



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 697 535**

⑮ Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2010 PCT/JP2010/059881**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **16.12.2010 WO10143698**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2010 E 10786229 (4)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2441831**

⑮ Título: **Procedimiento para la producción de proteína**

⑩ Prioridad:

**11.06.2009 JP 2009140626
11.06.2009 US 186138 P**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.01.2019

⑯ 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%)**

⑰ Inventor/es:

**KAWAKAMI, KOICHI;
YAMAGUCHI, KEINA;
OGAWA, RISA y
TSUKAHARA, MASAYOSHI**

⑯ Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 697 535 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 para la producción de proteína.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir una proteína de interés, que comprende introducir un vector de expresión de proteína que comprende un fragmento génico que comprende un ADN codificante de una proteína de interés y un gen marcador seleccionable y secuencias de transposición en ambos 10 extremos del fragmento génico, en una célula de mamífero en suspensión, integrando el fragmento génico insertado entre un par de secuencias de transposición en un cromosoma de la célula de mamífero con el fin de obtener una célula de mamífero apta para expresar la proteína de interés, y cultivar en suspensión la célula de mamífero, y una célula de mamífero apta para expresar la proteína de interés.

15 **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, la producción de proteínas recombinantes se lleva a cabo mediante la introducción de un vector de expresión que comprende una secuencia 20 de nucleótidos codificante de una proteína de interés en un hospedador, tal como *Escherichia coli*, una levadura, una célula de insecto, una célula vegetal y una célula animal, seleccionando un transformante en el que se integra el vector de expresión en el cromosoma, y cultivando además la estirpe celular bajo condiciones de cultivo apropiadas.

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

30 En los sistemas bacterianos, tales como *Escherichia coli* y los sistemas de levadura, diferentes de las células animales, las modificaciones postraduccionales, tales como las modificaciones de cadena sacárida, resultan difíciles de conseguir en muchos casos y, de esta manera, causan un problema durante la producción de una proteína que presente su actividad.

35 Debido a que la proteína producida se somete a una modificación postraduccional, tal como la fosforilación y la adición de cadenas sacáridas en el sistema de insecto, este sistema presenta el mérito de que puede expresarse la proteína con su actividad fisiológica original. Sin embargo, debido a que la estructura de la cadena sacárida de la proteína secretada es diferente de la de las células derivadas de mamífero, la antigenicidad y similares se convierten en un problema al aplicar la proteína al uso farmacéutico.

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

45 En el sistema de célula animal, pueden llevarse a cabo modificaciones postraduccionales, tales como fosforilación, adición de cadena sacárida y plegamiento, en proteínas derivadas de animales superiores, incluyendo el ser humano, de una manera más similar a las producidas en el cuerpo vivo. Dichas modificaciones postraduccionales precisas resultan necesarias para recrear la actividad fisiológica que posee originalmente una 50 proteína en su proteína recombinante, y habitualmente se aplica un sistema de producción de proteína en el que se utiliza una célula de mamífero como hospedador a productos farmacéuticos y similares que requieren dicha actividad fisiológica.

55 Sin embargo, un sistema de expresión de proteína en el que se utiliza una célula de mamífero como hospedador presenta generalmente una baja productividad y también causa en muchos casos un problema de estabilidad de los genes introducidos. La mejora de la productividad de una proteína mediante la utilización de una célula de mamífero en cultivo como hospedador no sólo resulta muy importante para producir medicamentos para el tratamiento, agentes diagnósticos y similares, sino que también presenta una gran contribución a la investigación y desarrollo de los mismos. De esta manera, resulta urgente desarrollar un sistema de expresión génica que 60 posibilite la fácil obtención de una estirpe celular de alta productividad utilizando una célula de mamífero en cultivo, en particular una célula de ovario de hámster chino (célula CHO) como hospedador.

65 Un transposición es un elemento genético transponible que puede transferirse de un locus a otro locus en el cromosoma. Un transposición es una herramienta potente de estudio de la biología y genética molecular y se utiliza con un propósito, tal como la mutagénesis, la captura de genes y la preparación de individuos transgénicos, en insectos o nemátodos (por ejemplo, *Drosophila melanogaster* o *Caenorhabditis elegans*) y plantas. Sin embargo, se ha retrasado el desarrollo de dicha técnica para los animales vertebrados, incluyendo las células de mamífero.

- 5 Sin embargo, en los últimos años se ha informado de transposones que presentan actividades también en animales vertebrados, y algunos de ellos se ha demostrado que presentan una actividad en células de mamífero, tales como células derivadas de ratón y ser humano. Entre los ejemplos típicos se incluyen los transposones Tol1 (referencia de patente nº 1) y Tol2 (referencia no de patente nº 1 y referencia no de patente nº 13) clonados a partir de pez medaka (ciprinodóntido), 'Sleeping Beauty' reconstruido a partir de un transposón no autónomo existente en el genoma de un pez *Onchorhynchus* (referencia no de patente nº 2), el transposón artificial 'Frog prince' (referencia no de patente nº 3), que se deriva de la rana y un transposón piggyBac (referencia no de patente nº 4), que se deriva de un insecto.
- 10 Estos transposones de ADN se han utilizado para mutagénesis, captura de genes, preparación de individuos transgénicos, expresión de proteínas resistentes a fármaco y similares, como herramienta de transferencia génica para producir un nuevo fenotipo en un genoma de una célula de mamífero (referencias no de patente nº 5 a nº 12).
- 15 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 proteína que utiliza las técnicas anteriormente indicadas (referencia de patente nº 2).
- 20 Sin embargo, debido a que la proteína de interés expresada no presenta un nivel de expresión suficiente y se produce en todo el cuerpo del gusano de seda, causa 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 de líquido corporal que incluye una gran cantidad de proteínas contaminadas.
- 25 Además, se conoce un ejemplo en el que se expresa una proteína relacionada con la resistencia a G418 en una célula de mamífero mediante la utilización del transposón derivado de medaka Tol2 (referencia no de patente nº 2)
- 30 Se ha identificado una secuencia en cis mínima y una secuencia altamente repetitiva en la región subterminal del transposón Tol2 que resultan esenciales para la transposición (referencia no de patente nº 14).
- 35 Una técnica para seleccionar células en las que se ha transferido un gen en un estado estable mediante la utilización de un nuevo gen de resistencia a fármaco como marcador estable y una técnica para obtener células en las que se expresa un gen a nivel elevado se dan a conocer en la referencia de patente nº 3.

Listado de referencias

- 40 Literatura de patentes
- Referencia de patente nº 1 WO2008/072540
 Referencia de patente nº 2 Solicitud publicada de patente japonesa no examinada nº 2001-532188
 Referencia de patente nº 3 Solicitud publicada de patente japonesa nº 2002-262879
- 45 Literatura no de patentes
- Referencia no de patente nº 1 Nature 383, 30 (1996)
 Referencia no de patente nº 2 Cell 91, 501-510 (1997)
 Referencia no de patente nº 3 Nucleic Acids Res, 31, 6873-6881 (2003)
 Referencia no de patente nº 4 Insect Mol.Biol.5, 141-151 (1996)
 Referencia no de patente nº 5 Genetics.166, 895-899 (2004)
 Referencia no de patente nº 6 PLoS Genet, 2, e169 (2006)
 Referencia no de patente nº 7 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 10769-10773 (1998)
 Referencia no de patente nº 8 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:6759-6764 (2001)
 Referencia no de patente nº 9 Nature 436, 221- 6 (2005)
 Referencia no de patente nº 10 Nucleic Acids Res., 31, 6873-6881 (2003)
 Referencia no de patente nº 11 Nucleic Acids Res., 35, e87 (2007)
 Referencia no de patente nº 12 Proc Natl. Acad. Sci. USA, 103, 15008-15013 (2006)
 Referencia no de patente nº 13 Genome Biology, 8 suppl I, S7.1-S7.10 (2007)
 Referencia no de patente nº 14 Genetics 174, 639-649 (2006)

Sumario de la invención

- 65 Problema técnico
- Con el fin de producir y analizar una proteína de interés, resulta necesario seleccionar una estirpe celular que

exprese establemente y a nivel elevado una proteína de interés utilizando una célula en cultivo derivada de mamífero, aunque la preparación y el cultivo de la célula que produce la proteína de interés requiere esfuerzo y tiempo considerables.

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

10 Tal como se ha mencionado anteriormente, se ha necesitado expresar una proteína de interés en una cantidad elevada mediante el establecimiento de un sistema de producción de proteína que pueda producir a nivel elevado una proteína de interés mediante la utilización de una célula de mamífero en cultivo de manera eficiente y en un corto tiempo. 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 de manera eficiente y un procedimiento para producir la proteína de interés mediante la utilización de la célula.

Solución a los problemas

20 Con el fin de resolver los problemas anteriormente mencionados, en el contexto de la presente invención se han llevado a cabo unos estudios exhaustivos y se ha descubierto como resultado que puede prepararse de manera eficiente una célula de mamífero capaz de expresar a nivel elevado una proteína de interés mediante la introducción de un vector de expresión de proteína que comprende un fragmento génico que comprende un ADN codificador de la proteína de interés y un gen marcador seleccionable y 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 las secuencias de transposón en un cromosoma de la célula de mamífero. Además, se ha descubierto que la proteína de interés puede producirse de manera eficiente mediante la utilización de la célula y de esta manera se ha llevado a cabo la invención.

30 Descripción detallada de la invención

Específicamente, la invención es tal como como se expone a continuación:

- 35 1. Un procedimiento para producir una proteína de interés, que comprende introducir un vector de expresión de proteína que comprende un fragmento génico que comprende un ADN codificador de una proteína de interés y un gen marcador seleccionable y, en ambos extremos del fragmento génico, un par de secuencias de transposón que son las secuencias de nucleótidos de Tol1 mostradas en SEC ID nº 14 y SEC ID nº 15 o las secuencias de nucleótidos de Tol2 mostradas en SEC ID nº 2 y SEC ID nº 3, en una célula de CHO en suspensión capaz de sobrevivir y proliferar en un medio sin suero; introducir un vector de expresión (b) que comprende un ADN codificador de una transposasa que reconoce las secuencias de transposón y posee actividad de transferencia del fragmento génico insertado entre las secuencias de transposón en un cromosoma al interior de la célula de CHO; integrar el fragmento génico insertado entre las secuencias de transposón en un cromosoma de la célula de CHO para obtener una de dichas células de CHO capaz de expresar la proteína de interés, y cultivar en suspensión la célula de CHO.
- 40 2. Un procedimiento descrito en el ítem 1 anteriormente mencionado, para producir una proteína de interés, que comprende:
- 45 (A) introducir simultáneamente los vectores de expresión (a) y (b) en la célula de CHO,
- 50 (B) expresar transitoriamente la transposasa a partir del vector de expresión introducido en la etapa (A) para integrar el fragmento génico insertado entre las secuencias de transposón en un cromosoma de la célula de CHO con el fin de obtener una célula de CHO en suspensión capaz de expresar la proteína de interés, y
- 55 (C) cultivar en suspensión la célula de CHO en suspensión capaz de expresar la proteína de interés obtenida en la etapa (B) para producir la proteína de interés.
- 60 3. Un procedimiento para obtener una célula de CHO en suspensión capaz de expresar una proteína de interés, que comprende introducir un vector de expresión de proteína que comprende un fragmento génico que comprende un ADN codificador de una proteína de interés y un gen marcador seleccionable y, en ambos extremos del fragmento génico, un par de secuencias de transposón que son las secuencias de nucleótidos de Tol1 mostradas en SEC ID nº 14 y SEC ID nº 15 o las secuencias de nucleótidos de Tol2 mostradas en SEC ID nº 2 y SEC ID nº 3, en una célula de CHO en suspensión capaz de sobrevivir y proliferar en un medio sin suero; introducir un vector de expresión (b) que comprende un ADN codificador

de una transposasa que reconoce las secuencias de transposición y posee actividad de transferencia del fragmento génico insertado entre las secuencias de transposición en un cromosoma al interior de la célula de CHO; e integrar el fragmento génico insertado entre un par de secuencias de transposición, en un cromosoma de la célula de CHO.

- 5 4. El procedimiento descrito en cualquiera de los ítems 1 a 3 anteriormente mencionados, en el que la célula de CHO es por lo menos una seleccionada de CHO-K1, CHO-K1SV, DUKXB11, CHO/DG44, Pro-3 y CHO-2.
- 10 5. El procedimiento descrito en cualquiera de los ítems 1 a 4 anteriormente mencionados, en el que el gen marcador seleccionable es un gen de resistencia a cicloheximida.
- 15 6. El procedimiento descrito en el ítem 5 anteriormente mencionado, en el que el gen de resistencia a cicloheximida es un gen codificante de un mutante de la proteína ribosómica humana L36a.
- 20 7. El procedimiento descrito en el ítem 6 anteriormente mencionado, en el que el mutante es un mutante en el que la prolina en la posición 54 de la proteína ribosómica humana L36a se sustituye por otro aminoácido.
- 25 8. El procedimiento descrito en el ítem 7 anteriormente mencionado, en el que el otro aminoácido es la glutamina.
- 30 9. Una célula de CHO en suspensión capaz de sobrevivir y proliferar en un medio sin suero y de producir una proteína de interés, en la que la célula comprende un vector de expresión (a) que comprende un fragmento génico que comprende un ADN codificante de una proteína de interés y un gen marcador seleccionable y, en ambos extremos del fragmento génico, un par de secuencias de transposición que son las secuencias de nucleótidos de Tol1 mostradas en SEC ID nº 14 y SEC ID nº 15 o las secuencias de nucleótidos de Tol2 mostradas en SEC ID nº 2 y SEC ID nº 3 y un vector de expresión (b) que comprende un ADN codificante de una transposasa (una transferasa) que reconoce las secuencias de transposición y posee actividad de transferencia del fragmento génico insertado entre las secuencias de transposición en un cromosoma para integrar el fragmento génico insertado entre las secuencias de transposición en el cromosoma de la célula de CHO.
- 35 10. La célula descrita en el ítem 9 anteriormente mencionado, en la que la célula de CHO es por lo menos una seleccionada de CHO-K1, CHO-K1SV, DUKXB11, CHO/DG44, Pro-3 y CHO-S;
- 40 11. La célula descrita en el ítem 9 o 10 anteriormente mencionada, en la que el gen marcador seleccionable es un gen de resistencia a la cicloheximida.
- 45 12. La célula descrita en el ítem 11 anteriormente mencionado, en el que el gen de resistencia a cicloheximida es un gen codificante de un mutante de la proteína ribosómica humana L36a.
- 50 13. El procedimiento descrito en el ítem 12 anteriormente mencionado, en el que el mutante es un mutante en el que la prolina en la posición 54 de la proteína ribosómica humana L36a se sustituye por otro aminoácido.
- 55 14. La célula descrita en el ítem 13 anteriormente mencionado, en el que el otro aminoácido es la glutamina, y
- 60 15. Utilización de un vector de expresión de proteína (a) que comprende un fragmento génico que comprende un ADN codificante de una proteína de interés y un gen marcador seleccionable y, en ambos extremos del fragmento génico, un par de secuencias de transposición que son las secuencias de nucleótidos de Tol1 mostradas en SEC ID nº 14 y SEC ID nº 15 o las secuencias de nucleótidos de Tol2 mostradas en SEC ID nº 2 y SEC ID nº 3 y un vector de expresión (b) que comprende un ADN codificante de una transposasa que reconoce las secuencias de transposición y posee actividad de transferencia del fragmento génico insertado entre las secuencias de transposición en un cromosoma para integrar el fragmento génico insertado entre las secuencias de transposición en el cromosoma de una célula de CHO en suspensión capaz de sobrevivir y proliferar en un medio sin suero.

Efectos ventajosos de la invención

Según el procedimiento de producción de proteína de la invención, puede producirse eficientemente una proteína de interés mediante la utilización de una célula de mamífero. Además, puede utilizarse la célula de la invención como célula de producción de proteína para producir una proteína recombinante con una eficiencia elevada.

