

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



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

15 Folleto corregido: T3

Texto afectado: Descripción y Reivindicaciones

48 Fecha de publicación de la corrección: 29.03.2019

51 Int. Cl.:

**C12N 15/00** (2006.01) **C12N 15/85** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

**C12P 21/02** (2006.01)

**C12P 21/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA CORREGIDA

T9

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

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

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

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

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

30 Prioridad:

**11.06.2009 JP 2009140626**

**11.06.2009 US 186138 P**

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

**24.01.2019**

73 Titular/es:

**INTER-UNIVERSITY RESEARCH INSTITUTE  
CORPORATION RESEARCH ORGANIZATION OF  
INFORMATION AND SYSTEMS (50.0%)**

**10-3, Midori-cho**

**Tachikawa-shi, Tokyo 190-0014, JP y**

**KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KAWAKAMI, KOICHI;**

**YAMAGUCHI, KEINA;**

**OGAWA, RISA y**

**TSUKAHARA, MASAYOSHI**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 697 535 T9

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 transposón en ambos extremos del fragmento génico, en una célula de mamífero en suspensión, integrando el fragmento génico insertado entre un par de secuencias de transposón 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 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 postraducciona, 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 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.

50 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 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 transposón es un elemento genético transponible que puede transferirse de un locus a otro locus en el cromosoma. Un transposón 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.

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.

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).

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).

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.

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)

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).

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

### 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

### 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

### Problema técnico

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

expresarse 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.

15 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.

#### 20 Solución a los problemas

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 codificante 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 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 codificante 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 codificante 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:

50 (A) introducir simultáneamente los vectores de expresión (a) y (b) en la célula de CHO,

(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 codificante 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 codificante

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; e integrar el fragmento génico insertado entre un par de secuencias de transposón, 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 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 y un vector de expresión (b) que comprende un ADN codificante de una transposasa (una transferasa) que reconoce las secuencias de transposón y posee actividad de transferencia del fragmento génico insertado entre las secuencias de transposón en un cromosoma para integrar el fragmento génico insertado entre las secuencias de transposón 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 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 y un vector de expresión (b) que comprende un ADN codificante 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 para integrar el fragmento génico insertado entre las secuencias de transposón 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

60 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 Tol2 (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 transposón 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 transposón en un cromosoma de la célula de mamífero con el fin de obtener una
- 50 célula de mamífero apta para expresar dicha proteína de interés, y cultivar en suspensión la célula de mamífero.
- 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:
- (a) un vector de expresión que comprende un fragmento génico que comprende un ADN codificante de una proteína de interés y secuencias de transposón en ambos extremos del fragmento génico,
- 60 (b) un vector de expresión que comprende un ADN codificante de una transposasa que reconoce las secuencias de transposón y posee actividad de transferencia de un fragmento génico insertado entre un par de las secuencias de transposón 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 transposón 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.

10 Además, la presente invención se refiere a una célula de mamífero en suspensión capaz de producir una 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 transposón en ambos extremos del fragmento génico, para integrar el fragmento génico insertado entre un par de las secuencias de transposón en un cromosoma.

15 Además, la presente invención se refiere a una célula de mamífero en suspensión capaz de producir una 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 transposón 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 transposón y posee actividad de transferencia del fragmento génico insertado entre un par de las secuencias de transposón a un cromosoma para integrar el fragmento génico insertado entre un par de las secuencias de transposón dentro del cromosoma.

20 El término "transposón" 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 El transposón comprende una unidad génica de secuencias de transposón 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 transposón para transferir un gen presente entre las secuencias de transposón.

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

35 La expresión "secuencia de transposón" en la presente memoria se refiere a la secuencia de nucleótidos de un transposón 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 transposón específica de la transposasa.

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

45 La secuencia de nucleótidos derivada de un transposón de tipo ADN es un par de secuencias de nucleótidos derivados del transposón1 o transposón2 derivado del pez medaka.

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 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 transposón Tol2 mostrada en la SEC ID nº 6 del Listado de secuencias.

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 transposón Tol2 mostrada en la SEC ID nº 1 del Listado de secuencias.

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 transposón Tol1 mostrada en la SEC ID nº 13 del Listado de secuencias.

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 codificante de la proteína transposasa o a un ADN codificante de la proteína transposasa se encuentren presentes simultáneamente en la célula.

45 El gen de transposasa se refiere a un gen codificante de una transposasa. Con el fin de mejorar su eficiencia de expresión en una célula de mamífero, una secuencia que ajusta un espacio entre la secuencia de consenso de Kozak (Kozak M., Nucleic Acids Res. 12:857-872, 1984) o una secuencia de unión 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 codificante 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 codificante 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 codificante de la transposasa en la célula hospedadora junto con un vector de expresión que comprende un ADN codificante de la proteína de interés y un gen marcador seleccionable. Además, mediante la introducción de un ARN codificante de un gen de transposasa en la célula hospedadora, puede expresarse la transposasa en la célula.

