Val Val Ser Ile  
 810 815 820

aat cac tca gta ggg gag cag ata tca tat gat gat gtt att gac gag 2549  
 Asn His Ser Val Gly Glu Gln Ile Ser Tyr Asp Asp Val Ile Asp Glu  
 825 830 835 840

ttt gca tca aga aag gct agg aag gtt agg ttt tag ttggtgtttt 2595  
 Phe Ala Ser Arg Lys Ala Arg Lys Val Arg Phe  
 845 850

ctgttattgt attggtgctg cagttatatt tatttttagcg tgcatttgt gtgataaaag 2655

gtttgtgctt tataatatatt attttatatt atttattcaa tattgagttt gattcaatat 2715

tttcttagct aactgtatatt ttgccatgct 2745

<210> 17

<211> 851

5 <212> PRT

<213> *Oryzias latipes*

<400> 17

Met Glu Lys Lys Arg Ser Lys Pro Ser Gly Ala Gln Phe Arg Lys Lys  
 1 5 10 15

Arg Lys Glu Glu Glu Lys Arg Asp Lys Glu Lys Gly Ala Leu Leu  
 20 25 30

Arg Tyr Phe Gly Ser Ser Thr Thr Ala Gln Asp Glu Thr Ser Thr Ser  
 35 40 45

Leu Pro Ala Ile Ser Ser Ala Thr Val Thr Val Ser Pro Pro Gln Asp  
 50 55 60

Glu Leu Pro Ser Thr Ser Ser Ala Thr His Val Val Pro Gln Leu Leu  
 65 70 75 80

Pro Glu Gln Ser Phe Asp Ser Glu Ala Glu Asp Val Val Pro Ser Thr  
 85 90 95

Ser Thr Gln Leu Glu Thr Ser Glu Met Pro Gly Asp Glu Thr Pro Leu  
 100 105 110

Thr Pro Thr Ala Glu Asp Gln Pro Leu Pro Thr Asp Pro Ala Lys Trp  
 115 120 125

Pro Ser Pro Leu Thr Asp Arg Ile Arg Met Glu Leu Val Arg Arg Gly  
 130 135 140

10

ES 2 661 981 T3

Pro Ser Ser Ile Pro Pro Asp Phe Val Phe Pro Arg Asn Asp Ser Asp  
 145 150 155 160  
 Gly Arg Ser Cys His His His Tyr Phe Arg Lys Thr Leu Val Ser Gly  
 165 170 175  
 Glu Lys Ile Ala Arg Thr Trp Leu Met Tyr Ser Lys Val Lys Asn Ser  
 180 185 190  
 Leu Phe Cys Phe Cys Cys Lys Leu Phe Ser Asn Lys Asn Ile Asn Leu  
 195 200 205  
 Thr Thr Ser Gly Thr Ala Asn Trp Lys His Ala Ser Thr Tyr Leu Thr  
 210 215 220  
 Ala His Glu Lys Ser Pro Glu His Leu Asn Cys Met Lys Ala Trp Lys  
 225 230 235 240  
 Glu Leu Ser Gly Arg Ile Arg Ser Gly Lys Thr Ile Asp Lys Gln Glu  
 245 250 255  
 Met Ala Leu Leu Glu Glu Glu Arg Val Arg Trp Arg Ala Val Leu Thr  
 260 265 270  
 Arg Leu Ile Ala Ile Val Gln Ser Leu Ala Val Arg Asn Leu Ala Leu  
 275 280 285  
 Arg Gly His Thr Glu Thr Leu Phe Thr Ser Ser Asn Gly Asn Phe Leu  
 290 295 300  
 Lys Glu Val Glu Leu Met Ala Arg Phe Asp Pro Ile Met Lys Asp His  
 305 310 315 320  
 Leu Asn Arg Val Leu Arg Gly Thr Ala Ser His Asn Ser Tyr Ile Gly  
 325 330 335  
 His His Val Gln Asn Glu Leu Ile Asp Leu Leu Ser Ser Lys Ile Leu  
 340 345 350  
 Ser Ala Ile Val Asp Asp Ile Lys Lys Ala Lys Tyr Phe Ser Ile Ile  
 355 360 365  
 Leu Asp Cys Thr Leu Asp Ile Ser His Thr Glu Gln Leu Ser Val Ile  
 370 375 380  
 Ile Arg Val Val Ser Leu Met Glu Lys Pro Gln Ile Arg Glu His Phe  
 385 390 395 400

ES 2 661 981 T3

Met Gly Phe Leu Glu Ala Glu Glu Ser Thr Gly Gln His Leu Ala Ser  
 405 410 415

Met Ile Leu Asn Arg Leu Glu Glu Leu Gly Ile Ser Phe Glu Asp Cys  
 420 425 430

Arg Gly Gln Ser Tyr Asp Asn Gly Ala Asn Met Lys Gly Lys Asn Lys  
 435 440 445

Gly Val Gln Ala Arg Leu Leu Glu Lys Asn Pro Arg Ala Leu Phe Leu  
 450 455 460

Pro Cys Gly Ala His Thr Leu Asn Leu Val Val Cys Asp Ala Ala Lys  
 465 470 475 480

Arg Ser Val Asp Ala Met Ser Tyr Phe Gly Val Leu Gln Lys Leu Tyr  
 485 490 495

Thr Leu Phe Ser Ala Ser Ala Gln Arg Trp Ala Ile Leu Lys Ser Gln  
 500 505 510

Val Ser Ile Thr Leu Lys Ser Trp Thr Glu Thr Arg Trp Glu Ser Lys  
 515 520 525

Ile Lys Ser Ile Glu Pro Met Arg Tyr Gln Gly Ala Ala Val Arg Glu  
 530 535 540

Ala Leu Ile Glu Val Arg Asp Lys Thr Lys Asp Pro Val Ile Lys Ala  
 545 550 555 560

Glu Ala Gln Ser Leu Ser Glu Glu Val Gly Ser Tyr Arg Phe Asn Ile  
 565 570 575

Cys Thr Val Val Trp His Asp Ile Leu Ser Thr Ile Lys His Val Ser  
 580 585 590

Lys Leu Met Gln Ser Pro Asn Met His Val Asp Leu Ala Val Ser Leu  
 595 600 605

Leu Lys Lys Thr Glu Gln Ser Leu Gln Ser Tyr Arg Ala Asn Gly Phe  
 610 615 620

Val Asn Ala Gln Met Ala Ala Lys Glu Met Cys Lys Glu Met Asn Val  
 625 630 635 640

Glu Ala Ile Leu Lys Gln Lys Arg Ile Arg Ser Thr Lys Cys Gln Phe  
 645 650 655

ES 2 661 981 T3

Ser Tyr Glu Ser His Asp Glu Pro Phe Ser Asp Ala Leu Lys Lys Leu  
 660 665 670

Glu Val Glu Phe Phe Asn Val Val Val Asp Glu Ala Leu Ser Ala Ile  
 675 680 685

Ala Glu Arg Phe Ser Thr Leu Glu Val Val Gln Asn Arg Phe Gly Val  
 690 695 700

Leu Thr Asn Phe Pro Ser Leu Gly Asp Glu Glu Leu Thr Glu Gln Cys  
 705 710 715 720

Glu Ala Leu Gly Asn Ile Leu His Phe Glu Lys Asn Trp Asp Leu Asp  
 725 730 735

Ser Arg Glu Leu Val Gln Glu Ile Lys Asn Leu Pro Asn Leu Pro Ser  
 740 745 750

Thr Thr Pro Ser Leu Leu Glu Leu Ile Ser Phe Met Ser Asp Lys Asp  
 755 760 765

Leu Ser Glu Ile Tyr Pro Asn Phe Trp Thr Ala Leu Arg Ile Ala Leu  
 770 775 780

Thr Leu Pro Val Thr Val Ala Gln Ala Glu Arg Ser Phe Ser Lys Leu  
 785 790 795 800

Lys Leu Ile Lys Ser Tyr Leu Arg Ser Thr Met Ser Gln Glu Arg Leu  
 805 810 815

Thr Asn Leu Ala Val Val Ser Ile Asn His Ser Val Gly Glu Gln Ile  
 820 825 830

Ser Tyr Asp Asp Val Ile Asp Glu Phe Ala Ser Arg Lys Ala Arg Lys  
 835 840 845

Val Arg Phe  
 850

- <210> 18
- <211> 417
- 5 <212> ADN
- <213> Artificial

- <220>
- 10 <223> Descripción de la secuencia artificial: región VH del anticuerpo anti-CD98

- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(417)

- 15 <400> 18

ES 2 661 981 T3

atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc aga tgg 48  
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp  
 1 5 10 15

gtc ctg tcc cag ctg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag 96  
 Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys  
 20 25 30

cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc 144  
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile  
 35 40 45

agc agt agt agt tac tac tgg ggc tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag 192  
 Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
 50 55 60

ggg ctg gag tgg att ggg agt atc tat tat agt ggg agt acc tac tac 240  
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr  
 65 70 75 80

aac ccg tcc ctc aag agt cga gtc acc ata tcc gta gac acg tcc aag 288  
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys  
 85 90 95

aac cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc gca gac acg gct 336  
 Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala  
 100 105 110

gtg tat tac tgt gcg aga caa ggg acg ggg ctc gcc cta ttt gac tac 384  
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Gly Thr Gly Leu Ala Leu Phe Asp Tyr  
 115 120 125

tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 417  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 130 135

<210> 19  
 <211> 139  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 10 <223> Constructo sintético

<400> 19  
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp  
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys  
 20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile  
 35 40 45

ES 2 661 981 T3

Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys  
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr  
65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys  
85 90 95

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala  
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Gly Thr Gly Leu Ala Leu Phe Asp Tyr  
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
130 135

<210> 20  
<211> 120  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Región VH del anticuerpo anti-CD98

<400> 20  
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
20 25 30

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

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Gln Gly Thr Gly Leu Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

15 <210> 21  
<211> 387  
<212> ADN  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: región VL del anticuerpo anti-CD98

ES 2 661 981 T3

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(387)

5 <400> 21  
 atg gaa acc cca gcg cag ctt ctc ttc ctc ctg cta ctc tgg ctc cca 48  
 Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
 1 5 10 15  
 gat acc acc gga gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct 96  
 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser  
 20 25 30  
 ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt 144  
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
 35 40 45  
 gtt agc agc agc ttc tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct 192  
 Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
 50 55 60  
 ccc agg ctc ctc atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca 240  
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro  
 65 70 75 80  
 gac agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc 288  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
 85 90 95  
 agc aga ctg gag cct gaa gat ttc gca gtg tat tac tgt cag cag tat 336  
 Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr  
 100 105 110  
 ggt agc tca cct cta ttc act ttc ggc cct ggg acc aaa gtg gat atc 384  
 Gly Ser Ser Pro Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile  
 115 120 125  
 aaa 387  
 Lys

<210> 22  
 <211> 129  
 10 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Constructo sintético  
 15 <400> 22

ES 2 661 981 T3

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser  
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
35 40 45

Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro  
65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr  
100 105 110

Gly Ser Ser Pro Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile  
115 120 125

Lys

<210> 23

<211> 109

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Región VL del anticuerpo anti-CD98

<400> 23

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
85 90 95

Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
100 105

15 <210> 24



ES 2 661 981 T3

<211> 420  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: región VH del anticuerpo anti-TNF alfa

<220>  
 <221> CDS  
 10 <222> (1)..(420)

<400> 24

atg gag ttg gga ctg agc tgg att ttc ctt ttg gct att tta aaa ggt	48
Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly	
1 5 10 15	
gtc cag tgt gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag	96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln	
20 25 30	
ccc ggc agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gcg gcc tct gga ttc acc ttt	144
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	
35 40 45	
gat gat tat gcc atg cac tgg gtc cgg caa gct cca ggg aag ggc ctg	192
Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	
50 55 60	
gaa tgg gtc tca gct atc act tgg aat agt ggt cac ata gac tat gcg	240
Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala	
65 70 75 80	
gac tct gtg gag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac	288
Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn	
85 90 95	
tcc ctg tat ctg caa atg aac agt ctg aga gct gag gat acg gcc gta	336
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
tat tac tgt gcg aaa gtc tcg tac ctt agc acc gcg tcc tcc ctt gac	384
Tyr Tyr Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp	
115 120 125	
tat tgg ggc caa ggt acc ctg gtc acc gtc tcg tca	420
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
130 135 140	

ES 2 661 981 T3

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly  
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45

Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala  
 65 70 75 80

Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
 85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110

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

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 130 135 140

<210> 26

<211> 121

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: región VH del anticuerpo anti-TNF alfa

10

<400> 26

ES 2 661 981 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 27  
<211> 387  
5 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> Descripción de la secuencia artificial: región VL del anticuerpo anti-TNF alfa

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(387)

15 <400> 27  
atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctt ctg ctg ctc tgg 48  
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp  
1 5 10 15  
ctc cca ggt gcc aga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc 96  
Leu Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
20 25 30  
ctg tct gca tct gta ggg gac aga gtc acc atc act tgt cgg gca agt 144  
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser  
35 40 45  
cag gcc atc aga aat tac tta gcc tgg tat cag caa aaa cca ggg aaa 192  
Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys  
50 55 60

ES 2 661 981 T3

gcc cct aag ctc ctg atc tat gct gca tcc act ttg caa tca ggg gtc 240  
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val  
 65 70 75 80

cca tct cgg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc 288  
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 85 90 95

atc agc agc cta cag cct gaa gat gtt gca act tat tac tgt caa agg 336  
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg  
 100 105 110

tat aac cgt gca ccg tat act ttt ggc cag ggg acc aaa gtg gag atc 384  
 Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 115 120 125

aaa 387  
 Lys

<210> 28  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Constructo sintético

10

<400> 28  
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp  
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser  
 35 40 45

Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys  
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val  
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg  
 100 105 110

Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 115 120 125

Lys

15

<210> 29  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: región VL del anticuerpo anti-TNF alfa

ES 2 661 981 T3

<400> 29

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 30

5 <211> 420

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: región VH del anticuerpo anti-CD20

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(420)

15

<400> 30

atg ggt tgg agc ctc atc ttg ctc ttc ctt gtc gct gtt gct acg cgt 48  
Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg  
1 5 10 15

gtc ctg tcc cag gta caa ctg cag cag cct ggg gct gag ctg gtg aag 96

ES 2 661 981 T3

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys  
 20 25 30

cct ggg gcc tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac aca ttt 144  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

acc agt tac aat atg cac tgg gta aaa cag aca cct ggt cgg ggc ctg 192  
 Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu  
 50 55 60

gaa tgg att gga gct att tat ccc gga aat ggt gat act tcc tac aat 240  
 Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn  
 65 70 75 80

cag aag ttc aaa ggc aag gcc aca ttg act gca gac aaa tcc tcc agc 288  
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser  
 85 90 95

aca gcc tac atg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc 336  
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
 100 105 110

tat tac tgt gca aga tcg act tac tac ggc ggt gac tgg tac ttc aat 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn  
 115 120 125

gtc tgg ggc gca ggg acc acg gtc acc gtc tct gca 420  
 Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala  
 130 135 140