Breve descripción de los dibujos

- 5 [Figura 1] La figura 1 representa una ilustración esquemática de un vector transposón para expresar un anticuerpo anti-M2 de influenza humana. Tol2-L representa un transposón de lado izquierdo de Tol2 (SEC ID nº 2), Tol2-R representa un transposón de lado derecho de Tol2 (SEC ID nº 3); CMV representa un promotor del CMV; poli A 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.
- 10 [Figura 2] La figura 2 representa una ilustración esquemática de un vector de expresión de anticuerpo anti-M2 de influenza humana. CMV representa un promotor del CMV; poli A 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.
- 15 [Figura 3] La figura 3 representa una ilustración esquemática de un vector de expresión de transposasa Tol2. CAGGS representa un promotor CAGGS; poli A representa un sitio de poliadenilación y ADNc de TPasa representa el ADNc de una transposasa Tol2.
- 20 [Figura 4A] La figura 4A representa el resultado del examen del nivel de expresión de un anticuerpo anti-M2 de influenza humana en una célula de CHO-K1 en suspensión al utilizar un vector transposón Tol2 para expresar un anticuerpo anti-M2 de influenza humana. La ordenada muestra el nivel producido de anticuerpo ($\mu\text{g/ml}$) y la abscisa muestra el número de clones transgénicos de la célula de CHO-K1 en suspensión.
- 25 [Figura 4B] La figura 4B representa el resultado del examen del nivel de expresión de un anticuerpo anti-M2 de influenza humana en una célula de CHO-K1 adhesiva al utilizar un vector transposón Tol2 para expresar un anticuerpo anti-M2 de influenza humana. La ordenada muestra el nivel producido de anticuerpo ($\mu\text{g/ml}$) y la abscisa muestra el número de clones transgénicos de la célula de CHO-K1 adhesiva.
- 30 [Figura 5] La figura 5 representa una ilustración esquemática de un vector transposón Tol1 para expresar un anticuerpo anti-M2 de influenza humana. Tol1-L representa un transposón de lado izquierdo de Tol1 (SEC ID nº 14), Tol1-R representa un transposón de lado derecho de Tol1 (SEC ID nº 15); CMV representa un promotor del CMV; poli A 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.
- 35 [Figura 6] La figura 6 representa una ilustración esquemática de un vector de expresión de transposasa Tol1. CAGGS representa un promotor CAGGS; poli A representa un sitio de poliadenilación y ADNc de TPasa representa el ADNc de una transposasa Tol1.
- 40 [Figura 7] La figura 7 representa el resultado del examen del nivel de expresión de un anticuerpo anti-M2 de influenza humana en una célula de CHO-K1 en suspensión al utilizar un vector transposón Tol1 para expresar un anticuerpo anti-M2 de influenza humana. La ordenada muestra el nivel producido de anticuerpo ($\mu\text{g/ml}$) y la abscisa muestra el número de clones transgénicos de la célula de CHO-K1 en suspensión.
- 45 La invención se refiere a un procedimiento para producir una proteína de interés, que comprende introducir un vector de expresión de proteína que comprende un fragmento génico que comprende un ADN codificante de una proteína de interés y un gen marcador seleccionable y secuencias de transposición en ambos extremos del fragmento génico, en una célula de mamífero en suspensión, integrando el fragmento génico insertado entre un par (dos) de secuencias de transposición en un cromosoma de la célula de mamífero con el fin de obtener una célula de mamífero apta para expresar dicha proteína de interés, y cultivar en suspensión la célula de mamífero.
- 50 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:
- 55 (A) una etapa de introducción simultánea de los vectores de expresión siguientes, (a) y (b), en una célula de mamífero en suspensión:
- 60 (a) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN codificante de una proteína de interés y secuencias de transposición en ambos extremos del fragmento génico,
- (b) un vector de expresión que comprende un ADN codificante de una transposasa que reconoce las secuencias de transposición y posee actividad de transferencia de un fragmento génico insertado entre un par de las secuencias de transposición al interior de un cromosoma,
- 65 (B) una etapa de expresión transitoria de la transposasa a partir del vector de expresión introducido en la etapa (A) para integrar el fragmento génico insertado entre un par de las secuencias de transposición en un

cromosoma de la célula de mamífero con el fin de obtener una célula de mamífero en suspensión capaz de expresar la proteína de interés, y

5 (C) una etapa de cultivo en suspensión de la célula de mamífero en suspensión capaz de expresar la proteína de interés obtenida en la etapa (B) para producir la proteína de interés.

Además, la presente invención se refiere a una célula de mamífero en suspensión capaz de producir una 10 proteína de interés, en la que se introduce un vector de expresión de proteína que comprende un fragmento génico que comprende un ADN codificante de una proteína de interés y un gen marcador seleccionable y secuencias de transposición en ambos extremos del fragmento génico, para integrar el fragmento génico insertado entre un par de las secuencias de transposición en un cromosoma.

Además, la presente invención se refiere a una célula de mamífero en suspensión capaz de producir una 15 proteína de interés, en la que un vector de expresión (a) que comprende un fragmento génico que comprende un ADN codificante de una proteína de interés y un gen marcador seleccionable y secuencias de transposición en ambos extremos del fragmento génico, y un vector de expresión (b) que comprende un ADN codificante de una transposasa (una transferasa) que reconoce las secuencias de transposición y posee actividad de transferencia del fragmento génico insertado entre un par de las secuencias de transposición a un cromosoma para integrar el fragmento génico insertado entre un par de las secuencias de transposición dentro del cromosoma.

20 20 El término "transposición" en la presente memoria es un elemento genético transponible y se refiere a una unidad génica que se desplaza en un cromosoma o de un cromosoma a otro cromosoma (transposición) manteniendo una determinada estructura.

25 25 El transposición comprende una unidad génica de secuencias de transposición repetidas (también denominadas secuencias repetidas invertidas (secuencias IR) o secuencias repetidas invertidas terminales (secuencias IRT)) que se sitúan en la misma dirección o en la dirección inversa en ambos extremos de la unidad génica, y una secuencia de nucleótidos codificante de una transposasa que reconoce la secuencia de transposición para transferir un gen presente entre las secuencias de transposición.

30 30 La transposasa traducida a partir del transposición puede transferir un ADN mediante el reconocimiento de secuencias de transposición de ambos extremos del transposición, extrayendo mediante corte el fragmento de ADN insertado entre un par de las secuencias de transposición e insertando el fragmento en el sitio que debe transferirse.

35 35 La expresión "secuencia de transposición" en la presente memoria se refiere a la secuencia de nucleótidos de un transposición reconocido por una transposasa y presenta el mismo significado que la secuencia IR o la secuencia IRT. Un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos puede comprender una fracción repetida imperfecta con la condición de que pueda transferirse (insertarse en otra posición en el genoma) mediante la actividad de una transposasa, y comprende una secuencia de transposición específica de la transposasa.

40 40 Como secuencia de transposición 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 ser transpuestos a células de mamíferos.

45 45 La secuencia de nucleótidos derivada de un transposición de tipo ADN es un par de secuencias de nucleótidos derivados del transposición1 o transposición2 derivado del pez medaka.

50 50 Las secuencias de nucleótidos de los transposones Tol2 y Tol1 derivados del pez medaka se muestran en SEC ID nº 6 y SEC ID nº 13, respectivamente.

55 55 Entre los ejemplos de una secuencia de nucleótidos derivada de un par de transposones Tol2 se incluyen la secuencia de nucleótidos en las posiciones 1 a 2.229 y la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 4.148 y 4.682 en la secuencia de nucleótidos del transposición Tol2 mostrada en la SEC ID nº 6 del Listado de secuencias.

60 60 Como secuencia de nucleótidos derivada de un par de transposones Tol2, se utiliza la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1 y 200 (SEC ID nº 2) (en adelante denominada "secuencia Tol2-L") y la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 2.285 y 2.788 (SEC ID nº 3) (en adelante denominada "secuencia Tol2-R") en la secuencia de nucleótidos del transposición Tol2 mostrada en la SEC ID nº 1 del Listado de secuencias.

65 65 Entre los ejemplos de una secuencia de nucleótidos derivada de un par de transposones Tol1 se incluyen la secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1 y 157 y la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1.748 y 1.855 en la secuencia de nucleótidos del transposición Tol1 mostrada en la SEC ID nº 13 del Listado de secuencias.

65 Como secuencia de nucleótidos derivada de un par de transposones Tol1, se utiliza la secuencia de nucleótidos

entre las posiciones 1 y 200 (SEC ID nº 14) (en adelante denominada "secuencia Tol1-L") y la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1.351 y 1.855 (SEC ID nº 15) (en adelante denominada "secuencia Tol1-R") en la secuencia de nucleótidos del transposón Tol2 mostrada en la SEC ID nº 1 del Listado de secuencias.

- 5 Entre los ejemplos de la secuencia de transposón se incluyen las secuencias de transposón las reacciones de transferencia de las cuales se controlan mediante la utilización de una secuencia parcial de una secuencia de transposón derivada del transposón anteriormente mencionado, mediante el ajuste de la longitud de la secuencia de nucleótidos y mediante la modificación de la secuencia de nucleótidos debido a adición, eliminación o sustitución.
- 10 Con respecto al control de la reacción de transferencia de un transposón, la reacción de transferencia puede acelerarse o suprimirse mediante la aceleración o supresión, respectivamente, del reconocimiento de la secuencia de transposón por parte de una transposasa.
- 15 El término "transposasa" en la presente memoria se refiere a un enzima que reconoce las secuencias de nucleótidos que presentan secuencias de transposón y transfieren un ADN presente entre las secuencias de nucleótidos al interior de un cromosoma o del cromosoma a otro cromosoma.
- 20 Entre los ejemplos de la transposasa se incluyen Tol1 y Tol2, que se deriva del pez medaka, 'Sleeping Beauty' reconstruido a partir de un transposón no autónomo presente en el genoma de un pez *Onchorhynchus*, el transposón artificial 'Frog prince', que se deriva de la rana, y el transposón PiggyBac, que se deriva de un insecto.
- 25 Como transposasa, puede utilizarse un enzima nativo, y puede utilizarse cualquier transposasa en la que una parte de sus aminoácidos han sido sustituidos, eliminados, insertados y/o añadidos, con la condición de que se mantenga la misma actividad de transferencia de la transposasa. Mediante el control de la actividad enzimática de la transposasa, puede controlarse la reacción de transferencia del ADN existente entre las secuencias de transposón.
- 30 Con el fin de analizar si posee o no una actividad de transferencia 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.
- 35 A título ilustrativo, puede analizarse si un elemento Tol2 no autónomo puede transferirse e insertarse o no en un cromosoma de célula de mamífero por la actividad de una transposasa, mediante la utilización separada de un plásmido que comprende un transposón Tol2 con delección de transposasa Tol2 (transposón no autónomo derivado de Tol2) y un plásmido que comprende la transposasa Tol2.
- 40 La expresión "transposón no autónomo" en la presente memoria se refiere a un transposón que ha perdido una transposasa presente dentro del transposón y que, por lo tanto, no puede llevarse a cabo su transferencia autónoma. El transposón no autónomo puede transferir el ADN insertado entre las secuencias de transposón del transposón no autónomo al cromosoma de la célula hospedadora en el caso de que se permita que una proteína transposasa, un ARNm codificador de la proteína transposasa o a un ADN codificador de la proteína transposasa se encuentren presentes simultáneamente en la célula.
- 45 El gen de transposasa se refiere a un gen codificador 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 ribosómica, la secuencia de Shine-Dalgarno y el codón de inicio, de distancia apropiada (por ejemplo, de 6 a 18 bases), puede conectarse a un sitio situado cadena arriba del codón de inicio de traducción ATG del gen.
- 50 Según el procedimiento de la invención, con el fin de integrar un fragmento génico que comprende un ADN codificador de la proteína de interés y un gen marcador seleccionable en un vector de expresión en el cromosoma de una célula hospedadora, se introduce en la célula hospedadora un vector de expresión que comprende el fragmento génico que comprende un ADN codificador de la proteína de interés y un gen marcador seleccionable y secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico, y se permite que actúa una transposasa sobre las secuencias de transposón comprendidas en el vector de expresión que se ha introducido en la célula.
- 55 Con el fin de permitir que una transposasa actúe sobre las secuencias de transposón comprendidas en el vector de expresión que se ha introducido en la célula, la transposasa puede inyectarse en la célula, o puede introducirse un vector de expresión que comprende un ADN codificador de la transposasa en la célula hospedadora junto con un vector de expresión que comprende un ADN codificador de la proteína de interés y un gen marcador seleccionable. Además, mediante la introducción de un ARN codificador de un gen de transposasa en la célula hospedadora, puede expresarse la transposasa en la célula.
- 60 65 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, según la célula hospedadora en la que se introduce un vector de expresión que comprende un gen de transposasa, y similares.

- 5 Con el fin de producir una proteína constituida de dos o más polipéptidos mediante el procedimiento de la invención, el ADN puede integrarse en el cromosoma de la célula mediante la integración de un ADN codificante de dos o más polipéptidos en el mismo o diferentes vectores de expresión, seguido de la introducción de los vectores de expresión en una célula hospedadora.
- 10 La transposasa puede insertarse en un vector de expresión para expresarla junto con la proteína de interés, o puede insertarse en un vector diferente del vector de expresión. Puede permitirse que la transposasa actúe transitoriamente o puede permitirse que actúe continuamente, aunque resulta preferente permitir que la transposasa actúe transitoriamente con el fin de preparar una célula para la producción estable.
- 15 Como procedimiento para permitir que la transposasa actúe transitoriamente, entre los ejemplos se incluye un procedimiento que comprende preparar un vector de expresión que comprende un ADN codificante de la transposasa y un vector de expresión que comprende un ADN codificante de una proteína de interés, seguido de la introducción de ambos plásmidos de expresión simultáneamente en una célula hospedadora.
- 20 La expresión "vector de expresión" en la presente memoria se refiere a un vector de expresión que se utilizará para la introducción en una célula de mamífero con el fin de expresar una proteína de interés. El vector de expresión utilizado en la invención presenta una estructura en la que se encuentran presentes por lo menos un par de secuencias de transposición a ambos lados de un casete de expresión.
- 25 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 contener un gen marcador seleccionable.
- 30 30 Puede utilizarse cualquier promotor, con la condición de que pueda funcionar en una célula animal. Entre los ejemplos se incluyen un promotor de gen IE (temprano inmediato,) del citomegalovirus (CMV), el promotor temprano del SV40, un promotor de retrovirus, un promotor metalotioneína, un promotor de choque térmico, el promotor SRa, el virus de la leucemia murina de Moloney, un intensificador y similares. Además, puede utilizarse un intensificador del gen IE del CMV humano junto con el promotor.
- 35 La expresión "gen marcador seleccionable" se refiere a otro gen marcador 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.
- 40 40 Entre los ejemplos del gen marcador seleccionable se incluyen un gen de resistencia a fármaco (un gen de resistencia a neomicina, un gen DHFR, un gen de resistencia a puromicina, un gen de resistencia a blasticidina, un gen de resistencia a higromicina y un gen de resistencia a cicloheximida (solicitud publicada de patente japonesa no examinada nº 262879/2002), genes marcadores de fluorescencia y bioluminiscencia (tal como la proteína fluorescente verde, GFP) y similares.
- 45 45 En la invención, marcador seleccionable preferente es un gen de resistencia a fármaco y un marcador seleccionable particularmente preferente es un gen de resistencia a cicloheximida. Además, mediante la realización de una modificación génica del gen marcador seleccionable, también puede modificarse el rendimiento de resistencia a fármaco y el rendimiento de luminiscencia de la proteína marcadora seleccionable.
- 50 50 La cicloheximida (en adelante en ocasiones denominada CHX) es un inhibidor de la síntesis de proteínas y como ejemplos de la utilización del gen de resistencia a CHX como gen marcador seleccionable, se conocen los casos de células de levadura (Kondo K., J. Bacteriol. 177(24):7171-7177, 1995) y de células animales (solicitud publicada de patente japonesa no examinada nº 262879/2002).
- 55 55 En el caso de las células animales, se ha encontrado que la resistencia a la cicloheximida la proporciona un transformante que expresa una proteína codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en 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 mostrada en la SEC ID nº 5 del Listado de secuencias se ha sustituido por glutamina.
- 60 El procedimiento para introducir el vector de expresión de proteínas anteriormente mencionado que comprende una secuencia de transposición, un vector plásmido que expresa una transposasa y 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 y similares.
- 65

- Entre los ejemplos del procedimiento para introducir directamente una transposasa en la forma de una proteína se incluyen la microinyección o la endocitosis para la introducción en una célula. La transferencia génica puede llevarse a cabo mediante el procedimiento descrito en la obra *Shin Idenshi Kogaku Handbook (New Genetic Engineering Handbook)*, editado por Masami Muramatsu y Tadashi Yamamoto, publicado por Yodo-sha, ISBN 9784897063737.
- 5 La célula hospedadora es una célula de mamífero en suspensión. La célula de mamífero es una célula de ovario de hámster chino, célula de CHO (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); 10 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, apéndice I y II (páginas 883 a 900). Entre los ejemplos de la célula de CHO 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 sub-cepas de célula de CHO.
- 15 Además, la célula hospedadora anteriormente mencionada también puede utilizarse en el procedimiento de producción de proteínas de la invención mediante su modificación de manera que resulte adecuado para la producción de proteínas, mediante la modificación del ADN cromosómico, la introducción de un gen exógeno, y similares.
- 20 Además, con el fin de controlar la estructura de la cadena sacárida unida a una proteína de interés que debe producirse, Lec13, que adquiere resistencia a lectinas [Somatic Cell and Molecular Genetics 12:55, 1986] y una célula de CHO de la que se ha eliminado el gen de α 1,6-fucosiltransferasa (documentos nº WO2005/35586 y nº WO2002/31140) también pueden utilizarse como la célula hospedadora.
- 25 La proteína de interés puede ser cualquier proteína con la condición de que pueda expresarse mediante el procedimiento de la invención. Específicamente, entre los ejemplos se incluyen una proteína sérica humana, una hormona peptídica, un factor de crecimiento, una citoquina, un factor de coagulación sanguínea, una proteína del sistema de fibrinolisis, un anticuerpo y fragmentos parciales de diversas proteínas, y similares.
- 30 Entre los ejemplos preferidos de la proteína de interés se incluyen un anticuerpo monoclonal, tal como un anticuerpo químérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano; proteína de fusión Fc y proteína unida a albúmina, y un fragmento de los mismos.
- 35 Una actividad efectora de un anticuerpo monoclonal obtenido mediante el procedimiento de la presente invención puede controlarse mediante diversos procedimientos. Por ejemplo, son procedimientos conocidos un procedimiento para controlar una cantidad de fucosa (en adelante denominada "fucosa nuclear") que está unida a N-acetilglucosamina (GlcNAc) mediante enlace α -1,6 en un extremo reductor de una cadena sacárida unida mediante N de tipo complejo que está 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 40 controlar una actividad efectora de un anticuerpo monoclonal mediante la modificación de uno o más grupos 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.
- 45 La "actividad efectora" se refiere a una actividad dependiente de anticuerpos que resulta inducida mediante 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.
- 50 Además, mediante el control del contenido de fucosa nuclear de una cadena sacárida unida mediante N de tipo complejo de la región Fc de un anticuerpo monoclonal, puede incrementarse o reducirse una actividad efectora del anticuerpo.
- 55 Como procedimiento para reducir el contenido de fucosa que está unida a una cadena sacárida unida mediante N de tipo complejo a Fc del anticuerpo, puede obtenerse un anticuerpo al que no está unido fucosa, mediante la expresión de un anticuerpo utilizando una célula de CHO que es deficiente en un gen codificante de α 1,6-fucosiltransferasa. El anticuerpo al que no está unido fucosa posee una elevada actividad ADCC.
- 60 Por otra parte, como procedimiento para incrementar el contenido de fucosa que está unida a una cadena sacárida unida mediante N de tipo complejo a Fc de un anticuerpo, puede obtenerse un anticuerpo al que está unido fucosa, mediante la expresión de un anticuerpo utilizando una célula hospedadora en la que se ha introducido un gen codificante de α 1,6-fucosiltransferasa. El anticuerpo al que está unido fucosa posee una actividad ADCC más baja que el anticuerpo al que no está unido fucosa.
- 65 Además, mediante la modificación de uno o más residuos aminoácidos en una región Fc de un anticuerpo, puede

incrementarse o reducirse la actividad ADCC o la actividad CDC. Por ejemplo, la actividad CDC de un anticuerpo puede incrementarse mediante la utilización de la secuencia de aminoácidos de la región Fc descrita en el documento nº US2007/0148165.