60 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 transposón 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 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 SR $\alpha$ , 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 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 puomicina, 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 n° 262879/2002), genes marcadores de fluorescencia y bioluminiscencia (tal como la proteína fluorescente verde, GFP) y similares.
- 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 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 n° 262879/2002).
- 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 n° 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 n° 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 transposón, 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

- 5 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.
- 10 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); 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 n° CCL-61), DUKXB11 (ATCC n° CCL-9096), Pro-5 (ATCC n° CCL-1781), CHO-S (Life Technologies, n° 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  $\alpha$ 1,6-fucosyltransferasa (documentos n° WO2005/35586 y n° 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 fibrinólisis, 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 quimérico, 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  $\alpha$ -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 n° WO2005/035586, n° WO2002/31140 y n° 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  $\alpha$ 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  $\alpha$ 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  $2 \times 10^5$  células/ml, la concentración celular después del cultivo durante 3 o 4 días preferentemente de  $5 \times 10^5$  células/ml o superior, más preferentemente de  $8 \times 10^5$  células/ml o superior, particularmente preferentemente de  $1 \times 10^6$  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% CO<sub>2</sub> 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 diálisis, 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 Se llevaron a cabo diversas técnicas experimentales relacionadas con la recombinación genéticas 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. Fritsch 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 transposón Tol2 a modo de vector plásmido para la expresión de proteína.

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.

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).

Cada fragmento de ADN sintético que comprende un par de secuencias de transposón (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 *AscI* al extremo 3'-terminal del mismo.

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.

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.

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 *AscI* en el lado 3'-terminal.

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.

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

### [Ejemplo 2]

#### 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]

#### (1) Preparación de célula de CHO en suspensión

Una célula de CHO adhesiva que había sido cultivada utilizando un medio  $\alpha$ -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 CO<sub>2</sub> utilizando un medio  $\alpha$ -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  $\alpha$ -MEM que contenía 5% de FCS a una concentración de 2x10<sup>5</sup> células/ml.

Varios días después, se llevó a cabo de manera similar la inoculación utilizando el medio  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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

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.

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 n° 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.

Se suspendió cada célula ( $4 \times 10^6$  células) en 400  $\mu$ l de PBS y el vector transposón para expresar el anticuerpo anti-M2 de influenza humana (10  $\mu$ g) y el vector de expresión de transposasa Tol2 (25  $\mu$ 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.

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

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  $\mu$ F de capacidad electrostática y a temperatura ambiente.

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

A continuación, desde el día de intercambio de medio el 4º día de la transfección, se añadieron 3  $\mu$ 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

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.

20 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.

Se utilizó un medio para las células en suspensión (EX-CELL 325-PF, fabricado por SAFB Biosciences) para la célula de CHO-K1 en suspensión, y el medio  $\alpha$ -MEM que contenía 10% de suero se utilizó para la célula de CHO-K1 adhesiva. Se cultivó cada célula en un incubador de CO<sub>2</sub> 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  $1 \times 10^6$  células en una placa de 6 pocillos y se cultivaron bajo agitación en un incubador de CO<sub>2</sub> durante 3 días y se midió la cantidad de proteína anticuerpo anti-M2 de influenza humana mediante HPLC utilizando el sobrenadante del cultivo.

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 ( $2 \times 10^6$  células) y 3 días después del cultivo estático, se midió la cantidad de proteína anticuerpo 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 las figuras 4A y 4B.

45 Tal como se muestra en la figura 4A, se obtuvo un gran número de células que mostraba un nivel de expresión de anticuerpo marcadamente elevado al utilizar la célula de CHO-K1 adaptada al cultivo en suspensión. Por otra parte, tal como se muestra en la figura 4B, sólo se obtuvieron células que mostraban un nivel de expresión en el límite de detección de la HPLC (5 µg/ml) o inferior al utilizar la célula de CHO-K1 adhesiva.

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.

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

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.

Cada ADN de los genes utilizados se sintetizó química 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.

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 (secuencias 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.

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 *AscI* que estaba conectado con el extremo 3'-terminal del mismo.

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 *AscI* presentes en el lado 3'-terminal.

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

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-asa (figura 6).

#### [Ejemplo 6]

##### (1) Preparación de célula de CHO productora de anticuerpo

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-asa 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.

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 ( $4 \times 10^6$  células) se suspendió en 400 µl de PBS y el vector transposón Tol1 para expresar el anticuerpo anti-M2 de influenza humana (10 µg) y el vector de expresión de la transposasa Tol1 (50 µg) 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.

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 µF 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 CO<sub>2</sub> durante 3 días utilizando el medio EX-CELL 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 transposón 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 transposón 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 transposón 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 transposón 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 transposón 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 transposón 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 CO<sub>2</sub> utilizando el medio de cultivo en suspensión EX-CELL 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 1x10<sup>6</sup> células en una placa de 6 pocillos y se cultivaron bajo agitación en un incubador de CO<sub>2</sub> 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 transposón Tol1. A partir de este resultado se encontró que, de manera similar al caso de la utilización de la secuencia de nucleótidos derivada del transposón Tol2, también podía obtenerse una célula de mamífero en suspensión capaz de expresar a nivel elevado la proteína de interés al utilizar una secuencia de nucleótidos derivada del transposón Tol1 como la secuencia de transposón.