<210> 31  
 <211> 140  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 10 <223> Constructo sintético

<400> 31  
 Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg  
 1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys  
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn  
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser

ES 2 661 981 T3

85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn  
115 120 125

Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala  
130 135 140

5 <210> 32  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: región VH del anticuerpo anti-CD20

<400> 32  
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly  
100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala  
115 120

15 <210> 33  
<211> 384  
<212> ADN  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: región VL del anticuerpo anti-CD20

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(384)

25 <400> 33

ES 2 661 981 T3

atg gat ttt cag gtg cag att atc agc ttc ctg cta atc agt gct tca 48  
 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
 1 5 10 15

gtc ata atg tcc aga gga caa att gtt ctc tcc cag tct cca gca atc 96  
 Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile  
 20 25 30

ctg tct gca tct cca ggg gag aag gtc aca atg act tgc agg gcc agc 144  
 Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser  
 35 40 45

tca agt gta agt tac atc cac tgg ttc cag cag aag cca gga tcc tcc 192  
 Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser  
 50 55 60

ccc aaa ccc tgg att tat gcc aca tcc aac ctg gct tct gga gtc cct 240  
 Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 65 70 75 80

gtt cgc ttc agt ggc agt ggg tct ggg act tct tac tct ctc aca atc 288  
 Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
 85 90 95

agc aga gtg gag gct gaa gat gct gcc act tat tac tgc cag cag tgg 336  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
 100 105 110

act agt aac cca ccc acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa atc aaa 384  
 Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 115 120 125

<210> 34  
 <211> 128  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Constructo sintético

10

<400> 34  
 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
 1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile  
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser  
 35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser  
 50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 65 70 75 80

Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
 85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
 100 105 110

Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 115 120 125

15



ES 2 661 981 T3

<210> 35  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Artificial

5

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: región VL del anticuerpo anti-CD20

<400> 35  
Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile  
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr  
85 90 95

10

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 36  
<211> 795  
<212> ADN  
<213> desconocido

15

<220>  
<223> gen de resistencia a neomicina de tipo salvaje

20

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(795)

<400> 36

ES 2 661 981 T3

atg att gaa caa gat gga ttg cac gca ggt tct ccg gcc gct tgg gtg 48  
Met Ile Glu Gln Asp Gly Leu His Ala Gly Ser Pro Ala Ala Trp Val  
1 5 10 15

gag agg cta ttc ggc tat gac tgg gca caa cag aca atc ggc tgc tct 96  
Glu Arg Leu Phe Gly Tyr Asp Trp Ala Gln Gln Thr Ile Gly Cys Ser  
20 25 30

gat gcc gcc gtg ttc cgg ctg tca gcg cag ggg cgc ccg gtt ctt ttt 144  
Asp Ala Ala Val Phe Arg Leu Ser Ala Gln Gly Arg Pro Val Leu Phe  
35 40 45

gtc aag acc gac ctg tcc ggt gcc ctg aat gaa ctg cag gac gag gca 192  
Val Lys Thr Asp Leu Ser Gly Ala Leu Asn Glu Leu Gln Asp Glu Ala  
50 55 60

gcg cgg cta tcg tgg ctg gcc acg acg ggc gtt cct tgc gca gct gtg 240  
Ala Arg Leu Ser Trp Leu Ala Thr Thr Gly Val Pro Cys Ala Ala Val  
65 70 75 80

ctc gac gtt gtc act gaa gcg gga agg gac tgg ctg cta ttg ggc gaa 288  
Leu Asp Val Val Thr Glu Ala Gly Arg Asp Trp Leu Leu Leu Gly Glu  
85 90 95

gtg ccg ggg cag gat ctc ctg tca tct cac ctt gct cct gcc gag aaa 336  
Val Pro Gly Gln Asp Leu Leu Ser Ser His Leu Ala Pro Ala Glu Lys  
100 105 110

gta tcc atc atg gct gat gca atg cgg cgg ctg cat acg ctt gat ccg 384  
Val Ser Ile Met Ala Asp Ala Met Arg Arg Leu His Thr Leu Asp Pro  
115 120 125

gct acc tgc cca ttc gac cac caa gcg aaa cat cgc atc gag cga gca 432  
Ala Thr Cys Pro Phe Asp His Gln Ala Lys His Arg Ile Glu Arg Ala  
130 135 140

cgt act cgg atg gaa gcc ggt ctt gtc gat cag gat gat ctg gac gaa 480  
Arg Thr Arg Met Glu Ala Gly Leu Val Asp Gln Asp Asp Leu Asp Glu  
145 150 155 160

gag cat cag ggg ctc gcg cca gcc gaa ctg ttc gcc agg ctc aag gcg 528  
Glu His Gln Gly Leu Ala Pro Ala Glu Leu Phe Ala Arg Leu Lys Ala  
165 170 175

cgc atg ccc gac ggc gag gat ctc gtc gtg acc cat ggc gat gcc tgc 576  
Arg Met Pro Asp Gly Glu Asp Leu Val Val Thr His Gly Asp Ala Cys  
180 185 190

ttg ccg aat atc atg gtg gaa aat ggc cgc ttt tct gga ttc atc gac 624  
Leu Pro Asn Ile Met Val Glu Asn Gly Arg Phe Ser Gly Phe Ile Asp  
195 200 205

tgt gcc cgg ctg ggt gtg gcg gac cgc tat cag gac ata gcg ttg gct 672  
Cys Gly Arg Leu Gly Val Ala Asp Arg Tyr Gln Asp Ile Ala Leu Ala  
210 215 220

acc cgt gat att gct gaa gag ctt ggc gcc gaa tgg gct gac cgc ttc 720  
Thr Arg Asp Ile Ala Glu Glu Leu Gly Gly Glu Trp Ala Asp Arg Phe  
225 230 235 240

ctc gtg ctt tac ggt atc gcc gct ccc gat tcg cag cgc atc gcc ttc 768  
Leu Val Leu Tyr Gly Ile Ala Ala Pro Asp Ser Gln Arg Ile Ala Phe  
245 250 255

tat cgc ctt ctt gac gag ttc ttc tga 795  
Tyr Arg Leu Leu Asp Glu Phe Phe  
260

5 <210> 37  
<211> 795  
<212> ADN

ES 2 661 981 T3

<213> Artificial

<220>

<223> gen de resistencia a neomicina modificado

5

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(795)

10

<400> 37

atg att gaa caa gat gga ttg cac gca ggt tct ccg gcc gct tgg gtg	48
Met Ile Glu Gln Asp Gly Leu His Ala Gly Ser Pro Ala Ala Trp Val	
1 5 10 15	
gag agg cta ttc ggc tat gac tgg gca caa cag aca atc ggc tgc tct	96
Glu Arg Leu Phe Gly Tyr Asp Trp Ala Gln Gln Thr Ile Gly Cys Ser	
20 25 30	
gat gcc gcc gtg ttc cgg ctg tca gcg cag ggg cgc ccg gtt ctt ttt	144
Asp Ala Ala Val Phe Arg Leu Ser Ala Gln Gly Arg Pro Val Leu Phe	
35 40 45	
gtc aag acc gac ctg tcc ggt gcc ctg aat gaa ctg caa gat gaa gcg	192
Val Lys Thr Asp Leu Ser Gly Ala Leu Asn Glu Leu Gln Asp Glu Ala	
50 55 60	
gcg cga tta tcg tgg tta gcg acg acg ggg gta ccg tgt gcg gcg gta	240
Ala Arg Leu Ser Trp Leu Ala Thr Thr Gly Val Pro Cys Ala Ala Val	
65 70 75 80	
tta gat gta gta acg gaa gcg ggg cga gat tgg tta tta tta ggg gaa	288
Leu Asp Val Val Thr Glu Ala Gly Arg Asp Trp Leu Leu Leu Gly Glu	
85 90 95	
gta ccg ggg caa gat tta tta tcg tcg cat tta gcg ccg gcg gaa aaa	336
Val Pro Gly Gln Asp Leu Leu Ser Ser His Leu Ala Pro Ala Glu Lys	
100 105 110	
gta tcg ata atg gcg gat gcg atg cga cga tta cat acg tta gat ccg	384
Val Ser Ile Met Ala Asp Ala Met Arg Arg Leu His Thr Leu Asp Pro	
115 120 125	
gcg acg tgt ccg ttt gat cat caa gcg aaa cat cga ata gaa cga gcg	432

ES 2 661 981 T3

	Ala Thr Cys Pro Phe Asp His Gln Ala Lys His Arg Ile Glu Arg Ala	
	130 135 140	
	cga acg cga atg gaa gcg ggg tta gta gat caa gat gat tta gat gaa	480
	Arg Thr Arg Met Glu Ala Gly Leu Val Asp Gln Asp Asp Leu Asp Glu	
	145 150 155 160	
	gaa cat caa ggg tta gcg ccg gcg gaa tta ttt gcg cga tta aaa gcg	528
	Glu His Gln Gly Leu Ala Pro Ala Glu Leu Phe Ala Arg Leu Lys Ala	
	165 170 175	
	cga atg ccg gat ggg gaa gat tta gta gta acg cat ggg gat gcg tgt	576
	Arg Met Pro Asp Gly Glu Asp Leu Val Val Thr His Gly Asp Ala Cys	
	180 185 190	
	tta ccg aat ata atg gta gaa aat ggg cga ttt tcg ggg ttt ata gat	624
	Leu Pro Asn Ile Met Val Glu Asn Gly Arg Phe Ser Gly Phe Ile Asp	
	195 200 205	
	tgt ggg cga tta ggg gta gcg gat cgt tat caa gat ata gcg tta gcg	672
	Cys Gly Arg Leu Gly Val Ala Asp Arg Tyr Gln Asp Ile Ala Leu Ala	
	210 215 220	
	acg cga gat ata gcg gaa gaa tta ggg ggg gaa tgg gcg gat cga ttt	720
	Thr Arg Asp Ile Ala Glu Glu Leu Gly Gly Glu Trp Ala Asp Arg Phe	
	225 230 235 240	
	tta gta tta tat ggg ata gcg gcg ccg gat tcg caa cga ata gcg ttt	768
	Leu Val Leu Tyr Gly Ile Ala Ala Pro Asp Ser Gln Arg Ile Ala Phe	
	245 250 255	
	tat cga tta tta gat gaa ttt ttt tga	795
	Tyr Arg Leu Leu Asp Glu Phe Phe	
	260	
	<210> 38	
	<211> 795	
5	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
10	<223> gen de resistencia a neomicina modificado	
	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(795)	
15	<400> 38	
	atg att gaa caa gat gga ttg cac gca ggt tct ccg gcc gct tgg gtg	48
	Met Ile Glu Gln Asp Gly Leu His Ala Gly Ser Pro Ala Ala Trp Val	
	1 5 10 15	
	gag agg cta ttc ggc tat gac tgg gca caa cag aca atc ggc tgc tct	96
	Glu Arg Leu Phe Gly Tyr Asp Trp Ala Gln Gln Thr Ile Gly Cys Ser	
	20 25 30	
	gat gcc gcc gtg ttc ccg ctg tca gcg cag ggg cgc ccg gtt ctt ttt	144
	Asp Ala Ala Val Phe Arg Leu Ser Ala Gln Gly Arg Pro Val Leu Phe	
	35 40 45	
	gta aaa acg gat tta tcg ggg gcg tta aat gaa tta caa gat gaa gcg	192
	Val Lys Thr Asp Leu Ser Gly Ala Leu Asn Glu Leu Gln Asp Glu Ala	

ES 2 661 981 T3

50	55	60	
gcg cga tta tct tgg tta gcg acg acg ggg gta ccg tgt gcg gcg gta			240
Ala Arg Leu Ser Trp Leu Ala Thr Thr Gly Val Pro Cys Ala Ala Val			
65	70	75	80
tta gat gta gta acg gaa gcg ggg cga gat tgg tta tta tta ggg gaa			288
Leu Asp Val Val Thr Glu Ala Gly Arg Asp Trp Leu Leu Leu Gly Glu			
	85	90	95
gta ccg ggg caa gat tta tta tct tct cat tta gcg ccg gcg gaa aaa			336
Val Pro Gly Gln Asp Leu Leu Ser Ser His Leu Ala Pro Ala Glu Lys			
	100	105	110
gta tct ata atg gcg gat gcg atg cga cga tta cat acg tta gat ccg			384
Val Ser Ile Met Ala Asp Ala Met Arg Arg Leu His Thr Leu Asp Pro			
	115	120	125
gcg acg tgt ccg ttt gat cat caa gcg aaa cat cga ata gaa cga gcg			432
Ala Thr Cys Pro Phe Asp His Gln Ala Lys His Arg Ile Glu Arg Ala			
	130	135	140
cga acg cga atg gaa gcg ggg tta gta gat caa gat gat tta gat gaa			480
Arg Thr Arg Met Glu Ala Gly Leu Val Asp Gln Asp Asp Leu Asp Glu			
	145	150	155
gaa cat caa ggg tta gcg ccg gcg gaa tta ttt gcg cga tta aaa gcg			528
Glu His Gln Gly Leu Ala Pro Ala Glu Leu Phe Ala Arg Leu Lys Ala			
	165	170	175
cga atg ccg gat ggg gaa gat tta gta gta acg cat ggg gat gcg tgt			576
Arg Met Pro Asp Gly Glu Asp Leu Val Val Thr His Gly Asp Ala Cys			
	180	185	190
tta ccg aat ata atg gta gaa aat ggg cga ttt tct ggg ttt ata gat			624
Leu Pro Asn Ile Met Val Glu Asn Gly Arg Phe Ser Gly Phe Ile Asp			
	195	200	205
tgt ggg cga tta ggg gta gcg gat cgt tat caa gat ata gcg tta gcg			672
Cys Gly Arg Leu Gly Val Ala Asp Arg Tyr Gln Asp Ile Ala Leu Ala			
	210	215	220
acg cga gat ata gcg gaa gaa tta ggg ggg gaa tgg gcg gat cga ttt			720
Thr Arg Asp Ile Ala Glu Glu Leu Gly Gly Glu Trp Ala Asp Arg Phe			
	225	230	235
tta gta tta tat ggg ata gcg gcg ccg gat tct caa cga ata gcg ttt			768
Leu Val Leu Tyr Gly Ile Ala Ala Pro Asp Ser Gln Arg Ile Ala Phe			
	245	250	255
tat cga tta tta gat gaa ttt ttt tga			795
Tyr Arg Leu Leu Asp Glu Phe Phe			
	260		