5 Además, la actividad ADCC o la actividad CDC de un anticuerpo puede incrementarse o reducirse mediante la modificación del aminoácido tal como se indica en las patentes US nº 6.737.056, nº 7.297.775 o nº 7.317.091.

10 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 de recubrimiento que facilita la adhesión de células en el cultivo, tal como microperlas, un recipiente de cultivo para el cultivo de tejidos (también denominado recipiente de cultivo tisular o de cultivo de adhesión, y similares) y similares, y puede sobrevivir y crecer mediante la suspensión en el líquido de cultivo.

15 En el caso de que la célula no se adhiera al anclaje de cultivo celular, puede sobrevivir y crecer en estado de célula individual en el líquido de cultivo o sobrevivir y crecer en estado de masa celular formada mediante aglutinación de dos o más células.

20 Además, como célula de mamífero en suspensión para la utilización en la presente invención, una célula que pueda sobrevivir y crecer en un medio sin suero que no contiene suero de feto bovino (en adelante denominado FCS) y similares, mientras está en suspensión en el líquido de cultivo sin adherirse al anclaje de cultivo celular, resulta preferible, y una célula de mamífero que pueda sobrevivir y crecer en suspensión en un medio sin proteínas que no contiene proteína resulta más preferible.

25 Como recipiente de cultivo para el cultivo tisular, puede ser cualquier recipiente de cultivo, tal como un matraz, una placa Petri y similares, con la condición de que se aplique en el mismo un recubrimiento para el cultivo de adhesión. Específicamente, por ejemplo, si es o no una célula de mamífero en suspensión puede confirmarse mediante la utilización de un matraz de cultivo tisular disponible comercialmente (fabricado por Greiner), un matraz de cultivo de adhesión (fabricado por Sumitomo Bakelite) y similares.

30 Como célula de mamífero en suspensión para la utilización en la presente invención, puede ser una célula de CHO preparada mediante la adaptación adicional de una célula de CHO que originalmente presentaba la propiedad de crecimiento en 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 del cultivo en suspensión.

35 Entre los ejemplos de célula que originalmente presentaba la propiedad de crecimiento en suspensión se incluye la célula de CHO-S (fabricada por Invitrogen) y similares.

40 La "célula de mamífero en suspensión preparada mediante adaptación de una célula de mamífero adhesiva a las condiciones del cultivo en suspensión" anteriormente mencionada puede prepararse mediante el procedimiento descrito en Mol. Biotechnol. 15(3):249-57, 2000, o mediante el procedimiento mostrado a continuación, y puede prepararse estableciendo una célula que muestra una propiedad de crecimiento en suspensión y una propiedad de supervivencia similares a las presentes antes de la adaptación al cultivo en suspensión o superiores a las presentes antes de la adaptación al cultivo en suspensión (J. Biotechnol. 130(3):289-90, 2007).

45 La expresión "similar a las presentes antes de 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 similares a las de la célula antes de la adaptación al cultivo en suspensión.

50 Entre los ejemplos del procedimiento para adaptar una célula de mamífero en suspensión a las condiciones de cultivo en suspensión según la presente invención se incluye el procedimiento siguiente. El contenido en suero de un medio que contiene suero se reduce a 1/10 y se repite el subcultivo a una concentración celular relativamente elevada. Al alcanzar el nivel de supervivencia y proliferación de la célula de mamífero, 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 sin suero.

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

60 En la presente invención, como propiedad que posee la célula de mamífero en suspensión, al cultivar en suspensión 2×10^5 células/ml, la concentración celular después del cultivo durante 3 o 4 días preferentemente de 5×10^5 células/ml o superior, más preferentemente de 8×10^5 células/ml o superior, particularmente preferentemente de 1×10^6 células/ml o superior, lo más preferentemente de $1,5 \times 10^6$ células/ml o superior.

65 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, lo más preferentemente de 11 horas o inferior.

- 5 Entre los ejemplos del medio para el cultivo en suspensión se incluye medio disponible comercialmente, tal como medio CD-CHO (fabricado por Invitrogen), medio EX-CELL 325-PF (fabricado por SAFC Biosciences), medio SFM4CHO (fabricado por HyClone) y similares. Además, también puede obtenerse mezclando sacáridos, aminoácidos y ácidos similares que resultan necesarios para el cultivo de células de mamífero.
- 10 La célula de mamífero en suspensión puede cultivarse utilizando un recipiente de cultivo que pueda utilizarse para el cultivo en suspensión bajo condiciones de cultivo capaces de cultivo en suspensión. Entre los ejemplos del recipiente de cultivo se incluyen una placa de 96 pocillos para el cultivo celular (fabricada por Corning), un matraz T (fabricado por Becton Dickinson), un matraz Erlenmeyer (fabricado por Corning) y similares.
- 15 Con respecto a las condiciones de cultivo, por ejemplo, puede cultivarse estáticamente en una atmósfera de 5% CO₂ a una temperatura de cultivo de 37°C. También puede utilizarse un equipo de cultivo de agitación, tal como un equipo de cultivo para la utilización exclusiva en cultivo en suspensión, Wave Bioreactor (fabricado por GE Healthcare Bioscience).
- 20 Con respecto a las condiciones de cultivo en suspensión de una célula de mamífero en suspensión utilizando el equipo Wave Bioreactor, la célula puede cultivarse mediante el procedimiento descrito en la página de Internet de GE Healthcare Bioscience <http://www.gelifesciences.co.jp/tech-support/manual/pdf/cellcult/wave-03-16.pdf>.
- 25 Además del cultivo de agitación, también puede utilizarse el cultivo mediante un equipo de agitación por rotación, 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.
- 30 En la presente invención, al utilizar una estirpe celular diferente de las células de mamífero en suspensión, puede utilizarse cualquier estirpe celular con la condición de que sea una línea de célula de mamífero adaptada al cultivo en suspensión mediante el procedimiento anteriormente mencionado y sea una estirpe celular que pueda utilizarse en el procedimiento de producción de proteína de la presente invención.
- 35 La purificación de la proteína de interés producida por la célula de mamífero en suspensión se lleva a cabo mediante la separación de la proteína de interés respecto de impurezas diferentes de la proteína de interés en un líquido de cultivo u homogeneizado celular que contiene la proteína de interés. Entre los ejemplos del procedimiento de separación se incluyen la centrifugación, la diálsis, la precipitación con sulfato amónico, la cromatografía de columna, un filtro y similares. La separación puede llevarse a cabo basándose en la diferencia de propiedades físico-químicas de la proteína de interés y las impurezas y basándose en la diferencia en su afinidad para el portador de la columna.
- 40 El procedimiento para purificar la proteína de interés puede llevarse a cabo, por ejemplo, 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).
- 45 La presente invención se ha descrito anteriormente mostrando unas formas de realización preferidas de la misma en aras de una fácil comprensión. En adelante, la presente invención se describe adicionalmente basándose específicamente en ejemplos, aunque las explicaciones anteriormente mencionadas y los ejemplos a continuación se proporcionan únicamente a título de ejemplo no limitativo. De acuerdo con lo anterior, 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 limitada exclusivamente por las reivindicaciones.
- 50

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

Ejemplos

60 [Ejemplo 1]

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

65 Se utilizó un plásmido que contiene un casete de expresión génica para células de mamífero que comprende un gen de anticuerpo humano arbitrario y un gen marcador de resistencia a fármaco insertado entre un par de secuencias de transposición Tol2 a modo de vector plásmido para la expresión de proteína.

5 Cada ADN de los genes utilizados se sintetizó química y artificialmente basándose en una secuencia de nucleótidos conocida u obtenida mediante preparación de los cebadores para las dos secuencias terminales y llevando a cabo una 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.

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

15 Cada fragmento de ADN sintético que comprende un par de secuencias de transposición (fabricadas por Takara Bio Inc.) se preparó mediante el procedimiento siguiente. Se preparó un fragmento de ADN que comprendía una secuencia de nucleótidos en el que estaba unida una secuencia de reconocimiento del enzima de restricción *NruI* tanto al extremo 5'-terminal como al extremo 3'-terminal de la secuencia Tol2-R. A continuación, se preparó un fragmento de ADN que comprendía una secuencia de nucleótidos en la que se había unido una secuencia de reconocimiento del enzima de restricción *FseI* al extremo 5'-terminal de la secuencia Tol2-L y se unió un enzima de restricción *Ascl* al extremo 3'-terminal del mismo.

20 20 Seguidamente, los fragmentos de ADN preparados de esta manera que comprendían la secuencia Tol2-R y la secuencia Tol2-L se insertaron en el 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 humana Z3G1.

25 25 El vector N5LG1-M2-Z3 (documento nº WO2006/061723) en el que se había insertado una secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 8) codificante de la cadena H del anticuerpo anti-M2 de influenza humana Z3G1 (ATCC nº de depósito PTA-5968, depositado el 13 de marzo de 2004, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) y una secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 10 y SEC ID nº 11) codificante de la cadena L (SEC ID nº 9) del mismo se insertaron bajo el control del intensificador/promotor del CMV como casete de expresión génica de anticuerpo.

30 30 35 El fragmento de ADN que comprendía la secuencia Tol2-R se insertó en el sitio *NruI* de enzima de restricción del vector N5LG1-M2-Z3, en el lado 5'-terminal de un fragmento génico que comprendía el casete de expresión génica del anticuerpo y un gen marcador de resistencia. A continuación, se insertó el fragmento de ADN que comprendía la secuencia Tol2-L en los sitios de enzima de restricción *FseI* y *Ascl* en el lado 3'-terminal.

40 40 45 Además, se construyó un vector transposón para expresar un anticuerpo anti-M2 de influenza humana (figura 1) mediante la inserción de un casete de expresión génica de resistencia a cicloheximida conectado con una secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 5) codificante de un gen de resistencia a cicloheximida (un gen en el que la prolina en la posición 54 de la proteína ribosómica humana L36a ha sido sustituida por glutamina) en el sitio de reconocimiento *FseI* del vector N5LG1-M2-Z3 conectado con la secuencia del transposón Tol2, bajo el control del intensificador/promotor de CMV.

50 50 55 55 Por otra parte, un vector que no contenía secuencias de transposición se denominó vector de expresión de anticuerpo anti-M2 de influenza humana y se utilizó como el vector de control (figura 2).

[Ejemplo 2]

50 Preparación de vector de expresión de transposasa

La transposasa se expresó 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) y se utilizó como el vector de expresión (figura 3).

[Ejemplo 3]

60 (1) Preparación de célula de CHO en suspensión

Una célula de CHO adhesiva que había sido cultivada utilizando un medio α-MEM (fabricado por Invitrogen) que contenía 10% de suero (FCS) se desprendió y recuperó mediante tratamiento con tripsina y se cultivó bajo agitación a 37°C en un incubador con 5% de CO₂ utilizando un medio α-MEM fresco que contenía 10% de FCS. Varios días después, se confirmó el crecimiento de estas células y seguidamente se llevó a cabo el cultivo bajo agitación mediante la siembra de las mismas en un medio α-MEM que contenía 5% de FCS a una concentración de 2x10⁵ células/ml.

5 Varios días después, se llevó a cabo de manera similar la inoculación utilizando el medio α-MEM que contenía 5% de FCS. Finalmente, se preparó una célula adaptada al cultivo en suspensión mediante repetición del subcultivo y cultivo bajo agitación utilizando medio α-MEM sin suero y se confirmó que las células presentaban la misma capacidad de crecimiento que en el caso del cultivo en presencia de suero.

(2) Preparación de célula de CHO productora de anticuerpo

10 El vector transposón para expresar el anticuerpo anti-M2 de influenza humana preparado en los Ejemplos 1 y 2 (en adelante denominado vector transposón) y el vector de expresión de transposasa Tol2 pCAGGS-T2TP (figura 3; Kawakami K. y Noda T., *Genetics* 166:895-899, 2004) se utilizaron como vectores de expresión. Además, como el control se utilizó el vector de expresión de anticuerpo anti-M2 de influenza humana que no presentaba secuencias de transposón.

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

20 Se suspendió cada célula (4×10^6 células) en 400 μ l de PBS y el vector transposón para expresar el anticuerpo anti-M2 de influenza humana (10 μ g) y el vector de expresión de transposasa Tol2 (25 μ g) directamente en forma de ADN circular mediante electroporación. En este aspecto, con el fin de expresar la transposasa Tol2 transitoriamente, el vector de expresión de la transposasa Tol2 se introdujo directamente en forma de ADN circular con el fin de evitar su integración en el cromosoma del hospedador.

25 Además, como control, se linealizó el vector de expresión del anticuerpo anti-M2 de influenza humana (10 μ g) con un enzima de restricción y después se introdujo en cada célula, de acuerdo con el procedimiento estándar de transferencia génica mediante electroporación.

30 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 las condiciones de 300 V de voltaje, 500 μ F de capacidad electrostática y a temperatura ambiente.

35 Tras la transfección mediante electroporación, se sembró cada célula en tres placas de 96 pocillos y se cultivó en un incubador de CO_2 durante 3 días utilizando el medio EX-CELL 325-PF fabricado por SAFC Biosciences para la célula de CHO y el medio FreeStyle-293 (fabricado por Invitrogen) para la célula HEK293.

40 A continuación, desde el día de intercambio de medio el 4º día de la transfección, se añadieron 3 μ g/ml de cicloheximida al medio de manera que se cultivaron las células en presencia de cicloheximida, seguido del cultivo durante 3 semanas, llevando a cabo simultáneamente el intercambio de medio cada semana.

Tras cultivar durante 3 semanas, se realizó el recuento del número de pocillos en los que se encontraron colonias resistentes a cicloheximida. Se muestran los resultados en las Tablas 1 y 2.

45 [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

50 [Tabla 2]

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

55 Tal como se muestra en la Tabla 1, cada vector transposón de expresión de anticuerpo anti-M2 de influenza humana o vector de expresión de anticuerpo anti-M2 de influenza humana se introdujo en la célula de CHO-K1 en suspensión. Como resultado, no se obtuvieron transformantes resistentes a cicloheximida de la célula

introducida con el vector de expresión de anticuerpo anti-M2 de influenza humana como en el caso de las otras estirpes celulares, pero se obtuvieron transformantes resistentes a cicloheximida de la célula en la que se había introducido vector transposón para expresar anticuerpo anti-M2 de influenza humana con una frecuencia elevada.

5 Por otra parte, tal como se muestra en la Tabla 2, no se obtuvieron transformantes resistentes a cicloheximida al introducir el vector transposón para expresar anticuerpo anti-M2 de influenza humana y vector de expresión de anticuerpo anti-M2 de influenza humana en la célula HEK293.