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 transposón 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

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

10 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

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

20 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 transposón Tol1 no autónomo

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

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

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

<150> US61/186138

<151> 2009-06-11

40

<160> 17

<170> PatentIn versión 3.3

45

<210> 1

<211> 2788

<212> ADN

<213> Artificial

50

<220>

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

<400> 1

ES 2 697 535 T9

cagagggtgta aagtacttga gtaatthttac ttgattactg tacttaagta ttatthtttg 60  
 ggatthtttac ttactttgag tacaattaaa aatcaataact ttactthtta cttaatata 120  
 thttthttaga aaaaaaagta cthtttactc cttacaatth tatttacagt caaaaaagtac 180  
 ttatthtttg gagatcactt cattctatth tcccttgcta ttaccaaacc aattgaattg 240  
 cgctgatgcc cagthtaatt taaatgttat ttattctgcc tatgaaaatc gthttcacat 300  
 tatatgaaat tggtcagaca tgttcattgg tccthttgga gtgacgtcat gtcacatcta 360  
 ttaccacaat gcacagcacc ttgacctgga aattaggga attataacag tcaatcagtg 420  
 gaagaaaatg gaggaagtat gtgattcatc agcagctgcg agcagcacag tccaaaatca 480  
 gccacaggat caagagcacc cgtggccgta tcttcgcaa thctthttct taagtgggtg 540  
 aaataaagat tcattcaaga tgaaatgtgt cctctgtctc ccgcttaata aagaaatc 600  
 ggcttcaaa agttgccat caaacctaag gaagcatatt gaggtaagta cattaagtat 660  
 thtgthttac tgatagthtt thttthtttt thttthtttt thtttggtg tgcathttt 720  
 gacgttgatg gcgcgcctth tatatgtgta gtaggcctat thtactaat gcatgcgatt 780  
 gacaatataa ggctcacgta ataaaatgct aaaatgcatt tgtaattggt aacgttaggt 840  
 ccacgggaaa thtggcgcct attgcagctt tgaataatca ttatcattcc gtgctctcat 900  
 tgtgttgaa thcatgcaaa acacaagaaa accaagcgag aaathtttt ccaaacatgt 960  
 tgtattgtca aaacggtaac actthacaat gaggttgatt agthcatgta ttaactaaca 1020  
 ttaaataacc atgagcaata catttgthac tgtatctgtt aatctthgtt aacgttagtt 1080

ES 2 697 535 T9

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

<210> 2  
<211> 200  
5 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> Descripción de secuencia artificial: secuencia de transposón Tol2-L

<400> 2



ES 2 697 535 T9

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

ES 2 697 535 T9

Ser	Asp	Gly	Val	Glu	Phe	Gln	Asp	Ala	Ser	Arg	Val	Leu	Asp	Gln	Asp		
		300					305					310					
gat	ggc	ttc	gaa	ttc	cag	cta	cca	aaa	cat	caa	aag	tgt	gcc	tgt	cac	1071	
Asp	Gly	Phe	Glu	Phe	Gln	Leu	Pro	Lys	His	Gln	Lys	Cys	Ala	Cys	His		
		315				320					325						
tta	ctt	aac	cta	gtc	tca	agc	gtt	gat	gcc	caa	aaa	gct	ctc	tca	aat	1119	
Leu	Leu	Asn	Leu	Val	Ser	Ser	Val	Asp	Ala	Gln	Lys	Ala	Leu	Ser	Asn		
		330			335					340					345		
gaa	cac	tac	aag	aaa	ctc	tac	aga	tct	gtc	ttt	ggc	aaa	tgc	caa	gct	1167	
Glu	His	Tyr	Lys	Lys	Leu	Tyr	Arg	Ser	Val	Phe	Gly	Lys	Cys	Gln	Ala		
			350						355					360			
tta	tgg	aat	aaa	agc	agc	cga	tcg	gct	cta	gca	gct	gaa	gct	gtt	gaa	1215	
Leu	Trp	Asn	Lys	Ser	Ser	Arg	Ser	Ala	Leu	Ala	Ala	Glu	Ala	Val	Glu		
			365					370						375			
tca	gaa	agc	cgg	ctt	cag	ctt	tta	agg	cca	aac	caa	acg	cgg	tgg	aat	1263	
Ser	Glu	Ser	Arg	Leu	Gln	Leu	Leu	Arg	Pro	Asn	Gln	Thr	Arg	Trp	Asn		
		380					385					390					
tca	act	ttt	atg	gct	gtt	gac	aga	att	ctt	caa	att	tgc	aaa	gaa	gca	1311	
Ser	Thr	Phe	Met	Ala	Val	Asp	Arg	Ile	Leu	Gln	Ile	Cys	Lys	Glu	Ala		
		395				400						405					
gga	gaa	ggc	gca	ctt	cgg	aat	ata	tgc	acc	tct	ctt	gag	gtt	cca	atg	1359	
Gly	Glu	Gly	Ala	Leu	Arg	Asn	Ile	Cys	Thr	Ser	Leu	Glu	Val	Pro	Met		
		410			415				420						425		
ttt	aat	cca	gca	gaa	atg	ctg	ttc	ttg	aca	gag	tgg	gcc	aac	aca	atg	1407	
Phe	Asn	Pro	Ala	Glu	Met	Leu	Phe	Leu	Thr	Glu	Trp	Ala	Asn	Thr	Met		
			430						435					440			
cgt	cca	gtt	gca	aaa	gta	ctc	gac	atc	ttg	caa	gcg	gaa	acg	aat	aca	1455	
Arg	Pro	Val	Ala	Lys	Val	Leu	Asp	Ile	Leu	Gln	Ala	Glu	Thr	Asn	Thr		
			445					450						455			
cag	ctg	ggg	tgg	ctg	ctg	cct	agt	gtc	cat	cag	tta	agc	ttg	aaa	ctt	1503	
Gln	Leu	Gly	Trp	Leu	Leu	Pro	Ser	Val	His	Gln	Leu	Ser	Leu	Lys	Leu		
		460					465						470				
cag	cga	ctc	cac	cat	tct	ctc	agg	tac	tgt	gac	cca	ctt	gtg	gat	gcc	1551	
Gln	Arg	Leu	His	His	Ser	Leu	Arg	Tyr	Cys	Asp	Pro	Leu	Val	Asp	Ala		
		475				480						485					
cta	caa	caa	gga	atc	caa	aca	cga	ttc	aag	cat	atg	ttt	gaa	gat	cct	1599	
Leu	Gln	Gln	Gly	Ile	Gln	Thr	Arg	Phe	Lys	His	Met	Phe	Glu	Asp	Pro		
			490			495				500					505		
gag	atc	ata	gca	gct	gcc	atc	ctt	ctc	cct	aaa	ttt	cgg	acc	tct	tgg	1647	
Glu	Ile	Ile	Ala	Ala	Ala	Ile	Leu	Leu	Pro	Lys	Phe	Arg	Thr	Ser	Trp		
			510						515					520			
aca	aat	gat	gaa	acc	atc	ata	aaa	cga	ggc	atg	gac	tac	atc	aga	gtg	1695	
Thr	Asn	Asp	Glu	Thr	Ile	Ile	Lys	Arg	Gly	Met	Asp	Tyr	Ile	Arg	Val		
			525					530						535			
cat	ctg	gag	cct	ttg	gac	cac	aag	aag	gaa	ttg	gcc	aac	agt	tca	tct	1743	
His	Leu	Glu	Pro	Leu	Asp	His	Lys	Lys	Glu	Leu	Ala	Asn	Ser	Ser	Ser		
			540				545					550					
gat	gat	gaa	gat	ttt	ttc	gct	tct	ttg	aaa	ccg	aca	aca	cat	gaa	gcc	1791	
Asp	Asp	Glu	Asp	Phe	Phe	Ala	Ser	Leu	Lys	Pro	Thr	Thr	His	Glu	Ala		