<210> 39  
 <211> 795  
 5 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> gen de resistencia a neomicina modificado

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(795)

15 <400> 39

ES 2 661 981 T3

atg att gaa caa gat gga ttg cac gca ggt tct ccg gcc gct tgg gtg 48  
Met Ile Glu Gln Asp Gly Leu His Ala Gly Ser Pro Ala Ala Trp Val  
1 5 10 15

gag agg cta ttt ggg tat gat tgg gcg caa caa acg ata ggg tgt tcg 96  
Glu Arg Leu Phe Gly Tyr Asp Trp Ala Gln Gln Thr Ile Gly Cys Ser  
20 25 30

gat gcg gcg gta ttt cga tta tcg gcg caa ggg cga ccg gta tta ttt 144  
Asp Ala Ala Val Phe Arg Leu Ser Ala Gln Gly Arg Pro Val Leu Phe  
35 40 45

gta aaa acg gat tta tcg ggg gcg tta aat gaa tta caa gat gaa gcg 192  
Val Lys Thr Asp Leu Ser Gly Ala Leu Asn Glu Leu Gln Asp Glu Ala  
50 55 60

gcg cga tta tcg tgg tta gcg acg acg ggg gta ccg tgt gcg gcg gta 240  
Ala Arg Leu Ser Trp Leu Ala Thr Thr Gly Val Pro Cys Ala Ala Val  
65 70 75 80

tta gat gta gta acg gaa gcg ggg cga gat tgg tta tta tta ggg gaa 288  
Leu Asp Val Val Thr Glu Ala Gly Arg Asp Trp Leu Leu Leu Gly Glu  
85 90 95

gta ccg ggg caa gat tta tta tcg tcg cat tta gcg ccg gcg gaa aaa 336  
Val Pro Gly Gln Asp Leu Leu Ser Ser His Leu Ala Pro Ala Glu Lys  
100 105 110

gta tcg ata atg gcg gat gcg atg cga cga tta cat acg tta gat ccg 384  
Val Ser Ile Met Ala Asp Ala Met Arg Arg Leu His Thr Leu Asp Pro  
115 120 125

gcg acg tgt ccg ttt gat cat caa gcg aaa cat cga ata gaa cga gcg 432  
Ala Thr Cys Pro Phe Asp His Gln Ala Lys His Arg Ile Glu Arg Ala  
130 135 140

cga acg cga atg gaa gcg ggg tta gta gat caa gat gat tta gat gaa 480  
Arg Thr Arg Met Glu Ala Gly Leu Val Asp Gln Asp Asp Leu Asp Glu  
145 150 155 160

gaa cat caa ggg tta gcg ccg gcg gaa tta ttt gcg cga tta aaa gcg 528  
Glu His Gln Gly Leu Ala Pro Ala Glu Leu Phe Ala Arg Leu Lys Ala  
165 170 175

cga atg ccg gat ggg gaa gat tta gta gta acg cat ggg gat gcg tgt 576  
Arg Met Pro Asp Gly Glu Asp Leu Val Val Thr His Gly Asp Ala Cys  
180 185 190

tta ccg aat ata atg gta gaa aat ggg cga ttt tcg ggg ttt ata gat 624  
Leu Pro Asn Ile Met Val Glu Asn Gly Arg Phe Ser Gly Phe Ile Asp  
195 200 205

tgt ggg cga tta ggg gta gcg gat cgt tat caa gat ata gcg tta gcg 672  
Cys Gly Arg Leu Gly Val Ala Asp Arg Tyr Gln Asp Ile Ala Leu Ala  
210 215 220

acg cga gat ata gcg gaa gaa tta ggg ggg gaa tgg gcg gat cga ttt 720  
Thr Arg Asp Ile Ala Glu Glu Leu Gly Gly Glu Trp Ala Asp Arg Phe  
225 230 235 240

tta gta tta tat ggg ata gcg gcg ccg gat tcg caa cga ata gcg ttt 768  
Leu Val Leu Tyr Gly Ile Ala Ala Pro Asp Ser Gln Arg Ile Ala Phe  
245 250 255

tat cga tta tta gat gaa ttt ttt tga 795  
Tyr Arg Leu Leu Asp Glu Phe Phe  
260

5 <210> 40  
<211> 649

ES 2 661 981 T3

<212> PRT

<213> *Oryzias latipes*

<400> 40

Met Glu Glu Val Cys Asp Ser Ser Ala Ala Ala Ser Ser Thr Val Gln  
1 5 10 15

Asn Gln Pro Gln Asp Gln Glu His Pro Trp Pro Tyr Leu Arg Glu Phe  
20 25 30

Phe Ser Leu Ser Gly Val Asn Lys Asp Ser Phe Lys Met Lys Cys Val  
35 40 45

Leu Cys Leu Pro Leu Asn Lys Glu Ile Ser Ala Phe Lys Ser Ser Pro  
50 55 60

Ser Asn Leu Arg Lys His Ile Glu Arg Met His Pro Asn Tyr Leu Lys  
65 70 75 80

Asn Tyr Ser Lys Leu Thr Ala Gln Lys Arg Lys Ile Gly Thr Ser Thr  
85 90 95

His Ala Ser Ser Ser Lys Gln Leu Lys Val Asp Ser Val Phe Pro Val  
100 105 110

Lys His Val Ser Pro Val Thr Val Asn Lys Ala Ile Leu Arg Tyr Ile  
115 120 125

Ile Gln Gly Leu His Pro Phe Ser Thr Val Asp Leu Pro Ser Phe Lys  
130 135 140

Glu Leu Ile Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Ser Val Ile Thr Arg Pro  
145 150 155 160

Thr Leu Arg Ser Lys Ile Ala Glu Ala Ala Leu Ile Met Lys Gln Lys  
165 170 175

Val Thr Ala Ala Met Ser Glu Val Glu Trp Ile Ala Thr Thr Thr Asp  
180 185 190

5

ES 2 661 981 T3

Cys Trp Thr Ala Arg Arg Lys Ser Phe Ile Gly Val Thr Ala His Trp  
 195 200 205  
 Ile Asn Pro Gly Ser Leu Glu Arg His Ser Ala Ala Leu Ala Cys Lys  
 210 215 220  
 Arg Leu Met Gly Ser His Thr Phe Glu Val Leu Ala Ser Ala Met Asn  
 225 230 235 240  
 Asp Ile His Ser Glu Tyr Glu Ile Arg Asp Lys Val Val Cys Thr Thr  
 245 250 255  
 Thr Asp Ser Gly Ser Asn Phe Met Lys Ala Phe Arg Val Phe Gly Val  
 260 265 270  
 Glu Asn Asn Asp Ile Glu Thr Glu Ala Arg Arg Cys Glu Ser Asp Asp  
 275 280 285  
 Thr Asp Ser Glu Gly Cys Gly Glu Gly Ser Asp Gly Val Glu Phe Gln  
 290 295 300  
 Asp Ala Ser Arg Val Leu Asp Gln Asp Asp Gly Phe Glu Phe Gln Leu  
 305 310 315 320  
 Pro Lys His Gln Lys Cys Ala Cys His Leu Leu Asn Leu Val Ser Ser  
 325 330 335  
 Val Asp Ala Gln Lys Ala Leu Ser Asn Glu His Tyr Lys Lys Leu Tyr  
 340 345 350  
 Arg Ser Val Phe Gly Lys Cys Gln Ala Leu Trp Asn Lys Ser Ser Arg  
 355 360 365  
 Ser Ala Leu Ala Ala Glu Ala Val Glu Ser Glu Ser Arg Leu Gln Leu  
 370 375 380  
 Leu Arg Pro Asn Gln Thr Arg Trp Asn Ser Thr Phe Met Ala Val Asp  
 385 390 395 400  
 Arg Ile Leu Gln Ile Cys Lys Glu Ala Gly Glu Gly Ala Leu Arg Asn  
 405 410 415  
 Ile Cys Thr Ser Leu Glu Val Pro Met Phe Asn Pro Ala Glu Met Leu  
 420 425 430  
 Phe Leu Thr Glu Trp Ala Asn Thr Met Arg Pro Val Ala Lys Val Leu





ES 2 661 981 T3

atg acg gaa tat aaa ccg acg gta cgt tta gcg acg cgt gat gat gta 48  
 Met Thr Glu Tyr Lys Pro Thr Val Arg Leu Ala Thr Arg Asp Asp Val  
 1 5 10 15

ccg cgt gcg gta cgt acg tta gcg gcg gcg ttt gcg gat tat ccg gcg 96  
 Pro Arg Ala Val Arg Thr Leu Ala Ala Ala Phe Ala Asp Tyr Pro Ala  
 20 25 30

acg cgt cat acg gta gat ccg gat cgt cat ata gaa cgt gta acg gaa 144  
 Thr Arg His Thr Val Asp Pro Asp Arg His Ile Glu Arg Val Thr Glu  
 35 40 45

tta caa gaa tta ttt tta acg cgt gta ggt tta gat ata ggt aaa gta 192  
 Leu Gln Glu Leu Phe Leu Thr Arg Val Gly Leu Asp Ile Gly Lys Val  
 50 55 60

tgg gta gcg gat gat ggt gcg gcg gta gcg gta tgg acg acg ccg gaa 240  
 Trp Val Ala Asp Asp Gly Ala Ala Val Ala Val Trp Thr Thr Pro Glu  
 65 70 75 80

tcg gta gaa gcg ggt gcg gta ttt gcg gaa ata ggt ccg cgt atg gcg 288  
 Ser Val Glu Ala Gly Ala Val Phe Ala Glu Ile Gly Pro Arg Met Ala  
 85 90 95

gaa tta tcg ggt tcg cgt tta gcg gcg caa caa caa atg gaa ggt tta 336  
 Glu Leu Ser Gly Ser Arg Leu Ala Ala Gln Gln Gln Met Glu Gly Leu  
 100 105 110

tta gcg ccg cat cgt ccg aaa gaa ccg gcg tgg ttt tta gcg acg gta 384  
 Leu Ala Pro His Arg Pro Lys Glu Pro Ala Trp Phe Leu Ala Thr Val  
 115 120 125

ggt gta tcg ccg gat cat caa ggt aaa ggt tta ggt tcg gcg gta gta 432  
 Gly Val Ser Pro Asp His Gln Gly Lys Gly Leu Gly Ser Ala Val Val  
 130 135 140

tta ccg ggt gta gaa gcg gcg gaa cgt gcg ggt gta ccg gcg ttt tta 480  
 Leu Pro Gly Val Glu Ala Ala Glu Arg Ala Gly Val Pro Ala Phe Leu  
 145 150 155 160

gaa acg tcg gcg ccg cgt aat tta ccg ttt tat gaa cgt tta ggt ttt 528  
 Glu Thr Ser Ala Pro Arg Asn Leu Pro Phe Tyr Glu Arg Leu Gly Phe  
 165 170 175

acg gta acg gcg gat gta gaa gta ccg gaa ggt ccg cgt acg tgg tgt 576  
 Thr Val Thr Ala Asp Val Glu Val Pro Glu Gly Pro Arg Thr Trp Cys  
 180 185 190

atg acg cgt aaa ccg ggt gcg tga 600  
 Met Thr Arg Lys Pro Gly Ala  
 195

<210> 42  
 <211> 600  
 5 <212> ADN  
 <213> desconocido

<220>  
 <223> gen de resistencia a puromicina de tipo salvaje

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(600)

15 <400> 42

ES 2 661 981 T3

atg acc gag tac aag ccc acg gtg cgc ctc gcc acc cgc gac gac gtc 48  
 Met Thr Glu Tyr Lys Pro Thr Val Arg Leu Ala Thr Arg Asp Asp Val  
 1 5 10 15

ccc cgg gcc gta cgc acc ctc gcc gcc gcg ttc gcc gac tac ccc gcc 96  
 Pro Arg Ala Val Arg Thr Leu Ala Ala Ala Phe Ala Asp Tyr Pro Ala  
 20 25 30

acg cgc cac acc gtc gac ccg gac cgc cac atc gag cgg gtc acc gag 144  
 Thr Arg His Thr Val Asp Pro Asp Arg His Ile Glu Arg Val Thr Glu  
 35 40 45

ctg caa gaa ctc ttc ctc acg cgc gtc ggg ctc gac atc ggc aag gtg 192  
 Leu Gln Glu Leu Phe Leu Thr Arg Val Gly Leu Asp Ile Gly Lys Val  
 50 55 60

tgg gtc gcg gac gac ggc gcc gcg gtg gcg gtc tgg acc acg ccg gag 240  
 Trp Val Ala Asp Asp Gly Ala Ala Val Ala Val Trp Thr Thr Pro Glu  
 65 70 75 80

agc gtc gaa gcg ggg gcg gtg ttc gcc gag atc ggc ccg cgc atg gcc 288  
 Ser Val Glu Ala Gly Ala Val Phe Ala Glu Ile Gly Pro Arg Met Ala  
 85 90 95

gag ttg agc ggt tcc cgg ctg gcc gcg cag caa cag atg gaa ggc ctc 336  
 Glu Leu Ser Gly Ser Arg Leu Ala Ala Gln Gln Gln Met Glu Gly Leu  
 100 105 110

ctg gcg ccg cac cgg ccc aag gag ccc gcg tgg ttc ctg gcc acc gtc 384  
 Leu Ala Pro His Arg Pro Lys Glu Pro Ala Trp Phe Leu Ala Thr Val  
 115 120 125

ggc gtc tcg ccc gac cac cag ggc aag ggt ctg ggc agc gcc gtc gtg 432  
 Gly Val Ser Pro Asp His Gln Gly Lys Gly Leu Gly Ser Ala Val Val  
 130 135 140

ctc ccc gga gtg gag gcg gcc gag cgc gcc ggg gtg ccc gcc ttc ctg 480  
 Leu Pro Gly Val Glu Ala Ala Glu Arg Ala Gly Val Pro Ala Phe Leu  
 145 150 155 160

gag acc tcc gcg ccc cgc aac ctc ccc ttc tac gag cgg ctc ggc ttc 528  
 Glu Thr Ser Ala Pro Arg Asn Leu Pro Phe Tyr Glu Arg Leu Gly Phe  
 165 170 175

acc gtc acc gcc gac gtc gag gtg ccc gaa gga ccg cgc acc tgg tgc 576  
 Thr Val Thr Ala Asp Val Glu Val Pro Glu Gly Pro Arg Thr Trp Cys  
 180 185 190

atg acc cgc aag ccc ggt gcc tga 600  
 Met Thr Arg Lys Pro Gly Ala  
 195

<210> 43  
 <211> 600  
 5 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> gen de resistencia a puromicina modificado