10 Basándose en estos resultados, se encontró que el gen codificante de proteína y el gen de resistencia a cicloheximida que se habían insertados entre un par de secuencias de transposón eran eficientemente introducidos en el cromosoma de la célula hospedadora, es decir, una célula de mamífero en suspensión.

15 (3) Examen de la producción de anticuerpo por la célula de CHO en suspensión y la célula de CHO adhesiva

20 Con el fin de examinar la eficiencia de la producción de anticuerpo por una célula de CHO en suspensión o una célula de CHO adhesiva, se examinaron las cantidades de los anticuerpos producidos por las estirpes celulares respectivas. Como célula de CHO en suspensión, se utilizó la célula de CHO-K1 en suspensión adaptada al cultivo en suspensión. Además, como célula de CHO adhesiva, se utilizó la célula de CHO-K1 adhesiva antes de la adaptación al cultivo en suspensión.

25 Se introdujo el vector transposón de expresión del anticuerpo anti-M2 de influenza humana (10 µg) y el vector de expresión de transposasa Tol2 (25 µg) en la célula de CHO-K1 en suspensión y en la célula de CHO-K1 adhesiva, respectivamente, mediante electroporación. Después, se sembró la célula de CHO-K1 en suspensión y la célula de CHO-K1 adhesiva en tres placas de 96 pocillos para cada célula.

30 Se utilizó un medio para las células en suspensión (EX-CELL 325-PF, fabricado por SAFC Biosciences) para la célula de CHO-K1 en suspensión, y el medio α-MEM que contenía 10% de suero se utilizó para la célula de CHO-K1 adhesiva. Se cultivó cada célula en un incubador de CO₂ durante 3 días. Desde el día de intercambio de medio el 4º día de la transfección, se añadieron al medio 3 µg/ml de cicloheximida de manera que las células se cultivasen en presencia de cicloheximida y se cultivaron adicionalmente las células durante 3 semanas. En este caso, se llevó a cabo el intercambio de medios cada semana.

35 Para la célula de CHO-K1 en suspensión, se sembraron 1x10⁶ células en una placa de 6 pocillos y se cultivaron bajo agitación en un incubador de CO₂ durante 3 días y se midió la cantidad de proteína anticuerpo anti-M2 de influenza humana mediante HPLC utilizando el sobrenadante del cultivo.

40 Para la célula de CHO-K1 adhesiva, se llevó a cabo el intercambio de medios tras alcanzar las células la confluencia en una placa de 6 pocillos (2x10⁶ células) y 3 días después del cultivo estático, se midió la cantidad de proteína anticuerpo mediante HPLC utilizando el sobrenadante del cultivo.

45 Se midió la concentración del anticuerpo en el sobrenadante de cultivo siguiendo el procedimiento descrito en Yeast Res. 7:1307-1316, 2007. Se muestran los resultados en las figuras 4A y 4B.

50 Basándose en estos resultados, se encontró que, para la expresión de una proteína de interés utilizando un vector transposón, la proteína de interés puede expresarse a un nivel elevado al utilizar una célula de mamífero en suspensión.

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

60 **[Ejemplo 4]**

Preparación de vector transposón Tol1 para la expresión de anticuerpo anti-M2 de influenza humana

65 De la misma manera que en el Ejemplo 1, se utilizó como vector plásmido de expresión de proteína un plásmido que contenía 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 insertado entre un par de secuencias de transposón Tol1.

5 Cada ADN de los genes utilizados se sintetizó químicamente y artificialmente basándose en una información de secuencia conocida u obtenida mediante preparación de los cebadores para las dos secuencias terminales y llevando a cabo una PCR utilizando una fuente de ADN apropiada como molde. Para la manipulación génica que debía llevarse a cabo posteriormente, se añadió un sitio cortado por un enzima de restricción al extremo del cebador.

10 Entre las secuencias de nucleótidos de transposón Tol1 no autónomo mostradas en la SEC ID nº 13 del Listado de secuencias (documento nº WO2008/072540), se utilizó la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1 y 200 (secuencia Tol1-L) (SEC ID nº 14) y la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1.351 y 1.855 (secuencia Tol1-R) (SEC ID nº 15) como las secuencias de transposón.

15 Cada uno de los fragmentos de ADN sintético que comprendía cada par de secuencias de transposón se preparó mediante el procedimiento siguiente. Se preparó un fragmento de ADN que comprendía una secuencia de nucleótidos en el que estaba conectada una secuencia de reconocimiento del enzima de restricción *NruI* tanto con el extremo 5'-terminal como con el extremo 3'-terminal de la secuencia Tol1-R. A continuación, un fragmento de ADN que comprendía una secuencia de nucleótidos en la que estaba conectada una secuencia de reconocimiento de un enzima de restricción *FseI* con el extremo 5'-terminal de la secuencia de Tol1-L y un sitio de enzima de restricción *Ascl* que estaba conectado con el extremo 3'-terminal del mismo.

20 25 A continuación, los fragmentos de ADN preparados de esta manera que comprendían la secuencia de Tol1-R y la secuencia de Tol1-L se insertaron en el vector de expresión N5LG1-M2-Z3. El fragmento de ADN que comprendía la secuencia de Tol1-R se insertó en el sitio del enzima de restricción *NruI* del vector N5LG1-M2-Z3, presente en el lado 5'-terminal de un fragmento génico que comprendía el casete de expresión génica del anticuerpo y un gen marcador de resistencia, y el fragmento de ADN que comprendía la secuencia de Tol1-L se insertó en los sitios de los enzimas de restricción *FseI* y *Ascl* presentes en el lado 3'-terminal.

30 35 Además, se construyó un vector transposón Tol1 para expresar un anticuerpo anti-M2 de influenza humana (figura 5) mediante la inserción de un casete de expresión génica de resistencia a cicloheximida conectado con un gen de resistencia a cicloheximida (un gen en el que la prolina en la posición 54 de la proteína ribosómica humana L36a se ha mutado a glutamina) en el sitio de reconocimiento *FseI* del vector N5LG1-M2-Z3 conectado con la secuencia del transposón Tol1, bajo el control del intensificador/promotor de CMV.

[Ejemplo 5]

Preparación de vector de expresión de transposasa Tol1

40 La transposasa se expresó utilizando un vector de expresión independiente del vector de expresión del anticuerpo de interés. Es decir, un casete de expresión génica de la transposasa Tol1 conectado con un fragmento de ADN codificante de una transposasa Tol1 derivada de pez medaka que contenía la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID nº 16 del Listado de secuencias se insertó en pBluescriptII SK (+) (fabricado por Stratagene) bajo el control del intensificador/promotor de CMV y se utilizó como vector de expresión pTol1-as (figura 6).

[Ejemplo 6]

(1) Preparación de célula de CHO productora de anticuerpo

50 El vector transposón Tol1 para expresar el anticuerpo anti-M2 de influenza humana (en adelante denominado vector transposón Tol1) y el vector de expresión de transposasa Tol1 pTol1-as de los Ejemplos 4 y 5 se utilizaron como los vectores de expresión. Además, la célula de CHO-K1 preparada mediante la adaptación al cultivo en suspensión de la misma manera que en el Ejemplo 3(1) se utilizó como la célula.

55 Los vectores de expresión anteriormente mencionados se introdujeron en la célula de CHO-K1 adaptada al cultivo en suspensión y se midió la frecuencia de obtención de clones resistentes a cicloheximida. La célula de CHO-K1 adaptada al cultivo en suspensión (4×10^6 células) se suspendió en 400 μ l de PBS y el vector transposón Tol1 para expresar el anticuerpo anti-M2 de influenza humana (10 μ g) y el vector de expresión de la transposasa Tol1 (50 μ g) se cotransfectaron directamente en forma de ADN circular mediante electroporación. Con el fin de llevar a cabo la expresión transitoria de la transposasa Tol1, el vector de expresión de la transposasa Tol1 se introdujo directamente en forma de ADN circular con el fin de evitar la integración en el cromosoma del hospedador.

65 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 las condiciones de 300 V de voltaje, 500 μ F de capacidad electrostática y a temperatura ambiente.

Después de la transfección mediante electroporación, se sembró cada célula en dos placas de 96 pocillos y se cultivaron en un incubador de CO₂ durante 3 días utilizando el medio EX-CELI 325-PF (fabricado por SAFC Biosciences) para la célula de CHO. A continuación, desde el día de intercambio de medio el 4º día de la transfección, se añadieron 3 µg/ml de cicloheximida al medio de manera que se cultivaron las células en presencia de cicloheximida, seguido del cultivo durante 3 semanas, llevando a cabo simultáneamente el intercambio de medio cada semana.

Tras cultivar durante 3 semanas, se realizó el recuento del número de pocillos en los que se encontraron colonias resistentes a cicloheximida. Se muestran los resultados en la Tabla 3. Cada uno de los ensayos 1 a 3 en la Tabla 3 muestra el resultado de llevar a cabo la transferencia génica en tres ocasiones.

[Tabla 3]

Vector transposición Tol1	
Ensayo 1	133 / 192
Ensayo 2	67 / 192
Ensayo 3	122 / 192

Tal como se muestra en la Tabla 3, al introducir el vector transposición Tol1 para expresar el anticuerpo anti-M2 de influenza humana en la célula de CHO-K1 en suspensión, se obtuvieron transformantes resistentes a cicloheximida a una frecuencia elevada de manera similar al Ejemplo 3, en el que se había introducido el vector transposición Tol2 para expresar el anticuerpo anti-M2 de influenza humana.

Se encontró, basándose en estos resultados, que el gen de anticuerpo y el gen de resistencia a cicloheximida insertados entre un par de secuencias de transposición se transducían 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 transposición Tol1

(2) Examen de la producción de anticuerpo por la célula de CHO-K1 en suspensión

Se examinó la eficiencia de la producción de anticuerpo de la célula de CHO-K1 en suspensión utilizando la célula de CHO-K1 en suspensión. El vector transposición para expresar el anticuerpo anti-M2 de influenza humana (10 µg) y el vector de expresión de transposasa Tol1 (50 µg) se introdujeron mediante electroporación en la célula de CHO-K1 en suspensión adaptada al cultivo en suspensión.

Después, se sembraron las células en dos placas de 96 pocillos respectivas y se cultivaron durante 3 días en un incubador de CO₂ utilizando el medio de cultivo en suspensión EX-CELI 325-PF. A partir del intercambio de medio el 4º día posterior a la electroporación, se cultivaron las células durante 3 semanas en presencia de 3 µg/ml de cicloheximida. En este caso, se llevó a cabo el intercambio de medios cada semana.

Para la célula de CHO-K1 en suspensión, se sembraron 1x10⁶ células en una placa de 6 pocillos y se cultivaron bajo agitación en un incubador de CO₂ durante 3 días y se midió la cantidad de proteína anticuerpo anti-M2 de influenza humana mediante HPLC utilizando el sobrenadante del cultivo.

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

Tal como se muestra en la figura 7, se obtuvo un gran número de células que mostraban un nivel de expresión de anticuerpo marcadamente elevado en el caso de que se utilizase también el transposición Tol1. A partir de este resultado se encontró que, de manera similar al caso de la utilización de la secuencia de nucleótidos derivada del transposición 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 transposición Tol1 como la secuencia de transposición.

La presente solicitud se basa en la solicitud japonesa nº 2009-140626, presentada el 11 de junio de 2009 y en la solicitud provisional de patente US nº 61/186.138, presentada el 11 de junio de 2009.

Aplicabilidad industrial

Mediante el procedimiento para producir 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 proteína para la producción de una proteína recombinante.

Texto libre del listado de secuencias

SEC ID nº 1. Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos de transposición Tol2 no autónomo

SEC ID nº 2. Descripción de secuencia artificial: secuencia Tol2-L
SEC ID nº 3. Descripción de secuencia artificial: secuencia Tol2-R

5 SEC ID nº 7. Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos de gen de resistencia a cicloheximida

10 SEC ID nº 8. Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácido de proteína codificada por el gen de resistencia a cicloheximida

15 SEC ID nº 9. Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos codificante de la cadena H del anticuerpo M2Z3

15 SEC ID nº 10. Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos codificante de la cadena H del anticuerpo M2Z3

20 SEC ID nº 11. Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos codificante de la cadena L del anticuerpo M2Z3

25 SEC ID nº 12. Descripción de secuencia artificial: secuencia de aminoácidos codificante de la cadena L del anticuerpo M2Z3

SEC ID nº 13. Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos de transposición Tol1 no autónomo

SEC ID nº 14. Descripción de secuencia artificial: secuencia Tol1-L

25 SEC ID nº 15. Descripción de secuencia artificial: secuencia Tol1-R

25 Listado de secuencias

<110> Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.

Inter-University Research Institute Corporation Research Organization of Information and Systems

30 <120> Procedimiento de producción de proteína

<130> WO69874

35 <150> JP2009-140626

<151> 2009-06-11

40 <150> US61/186138

<151> 2009-06-11

40 <160> 17

45 <170> PatentIn versión 3.3

45 <210> 1

<211> 2788

<212> ADN

<213> Artificial

50 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: transposición Tol2 no autólogo

50 <400> 1

ES 2 697 535 T3

cagaggtgta aagtacttga gtaattttac ttgattactg tacttaagta ttatttttgg	60
ggatTTTtac ttTactttag tacaattaaa aatcaatact ttTactttta cttaaattaca	120
tttttttaga aaaaaaaagta ctTTTactc cttacaattt tatTTacagt caaaaagtac	180
ttatTTTTg gagatcactt cattctattt tcccttgcta ttaccaaacc aattgaattg	240
cgctgatgcc cagTTtaatt taaatgttat ttattctgcc tatgaaaatc gTTTcacat	300
tatATgaaat tggTCAGACA tggTCATTGG tcCTTGGAA gtGACGTcat gTCACATcta	360
ttaccacaat gcacAGCACC ttGACCTGGA aattAGGGAA attATAACAG tcaATCAGTG	420
gaAGAAAATG gagGAAGTAT gtGATTcatc agCAGCTGCG agCAGCACAG tCCAAAATCA	480
gCCACAGGAT caAGAGCACC CGTGGCCGTA tCTTCGCGAA tTCTTTCTT taAGTGGTGT	540
aaATAAAGAT tcATTCAAGA tGAAATGTGT CCTCTGTCTC CCGCTTAATA aAGAAATATC	600
ggCCTTCAAA agTTGCCAT caAAACCTAAG gaAGCATATT gagGTAAAGTA cATTAAAGTAT	660
tttGTTTtac tgatAGTTT tttttttttt tttttttttt ttttGGGTG tgcATGTTT	720
gacGTTGATG gCGCGCCTT tATATGTGTA gtAGGCCTAT tttcACTAAT gcatGCGATT	780
gacaATATAA ggCTCACGTA atAAAATGCT AAAATGCATT tgTAATTGGT aACGTTAGGT	840
ccACGGGAAA tttGGCGCCTt attGcAGCTT tGAATAATCA ttATCATTCC gtGCTCTCAT	900
tgtGTTGAA ttCATGCAAA acACAAGAAA accAAGCGAG aaATTTTTT ccaaACATGT	960
tgtATTGTCA aaACGGTAAC actTTACAAT gagGTTGATT agttCATGTA ttaACTAACA	1020
ttaAAATAACC atGAGCAATA cATTGTTAC tGTATCTGTT aATCTTGTT aACGTTAGTT	1080

aatagaaaata cagatgttca ttgtttgttc atgttagttc acagtgcatt aactaatgtt 1140
 aacaagatataa aagtatttag taaatgttga aattaacatg tatacgtgca gttcattatt
 agttcatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 1200
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 1260
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 1320
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 1380
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 1440
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 1500
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 1560
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 1620
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 1680
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 1740
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 1800
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 1860
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 1920
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 1980
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 2040
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 2100
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 2160
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 2220
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 2280
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 2340
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 2400
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 2460
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 2520
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 2580
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 2640
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 2700
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 2760
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 2820
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 2880
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 2940
 aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt aactaatgtt 3000