ES 2 697 535 T9

555	560	565	
agc aaa gag ttg gat gga tat ctg gcc tgt gtt tca gac acc agg gag			1839
Ser Lys Glu Leu Asp Gly Tyr Leu Ala Cys Val Ser Asp Thr Arg Glu			
570	575	580	585
tct ctg ctc acg ttt cct gct att tgc agc ctc tct atc aag act aat			1887
Ser Leu Leu Thr Phe Pro Ala Ile Cys Ser Leu Ser Ile Lys Thr Asn			
	590	595	600
aca cct ctt ccc gca tcg gct gcc tgt gag agg ctt ttc agc act gca			1935
Thr Pro Leu Pro Ala Ser Ala Ala Cys Glu Arg Leu Phe Ser Thr Ala			
	605	610	615
gga ttg ctt ttc agc ccc aaa aga gct agg ctt gac act aac aat ttt			1983
Gly Leu Leu Phe Ser Pro Lys Arg Ala Arg Leu Asp Thr Asn Asn Phe			
	620	625	630
gag aat cag ctt cta ctg aag tta aat ctg agg ttt tac aac ttt gag			2031
Glu Asn Gln Leu Leu Leu Lys Leu Asn Leu Arg Phe Tyr Asn Phe Glu			
	635	640	645
tag cgtgtactgg cattagattg tctgtcttat agtttgataa ttaaatacaa			2084
acagttctaa agcaggataa aaccttgtat gcatttcatt taatgttttt tgagattaaa			2144
agcttaaaca ag			2156

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

5

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

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

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

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

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

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

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

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

10



ES 2 697 535 T9

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 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 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 T9