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(600)

15 <400> 43

ES 2 661 981 T3

atg acc gag tac aag ccc acg gta cgc tta gcg acc cgc gac gac gta 48  
 Met Thr Glu Tyr Lys Pro Thr Val Arg Leu Ala Thr Arg Asp Asp Val  
 1 5 10 15

ccc cgg gcg gta cgc acc tta gcg gcg gcg ttc gcg gac tac ccc gcg 96  
 Pro Arg Ala Val Arg Thr Leu Ala Ala Ala Phe Ala Asp Tyr Pro Ala  
 20 25 30

acg cgc cac acc gta gac ccg gac cgc cac atc gag cgg gta acc gag 144  
 Thr Arg His Thr Val Asp Pro Asp Arg His Ile Glu Arg Val Thr Glu  
 35 40 45

tta caa gaa tta ttc tta acg cgc gta ggg tta gac atc ggc aag gta 192  
 Leu Gln Glu Leu Phe Leu Thr Arg Val Gly Leu Asp Ile Gly Lys Val  
 50 55 60

tgg gta gcg gac gac ggc gcg gcg gta gcg gta tgg acc acg ccg gag 240  
 Trp Val Ala Asp Asp Gly Ala Ala Val Ala Val Trp Thr Thr Pro Glu  
 65 70 75 80

tcg gta gaa gcg ggg gcg gta ttc gcg gag atc ggc ccg cgc atg gcg 288  
 Ser Val Glu Ala Gly Ala Val Phe Ala Glu Ile Gly Pro Arg Met Ala  
 85 90 95

gag tta tcg ggt tcg cgg tta gcg gcg cag caa cag atg gaa ggc tta 336  
 Glu Leu Ser Gly Ser Arg Leu Ala Ala Gln Gln Gln Met Glu Gly Leu  
 100 105 110

tta gcg ccg cac cgg ccc aag gag ccc gcg tgg ttc tta gcg acc gta 384  
 Leu Ala Pro His Arg Pro Lys Glu Pro Ala Trp Phe Leu Ala Thr Val  
 115 120 125

ggc gta tcg ccc gac cac cag ggc aag ggt tta ggc tcg gcg gta gta 432  
 Gly Val Ser Pro Asp His Gln Gly Lys Gly Leu Gly Ser Ala Val Val  
 130 135 140

tta ccc gga gta gag gcg gcg gag cgc gcg ggg gta ccc gcg ttc tta 480  
 Leu Pro Gly Val Glu Ala Ala Glu Arg Ala Gly Val Pro Ala Phe Leu  
 145 150 155 160

gag acc tcg gcg ccc cgc aac tta ccc ttc tac gag cgg tta ggc ttc 528  
 Glu Thr Ser Ala Pro Arg Asn Leu Pro Phe Tyr Glu Arg Leu Gly Phe  
 165 170 175

acc gta acc gcg gac gta gag gta ccc gaa gga ccg cgc acc tgg tgc 576  
 Thr Val Thr Ala Asp Val Glu Val Pro Glu Gly Pro Arg Thr Trp Cys  
 180 185 190

atg acc cgc aag ccc ggt gcg tga 600  
 Met Thr Arg Lys Pro Gly Ala  
 195

<210> 44  
 <211> 600  
 5 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> gen de resistencia a puromicina modificado

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(600)

15 <400> 44

ES 2 661 981 T3

atg acg gaa tat aaa ccg acg gta cgt tta gcg acg cgt gat gat gta 48  
 Met Thr Glu Tyr Lys Pro Thr Val Arg Leu Ala Thr Arg Asp Asp Val  
 1 5 10 15

ccg cgt gcg gta cgt acg tta gcg gcg gcg ttt gcg gat tat ccg gcg 96  
 Pro Arg Ala Val Arg Thr Leu Ala Ala Ala Phe Ala Asp Tyr Pro Ala  
 20 25 30

acg cgt cat acg gta gat ccg gat cgt cat ata gaa cgt gta acg gaa 144  
 Thr Arg His Thr Val Asp Pro Asp Arg His Ile Glu Arg Val Thr Glu  
 35 40 45

tta caa gaa tta ttt tta acg cgt gta ggt tta gat ata ggt aaa gta 192  
 Leu Gln Glu Leu Phe Leu Thr Arg Val Gly Leu Asp Ile Gly Lys Val  
 50 55 60

tgg gta gcg gat gat ggt gcg gcg gta gcg gta tgg acg acg ccg gaa 240  
 Trp Val Ala Asp Asp Gly Ala Ala Val Ala Val Trp Thr Thr Pro Glu  
 65 70 75 80

tcg gta gaa gcg ggt gcg gta ttt gcg gaa ata ggt ccg cgt atg gcg 288  
 Ser Val Glu Ala Gly Ala Val Phe Ala Glu Ile Gly Pro Arg Met Ala  
 85 90 95

gaa tta tcg ggt tcg cgt tta gcg gcg caa caa caa atg gaa ggt tta 336  
 Glu Leu Ser Gly Ser Arg Leu Ala Ala Gln Gln Gln Met Glu Gly Leu  
 100 105 110

tta gcg ccg cat cgt ccg aaa gaa ccg gcg tgg ttt tta gcg acg gta 384  
 Leu Ala Pro His Arg Pro Lys Glu Pro Ala Trp Phe Leu Ala Thr Val  
 115 120 125

ggt gta tcg ccg gat cat caa ggt aaa ggt tta ggt tcg gcg gta gta 432  
 Gly Val Ser Pro Asp His Gln Gly Lys Gly Leu Gly Ser Ala Val Val  
 130 135 140

tta ccg ggt gta gaa gcg gcg gaa cgt gcg ggt gta ccg gcg ttt tta 480  
 Leu Pro Gly Val Glu Ala Ala Glu Arg Ala Gly Val Pro Ala Phe Leu  
 145 150 155 160

gaa acg tcg gcg ccg cgt aat tta ccg ttt tat gaa cgt tta ggt ttt 528  
 Glu Thr Ser Ala Pro Arg Asn Leu Pro Phe Tyr Glu Arg Leu Gly Phe  
 165 170 175

acg gta acg gcg gat gta gaa gta ccg gaa ggt ccg cgt acg tgg tgt 576  
 Thr Val Thr Ala Asp Val Glu Val Pro Glu Gly Pro Arg Thr Trp Cys  
 180 185 190

atg acg cgt aaa ccg ggt gcg tga 600  
 Met Thr Arg Lys Pro Gly Ala

195

- 5 <210> 45  
 <211> 375  
 <212> ADN  
 <213> artificial
- 10 <220>  
 <223> gen de resistencia a zeocina modificado  
 <220>  
 <221> CDS
- 15 <222> (1)..(375)  
 <400> 45

ES 2 661 981 T3

atg gcg aag tta acc tcg gcg gtt ccg gta tta acc gcg cgc gac gtc 48  
 Met Ala Lys Leu Thr Ser Ala Val Pro Val Leu Thr Ala Arg Asp Val  
 1 5 10 15

gcg gga gcg gtc gag ttc tgg acc gac ccg tta ggg ttc tcg ccg gac 96  
 Ala Gly Ala Val Glu Phe Trp Thr Asp Arg Leu Gly Phe Ser Arg Asp  
 20 25 30

ttc gta gag gac gac ttc gcg ggt gta gtc ccg gac gac gta acc tta 144  
 Phe Val Glu Asp Asp Phe Ala Gly Val Val Arg Asp Asp Val Thr Leu  
 35 40 45

ttc atc tcg gcg gtc cag gac cag gta gta ccg gac aac acc tta gcg 192  
 Phe Ile Ser Ala Val Gln Asp Gln Val Val Pro Asp Asn Thr Leu Ala  
 50 55 60

tgg gta tgg gta cgc gcc tta gac gag tta tac gcg gag tgg tcg gag 240  
 Trp Val Trp Val Arg Gly Leu Asp Glu Leu Tyr Ala Glu Trp Ser Glu  
 65 70 75 80

gtc gta tcg acg aac ttc ccg gac gcc tcg ggg ccg gcg atg acc gag 288  
 Val Val Ser Thr Asn Phe Arg Asp Ala Ser Gly Pro Ala Met Thr Glu  
 85 90 95

atc gcc gag cag ccg tgg ggg ccg gag ttc gcg tta cgc gac ccg gcg 336  
 Ile Gly Glu Gln Pro Trp Gly Arg Glu Phe Ala Leu Arg Asp Pro Ala  
 100 105 110

ggc aac tgc gta cac ttc gta gcg gag gag cag gac tga 375  
 Gly Asn Cys Val His Phe Val Ala Glu Glu Gln Asp  
 115 120

<210> 46  
 <211> 375  
 5 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> gen de resistencia a zeocina modificado

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(375)

15 <400> 46  
 atg gcg aaa tta acg tcg gcg gta ccg gta tta acg gcg cgt gat gta 48

ES 2 661 981 T3

	Met	Ala	Lys	Leu	Thr	Ser	Ala	Val	Pro	Val	Leu	Thr	Ala	Arg	Asp	Val	
	1				5					10					15		
	gcg	ggt	gcg	gta	gaa	ttt	tgg	acg	gat	cgt	tta	ggt	ttt	tcg	cgt	gat	96
	Ala	Gly	Ala	Val	Glu	Phe	Trp	Thr	Asp	Arg	Leu	Gly	Phe	Ser	Arg	Asp	
				20					25					30			
	ttt	gta	gaa	gat	gat	ttt	gcg	ggt	gta	gta	cgt	gat	gat	gta	acg	tta	144
	Phe	Val	Glu	Asp	Asp	Phe	Ala	Gly	Val	Val	Arg	Asp	Asp	Val	Thr	Leu	
			35					40					45				
	ttt	ata	tcg	gcg	gta	caa	gat	caa	gta	gta	ccg	gat	aat	acg	tta	gcg	192
	Phe	Ile	Ser	Ala	Val	Gln	Asp	Gln	Val	Val	Pro	Asp	Asn	Thr	Leu	Ala	
			50				55					60					
	tgg	gta	tgg	gta	cgt	ggt	tta	gat	gaa	tta	tat	gcg	gaa	tgg	tcg	gaa	240
	Trp	Val	Trp	Val	Arg	Gly	Leu	Asp	Glu	Leu	Tyr	Ala	Glu	Trp	Ser	Glu	
	65					70					75					80	
	gta	gta	tcg	acg	aat	ttt	cgt	gat	gcg	tcg	ggt	ccg	gcg	atg	acg	gaa	288
	Val	Val	Ser	Thr	Asn	Phe	Arg	Asp	Ala	Ser	Gly	Pro	Ala	Met	Thr	Glu	
					85					90					95		
	ata	ggt	gaa	caa	ccg	tgg	ggt	cgt	gaa	ttt	gcg	tta	cgt	gat	ccg	gcg	336
	Ile	Gly	Glu	Gln	Pro	Trp	Gly	Arg	Glu	Phe	Ala	Leu	Arg	Asp	Pro	Ala	
				100					105					110			
	ggt	aat	tgt	gta	cat	ttt	gta	gcg	gaa	gaa	caa	gat	tga				375
	Gly	Asn	Cys	Val	His	Phe	Val	Ala	Glu	Glu	Gln	Asp					
			115					120									
	<210>	47															
	<211>	1026															
5	<212>	ADN															
	<213>	artificial															
	<220>																
10	<223>	gen de resistencia a higromicina modificado															
	<220>																
	<221>	CDS															
	<222>	(1)..(1026)															
15	<400>	47															
	atg	aaa	aag	cct	gaa	tta	acc	gcg	acg	tcg	gta	gag	aag	ttt	tta	atc	48
	Met	Lys	Lys	Pro	Glu	Leu	Thr	Ala	Thr	Ser	Val	Glu	Lys	Phe	Leu	Ile	
	1				5					10					15		
	gaa	aag	ttc	gac	tcg	gta	tcg	gac	tta	atg	cag	tta	tcg	gag	ggc	gaa	96
	Glu	Lys	Phe	Asp	Ser	Val	Ser	Asp	Leu	Met	Gln	Leu	Ser	Glu	Gly	Glu	
				20					25					30			
	gaa	tcg	cgt	gcg	ttc	tcg	ttc	gat	gta	gga	ggg	cgt	gga	tat	gta	tta	144
	Glu	Ser	Arg	Ala	Phe	Ser	Phe	Asp	Val	Gly	Gly	Arg	Gly	Tyr	Val	Leu	
				35				40					45				
	cgt	gta	aat	tcg	tgc	gcg	gat	ggt	ttc	tac	aaa	gat	cgt	tat	gta	tat	192
	Arg	Val	Asn	Ser	Cys	Ala	Asp	Gly	Phe	Tyr	Lys	Asp	Arg	Tyr	Val	Tyr	
			50				55					60					
	cgt	cac	ttt	gcg	tcg	gcg	gcg	tta	ccg	att	ccg	gaa	gta	tta	gac	att	240
	Arg	His	Phe	Ala	Ser	Ala	Ala	Leu	Pro	Ile	Pro	Glu	Val	Leu	Asp	Ile	