<210> 2

<211> 200

5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>

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

10 <400> 2

ES 2 697 535 T3

ES 2 697 535 T3

tca ttc aag atg aaa tgt gtc ctc tgt ctc ccg ctt aat aaa gaa ata Ser Phe Lys Met Lys Cys Val Leu Cys Leu Pro Leu Asn Lys Glu Ile 45 50 55	255
tcg gcc ttc aaa agt tcg cca tca aac cta agg aag cat att gag aga Ser Ala Phe Lys Ser Ser Pro Ser Asn Leu Arg Lys His Ile Glu Arg 60 65 70	303
atg cac cca aat tac ctc aaa aac tac tct aaa ttg aca gca cag aag Met His Pro Asn Tyr Leu Lys Asn Tyr Ser Lys Leu Thr Ala Gln Lys 75 80 85	351
aga aag atc ggg acc tcc acc cat gct tcc agc agt aag caa ctg aaa Arg Lys Ile Gly Thr Ser Thr His Ala Ser Ser Lys Gln Leu Lys 90 95 100 105	399
gtt gac tca gtt ttc cca gtc aaa cat gtg tct cca gtc act gtg aac Val Asp Ser Val Phe Pro Val Lys His Val Ser Pro Val Thr Val Asn 110 115 120	447
aaa gct ata tta agg tac atc att caa gga ctt cat cct ttc agc act Lys Ala Ile Leu Arg Tyr Ile Ile Gln Gly Leu His Pro Phe Ser Thr 125 130 135	495
gtt gat ctg cca tca ttt aaa gag ctg att agt aca ctg cag cct ggc Val Asp Leu Pro Ser Phe Lys Glu Leu Ile Ser Thr Leu Gln Pro Gly 140 145 150	543
att tct gtc att aca agg cct act tta cgc tcc aag ata gct gaa gct Ile Ser Val Ile Thr Arg Pro Thr Leu Arg Ser Lys Ile Ala Glu Ala 155 160 165	591
gct ctg atc atg aaa cag aaa gtg act gct gcc atg agt gaa gtt gaa Ala Leu Ile Met Lys Gln Lys Val Thr Ala Ala Met Ser Glu Val Glu 170 175 180 185	639
tgg att gca acc aca acg gat tgt tgg act gca cgt aga aag tca ttc Trp Ile Ala Thr Thr Asp Cys Trp Thr Ala Arg Arg Lys Ser Phe 190 195 200	687
att ggt gta act gct cac tgg atc aac cct gga agt ctt gaa aga cat Ile Gly Val Thr Ala His Trp Ile Asn Pro Gly Ser Leu Glu Arg His 205 210 215	735
tcc gct gca ctt gcc tgc aaa aga tta atg ggc tct cat act ttt gag Ser Ala Ala Leu Ala Cys Lys Arg Leu Met Gly Ser His Thr Phe Glu 220 225 230	783
gta ctg gcc agt gcc atg aat gat atc cac tca gag tat gaa ata cgt Val Leu Ala Ser Ala Met Asn Asp Ile His Ser Glu Tyr Glu Ile Arg 235 240 245	831
gac aag gtt gtc aca acc aca gac agt ggt tcc aac ttt atg aag Asp Lys Val Val Cys Thr Thr Asp Ser Gly Ser Asn Phe Met Lys 250 255 260 265	879
gct ttc aga gtt ttt ggt gtg gaa aac aat gat atc gag act gag gca Ala Phe Arg Val Phe Gly Val Glu Asn Asn Asp Ile Glu Thr Glu Ala 270 275 280	927
aga agg tgt gaa agt gat gac act gat tct gaa ggc tgt ggt gag gga Arg Arg Cys Glu Ser Asp Asp Thr Asp Ser Glu Gly Cys Gly Glu Gly 285 290 295	975
agt gat ggt gtg gaa ttc caa gat gcc tca cga gtc ctg gac caa gac	1023

ES 2 697 535 T3

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 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 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 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 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
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 Ala Ser Leu Lys Pro Thr Thr His Glu Ala		

ES 2 697 535 T3

555	560	565	
agc aaa gag ttg gat gga tat ctg gcc tgt gtt tca gac acc agg gag Ser Lys Glu Leu Asp Gly Tyr Leu Ala Cys Val Ser Asp Thr Arg Glu 570 575 580 585			1839
tct ctg ctc acg ttt cct gct att tgc agc ctc tct atc aag act aat Ser Leu Leu Thr Phe Pro Ala Ile Cys Ser Leu Ser Ile Lys Thr Asn 590 595 600			1887
aca cct ctt ccc gca tcg gct gcc tgt gag agg ctt ttc agc act gca Thr Pro Leu Pro Ala Ser Ala Ala Cys Glu Arg Leu Phe Ser Thr Ala 605 610 615			1935
gga ttg ctt ttc agc ccc aaa aga gct agg ctt gac act aac aat ttt Gly Leu Leu Phe Ser Pro Lys Arg Ala Arg Leu Asp Thr Asn Asn Phe 620 625 630			1983
gag aat cag ctt cta ctg aag tta aat ctg agg ttt tac aac ttt gag Glu Asn Gln Leu Leu Lys Leu Asn Leu Arg Phe Tyr Asn Phe Glu 635 640 645			2031
tag cgtgtactgg cattagattt gctgtttat agtttataaa ttaaatacaa			2084
acagttctaa agcaggataa aaccttgtat gcatttcatt taatgttttt tgagattaaa			2144
agcttaaaca ag			2156
<p><210> 5 <211> 649 5 <212> PRT <213> Oryzias latipes</p>			
<p><400> 5 Met Glu Glu Val Cys Asp Ser Ser Ala Ala Ala Ser Ser Thr Val Gln 1 5 10 15</p>			
<p>Asn Gln Pro Gln Asp Gln Glu His Pro Trp Pro Tyr Leu Arg Glu Phe 20 25 30</p>			
<p>Phe Ser Leu Ser Gly Val Asn Lys Asp Ser Phe Lys Met Lys Cys Val 35 40 45</p>			
<p>Leu Cys Leu Pro Leu Asn Lys Glu Ile Ser Ala Phe Lys Ser Ser Pro 50 55 60</p>			
<p>Ser Asn Leu Arg Lys His Ile Glu Arg Met His Pro Asn Tyr Leu Lys 65 70 75 80</p>			
<p>Asn Tyr Ser Lys Leu Thr Ala Gln Lys Arg Lys Ile Gly Thr Ser Thr 85 90 95</p>			
<p>His Ala Ser Ser Ser Lys Gln Leu Lys Val Asp Ser Val Phe Pro Val 100 105 110</p>			
<p>Lys His Val Ser Pro Val Thr Val Asn Lys Ala Ile Leu Arg Tyr Ile</p>			

ES 2 697 535 T3

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		
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

ES 2 697 535 T3

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
435 440 445

Asp Ile Leu Gln Ala Glu Thr Asn Thr Gln Leu Gly Trp Leu Leu Pro
450 455 460

Ser Val His Gln Leu Ser Leu Lys Leu Gln Arg Leu His His Ser Leu
465 470 475 480

Arg Tyr Cys Asp Pro Leu Val Asp Ala Leu Gln Gln Gly Ile Gln Thr
485 490 495

Arg Phe Lys His Met Phe Glu Asp Pro Glu Ile Ile Ala Ala Ala Ile
500 505 510

Leu Leu Pro Lys Phe Arg Thr Ser Trp Thr Asn Asp Glu Thr Ile Ile
515 520 525

Lys Arg Gly Met Asp Tyr Ile Arg Val His Leu Glu Pro Leu Asp His
530 535 540

Lys Lys Glu Leu Ala Asn Ser Ser Asp Asp Glu Asp Phe Phe Ala
545 550 555 560

Ser Leu Lys Pro Thr Thr His Glu Ala Ser Lys Glu Leu Asp Gly Tyr
565 570 575

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 Lys
625 630 635 640

Leu Asn Leu Arg Phe Tyr Asn Phe Glu
645

<210> 6

5 <211> 4682

<212> ADN

<213> Oryzias latipes

<400> 6

ES 2 697 535 T3

cagaggtgta aagtacttga gtaattttac ttgattactg tacttaagta ttatttttgg	60
ggatttttac ttactttag tacaattaaa aatcaatact ttactttta cttaaattaca	120
tttttttaga aaaaaaaagta cttttactc cttacaattt tatcacgt caaaaagtagc	180
ttattttttg gagatcactt cattctattt tcccttgcta ttaccaaacc aattgaattg	240
cgctgatgcc cagtttaatt taaatgttat ttattctgcc tatgaaaatc gtttcacat	300
tatatgaaat tggtcagaca tgttcattgg tcctttggaa gtgacgtcat gtcacatcta	360
ttaccacaat gcacagcacc ttgacctgga aattagggaa attataacag tcaatcagtg	420
gaagaaaatg gaggaagtat gtgattcatc agcagctgctg agcagcacag tccaaaatca	480
gccacaggat caagagcacc cgtggccgta tcttcgcgaa ttctttctt taagtgggt	540
aaataaaagat tcattcaaga taaaatgtgt cctctgtctc ccgcttaata aagaaatatc	600
ggccttcaaa agttcgccat caaacctaag gaagcatatt gaggttaagta cattaagtat	660
tttggtttac tgatagttt tttttttttt tttttttttt tttttgggtg tgcatttttt	720
gacgttcatg ggcgcgcctt tataatgtta gttaggcctat ttctactaat gcatgcgatt	780
gacaatataa ggctcacgta ataaaatgct aaaaatgcatt tgtaattggt aacgttaggt	840
ccacgggaaa ttggcgccctt attgcagctt tgaataatca ttatcattcc gtgcctctcat	900
tgtgtttgaa ttcatgcaaa acacaagaaa accaagcgag aaatttttt ccaaacatgt	960
tgtattgtca aaacggtaac actttacaat gaggttgatt agttcatgtta ttaactaaca	1020
ttaaataacc atgagcaata catttttac tggatctgtt aatctttttt aacgttagtt	1080
aatagaaaata cagatgttca ttgtttgttc atgttagttt acagtgcatt aactaatgtt	1140
aacaagatataa aaggtattag taaatgttga aattaacatg tatacgtgca gttcattttt	1200
agttcatgtt aactaatgtt gttactaac gaaccttatt gtaaaagtgt taccatcaaa	1260
actaatgtaa tgaaatcaat tcaccctgtc atgtcagcct tacagtcctg tgttttgtc	1320
aatataatca gaaataaaaat taatgttga ttgtcactaa atgctactgt atttctaaaa	1380
tcaacaagta tttaacatca taaagtgtgc aattggctgc aatgtcagt tttattaaag	1440
ggtagttca cccaaaaatg aaaataatgt cattaatgac tcgcctcat gtcgttccaa	1500
gccccgttca cctccgttca tcttcagaac acagtttaag atattttaga tttagtccga	1560
gagctttctg tgcctccatt gagaatgtat gtacggtata ctgtccatgt ccagaaaagg	1620

aataaaaaca	tcaaagttagt	ccatgtgaca	tcagtgggtt	agttagaatt	tttgaagca	1680
tcgaaatacat	tttggtccaa	aaataacaaa	acctacgact	ttattcgca	ttgtattctc	1740
ttccgggtct	gttgtcaatc	cgcgttcacg	acttcgcagt	gacgctacaa	tgctgaataa	1800
agtcgttaggt	tttggttattt	ttggacccaa	atgtatttc	gatgcttcaa	ataattctac	1860
ctaaccact	gatgtcacat	ggactacttt	gatgtttta	ttaccttct	ggacatggac	1920
agtataccgt	acatacattt	tcagtggagg	gacagaaagc	tctcgacta	aatctaaaat	1980
atcttaaact	gtgttccgaa	gatgaacgga	ggtgttacgg	gcttggaaacg	acatgaggg	2040
gagtcattaa	tgacatcttt	tcatttttgg	gtgaactaac	cctttaatgc	tgtaatcaga	2100
gagtgtatgt	gtaattgtta	catttattgc	atacaatata	aatatttatt	tgttgtttt	2160
acagagaatg	cacccaaatt	acctcaaaaa	ctactctaaa	ttgacagcac	agaagagaaa	2220
gatcgggacc	tccacccatg	cttccagcag	taagcaactg	aaagttgact	cagtttccc	2280
agtcaaacat	gtgtctccag	tcactgtgaa	caaagctata	ttaaggtaca	tcattcaagg	2340
acttcatcc	ttcagcactg	ttgatctgcc	atcatttaaa	gagctgatta	gtacactgca	2400
gcctggcatt	tctgtcatta	caaggcctac	tttacgctcc	aagatagctg	aagctgctct	2460
gatcatgaaa	cagaaagtga	ctgctccat	gagtaagtt	gaatggattt	caaccacaac	2520
ggattgttgg	actgcacgta	gaaagtccatt	cattggtgta	actgctca	ggatcaaccc	2580
tggaaagtctt	gaaagacatt	ccgctgcaet	tgcctgcaaa	agattaatgg	gctctcatac	2640
ttttgaggtt	ctggccagtg	ccatgaatga	tatccactca	gagttatgaaa	tacgtgacaa	2700
ggttgttgc	acaaccacag	acagtggttc	caactttatg	aaggcttca	gagtttttgg	2760
tgtggaaaac	aatgataatcg	agactgaggc	aagaagggtgt	gaaagtgtat	acactgattc	2820
tgaaggctgt	ggtgagggaa	gtgatgggt	ggaattccaa	gatgcctcac	gagtcctgga	2880
ccaagacgat	ggcttcgaat	tccagctacc	aaaacatcaa	aagtgtcc	gtcacttact	2940
taacctagtc	tcaagcggtt	atgccccaaa	agctctctca	aatgaacact	acaagaaact	3000
ctacagatct	gtctttggca	aatgccaagc	tttatggat	aaaagcagcc	gatcggtct	3060
agcagctgaa	gctgttgaat	cagaaagccg	gcttcagctt	ttaaggccaa	accaaacgcg	3120
gtggaattca	acttttatgg	ctgttgacag	aattcttcaa	atttgcaaaag	aaggcaggaga	3180
aggcgcactt	cggaatataat	gcacccctct	tgaggttcca	atgttaagtgt	ttttccccctc	3240
tatcgatgt	aacaaatgtg	ggttgtttt	gtttaataact	cttgcattat	gtgttattct	3300
cctgttaggtt	taatccagca	gaaatgtgt	tcttgacaga	gtggggccaaac	acaatgcgtc	3360
cagttgcaaa	agtactcgac	atcttgcaag	cggaaacgaa	tacacagctg	gggtggctgc	3420
tgccttagtgt	ccatcagttt	agttgaaac	ttcagcact	coaccattct	ctcaggtact	3480
gtgacccact	tgtggatgcc	ctacaacaag	gaatccaaac	acgattcaag	catatgttg	3540
aagatccctga	gatcatagca	gctgccatcc	ttctccctaa	atttcggacc	tcttggacaa	3600

ES 2 697 535 T3

	atgatgaaac catcataaaa cgaggtaaat gaatgcaagc aacatacact tgacgaattc	3660
	taatctgggc aaccctttagg ccataccaaa attattctt tatattatata tttttgcact	3720
	tttttaggaat gttatataccc atctttggct gtgatctcaa tatgaatattt gatgtaaagt	3780
	attcttgcag caggtttagt ttatccctca gtgtttctt aaacccaaact cataatgtatc	3840
	atatgtggtt tggaaatgca gtttagatttt atgctaaaat aagggatttg catgattttt	3900
	gatgttagatg actgcacgta aatgttagtta atgacaaaat ccataaaaatt tgttcccagt	3960
	cagaagcccc tcaaccaaac ttttcttgt gtctgctcac tgtgcttgc ggcattggact	4020
	acatcagagt gcatctggag ccttggacc acaagaagga attggccaac agttcatctg	4080
	atgatgaaga tttttcgct tctttgaaac cgacaacaca tgaagccagc aaagagttgg	4140
	atggatatact ggcctgtgtt tcagacacca gggagtctct gctcacgtt cctgctattt	4200
	gcagcctctc tatcaagact aatacacctc ttccgcata ggctgcctgt gagaggctt	4260
	tcagcactgc aggattgctt ttcaagccccaa aaagagctag gcttgacact aacaattttg	4320
	agaatcagct tctactgaag ttaaatctga gttttacaa ctgttgcgtt cgtgtactgg	4380
	cattagatttgc tctgtcttat agtttgataa ttaaatacaa acagttctaa agcaggataa	4440
	aacccctgtat gcatttcatt taatgttttt tgagattaaa agcttaaaca agaatctcta	4500
	gttttcttgc ttgcgtttac ttttacttcc ttaatactca agtacaattt taatggagta	4560
	ctttttacttacttcaag taagattcta gccagatact tttactttta attgagtaaa	4620
	atttcccta agtacttgta ctgcacttg agtaaaattt ttgagttactt ttacacctc	4680
	tg	4682
	<210> 7	
	<211> 321	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: gen de resistencia a cicloheximida	
10	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(321)	
15	<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 Tyr Asp Arg Lys Gln Ser Gly Tyr	
	35 40 45	

ggt ggg cag aca aag caa att ttc cgg aag aag gct aag acc aca aag Gly Gly Thr Lys Gln Ile Phe Arg Lys Lys Ala Lys Thr Thr Lys 50 55 60	192
aag att gtg cta agg ctg gaa tgt gtt gag cct aac tgc aga tcc aag Lys Ile Val Leu Arg Leu Glu Cys Val Glu Pro Asn Cys Arg Ser Lys 65 70 75 80	240
agg atg ctg gcc att aag aga tgc aag cat ttt gaa ctg gga gga gat Arg Met Leu Ala Ile Lys Arg Cys Lys His Phe Glu Leu Gly Gly Asp 85 90 95	288
aag aag aag ggc caa gtg atc cag ttc taa Lys Lys Arg Gly Gln Val Ile Gln Phe 100 105	321
<210> 8	
<211> 106	
5 <212> PRT	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Constructo sintético	
10 <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 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	
<210> 9	
15 <211> 1404	
<212> ADN	
<213> Artificial	
<220>	
20 <223> cadena pesada de M2Z3	
<220>	
<221> CDS	
<222> (1)..(1404)	
25 <400> 9	