cagaggtgta aagtacttga gtaatthttac ttgattactg tacttaagta ttatthtttg 60  
 ggatthtttac ttactttgag tacaattaaa aatcaataact ttactthtta cttaattaca 120  
 thttthttaga aaaaaaagta cthtttactc cttacaatth tatttacagt caaaaagtac 180  
 ttatthtttg gagatcactt cattctatth tccottgcta ttaccaaacc aattgaattg 240  
 cgctgatgcc cagthtaatt taaatgttat ttattctgcc tatgaaaatc gthttcacat 300  
 tatatgaaat tggtcagaca tgttcattgg tccthtggaa gtgacgtcat gtcacatcta 360  
 ttaccacaat gcacagcacc ttgacctgga aattaggga attataacag tcaatcagtg 420  
 gaagaaaatg gaggaagtat gtgattcatc agcagctgcg agcagcacag tccaaaatca 480  
 gccacaggat caagagcacc cgtggccgta tcttcgcaa thctthttct taagtgggtg 540  
 aaataaagat tcattcaaga tgaaatgtgt cctctgtctc ccgcttaata aagaaatac 600  
 ggcctcaaa agttcgccat caaacctaag gaagcatatt gaggtaagta cattaagtat 660  
 thtgthttac tgatagthtt thttthtttt thttthtttt thtttggtg tgcatgthtt 720  
 gacgttgatg gcgcgcctth tatatgtgta gtaggcctat thtactaat gcatgcgatt 780  
 gacaataaa ggctcacgta ataaaatgct aaaatgcatt tgtaattggt aacgttaggt 840  
 ccacgggaaa thtggcgcct attgcagctt tgaataatca ttatcattcc gtgctctcat 900  
 tgtgttgaa thcatgcaaa acacaagaaa accaagcgag aaththtttt ccaaactgt 960  
 tgtattgtca aaacggtaac actthacaat gaggttgatt agttcatgta ttaactaaca 1020  
 ttaaataacc atgagcaata catttgthac tgtatctgth aatctthgtt aacgttagth 1080  
 aatagaaata cagatgthca thgtthgtc atgttagthc acagtgcat aactaatgth 1140  
 aacaagatat aaagtattag taaatgttga aattaactg tatacgtgca gthcattatt 1200  
 agttcatgth aactaatgta gthtaactaac gaaccttatt gtaaaagtgt taccatcaaa 1260  
 actaatgtaa tgaaatcaat tcaccctgtc atgtcagcct tacagtcctg thgtthttgtc 1320  
 aatataatca gaaataaaat taatgtthga thgtcactaa atgtactgt atthctaaaa 1380  
 tcaacaagta thtaacatta taaagtgtgc aattggctgc aatgtcagt thtattaaag 1440  
 ggttagthca cccaaaaatg aaaataatgt cattaatgac tgcacctcat gtcgthtcaa 1500  
 gcccgtaaga cctccgthca thttcagaac acagthtaag ataththtaga thtagtccga 1560  
 gagctthctg tgcctccatt gagaatgtat gtacggtata ctgtccatgt ccagaaaggt 1620

ES 2 697 535 T9

aataaaaaca tcaaagtagt ccatgtgaca tcagtgggtt agttagaatt ttttgaagca 1680  
tcgaatacat tttgggtccaa aaataacaaa acctacgact ttattcggca ttgtattctc 1740  
ttccgggtct gttgtcaatc cgcgttcacg acttcgcagt gacgctacaa tgctgaataa 1800  
agtctgtagt tttgttattt ttggacccaa atgtattttc gatgcttcaa ataattctac 1860  
ctaaccctact gatgtcacat ggactacttt gatgttttta ttacctttct ggacatggac 1920  
agtataccgt acatacattt tcagtggagg gacagaaagc tctcggacta aatctaaaat 1980  
atcttaaaact gtgttccgaa gatgaacgga ggtgttacgg gcttggaacg acatgaggg 2040  
gagtcattaa tgacatcttt tcatttttgg gtgaactaac cctttaatgc tgtaatcaga 2100  
gagtgtatgt gtaattgtta cttttattgc atacaatata aatatttatt tgttgttttt 2160  
acagagaatg caccctaaat acctcaaaaa ctactctaaa ttgacagcac agaagagaaa 2220  
gatcggggacc tccaccctatg cttccagcag taagcaactg aaagttgact cagttttccc 2280  
agtcaaacat gtgtctccag tcaactgtgaa caagctata ttaaggtaca tcattcaagg 2340  
acttcatcct ttcagcactg ttgatctgcc atcatttaaa gagctgatta gtacactgca 2400  
gcctggcatt tctgtcatta caaggcctac tttacgctcc aagatagctg aagctgctct 2460  
gatcatgaaa cagaaagtga ctgctgccat gagtgaagtt gaatggattg caaccacaac 2520  
ggattgttgg actgcacgta gaaagtcatt cattggtgta actgctcact ggatcaaccc 2580  
tggaagtctt gaaagacatt ccgctgcact tgccctgaaa agattaatgg gctctcatac 2640  
ttttgaggta ctggccagtg ccatgaatga tatccactca gagtatgaaa tacgtgacaa 2700  
ggttgtttgc acaaccacag acagtggttc caactttatg aaggctttca gagtttttgg 2760  
tgtggaaaac aatgatatcg agactgaggc aagaaggtgt gaaagtgatg aactgatc 2820  
tgaagctgtt ggtgagggaa gtgatggtgt ggaattccaa gatgcctcac gagtctgga 2880  
ccaagacgat ggcttcgaat tccagctacc aaaacatcaa aagtgtgcct gtcacttact 2940  
taacctagtc tcaagcgttg atgcccaaaa agctctctca aatgaacact acaagaaact 3000  
ctacagatct gtctttggca aatgccaaagc tttatggaat aaaagcagcc gatcggctct 3060  
agcagctgaa gctgttgaat cagaaagccg gcttcagctt ttaaggccaa accaaacgcg 3120  
gtggaattca acttttatgg ctgttgacag aattcttcaa atttgcaaag aagcaggaga 3180  
aggcgcactt cggaatataat gcacctctct tgaggttcca atgtaagtgt ttttcccctc 3240  
tatcgatgta acaaatgtg ggtgtttttt gtttaatact ctttgattat gctgatttct 3300  
cctgtaggtt taatccagca gaaatgctgt tcttgacaga gtgggccaac acaatgcgtc 3360  
cagttgcaaa agtactcgac atcttgcaag cggaaacgaa tacacagctg ggggtggtgc 3420  
tgcctagtgt ccatcagtta agcttgaaac ttcagcgact ccaccattct ctcaggtact 3480  
gtgaccctact tgtggatgcc ctacaacaag gaatccaaac acgattcaag catatgtttg 3540  
aagatcctga gatcatagca gctgccatcc ttctccctaa atttcggacc tcttgacaaa 3600