ES 2 661 981 T3

65	70	75	80	
ggg gaa ttc tcg gag tgc tta acc tat tgc atc tgc cgc cgt gcg cag				288
Gly Glu Phe Ser Glu Ser Leu Thr Tyr Cys Ile Ser Arg Arg Ala Gln				
	85	90	95	
ggt gta acg ttg caa gac tta cct gaa acc gaa tta ccc gcg gta tta				336
Gly Val Thr Leu Glu Asp Leu Pro Glu Thr Glu Leu Pro Ala Val Leu				
	100	105	110	
cag ccg gta gcg gag gcg atg gat gcg atc gcg gcg gcg gat tta tgc				384
Gln Pro Val Ala Glu Ala Met Asp Ala Ile Ala Ala Ala Asp Leu Ser				
	115	120	125	
cag acg tgc ggg ttc ggc cca ttc gga ccg caa gga atc ggt caa tac				432
Gln Thr Ser Gly Phe Gly Pro Phe Gly Pro Gln Gly Ile Gly Gln Tyr				
	130	135	140	
act aca tgg cgt gat ttc ata tgc gcg att gcg gat ccc cat gta tat				480
Thr Thr Trp Arg Asp Phe Ile Cys Ala Ile Ala Asp Pro His Val Tyr				
	145	150	155	160
cac tgg caa act gta atg gac gac acc gta tgc gcg tgc gta gcg cag				528
His Trp Gln Thr Val Met Asp Asp Thr Val Ser Ala Ser Val Ala Gln				
	165	170	175	
gcg tta gat gag tta atg tta tgg gcg gag gac tgc ccc gaa gta cgt				576
Ala Leu Asp Glu Leu Met Leu Trp Ala Glu Asp Cys Pro Glu Val Arg				
	180	185	190	
cac tta gta cac gcg gat ttc ggc tgc aac aat gta tta acg gac aat				624
His Leu Val His Ala Asp Phe Gly Ser Asn Asn Val Leu Thr Asp Asn				
	195	200	205	
ggc cgc ata aca gcg gta att gac tgg tgc gag gcg atg ttc ggg gat				672
Gly Arg Ile Thr Ala Val Ile Asp Trp Ser Glu Ala Met Phe Gly Asp				
	210	215	220	
tgc caa tac gag gta gcg aac atc ttc ttc tgg cgt ccg tgg ttg gcg				720
Ser Gln Tyr Glu Val Ala Asn Ile Phe Phe Trp Arg Pro Trp Leu Ala				
	225	230	235	240
tgt atg gag cag cag acg cgc tac ttc gag cgt cgt cat ccg gag tta				768
Cys Met Glu Gln Gln Thr Arg Tyr Phe Glu Arg Arg His Pro Glu Leu				
	245	250	255	
gcg gga tgc ccg cgt tta cgt gcg tat atg tta cgc att ggt ctt gac				816
Ala Gly Ser Pro Arg Leu Arg Ala Tyr Met Leu Arg Ile Gly Leu Asp				
	260	265	270	
caa tta tat cag tgc ttg gta gac ggc aat ttc gat gat gcg gcg tgg				864
Gln Leu Tyr Gln Ser Leu Val Asp Gly Asn Phe Asp Asp Ala Ala Trp				
	275	280	285	
gcg cag ggt cga tgc gac gcg atc gta cga tgc gga gcg ggg act gta				912
Ala Gln Gly Arg Cys Asp Ala Ile Val Arg Ser Gly Ala Gly Thr Val				
	290	295	300	
ggg cgt aca caa atc gcg cgc cgt tgc gcg gcg gta tgg acc gat ggc				960
Gly Arg Thr Gln Ile Ala Arg Arg Ser Ala Ala Val Trp Thr Asp Gly				
	305	310	315	320
tgt gta gaa gta tta gcg gat tgc gga aac cga cgc ccc tgc act cgt				1008
Cys Val Glu Val Leu Ala Asp Ser Gly Asn Arg Arg Pro Ser Thr Arg				
	325	330	335	
ccg cgt gcg aag gaa tag				1026
Pro Arg Ala Lys Glu				
	340			

5 <210> 48  
 <211> 1026  
 <212> ADN



ES 2 661 981 T3

<213> artificial

<220>

<223> gen de resistencia a higromicina modificado

5

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1026)

10

<400> 48

atg	aaa	aaa	ccg	gaa	tta	acg	gcg	acg	tcg	gta	gaa	aaa	ttt	tta	ata	48
Met	Lys	Lys	Pro	Glu	Leu	Thr	Ala	Thr	Ser	Val	Glu	Lys	Phe	Leu	Ile	
1				5					10					15		
gaa	aaa	ttt	gat	tcg	gta	tcg	gat	tta	atg	caa	tta	tcg	gaa	ggt	gaa	96
Glu	Lys	Phe	Asp	Ser	Val	Ser	Asp	Leu	Met	Gln	Leu	Ser	Glu	Gly	Glu	
			20					25					30			
gaa	tcg	cgt	gcg	ttt	tcg	ttt	gat	gta	ggt	ggt	cgt	ggt	tat	gta	tta	144
Glu	Ser	Arg	Ala	Phe	Ser	Phe	Asp	Val	Gly	Gly	Arg	Gly	Tyr	Val	Leu	
			35				40					45				
cgt	gta	aat	tcg	tgt	gcg	gat	ggt	ttt	tat	aaa	gat	cgt	tat	gta	tat	192
Arg	Val	Asn	Ser	Cys	Ala	Asp	Gly	Phe	Tyr	Lys	Asp	Arg	Tyr	Val	Tyr	
	50					55					60					
cgt	cat	ttt	gcg	tcg	gcg	gcg	tta	ccg	ata	ccg	gaa	gta	tta	gat	ata	240
Arg	His	Phe	Ala	Ser	Ala	Ala	Leu	Pro	Ile	Pro	Glu	Val	Leu	Asp	Ile	
65					70					75				80		
ggt	gaa	ttt	tcg	gaa	tcg	tta	acg	tat	tgt	ata	tcg	cgt	cgt	gcg	caa	288
Gly	Glu	Phe	Ser	Glu	Ser	Leu	Thr	Tyr	Cys	Ile	Ser	Arg	Arg	Ala	Gln	
				85					90					95		
ggt	gta	acg	tta	caa	gat	tta	ccg	gaa	acg	gaa	tta	ccg	gcg	gta	tta	336
Gly	Val	Thr	Leu	Gln	Asp	Leu	Pro	Glu	Thr	Glu	Leu	Pro	Ala	Val	Leu	
			100				105						110			
caa	ccg	gta	gcg	gaa	gcg	atg	gat	gcg	ata	gcg	gcg	gcg	gat	tta	tcg	384
Gln	Pro	Val	Ala	Glu	Ala	Met	Asp	Ala	Ile	Ala	Ala	Ala	Asp	Leu	Ser	
		115					120					125				
caa	acg	tcg	ggt	ttt	ggt	ccg	ttt	ggt	ccg	caa	ggt	ata	ggt	caa	tat	432
Gln	Thr	Ser	Gly	Phe	Gly	Pro	Phe	Gly	Pro	Gln	Gly	Ile	Gly	Gln	Tyr	
	130					135					140					
acg	acg	tgg	cgt	gat	ttt	ata	tgt	gcg	ata	gcg	gat	ccg	cat	gta	tat	480
Thr	Thr	Trp	Arg	Asp	Phe	Ile	Cys	Ala	Ile	Ala	Asp	Pro	His	Val	Tyr	
145					150				155					160		
cat	tgg	caa	acg	gta	atg	gat	gat	acg	gta	tcg	gcg	tcg	gta	gcg	caa	528
His	Trp	Gln	Thr	Val	Met	Asp	Asp	Thr	Val	Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Gln	

ES 2 661 981 T3

165					170					175						
gcg	tta	gat	gaa	tta	atg	tta	tgg	gcg	gaa	gat	tgt	ccg	gaa	gta	cgt	576
Ala	Leu	Asp	Glu	Leu	Met	Leu	Trp	Ala	Glu	Asp	Cys	Pro	Glu	Val	Arg	
			180					185					190			
cat	tta	gta	cat	gcg	gat	ttt	ggt	tcg	aat	aat	gta	tta	acg	gat	aat	624
His	Leu	Val	His	Ala	Asp	Phe	Gly	Ser	Asn	Asn	Val	Leu	Thr	Asp	Asn	
		195					200					205				
ggt	cgt	ata	acg	gcg	gta	ata	gat	tgg	tcg	gaa	gcg	atg	ttt	ggt	gat	672
Gly	Arg	Ile	Thr	Ala	Val	Ile	Asp	Trp	Ser	Glu	Ala	Met	Phe	Gly	Asp	
	210					215					220					
tcg	caa	tat	gaa	gta	gcg	aat	ata	ttt	ttt	tgg	cgt	ccg	tgg	tta	gcg	720
Ser	Gln	Tyr	Glu	Val	Ala	Asn	Ile	Phe	Phe	Trp	Arg	Pro	Trp	Leu	Ala	
225					230					235					240	
tgt	atg	gaa	caa	caa	acg	cgt	tat	ttt	gaa	cgt	cgt	cat	ccg	gaa	tta	768
Cys	Met	Glu	Gln	Gln	Thr	Arg	Tyr	Phe	Glu	Arg	Arg	His	Pro	Glu	Leu	
				245					250					255		
gcg	ggt	tcg	ccg	cgt	tta	cgt	gcg	tat	atg	tta	cgt	ata	ggt	tta	gat	816
Ala	Gly	Ser	Pro	Arg	Leu	Arg	Ala	Tyr	Met	Leu	Arg	Ile	Gly	Leu	Asp	
			260					265					270			
caa	tta	tat	caa	tcg	tta	gta	gat	ggt	aat	ttt	gat	gat	gcg	gcg	tgg	864
Gln	Leu	Tyr	Gln	Ser	Leu	Val	Asp	Gly	Asn	Phe	Asp	Asp	Ala	Ala	Trp	
		275					280					285				
gcg	caa	ggt	cgt	tgt	gat	gcg	ata	gta	cgt	tcg	ggt	gcg	ggt	acg	gta	912
Ala	Gln	Gly	Arg	Cys	Asp	Ala	Ile	Val	Arg	Ser	Gly	Ala	Gly	Thr	Val	
	290					295					300					
ggt	cgt	acg	caa	ata	gcg	cgt	cgt	tcg	gcg	gcg	gta	tgg	acg	gat	ggt	960
Gly	Arg	Thr	Gln	Ile	Ala	Arg	Arg	Ser	Ala	Ala	Val	Trp	Thr	Asp	Gly	
305					310					315					320	
tgt	gta	gaa	gta	tta	gcg	gat	tcg	ggt	aat	cgt	cgt	ccg	tcg	acg	cgt	1008
Cys	Val	Glu	Val	Leu	Ala	Asp	Ser	Gly	Asn	Arg	Arg	Pro	Ser	Thr	Arg	
				325					330					335		
ccg	cgt	gcg	aaa	gaa	tga											1026
Pro	Arg	Ala	Lys	Glu												
			340													

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para producir un anticuerpo, que comprende introducir en una célula de CHO en suspensión:

- 5 (a) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un gen marcador seleccionable y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, o
- 10
- 15 (b) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, o
- 20 (c) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico,

25 en el que cada par de secuencias de transposón son secuencias de nucleótidos de Tol1 o secuencias de nucleótidos de Tol2; permitir que una transposasa actúe sobre las secuencias de transposón integrando así los fragmentos génicos en un cromosoma de la célula de CHO para obtener una célula de CHO que expresa el anticuerpo; y cultivar en suspensión la célula de CHO.

30 2. Procedimiento para producir un anticuerpo, que comprende las etapas (A) a (C) siguientes:

(A) introducir simultáneamente en una célula de CHO en suspensión:

- 35 (a) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un gen marcador seleccionable y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, o
- 40
- 45 (b) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, o
- 50 (c) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico,

55 en el que cada par de secuencias de transposón son secuencias de nucleótidos de Tol1 o secuencias de nucleótidos de Tol2, y un vector de expresión que comprende un ADN que codifica una transposasa que reconoce las secuencias de transposón y presenta una actividad de transferencia de un fragmento génico insertado entre un par de secuencias de transposón en un cromosoma;

60 (B) obtener una célula de CHO en suspensión que expresa el anticuerpo expresando de manera transitoria la transposasa a partir del vector de expresión que se introduce en la célula de CHO en suspensión en la etapa (A) para integrar los fragmentos génicos en un cromosoma de la célula de CHO; y

65 (C) cultivar en suspensión la célula de CHO en suspensión que expresa el anticuerpo obtenido en la etapa (B) para producir el anticuerpo.

3. Procedimiento para obtener una célula de CHO en suspensión que expresa un anticuerpo, que comprende introducir en una célula de CHO en suspensión:

- 5 (a) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un gen marcador seleccionable y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, o
- 10 (b) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, o
- 15 (c) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico,
- 20

25 en el que cada par de secuencias de transposón son secuencias de nucleótidos de Tol1 o secuencias de nucleótidos de Tol2; y permitir que una transposasa actúe sobre las secuencias de transposón integrando así los fragmentos génicos en un cromosoma de la célula de CHO.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:

- 30 (i) las secuencias de nucleótidos de Tol2 son la secuencia de nucleótidos representada en SEC ID n°: 2 y la secuencia de nucleótidos representada en SEC ID n°: 3, o
- (ii) las secuencias de nucleótidos de Tol1 son la secuencia de nucleótidos representada en SEC ID n°: 14 y la secuencia de nucleótidos representada en SEC ID n°: 15.
- 35

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el gen marcador seleccionable es un gen de resistencia a cicloheximida.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el gen de resistencia a cicloheximida es un gen que codifica un mutante de la proteína ribosómica humana L36.

40

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:

- 45 (a) la célula de CHO en suspensión es una célula que puede sobrevivir y proliferar en un medio sin suero; y/o
- (b) la célula de CHO en suspensión es una célula de CHO adaptada para el cultivo en suspensión; y/o
- (c) el anticuerpo es un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con tumores, un antígeno relacionado con una alergia o inflamación, un antígeno relacionado con una enfermedad cardiovascular, un antígeno que se relaciona con una enfermedad autoinmunitaria o un antígeno relacionado con una infección bacteriana.
- 50

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la célula de CHO es por lo menos una seleccionada de entre CHO-K1, CHO-K1SV, DUKXB11, CHO/DG44, Pro-3 y CHO-S.

55

9. Célula de CHO en suspensión que presenta un cromosoma en el que se integra:

- 60 (a) un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y que presenta un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y que presenta un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un fragmento génico que comprende un gen marcador seleccionable y que presenta un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, o
- (b) un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y que presenta un par de secuencias de transposón en ambos extremos del
- 65

fragmento génico y un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y que presenta un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, o

5 (c) un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y que presenta un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y que presenta un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico,

10 en la que cada par de secuencias de transposón son secuencias de nucleótidos de Tol1 o secuencias de nucleótidos de Tol2; y que produce el anticuerpo y puede sobrevivir y proliferar en un medio sin suero.

15 10. Célula de CHO según la reivindicación 9, en la que el gen marcador seleccionable es un gen de resistencia a cicloheximida.

11. Célula de CHO según la reivindicación 10, en el que el gen de resistencia a cicloheximida es un gen que codifica un mutante de la proteína ribosómica humana L36a.

20 12. Célula de CHO según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en la que:

(a) la célula de CHO en suspensión es una célula de CHO adaptada al cultivo en suspensión, y/o

25 (b) el anticuerpo es un anticuerpo que reconoce un antígeno relacionado con tumores, un antígeno relacionado con una alergia o inflamación, un antígeno relacionado con una enfermedad cardiovascular, un antígeno que se relaciona con una enfermedad autoinmunitaria o un antígeno relacionado con una infección bacteriana.

30 13. Célula de CHO según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en la que la célula de CHO es cualquiera seleccionada de entre CHO-K1, CHO-K1SV, DUKXB11, CHO/DG44, Pro-3 y CHO-S.