ES 2 697 535 T3

atg gac tgg acc tgg agc atc ctt ttc ttg gtg gca gca gca aca ggt Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly 1 5 10 15	48
gcc cac tcc cag gtt cag ctg gtg cag tct gga gct gag gtg aag aag Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys 20 25 30	96
cct ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct ggt tac acc ttt Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe 35 40 45	144
acc agc tat ggt atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu 50 55 60	192
gag tgg atg gga tgg atc agc gct tac aat ggt aac aca aac tat gca Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala 65 70 75 80	240
cag aag ctc cag ggc aga gtc acc atg acc aca gac aca tcc acg agc Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Asp Thr Ser Thr Ser 85 90 95	288
aca gcc tac atg gag ctg agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtg Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val 100 105 110	336
tat tac tgt gcg agg gca gca gct ggc gga tac ttc cag cac tgg ggc Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Ala Gly Gly Tyr Phe Gln His Trp Gly 115 120 125	384
cag ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc acc aag ggc cca tcg Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser 130 135 140	432
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

ES 2 697 535 T3

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 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 385 390 395 400	1200
tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro 405 410 415	1248
gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val 420 425 430	1296
gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met 435 440 445	1344
cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser 450 455 460	1392
ccg ggt aaa tga Pro Gly Lys 465	1404

<210> 10

<211> 467

5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10 <400> 10

ES 2 697 535 T3

Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Ala Gly Gly Tyr Phe Gln His Trp Gly
115 120 125

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

ES 2 697 535 T3

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
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>

<223> cadena ligera de M2Z3

10 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(708)

ES 2 697 535 T3

<400> 11		
atg gcc agc ttc cct 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		
85 90 95		
ggg ctc cag tct gag gag gct gat tat tac tgt gca gca tgg gat		336
Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp		
100 105 110		
gac agc ctg aat ggt gtg gta ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc		384
Asp Ser Leu Asn Gly Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val		
115 120 125		
cta ggt cag ccc aag gct gcc ccc tag gtc act ctg ttc cca ccc tcc		432
Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser		
130 135 140		
tct gag gag ctt caa gcc aac aag gcc aca ctg gtg tgt ctc ata agt		480
Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser		
145 150 155 160		
gac ttc tac ccg gga gcc gtg aca gtg gcc tgg aag gca gat agc agc		528
Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser		
165 170 175		
ccc gtc aag gcg gga gtg gag acc acc aca ccc tcc aaa caa agc aac		576
Pro Val Lys Ala Gly Val Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn		
180 185 190		
aac aag tac gcg gcc agc agc tac ctg agc ctg acg cct gag cag tgg		624
Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp		
195 200 205		
aag tcc cac aaa agc tac agc tgc cag gtc acg cat gaa ggg agc acc		672
Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr		
210 215 220		
gtg gag aag aca gtg gcc cct aca gaa tgt tca tag		708
Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser		
225 230 235		

5

<210> 12
<211> 235
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 12

ES 2 697 535 T3

Met Ala Ser Phe Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Thr His Cys Ala Gly
 1 5 10 15

Ser Trp Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr
 20 25 30

Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile
 35 40 45

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

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 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

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

10 <220>
 <223> transposón Tol1 no autólogo
 <400> 13

cagtagcggt tctaggcacg ggccgtccgg gcggtggcct ggggcggaaa actgaagggg 60
 ggcggcaccg gcggttcacgc cctttgtaat atattaatat gcaccactat tggtttactt 120
 atgtcacagt ttgttaagttt gtaacagcct gaacctggcc gcgccgcccgc cctcgccccg 180
 cagctgcgct ctccgtctt tgagaagtag acacaaaatgt gtgtgaagaa ggagaaggga 240
 gggggcgcgg ggtgagcacg gagcgtcgcc gcgttgcgc atgcgcaaaaa cctggctggc 300
 tcatcttca ggggaggcga cggtcgccggg cttgtatgaaa aaaataaaaag taaaaactgc 360
 gactgcgccc tcatgttagcg aatcagcgcc cctggctgtt gctgcacgcg ctccgtctgg 420
 aaatgtgtga agagggggggg gggggggggg gctgcggggg atcagttcaa ttgtgggacg 480
 ctccaaatt aagtggctag gtggggacaa gggcgggggt ttgaatctac ttcataaaaac 540
 cttttatata tataagttag tcataagggtg acattctata acctacattt taataaaggt 600
 ataaaaaaaata tattctgtttt tttttgggtt aattttgtgt gaaatgtcca aataaaaaaaa 660
 atggcaacac aaaacaatgc tgtcaactaag gtgacagttt gttcagtcga cggacttgat 720
 gccttcctcg tgacgtgagg acatttatgc caaacaacacg ccaataaaca tctaaaaat 780
 ggaaaaagaaa aggtcaaagc catctggtgc ccaattttaga aagaaaagaa aagaagaaga 840
 ggagaaaaaga gataaagaaa agggtaagtc ctcacagctt gatgcattt ttttctaaat 900
 tctaattgcta cctgcctac aacaacgttg ccgtgaaaaa ctttattttt gtcgatgacc 960
 aacactgaat taggccccaaa tggcaat agcgtcattt tttttttttt ttttagattt 1020
 tattctaaa aatttgcctt gccttaactt gtaacattttt ttatgattca tggctgttc 1080
 tgctctgtg taacacaaaag gttttgtgg gttttgtgt tggataactag ctctataatgt 1140
 taaaaaaagct gtgatggta cacagcatgc tggctgtgcc ataagatgt aatggggcaa 1200
 ataatttgag attggtcatt aatttaataa tcatttgtgg cagcctaaac gttttcacaa 1260
 tttttttt acatttaact ggggatttttag gggtaattt tgagcctgca tatgaagttt 1320
 attttttattt tggtaacaa atgtgggattt atatttttag ccaatagaat ttccataaaat 1380
 ctgttaggtag ttttaaaaat gaatatttac catttactgc aactctatgg ggacaaaaca 1440
 taatgtacaaca ggtcataact aaaaatgtgc caatcaaagg attgaagacg gaaaacatga 1500
 gttaattttt cttctctgaa gtagagatcg atatagaaca tgacaattta aatttccaaat 1560
 tcataaatgt ttttaaaaata ttttattttt attatttttta acattttagg tttgattcaa 1620
 tattttctta gcttaactgtt ttttgccat gcttatggtc ttttattttt tggctgttc 1680
 taacttttat aatgttttc agaattttga catttttgtt atccacttct taatttcaat 1740
 gacaataaaa catttcagtt gacgaagaca aacaaagtgc tgggtgtact atgggggggg 1800
 ggggcgcctg gggatggtct cgcccgccggg gtaattcagg gtagaaccgc cactg 1855

5 <210> 14
 <211> 200
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> secuencia de transposición Tol1-L

<400> 14

ES 2 697 535 T3

	cagtagcggt tctaggcacg ggccgtccgg gcgggtggcct ggggcggaaa actgaagggg	60
	ggcggcaccg gcggtcaagc cctttgtaat atattaatat gcaccactat tggttactt	120
	atgtcacagt ttgttaagttt gtaacagcct gaacctggcc gcgcgcgcgc cctcgccccg	180
	cagctgcgct ctcctgtctt	200
	<210> 15	
	<211> 505	
5	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> secuencia de transposición Tol1-R	
10	<400> 15	
	atatttttag ccaatagaat ttccataaaat ctgttaggtag ttttaaaaat gaatatttac	60
	catttactgc aactctatgg ggacaaaaca taatgtaca ggtcataact aaaaatgtgc	120
	caatcaaagg attgaagacg gaaaacatga gttaaattttt cttctctgaa gtagagatcg	180
	atatagaaca tgacaattta aatttccaat tcataaaatgt ttttaaaaata ttttattttat	240
	attattttattt taacattttag tttgattcaa tattttctta gctaactgta tttttgccat	300
	gcttatggtc ttttattttt tggttctga taactttat aatgctttc agaattttga	360
	catcttttgt atccacttct taatttcaat gacaataaaa catttcagtt gacgaagaca	420
	aacaaagttc tgggtgtact atgggggggg ggggcgcctg gggatggct cggccgggga	480
	gtaattcagg gtagaaccgc cactg	505
	<210> 16	
15	<211> 2745	
	<212> ADN	
	<213> Oryzias latipes	
	<220>	
20	<221> CDS	
	<222> (30)..(2585)	
	<400> 16	

ES 2 697 535 T3

gccaaacaaa cgccaaaaac atctaaaat atg gag aaa aaa agg tca aag cca Met Glu Lys Lys Arg Ser Lys Pro 1 5	53
tct ggt gcc caa ttt aga aag aaa aga aaa gaa gaa gag gag aaa aga Ser Gly Ala Gln Phe Arg Lys Lys Arg Lys Glu Glu Glu Lys Arg 10 15 20	101
gat aaa gaa aag ggg gca ctt cta aga tat ttt gga tcg tct acc act Asp Lys Glu Lys Gly Ala Leu Leu Arg Tyr Phe Gly Ser Ser Thr Thr 25 30 35 40	149
gct caa gat gag aca tct acc tcc ctg cca gct atc tca tca gcc aca Ala Gln Asp Glu Thr Ser Thr Ser Leu Pro Ala Ile Ser Ser Ala Thr 45 50 55	197
gtc aca gtc tca ccc cct cag gat gag cta cca tct aca tcc tct gct Val Thr Val Ser Pro Pro Gln Asp Glu Leu Pro Ser Thr Ser Ser Ala 60 65 70	245
act cat gta gtt cca cag ttg tta cct gag caa agt ttt gat agt gag Thr His Val Val Pro Gln Leu Pro Glu Gln Ser Phe Asp Ser Glu 75 80 85	293
gct gaa gac gtt gtt cca tct acg tct acc cag ctt gag act tca gaa Ala Glu Asp Val Val Pro Ser Thr Ser Thr Gln Leu Glu Thr Ser Glu 90 95 100	341
atg cct ggt gat gaa acc cca ctg acc ccg act gct gag gac cag cct Met Pro Gly Asp Glu Thr Pro Leu Thr Pro Thr Ala Glu Asp Gln Pro 105 110 115 120	389
cta cca act gac cct gca aag tgg ccc tca cct ctg act gac agg ata Leu Pro Thr Asp Pro Ala Lys Trp Pro Ser Pro Leu Thr Asp Arg Ile 125 130 135	437
cgg atg gag ctg gtt cga aga gga cca agt agc ata cca cct gac ttt Arg Met Glu Leu Val Arg Arg Gly Pro Ser Ser Ile Pro Pro Asp Phe 140 145 150	485
gtt ttc cca aga aat gac agt gat ggg aga agt tgt cat cac cac tat Val Phe Pro Arg Asn Asp Ser Gly Arg Ser Cys His His His Tyr 155 160 165	533
ttc agg aag aca cta gta agt ggt gaa aaa ata gca aga act tgg ttg Phe Arg Lys Thr Leu Val Ser Gly Glu Lys Ile Ala Arg Thr Trp Leu 170 175 180	581
atg tat tca aaa gtg aag aac agc ctc ttt tgc ttt tgt tgc aaa ttg Met Tyr Ser Lys Val Lys Asn Ser Leu Phe Cys Phe Cys Cys Lys Leu 185 190 195 200	629
ttt tcc aac aaa aac att aat tta aca act tct ggt aca gca aac tgg Phe Ser Asn Lys Asn Ile Asn Leu Thr Thr Ser Gly Thr Ala Asn Trp 205 210 215	677

ES 2 697 535 T3

aaa cat gca agc aca tac ctc aca gca cac gaa aaa agc cca gaa cac Lys His Ala Ser Thr Tyr Leu Thr Ala His Glu Lys Ser Pro Glu His 220 225 230	725
ctc aat tgt atg aaa gca tgg aag gaa ctg tca ggg agg atc aga agt Leu Asn Cys Met Lys Ala Trp Lys Glu Leu Ser Gly Arg Ile Arg Ser 235 240 245	773
ggg aaa aca att gat aag cag gag atg gca ctt ctg gaa gag gag cgg Gly Lys Thr Ile Asp Lys Gln Glu Met Ala Leu Leu Glu Glu Glu Arg 250 255 260	821
gtg aga tgg aga gca gtg cta acc cgt ctc att gct att gtg cag tca Val Arg Trp Arg Ala Val Leu Thr Arg Leu Ile Ala Ile Val Gln Ser 265 270 275 280	869
ctg gca gtt cgg aat ttg gct cta agg gga cac aca gaa aca ctg ttc Leu Ala Val Arg Asn Leu Ala Leu Arg Gly His Thr Glu Thr Leu Phe 285 290 295	917
aca tca tca aat ggg aat ttt ttg aaa gag gtt gaa ctg atg gcc agg Thr Ser Ser Asn Gly Asn Phe Leu Lys Glu Val Glu Leu Met Ala Arg 300 305 310	965
ttt gat ccc ata atg aaa gat cat ctt aac cgt gta tta aga gga aca Phe Asp Pro Ile Met Lys Asp His Leu Asn Arg Val Leu Arg Gly Thr 315 320 325	1013
gca agt cac aac agc tac ata ggc cat cat gtg cag aat gaa ctt att Ala Ser His Asn Ser Tyr Ile Gly His His Val Gln Asn Glu Leu Ile 330 335 340	1061
gat ttg ttg agc agc aaa atc cta tcc gct ata gtg gat gac atc aaa Asp Leu Leu Ser Ser Lys Ile Leu Ser Ala Ile Val Asp Asp Ile Lys 345 350 355 360	1109
aag gca aaa tat ttt tca ata att ctg gac tgc act ctg gat ata agc Lys Ala Lys Tyr Phe Ser Ile Ile Leu Asp Cys Thr Leu Asp Ile Ser 365 370 375	1157
cac aca gaa cag ttg tca gtt ata att aga gtg gtg tca ctg atg gag His Thr Glu Gln Leu Ser Val Ile Ile Arg Val Val Ser Leu Met Glu 380 385 390	1205
aag cct cag atc agg gaa cat ttt atg ggg ttt ttg gag gca gag gag Lys Pro Gln Ile Arg Glu His Phe Met Gly Phe Leu Glu Ala Glu Glu 395 400 405	1253
tcc aca ggc cag cac ttg gca tcc atg atc tta aac aga ctt gag gag Ser Thr Gly Gln His Leu Ala Ser Met Ile Leu Asn Arg Leu Glu Glu 410 415 420	1301
tta gga att tct ttt gaa gac tgc aga gga caa tca tat gat aat ggg Leu Gly Ile Ser Phe Glu Asp Cys Arg Gly Gln Ser Tyr Asp Asn Gly 425 430 435 440	1349
gca aat atg aaa ggc aaa aat aag gga gta caa gcc agg ctc tta gaa Ala Asn Met Lys Gly Lys Asn Lys Gly Val Gln Ala Arg Leu Leu Glu 445 450 455	1397
aag aat ccc cgt gct ctg ttt ttg cca tgc ggt gca cac aca ttg aat Lys Asn Pro Arg Ala Leu Phe Leu Pro Cys Gly Ala His Thr Leu Asn 460 465 470	1445

ES 2 697 535 T3

tta gtt gtg tgt gat gct gct aag aga tct gtt gat gct atg agc tac Leu Val Val Cys Asp Ala Ala Lys Arg Ser Val Asp Ala Met Ser Tyr 475 480 485	1493
ttt ggt gtc ctg caa aag ctt tac act tta ttt tca gcc tct gcc caa Phe Gly Val Leu Gln Lys Leu Tyr Thr Leu Phe Ser Ala Ser Ala Gln 490 495 500	1541
cga tgg gcc ata ctg aag agt cag gtg agc atc act cta aag tcg tgg Arg Trp Ala Ile Leu Lys Ser Gln Val Ser Ile Thr Leu Lys Ser Trp 505 510 515 520	1589
aca gaa aca agg tgg gag agc aaa atc aaa agc atc gag ccc atg agg Thr Glu Thr Arg Trp Glu Ser Lys Ile Lys Ser Ile Glu Pro Met Arg 525 530 535	1637
tac cag gga gct gca gtg aga gag gct tta ata gaa gtg aga gac aag Tyr Gln Gly Ala Ala Val Arg Glu Ala Leu Ile Glu Val Arg Asp Lys 540 545 550	1685
acc aaa gac cca gtt ata aag gct gag gcc cag tct ttg tct gaa gag Thr Lys Asp Pro Val Ile Lys Ala Glu Ala Gln Ser Leu Ser Glu Glu 555 560 565	1733
gtt ggg tcc tac cgc ttc aac atc tgc aca gtc gta tgg cat gac att Val Gly Ser Tyr Arg Phe Asn Ile Cys Thr Val Val Trp His Asp Ile 570 575 580	1781
cta tct aca ata aag cat gtc agc aaa ctc atg cag tct cca aat atg Leu Ser Thr Ile Lys His Val Ser Lys Leu Met Gln Ser Pro Asn Met 585 590 595 600	1829
cat gtg gac cta gct gtg agt ctt ttg aag aag act gaa caa agt ctc His Val Asp Leu Ala Val Ser Leu Leu Lys Lys Thr Glu Gln Ser Leu 605 610 615	1877
cag agc tac agg gca aat ggc ttt gtg aat gca cag atg gca gcc aaa Gln Ser Tyr Arg Ala Asn Gly Phe Val Asn Ala Gln Met Ala Ala Lys 620 625 630	1925
gaa atg tgc aag gaa atg aat gtc gag gct att ttg aaa caa aaa aga Glu Met Cys Lys Glu Met Asn Val Glu Ala Ile Leu Lys Gln Lys Arg 635 640 645	1973
ata aga tcc aca aag tgc caa ttc tcg tat gaa tca cac gat gag cct Ile Arg Ser Thr Lys Cys Gln Phe Ser Tyr Glu Ser His Asp Glu Pro 650 655 660	2021
ttc agt gac gca ctt aaa aag ttg gag gtt gaa ttt ttc aat gtt gtt Phe Ser Asp Ala Leu Lys Lys Leu Glu Val Glu Phe Phe Asn Val Val 665 670 675 680	2069
gtt gat gaa gcc ttg tca gcc atc gcg gag agg ttt tcc aca ttg gaa Val Asp Glu Ala Leu Ser Ala Ile Ala Glu Arg Phe Ser Thr Leu Glu 685 690 695	2117
gtt gta caa aac aga ttt ggg gtt ttg acc aat ttc cca agc ctt gga Val Val Gln Asn Arg Phe Gly Val Leu Thr Asn Phe Pro Ser Leu Gly 700 705 710	2165
gac gag gag ctg acg gag caa tgc gag gca cta ggc aac ata ctc cat Asp Glu Glu Leu Thr Glu Gln Cys Glu Ala Leu Gly Asn Ile Leu His 715 720 725	2213
ttt gag aag aac tgg gat ttg gac agt aga gag ctt gtt cag gaa atc	2261