ES 2 697 535 T9

atgatgaaac catcataaaa cgaggtaaat gaatgcaagc aacatacaact tgacgaattc 3660  
 taatctgggc aacctttgag ccataccaaa attattcttt tatttattta tttttgcaact 3720  
 ttttaggaat gttatatccc atctttggct gtgatctcaa tatgaatatt gatgtaaagt 3780  
 attcttgcaag caggtttagg ttatccctca gtgtttcttg aaaccaaact catatgtatc 3840  
 atatgtggtt tggaaatgca gttagatfff atgctaaaat aagggatttg catgatttta 3900  
 gatgtagatg actgcacgta aatgtagtta atgacaaaat ccataaaaatt tgttcccagt 3960  
 cagaagcccc tcaaccaaac ttttctttgt gtctgtcac tgtgcttcta ggcatggact 4020  
 acatcagagt gcatctggag cctttggacc acaagaagga attggccaac agttcatctg 4080  
 atgatgaaga ttttttcgct tctttgaaac cgacaacaca tgaagccagc aaagagttgg 4140  
 atggatatct ggctgtggt tcagacacca gggagtctct gctcacgttt cctgctatft 4200  
 gcagcctctc tatcaagact aatacacctc tccccgcatc ggctgcctgt gagaggctft 4260  
 tcagcaactgc aggattgctt ttcagcccca aaagagctag gcttgacact aacaattttg 4320  
 agaatcagct tctactgaag ttaaactctga ggttttaca ctttgagtag cgtgtactgg 4380  
 cattagattg tctgtcttat agtttgataa ttaaatacaa acagttctaa agcaggataa 4440  
 aacctgtat gcatttcatt taatgttttt tgagattaaa agcttaaaca agaactctta 4500  
 gttttctttc ttgcttttac ttttacttcc ttaatactca agtacaattt taatggagta 4560  
 ctttttact tttactcaag taagattcta gccagatact tttactttta attgagtaaa 4620  
 atttcccta agtacttcta ctttacttgg agtaaaattt ttgagtactt tttacacctc 4680  
 tg 4682

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

5

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

10

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

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 Arg Tyr Asp Arg Lys Gln Ser Gly Tyr  
 35 40 45

ES 2 697 535 T9

ggt ggg cag aca aag caa att ttc cgg aag aag gct aag acc aca aag 192  
 Gly Gly Gln Thr Lys Gln Ile Phe Arg Lys Lys Ala Lys Thr Thr Lys  
 50 55 60

aag att gtg cta agg ctg gaa tgt gtt gag cct aac tgc aga tcc aag 240  
 Lys Ile Val Leu Arg Leu Glu Cys Val Glu Pro Asn Cys Arg Ser Lys  
 65 70 75 80

agg atg ctg gcc att aag aga tgc aag cat ttt gaa ctg gga gga gat 288  
 Arg Met Leu Ala Ile Lys Arg Cys Lys His Phe Glu Leu Gly Gly Asp  
 85 90 95

aag aag aga aag ggc caa gtg atc cag ttc taa 321  
 Lys Lys Arg Lys Gly Gln Val Ile Gln Phe  
 100 105

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

10 <220>  
 <223> Constructo sintético

<400> 8  
 Met Val Asn Val Pro Lys Thr Arg Arg Thr Phe Cys Lys Lys Cys Gly  
 1 5 10 15

Lys His Gln Pro His Lys Val Thr Gln Tyr Lys Lys Gly Lys Asp Ser  
 20 25 30

Leu Tyr Ala Gln Gly Arg Arg Arg Tyr Asp Arg Lys Gln Ser Gly Tyr  
 35 40 45

Gly Gly Gln Thr Lys Gln Ile Phe Arg Lys Lys Ala Lys Thr Thr Lys  
 50 55 60

Lys Ile Val Leu Arg Leu Glu Cys Val Glu Pro Asn Cys Arg Ser Lys  
 65 70 75 80

Arg Met Leu Ala Ile Lys Arg Cys Lys His Phe Glu Leu Gly Gly Asp  
 85 90 95

Lys Lys Arg Lys Gly Gln Val Ile Gln Phe  
 100 105

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

20 <220>  
 <223> cadena pesada de M2Z3

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1404)

25 <400> 9

ES 2 697 535 T9

atg gac tgg acc tgg agc atc ctt ttc ttg gtg gca gca gca aca ggt	48
Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly	
1 5 10 15	
gcc cac tcc cag gtt cag ctg gtg cag tct gga gct gag gtg aag aag	96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	
20 25 30	
cct ggg gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct ggt tac acc ttt	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
35 40 45	
acc agc tat ggt atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt	192
Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
50 55 60	
gag tgg atg gga tgg atc agc gct tac aat ggt aac aca aac tat gca	240
Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala	
65 70 75 80	
cag aag ctc cag ggc aga gtc acc atg acc aca gac aca tcc acg agc	288
Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser	
85 90 95	
aca gcc tac atg gag ctg agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtg	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
tat tac tgt gcg agg gca gca gct ggc gga tac ttc cag cac tgg ggc	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Ala Ala Gly Gly Tyr Phe Gln His Trp Gly	
115 120 125	
cag ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc acc aag ggc cca tcg	432
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser	
130 135 140	
gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg	480
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala	
145 150 155 160	
gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg	528
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val	
165 170 175	
tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct	576
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala	
180 185 190	
gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg	624
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val	
195 200 205	
ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac	672
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His	
210 215 220	
aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt	720
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys	
225 230 235 240	