14. Utilización, en un procedimiento para producir un anticuerpo, de:

35 (a) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un gen marcador seleccionable y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, o

40 (b) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, o

45 (c) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena L de un anticuerpo y un gen marcador seleccionable y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico y un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una cadena H de un anticuerpo y comprende asimismo un par de secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico,

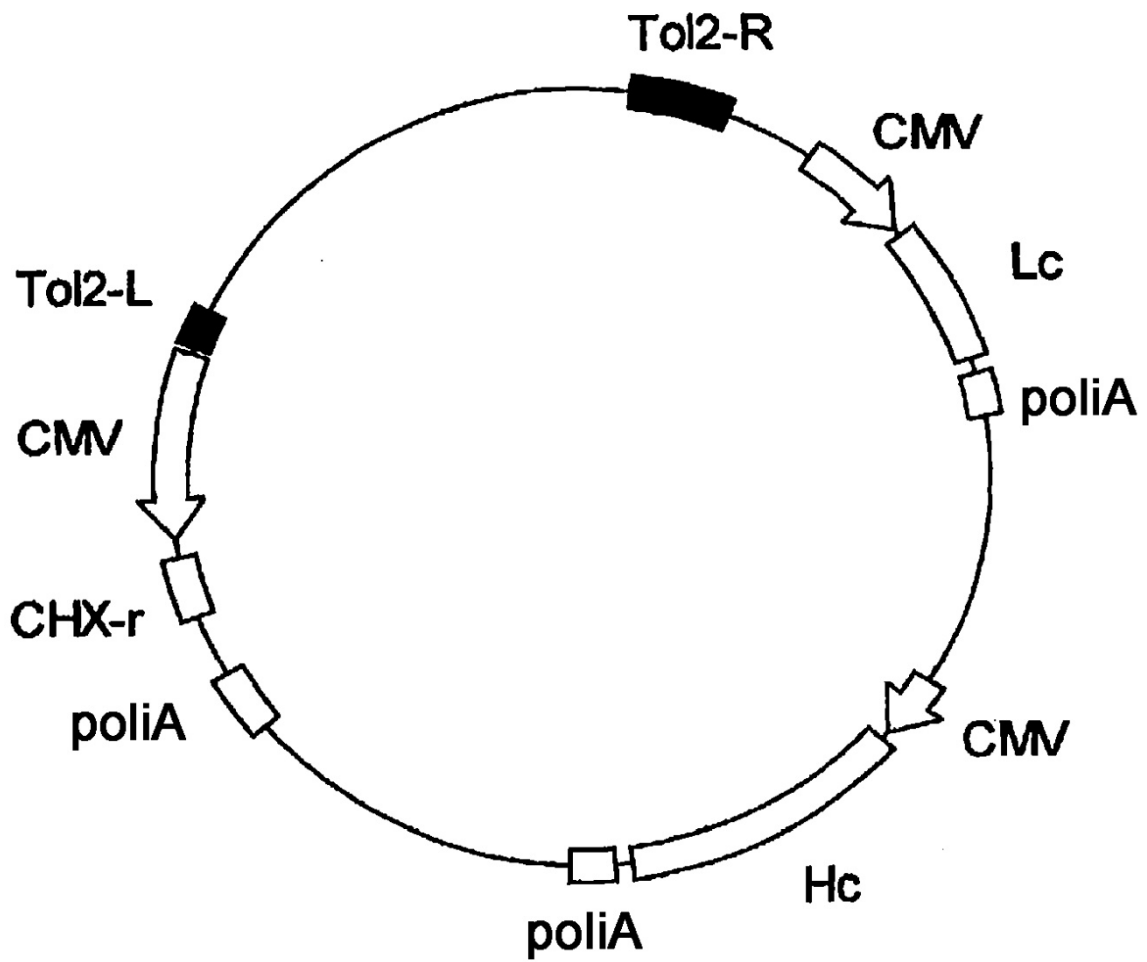
50 en la que cada par de secuencias de transposón son secuencias de nucleótidos de Tol1 o secuencias de nucleótidos de Tol2.

55 15. Célula de CHO según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13 o utilización según la reivindicación 14, en la que:

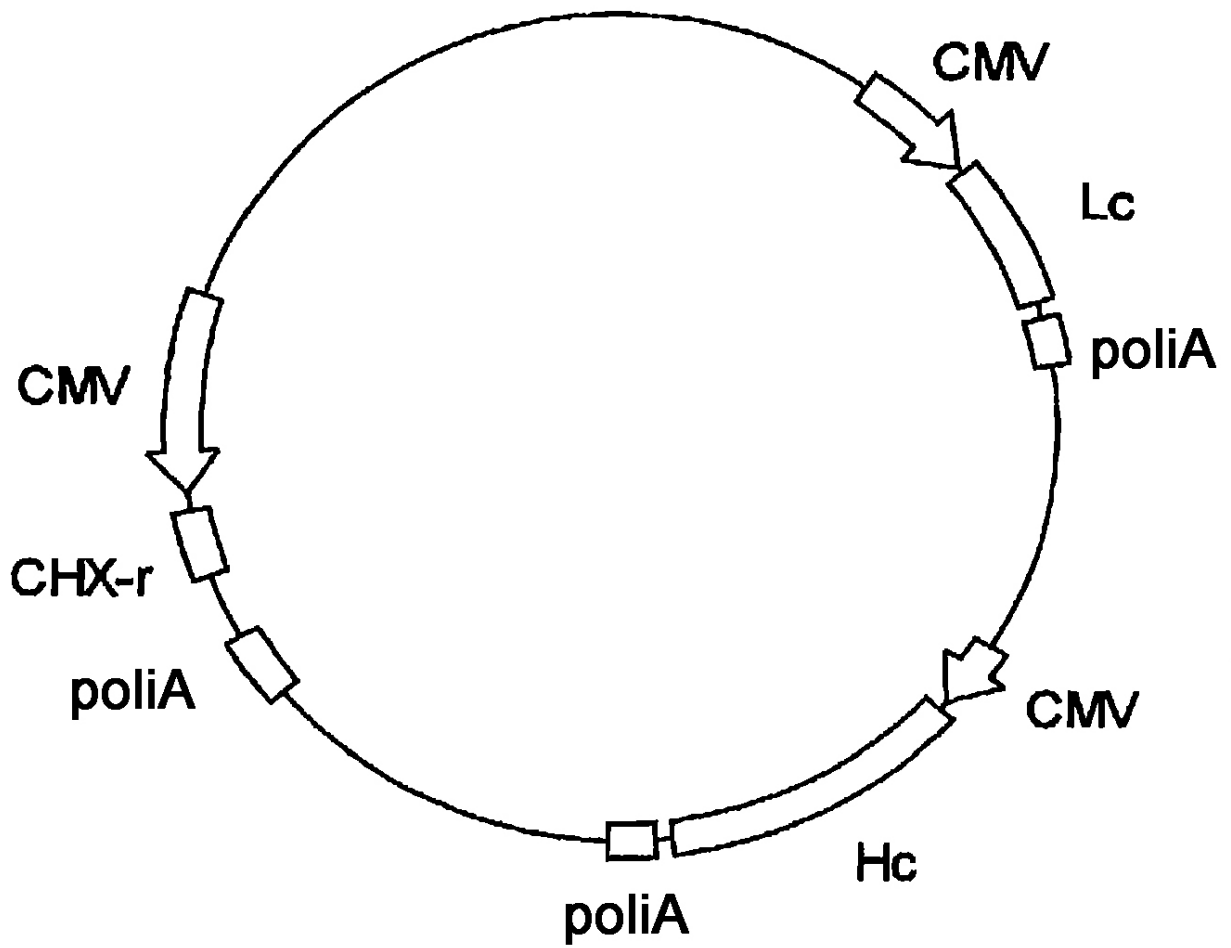
60 (a) las secuencias de nucleótidos de Tol2 son la secuencia de nucleótidos representada en SEC ID n°: 2 y la secuencia de nucleótidos representada en SEC ID n°: 3, o

(b) las secuencias de nucleótidos de Tol1 son la secuencia de nucleótidos representada en SEC ID n°: 14 y la secuencia de nucleótidos representada en SEC ID n°: 15.

*Fig. 1*



*Fig. 2*



*Fig. 3*

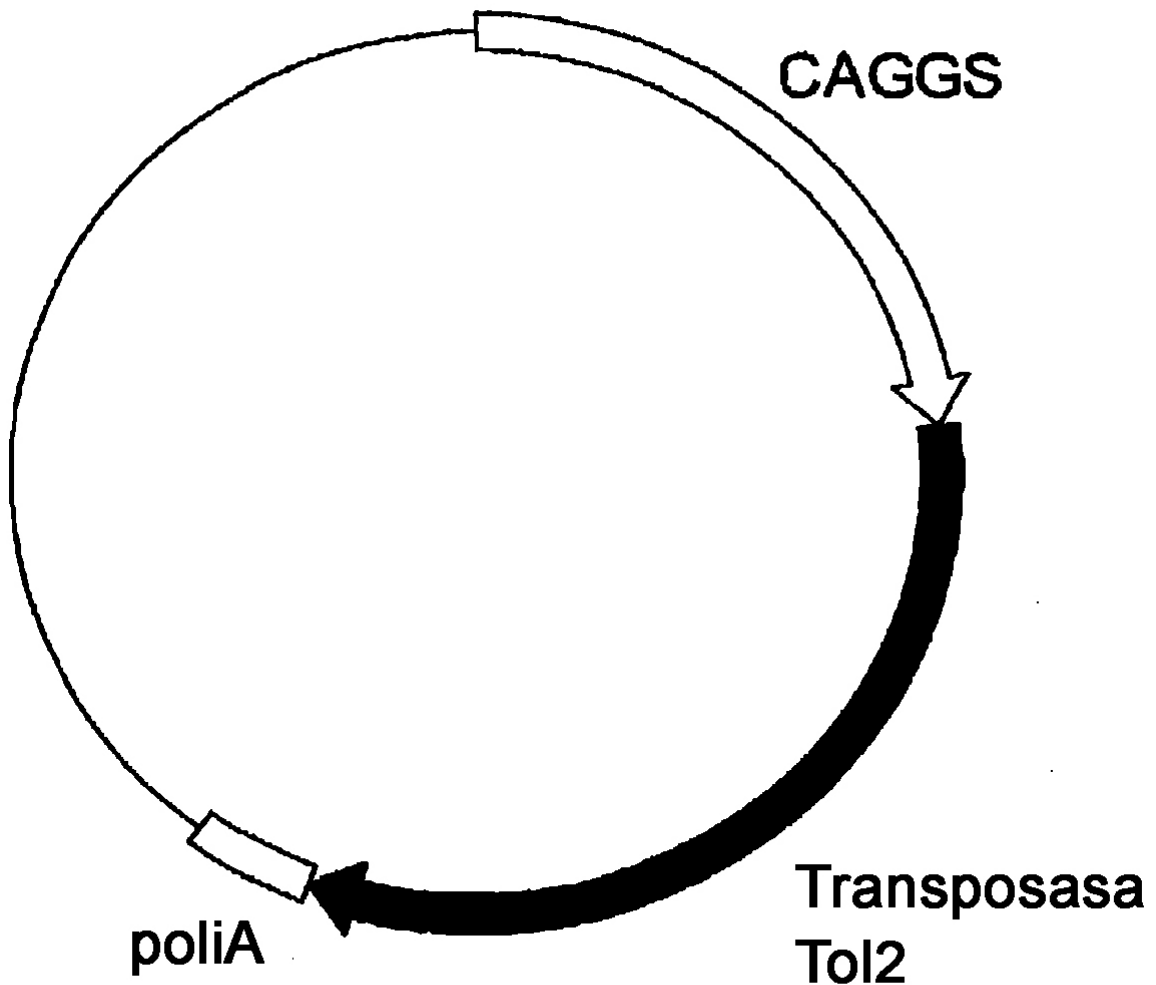
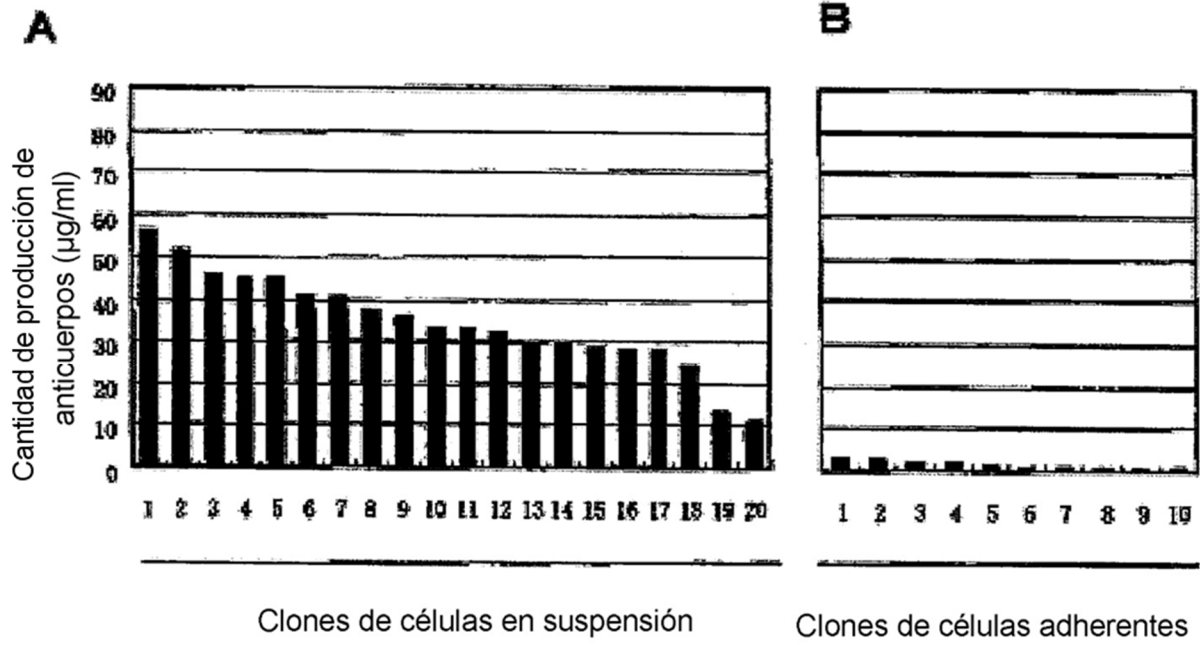
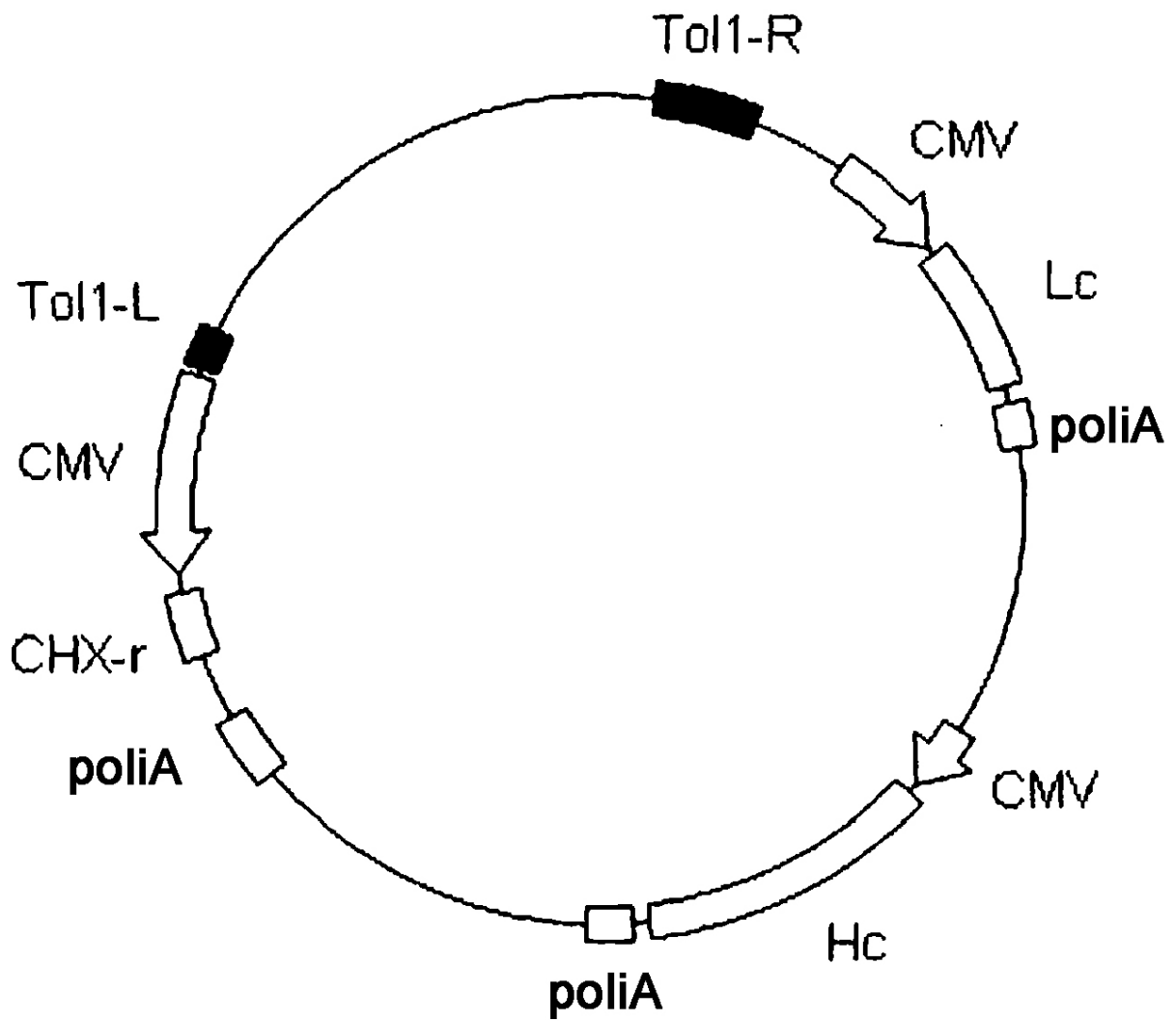