ES 2 697 535 T3

Phe	Glu	Lys	Asn	Trp	Asp	Leu	Asp	Ser	Arg	Glu	Leu	Val	Gln	Glu	Ile		
730																	
																740	
aag	aac	ttg	cct	aac	tta	cca	tca	acg	act	cca	agt	ctc	ctt	gag	ctc		
Lys	Asn	Leu	Pro	Asn	Leu	Pro	Ser	Thr	Thr	Pro	Ser	Leu	Leu	Glu	Leu		
745																760	
atc	tct	ttc	atg	tct	gat	aag	gat	cta	tca	gaa	atc	tat	ccg	aac	ttt		
Ile	Ser	Phe	Met	Ser	Asp	Lys	Asp	Leu	Ser	Glu	Ile	Tyr	Pro	Asn	Phe		
																775	
tgg	act	gct	ctc	agg	att	gca	ctc	acc	ttg	cca	gtc	act	gtg	gct	caa		
Trp	Thr	Ala	Leu	Arg	Ile	Ala	Leu	Thr	Leu	Pro	Val	Thr	Val	Ala	Gln		
																790	
gca	gag	agg	agc	ttt	tca	aaa	cta	aaa	ttg	atc	aag	tcg	tac	ctg	agg		
Ala	Glu	Arg	Ser	Phe	Ser	Lys	Leu	Lys	Leu	Ile	Lys	Ser	Tyr	Leu	Arg		
																805	
tca	aca	atg	tca	cag	gag	cga	ctc	act	aac	ctt	gcc	gtt	gtt	agc	atc		
Ser	Thr	Met	Ser	Gln	Glu	Arg	Leu	Thr	Asn	Leu	Ala	Val	Val	Ser	Ile		
																820	
aat	cac	tca	gta	ggg	gag	cag	ata	tca	tat	gat	gat	gtt	att	gac	gag		
Asn	His	Ser	Val	Gly	Glu	Gln	Ile	Ser	Tyr	Asp	Asp	Val	Ile	Asp	Glu		
																840	
ttt	gca	tca	aga	aag	gct	agg	aag	gtt	agg	ttt	tag	ttgggtgtttt					
Phe	Ala	Ser	Arg	Lys	Ala	Arg	Lys	Val	Arg	Phe							
																850	
ctgttattgt	attggtgctg	cagttatatt	tatTTtagcg	tgtcatttgt	gtgataaaag												2655
gtttgtgctt	tataatatTT	atTTtatatt	atTTattcaa	tattgagttt	gattcaatAT												2715
tttcttagct	aactgtatTT	ttgccatgct															2745
<210> 17																	
<211> 851																	
<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																	

ES 2 697 535 T3

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

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 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 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

ES 2 697 535 T3

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

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

ES 2 697 535 T3

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

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

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir una proteína de interés, que comprende introducir un vector de expresión de proteína (a) que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una proteína de interés y un gen marcador seleccionable y, en ambos extremos del fragmento génico, un par de secuencias de transposición que son las secuencias de nucleótidos de Tol1 representadas en SEC ID nº 14 y SEC ID nº 15 o las secuencias de nucleótidos de Tol2 representadas en SEC ID nº 2 y SEC ID nº 3, en una célula de CHO en suspensión apta para sobrevivir y proliferar en un medio sin suero; introducir un vector de expresión (b) que comprende un ADN que codifica una transposasa que reconoce las secuencias de transposición y presenta una actividad de transferir un fragmento génico insertado entre las secuencias de transposición en un cromosoma en la célula de CHO; integrar el fragmento génico insertado entre las secuencias de transposición en un cromosoma de la célula de CHO para obtener dicha célula de CHO apta para expresar la proteína de interés; y cultivar en suspensión la célula de CHO.
- 5 2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende:
- (A) introducir simultáneamente los vectores de expresión (a) y (b) en la célula de CHO,
- 10 (B) expresar de manera transitoria la transposasa a partir del vector de expresión introducido en la etapa (A) para integrar el fragmento génico insertado entre las secuencias de transposición en un cromosoma de la célula de CHO para obtener dicha célula de CHO en suspensión apta para expresar la proteína de interés, y
- 15 (C) cultivar en suspensión la célula de CHO en suspensión apta para expresar la proteína de interés obtenida en la etapa (B) para producir la proteína de interés.
- 20 3. Procedimiento para obtener una célula de CHO en suspensión apta para expresar una proteína de interés, que comprende introducir un vector de expresión de proteína que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una proteína de interés y un gen marcador seleccionable y, en ambos extremos del fragmento génico, un par de secuencias de transposición que son las secuencias de nucleótidos de Tol1 representadas en SEC ID nº 14 y SEC ID nº 15 o las secuencias de nucleótidos de Tol2 representadas en SEC ID nº 2 y SEC ID nº 3, en una célula de CHO en suspensión apta para sobrevivir y proliferar en un medio sin suero; introducir un vector de expresión (b) que comprende un ADN que codifica una transposasa que reconoce las secuencias de transposición y presenta una actividad de transferir un fragmento génico insertado entre las secuencias de transposición en un cromosoma en la célula de CHO; e integrar el fragmento génico insertado entre las secuencias de transposición, en un cromosoma de la célula de CHO.
- 25 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 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.
- 30 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el gen marcador seleccionable es un gen de resistencia a cicloheximida.
- 35 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 L36a.
- 40 7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el mutante es un mutante en el que la prolina en la posición 54 de la proteína ribosómica humana L36a se sustituye con otro aminoácido.
- 45 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el otro aminoácido es la glutamina.
- 50 9. Célula de CHO en suspensión apta para sobrevivir y proliferar en un medio sin suero y para producir una proteína de interés, comprendiendo dicha célula 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, en ambos extremos del fragmento génico, un par de secuencias de transposición que son las secuencias de nucleótidos de Tol1 representadas en SEC ID nº 14 y SEC ID nº 15 o las secuencias de nucleótidos de Tol2 representadas en SEC ID nº 2 y SEC ID nº 3 y un vector de expresión (b) que comprende un ADN que codifica una transposasa (una transferasa) que reconoce las secuencias de transposición y presenta una actividad de transferir el fragmento génico insertado entre las secuencias de transposición en un cromosoma para integrar el fragmento génico insertado entre las secuencias de transposición en un cromosoma de la célula de CHO.
- 55 10. Célula según la reivindicación 9, en la 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.
- 60 11. Célula según la reivindicación 9 o 10, en la que el gen marcador seleccionable es un gen de resistencia a cicloheximida.

12. Célula según la reivindicación 11, en la que el gen de resistencia a cicloheximida es un gen que codifica un mutante de la proteína ribosómica humana L36a.

5 13. Célula según la reivindicación 12, en la que el mutante es un mutante en el que la prolina en la posición 54 de la proteína ribosómica humana L36a se sustituye con otro aminoácido.

14. Célula según la reivindicación 13, en la que el otro aminoácido es la glutamina.

10 15. Utilización de un vector de expresión de proteína (a) que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una proteína de interés y un gen marcador seleccionable y, en ambos extremos del fragmento génico, un par de secuencias de transposición que son las secuencias de nucleótidos de Tol1 representadas en SEC ID nº 14 y SEC ID nº 15 o las secuencias de nucleótidos de Tol2 representadas en SEC ID nº 2 y SEC ID nº 3 y un vector de expresión (b) que comprende un ADN que codifica una transposasa que reconoce las secuencias de transposición y presenta una actividad de transferir un fragmento génico insertado entre las secuencias de transposición en un cromosoma, para integrar el fragmento génico insertado entre las secuencias de transposición en un cromosoma de una célula de CHO en suspensión apta para sobrevivir y proliferar en un medio sin suero.