ES 2 697 535 T9

gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg 768  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 245 250 255

gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg 816  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 260 265 270

atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac 864  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 275 280 285

gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg 912  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 290 295 300

cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac 960  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 305 310 315 320

cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc 1008  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 325 330 335

aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc 1056  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 340 345 350

gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg 1104  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 355 360 365

tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc 1152  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 370 375 380

ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag 1200  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 385 390 395 400

tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc 1248  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 405 410 415

gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg 1296  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 420 425 430

gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg 1344  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 435 440 445

cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct 1392  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 450 455 460

ccg ggt aaa tga 1404  
 Pro Gly Lys  
 465

<210> 10  
 <211> 467  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Constructo sintético

10 <400> 10

ES 2 697 535 T9

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 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 T9

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 T9

<400> 11  
atg gcc agc ttc cct ctc ctc ctc acc ctc ctc act cac tgt gca ggg 48  
Met Ala Ser Phe Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Thr His Cys Ala Gly  
1 5 10 15

tcc tgg gcc cag tct gtg ctg act cag cca ccc tca gcg tct ggg acc 96  
Ser Trp Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr  
20 25 30

ccc ggg cag agg gtc acc atc tct tgt tct gga agc aac tcc aac atc 144  
Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile  
35 40 45

gga agt aaa act gta aac tgg tac cag cag ctc cca gga acg gcc ccc 192  
Gly Ser Lys Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro  
50 55 60

aaa ctc ctc atc tct agt aat aat cag cgg ccc tca ggg gtc cct gac 240  
Lys Leu Leu Ile Ser Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp  
65 70 75 80

cga ttc tct ggc tcc aag tct ggc acc tca gcc tcc ctg gcc atc agt 288  
Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser  
85 90 95

ggg ctc cag tct gag gat 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 Gly Thr Lys Leu Thr Val  
115 120 125

cta ggt cag ccc aag gct gcc ccc tcg 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 Glu Thr 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 T9

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 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

ES 2 697 535 T9

cagtagcggg tctaggcacg ggccgtccgg gcggtggcct ggggcggaaa actgaagggg 60  
 ggcggcaccg gcggtcagc cctttgtaat atattaatat gcaccactat tggtttactt 120  
 atgtcacagt ttgtaagttt gtaacagcct gaacctggcc gcgccgccgc cctcgccccg 180  
 cagctgcgct ctctgtctt tgagaagtag acacaaatgt gtgtgaagaa ggagaagggg 240  
 gggggcgcgg ggtgagcacg gagcgtcgcc gcgtttgcgc atgcgcaaaa cctggctggc 300  
 tcatctttca ggggagggca cggtcgcggg cttgatgaaa aaaataaaaag taaaaactgc 360  
 gactgcgccg tcatgtagcg aatcagcgcc cctggctgta gctgcacgcg ctctgtctgg 420  
 aatgtgtga agaggggggg gggggggggg gctgcgggga atcagttcaa ttgtgggacg 480  
 cttccaaatt aagtggctag gtggggacaa ggcggggggt ttgaatctac ttcataaaac 540  
 cttttatat tataagtcag tcataaggtg acattctata acctacattt taataaaggt 600  
 ataaaaata tattctgctt tttttgggtt aattttgtgt gaaatgtcca aataaaaaaa 660  
 atggcaacac aaaacaatgc tgtcactaag gtgacagttg gttcagtcga cggacttgat 720  
 gccttcttgc tgacgtgagg acatttatgc caaacaaacg ccaataaaca tctaaaatat 780  
 ggaaaagaaa aggtcaaagc catctggtgc ccaatttaga aagaaaagaa aagaagaaga 840  
 ggagaaaaga gataaagaaa agggtaagtc ctcacagctt gatgcatggt ttttctaaat 900  
 tctaattgta cctgccctac aacaacgttg ccgatgaaaa ctttattttg gtcgatgacc 960  
 aacctgaat taggcccaaa tgttgcaaat agcgtcattt tttttttttt ttttagattt 1020  
 tattcttaaa aatttgctct gccttaactt gtaacattag ttatgattca tgtgtctgtc 1080  
 tgctctgctg taacacaaag gttttgttgg gttttgctgt tgtatactag ctcataatgt 1140  
 taaaaaagct gtgatggtta cacagcatgc tgggtctgcc ataagatgct aatggggcaa 1200  
 ataatttgag attggtcatt aatttaataa tcatttgggg cagcctaaac gttttcacia 1260  
 tgtttttttg acatttaact ggggatttag gggtaattt tgagcctgca tatgaagttt 1320  
 attttttatt tgttttacia atgtgggatt atatttttag ccaatagaat ttccataaat 1380  
 ctgtaggtag ttttaaaaat gaatatttac catttactgc aactctatgg ggacaaaaca 1440  
 taatgtaaca ggtcataact aaaaatgtgc caatcaaagg attgaagacg gaaaacatga 1500  
 gttaattttt ctctctgaa gtagagatcg atatagaaca tgacaattta aatttccaat 1560  
 tcataaatgt ttttaaaata tttattttat attatttatt taacattgag tttgattcaa 1620  
 tattttotta gtaactgta tttttgccat gcttatggtc ttttattttt tgtgttctga 1680  
 taacttttat aatgcttttc agaattttga catcttttgt atccacttct taatttcaat 1740  
 gacaataaaa catttcagtt gacgaagaca acaaaagttc tgttgtgact atgggggggg 1800  
 ggggcgcctg gggatggctc cgccccggga gtaattcagg gtagaaccgc cactg 1855