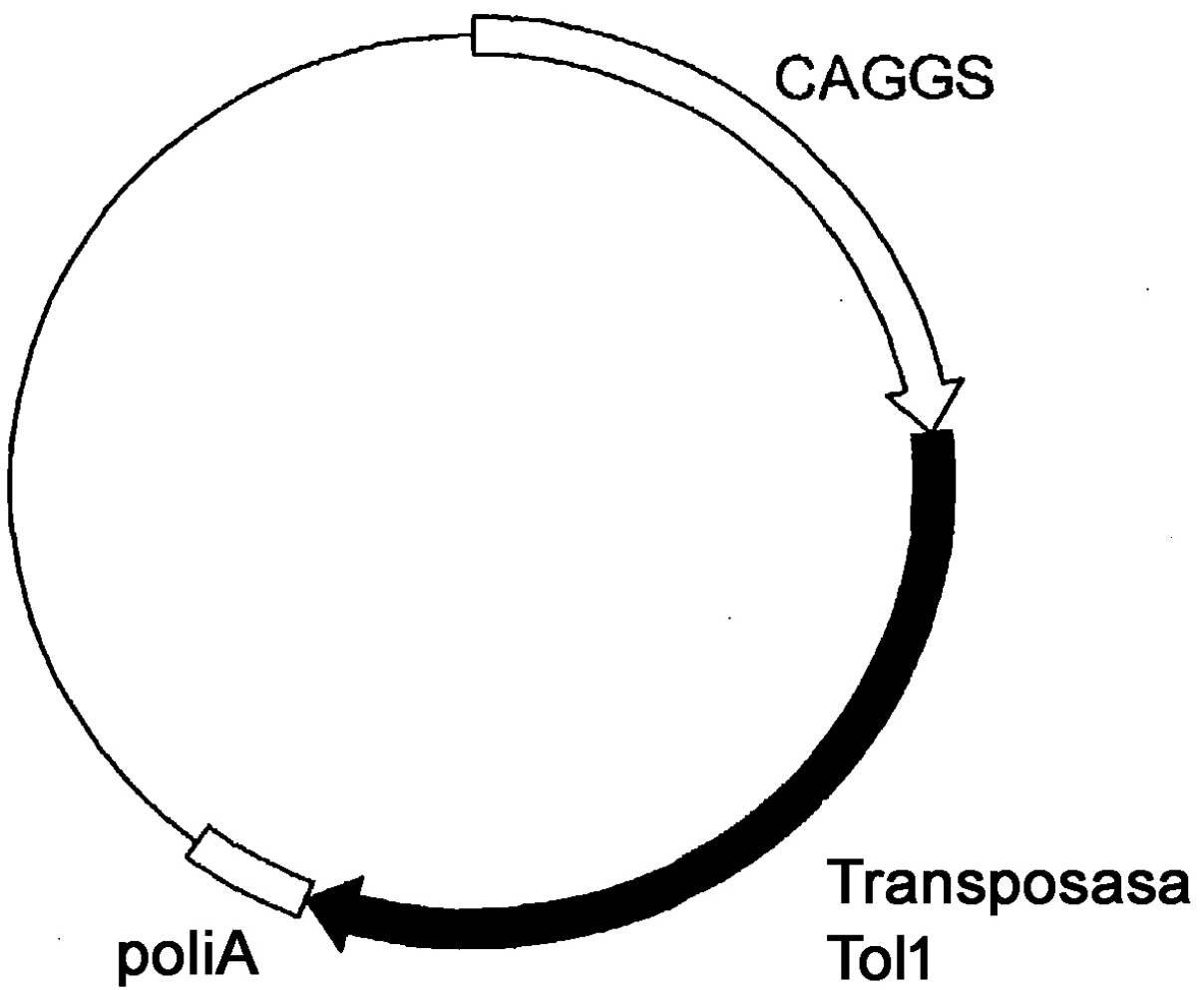
Fig. 4



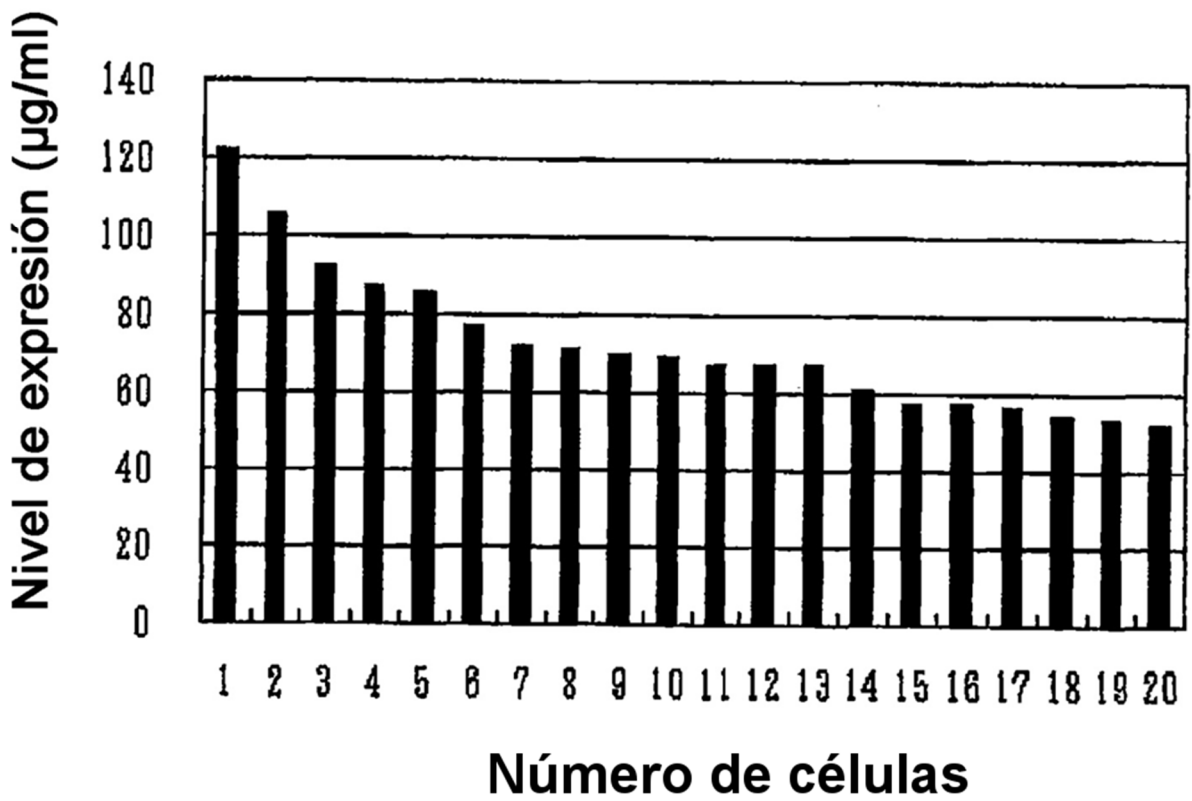
*Fig. 5*



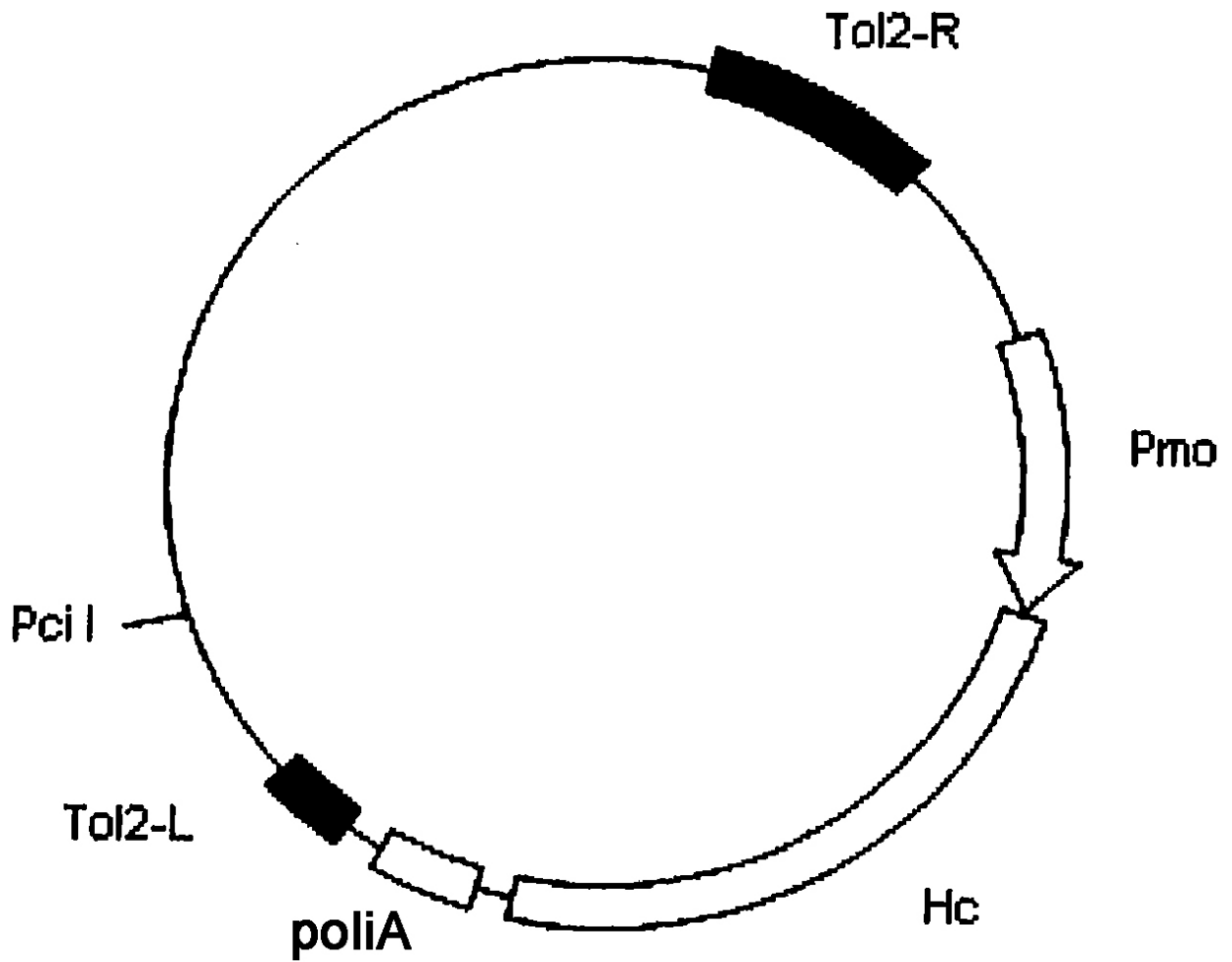
*Fig. 6*



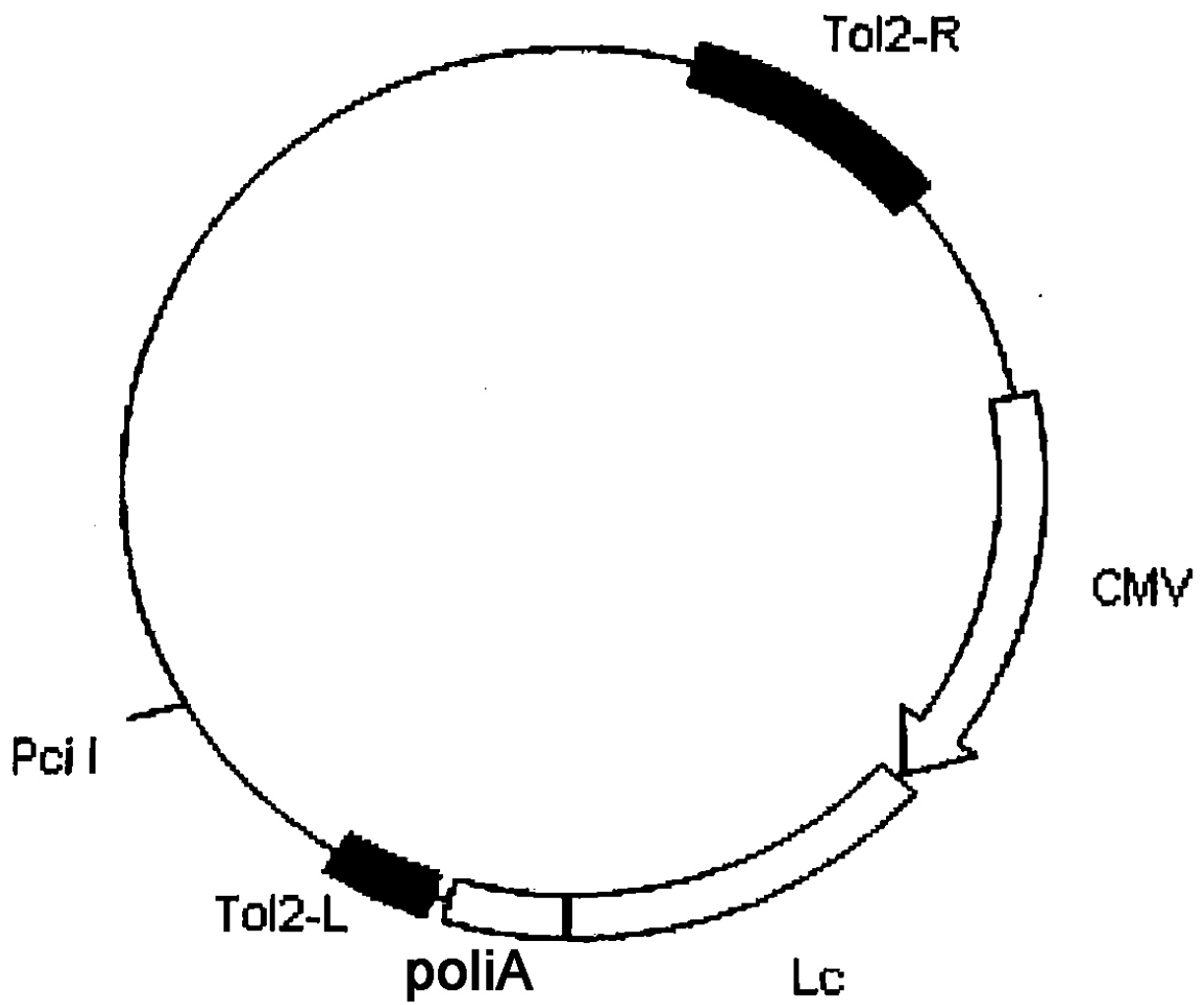
*Fig. 7*