Fig. 1

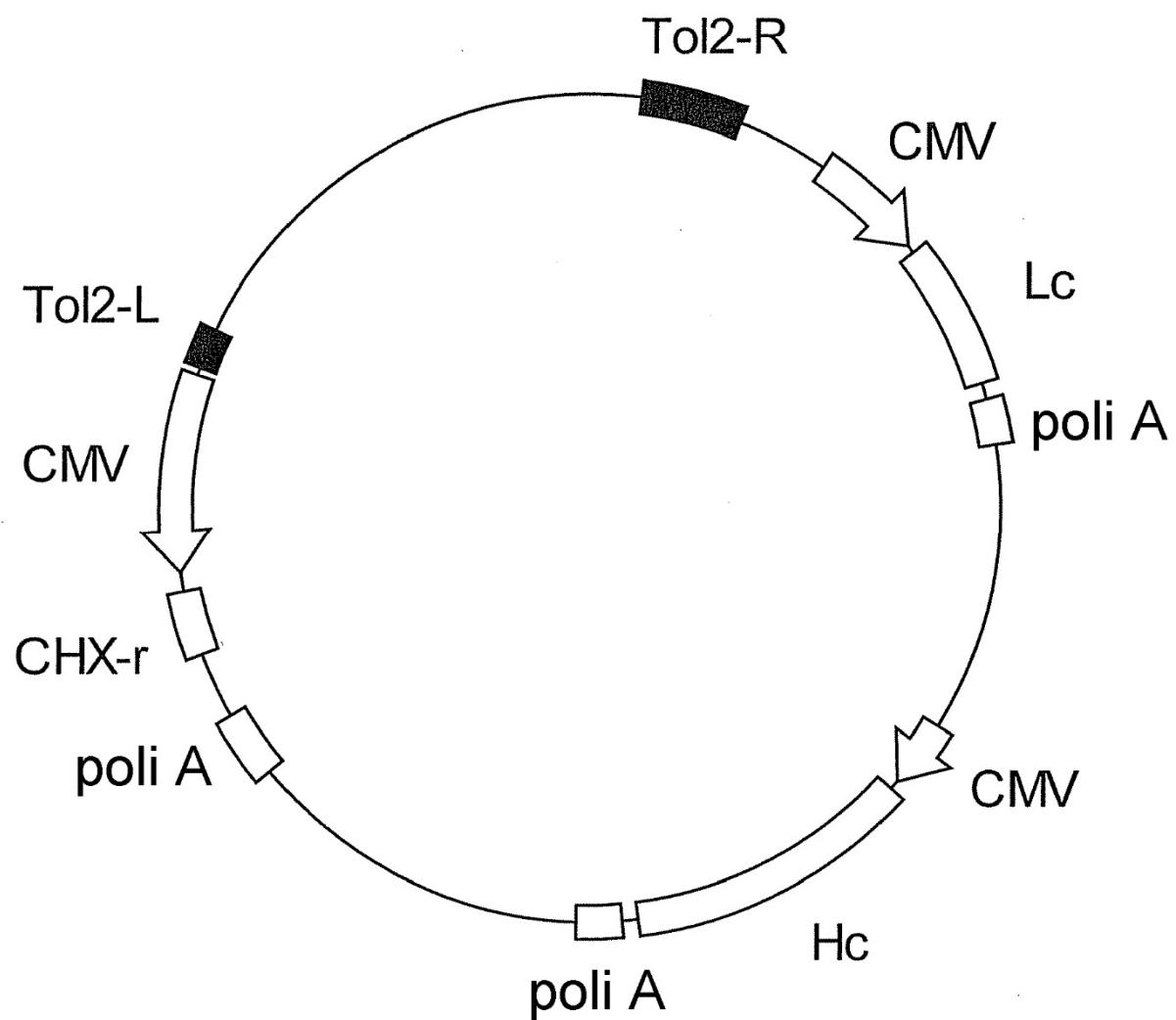


Fig.2

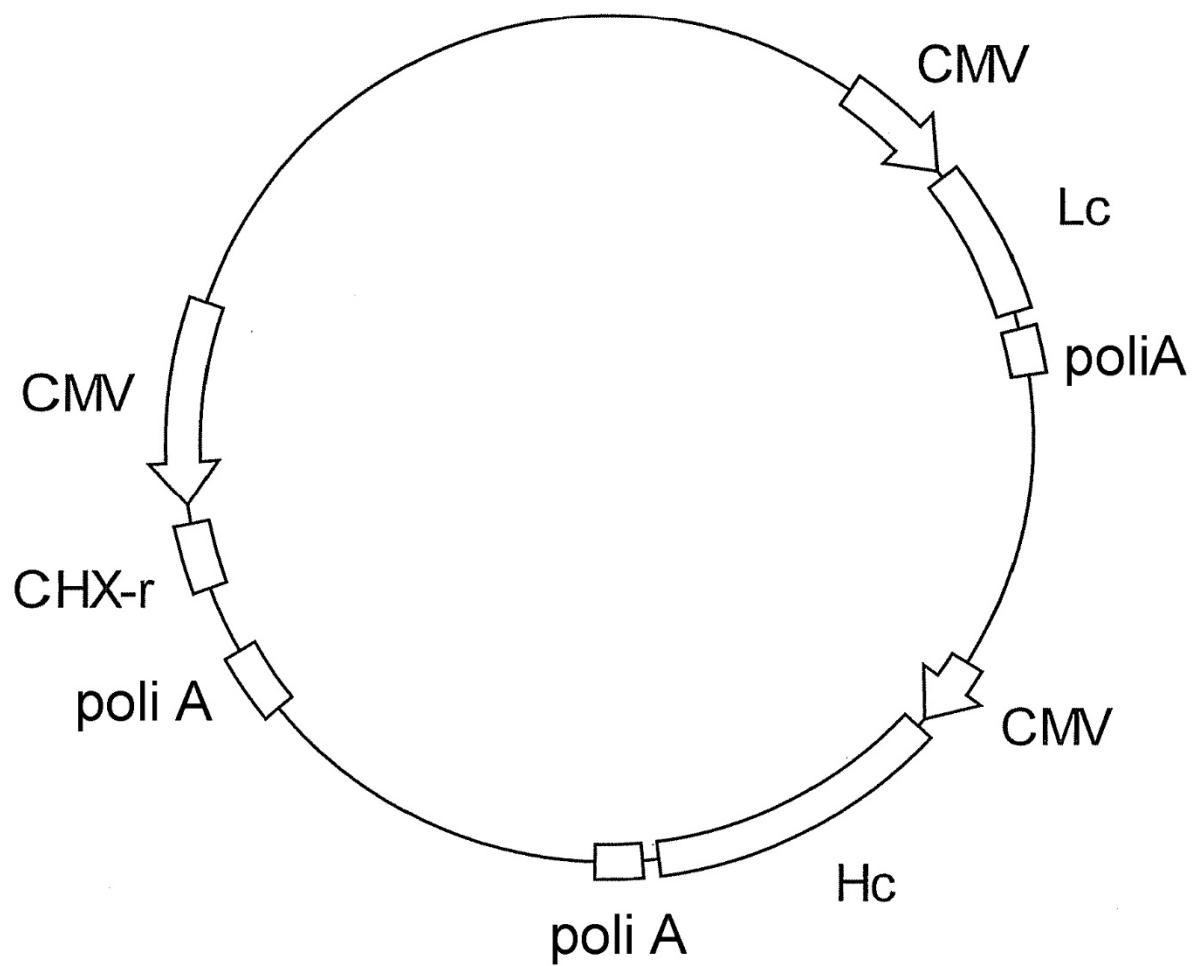


Fig.3

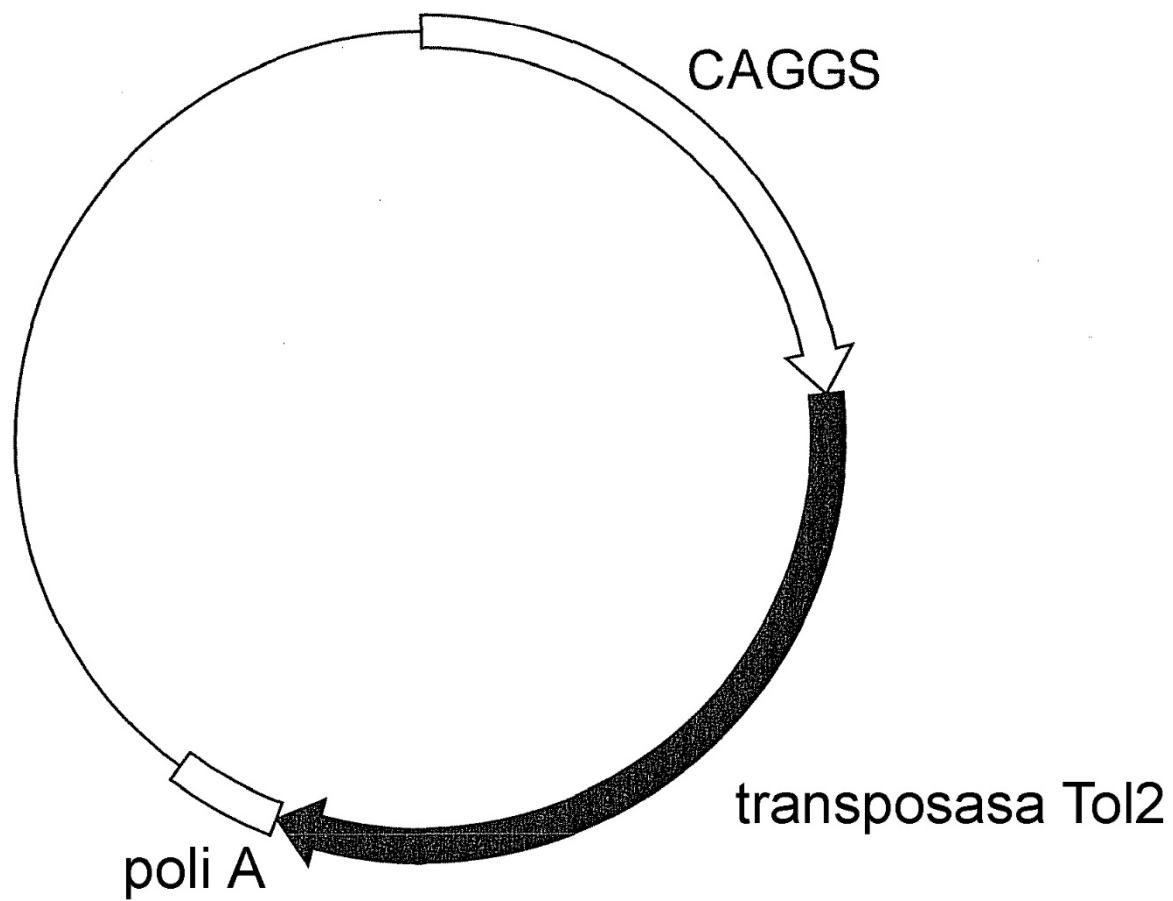


Fig. 4A

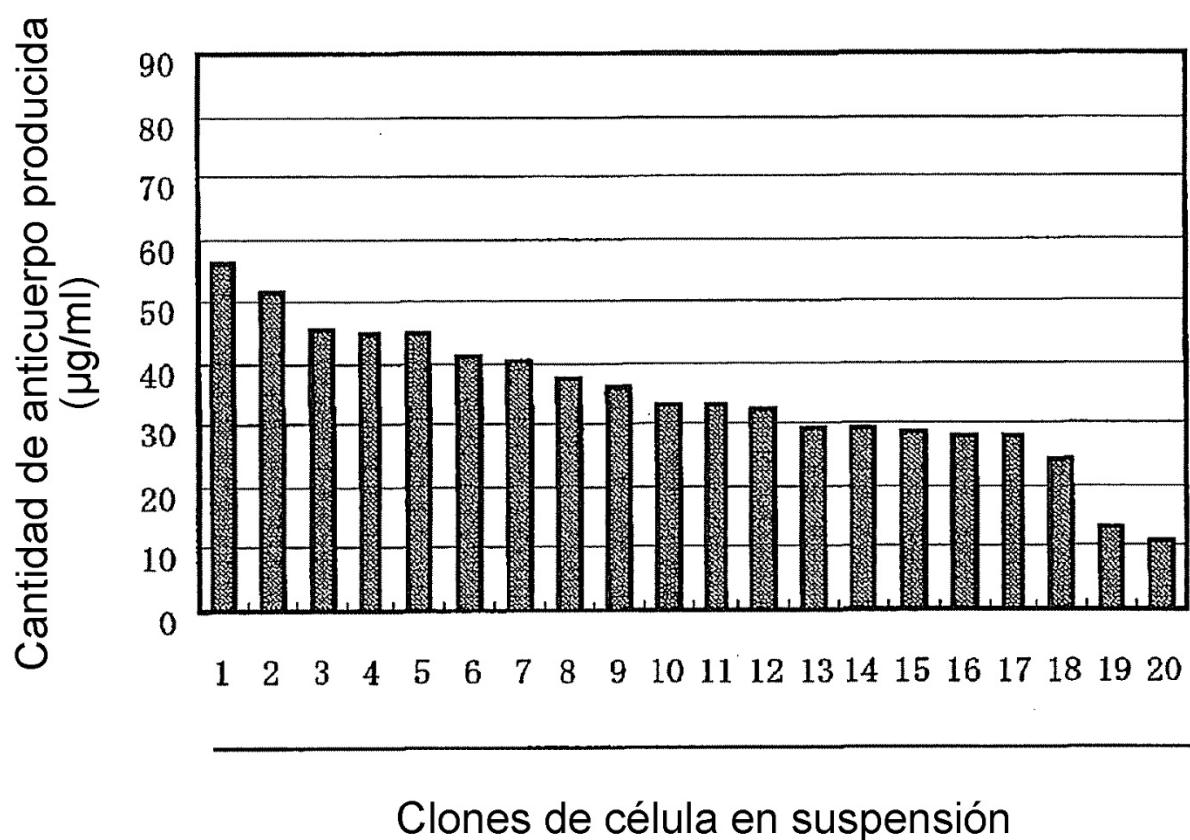


Fig. 4B

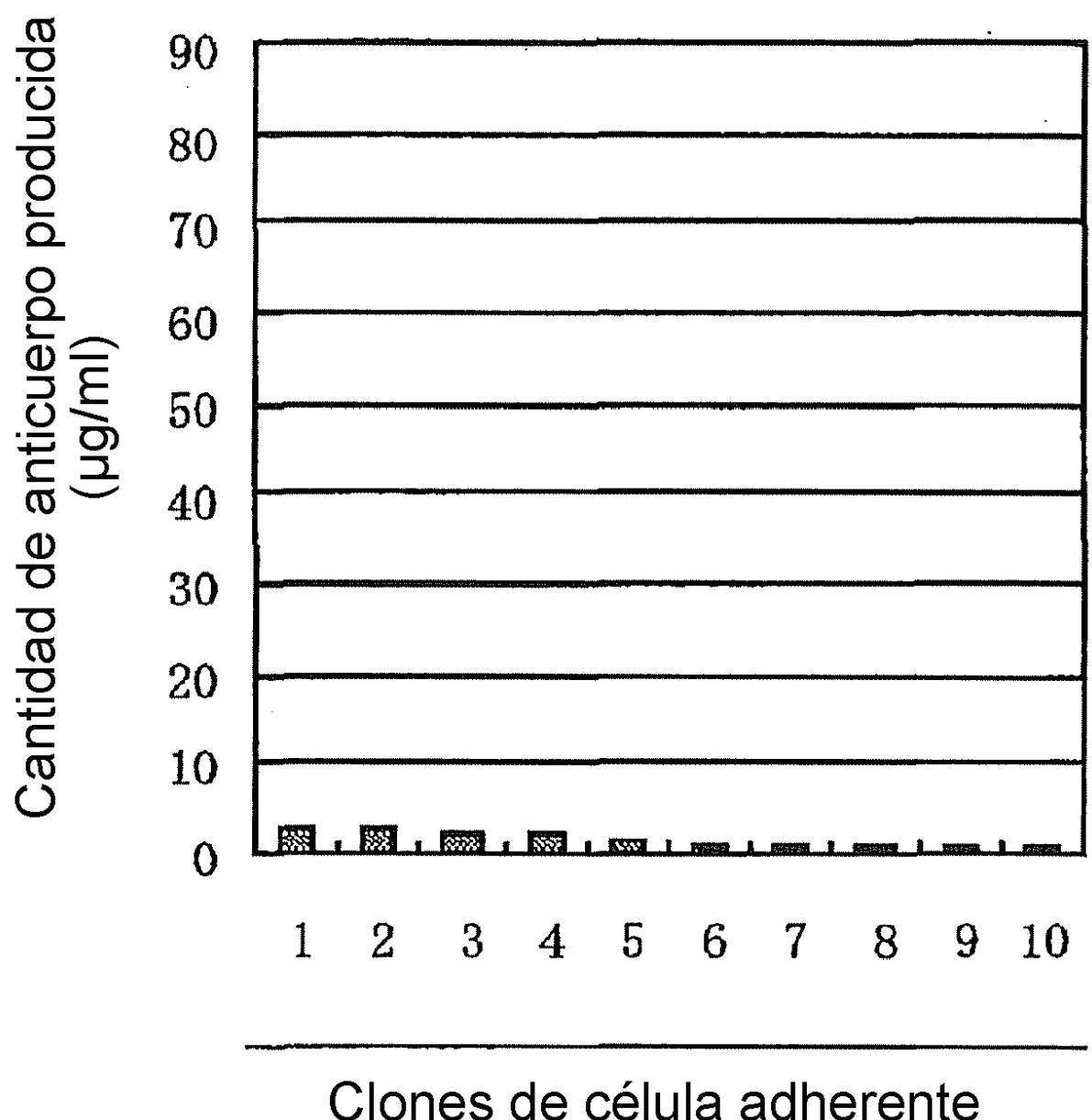


Fig. 5

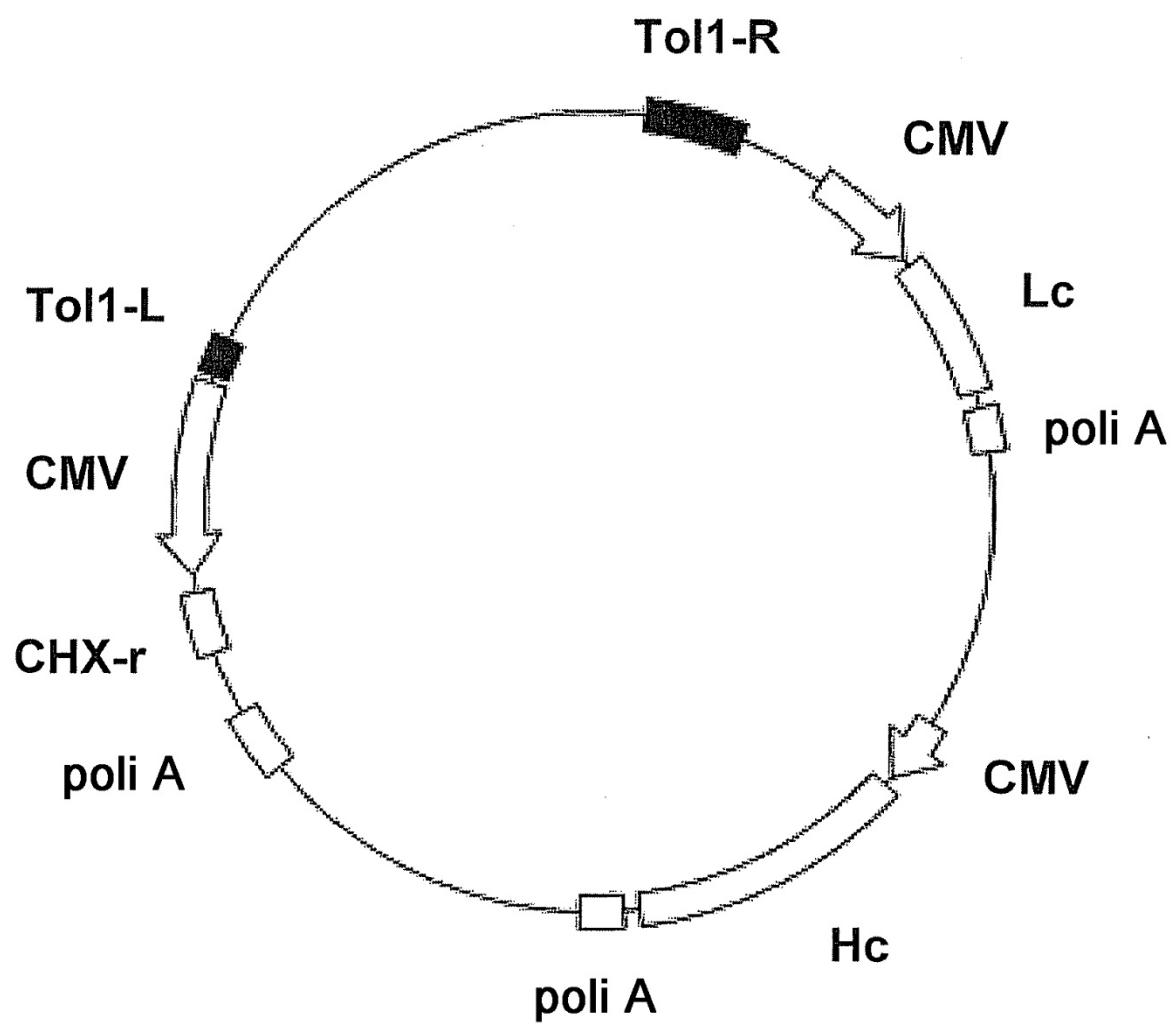


Fig. 6

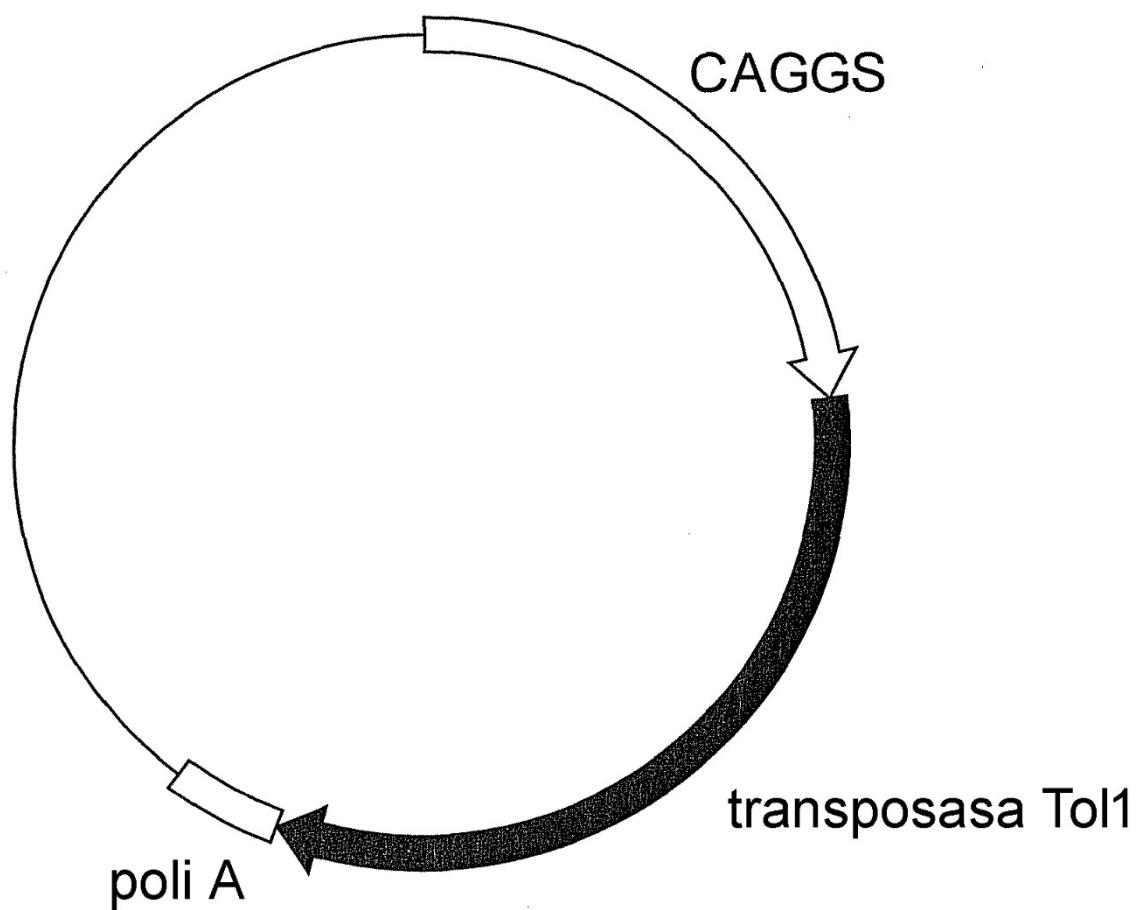


Fig. 7