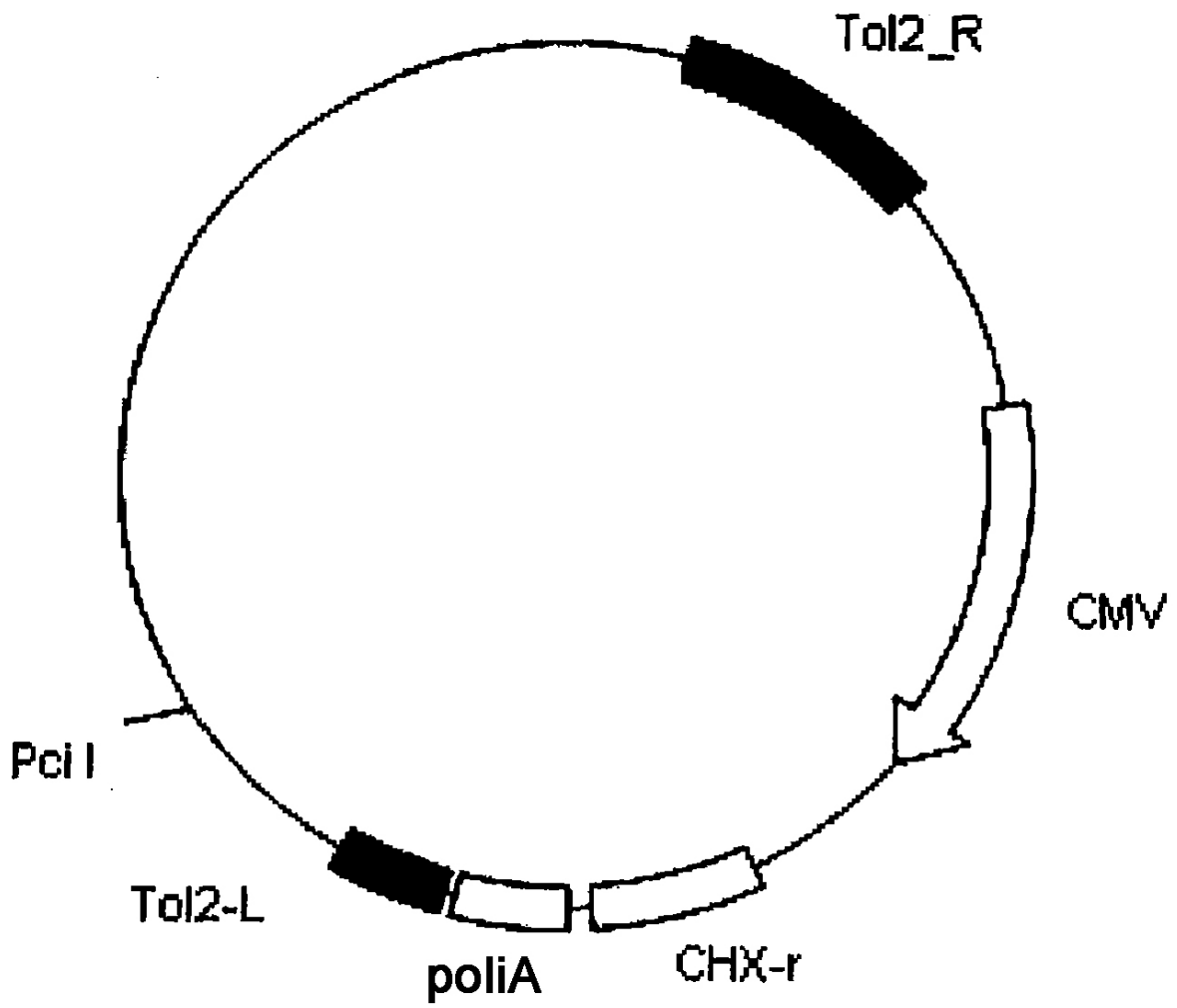
*Fig. 8*



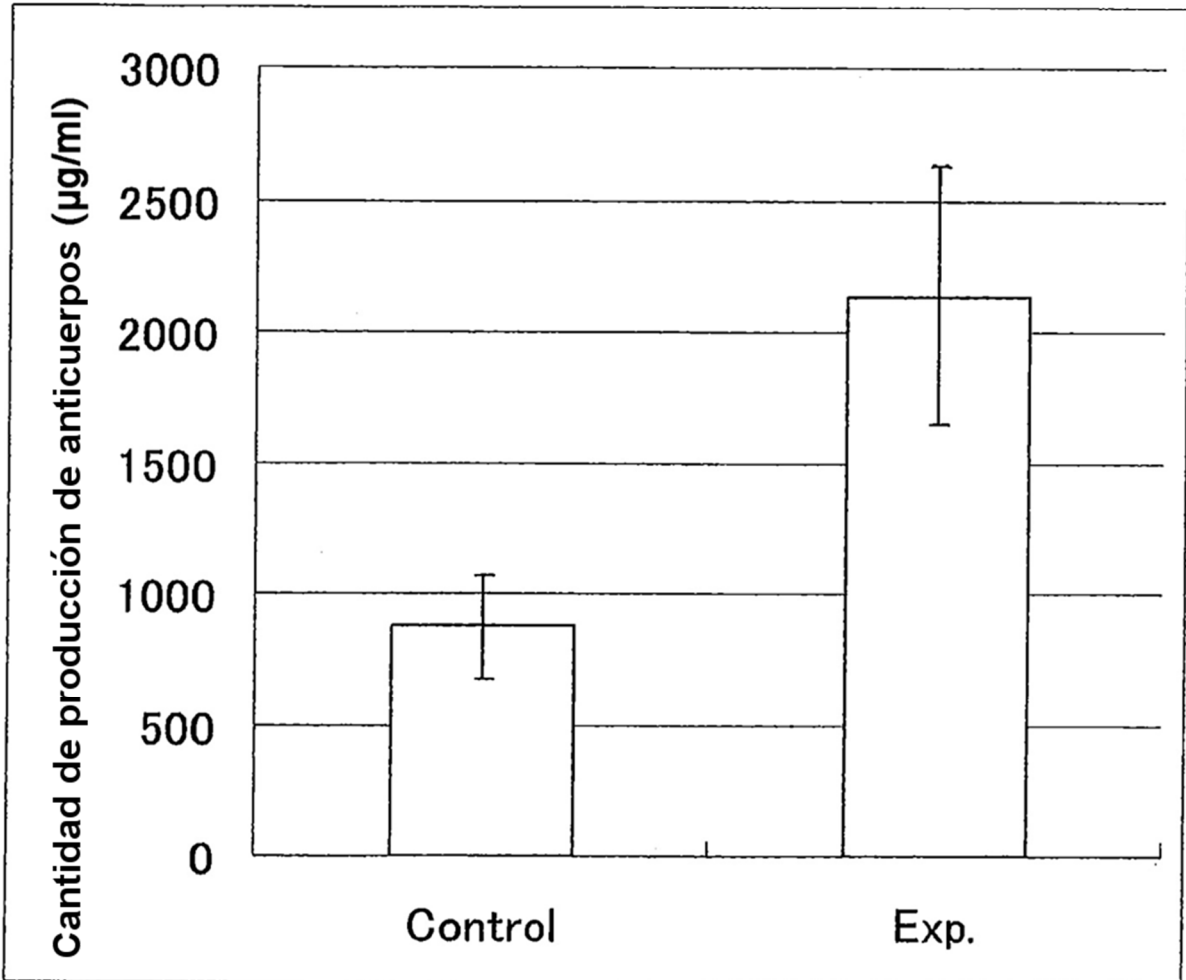
*Fig. 9*



*Fig. 10*

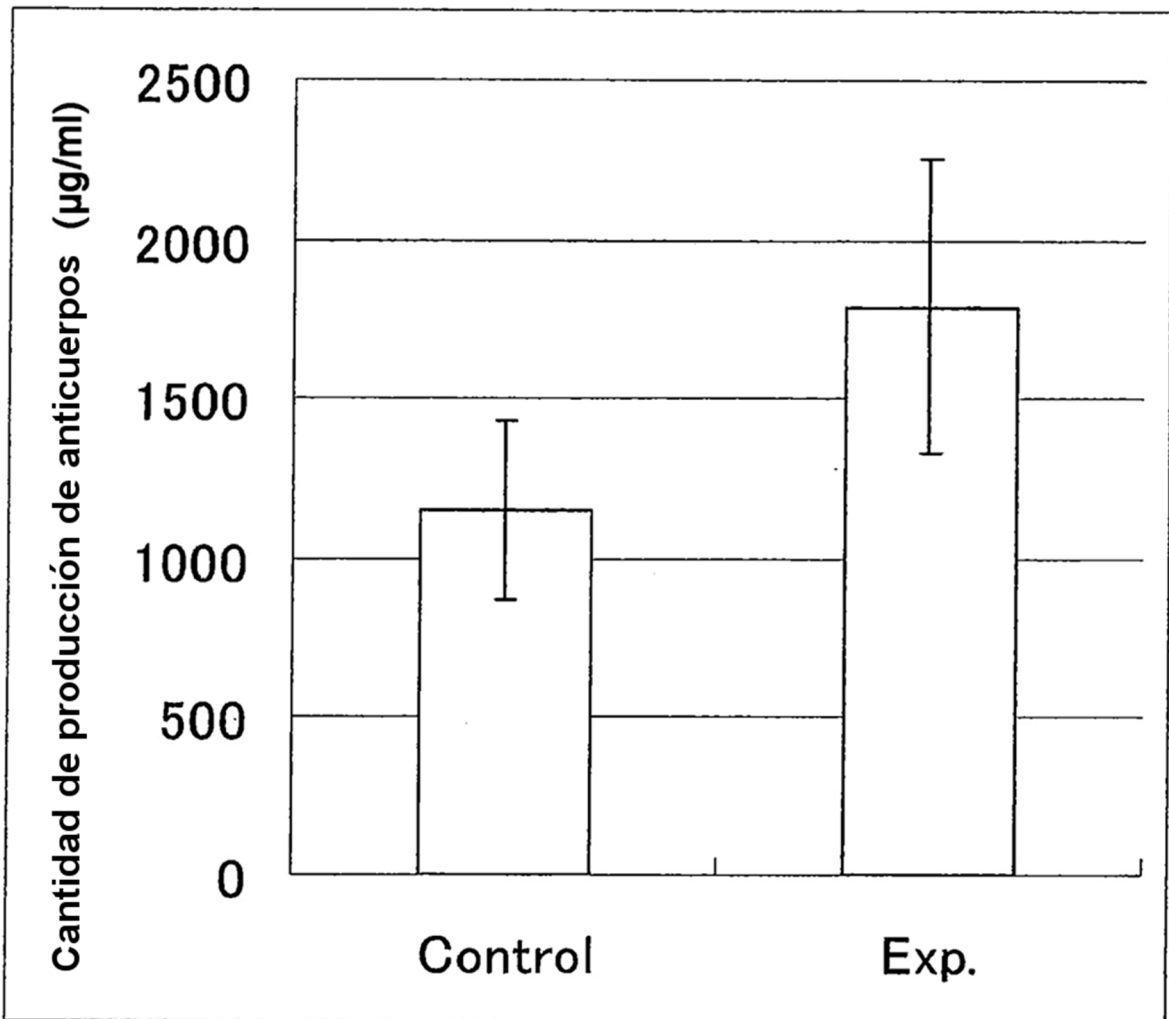


*Fig. 11*





*Fig. 12*



*Fig. 13*