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

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

<400> 14

ES 2 697 535 T9

cagtagcggg tctaggcacg ggccgtccgg gcggtggcct ggggcggaaa actgaagggg 60  
 ggcggcaaccg gcggctcagc cctttgtaat atattaatat gcaccactat tggtttactt 120  
 atgtcacagt ttgtaagttt gtaacagcct gaacctggcc gcgccgccgc cctcgccccg 180  
 cagctgcgct ctctgttctt 200  
  
 <210> 15  
 <211> 505  
 5 <212> ADN  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> secuencia de transposón Tol1-R  
 10  
 <400> 15  
 atatttttag ccaatagaat ttccataaat ctgtaggtag ttttaaaaat gaatatttac 60  
 catttactgc aactctatgg ggacaaaaca taatgtaaca ggtcataact aaaaatgtgc 120  
 caatcaaagg attgaagacg gaaaacatga gttaatTTTT cttctctgaa gtagagatcg 180  
 atatagaaca tgacaattta aatttccaat tcataaatgt ttttaaaata tttattttat 240  
 attatttatt taacattgag ttgattcaa tattttctta gctaactgta tttttgccat 300  
 gcttatggtc ttttattttt tgtgttctga taacttttat aatgcttttc agaattttga 360  
 catcttttgt atccacttct taatttcaat gacaataaaa catttcagtt gacgaagaca 420  
 aacaaagttc tgttgtgact atgggggggg ggggcgcctg gggatggtct cgccccggga 480  
 gtaattcagg gtagaacgc 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 T9

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

ES 2 697 535 T9

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 T9

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

ES 2 697 535 T9

Phe Glu Lys Asn Trp Asp Leu Asp Ser Arg Glu Leu Val Gln Glu Ile  
 730 735 740

aag aac ttg cct aac tta cca tca acg act cca agt ctc ctt gag ctc 2309  
 Lys Asn Leu Pro Asn Leu Pro Ser Thr Thr Pro Ser Leu Leu Glu Leu  
 745 750 755 760

atc tct ttc atg tct gat aag gat cta tca gaa atc tat ccg aac ttt 2357  
 Ile Ser Phe Met Ser Asp Lys Asp Leu Ser Glu Ile Tyr Pro Asn Phe  
 765 770 775

tgg act gct ctc agg att gca ctc acc ttg cca gtc act gtg gct caa 2405  
 Trp Thr Ala Leu Arg Ile Ala Leu Thr Leu Pro Val Thr Val Ala Gln  
 780 785 790

gca gag agg agc ttt tca aaa cta aaa ttg atc aag tcg tac ctg agg 2453  
 Ala Glu Arg Ser Phe Ser Lys Leu Lys Leu Ile Lys Ser Tyr Leu Arg  
 795 800 805

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

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

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

ctgttattgt attggtgctg cagttatatt tattttagcg tgtcatttgt gtgataaaag 2655

gtttgtgctt tataaatatt attttatatt atttattcaa tattgagttt gattcaatat 2715

tttcttagct aactgtatatt ttgccatgct 2745

<210> 17  
 <211> 851  
 <212> PRT  
 <213> *Oryzias latipes*

5

<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 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

10

ES 2 697 535 T9

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 His Tyr Phe Arg Lys Thr Leu Val Ser Gly  
165 170 175

Glu Lys Ile Ala Arg Thr Trp Leu Met Tyr Ser Lys Val Lys Asn Ser  
180 185 190

Leu Phe Cys Phe Cys Cys Lys Leu Phe Ser Asn Lys Asn Ile Asn Leu  
195 200 205

Thr Thr Ser Gly Thr Ala Asn Trp Lys His Ala Ser Thr Tyr Leu Thr  
210 215 220

Ala His Glu Lys Ser Pro Glu His Leu Asn Cys Met Lys Ala Trp Lys  
225 230 235 240

Glu Leu Ser Gly Arg Ile Arg Ser Gly Lys Thr Ile Asp Lys Gln Glu  
245 250 255

Met Ala Leu Leu Glu Glu Glu Arg Val Arg Trp Arg Ala Val Leu Thr  
260 265 270

Arg Leu Ile Ala Ile Val Gln Ser Leu Ala Val Arg Asn Leu Ala Leu  
275 280 285

Arg Gly His Thr Glu Thr Leu Phe Thr Ser Ser Asn Gly Asn Phe Leu  
290 295 300

Lys Glu Val Glu Leu Met Ala Arg Phe Asp Pro Ile Met Lys Asp His  
305 310 315 320

Leu Asn Arg Val Leu Arg Gly Thr Ala Ser His Asn Ser Tyr Ile Gly  
325 330 335

His His Val Gln Asn Glu Leu Ile Asp Leu Leu Ser Ser Lys Ile Leu

ES 2 697 535 T9

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 T9

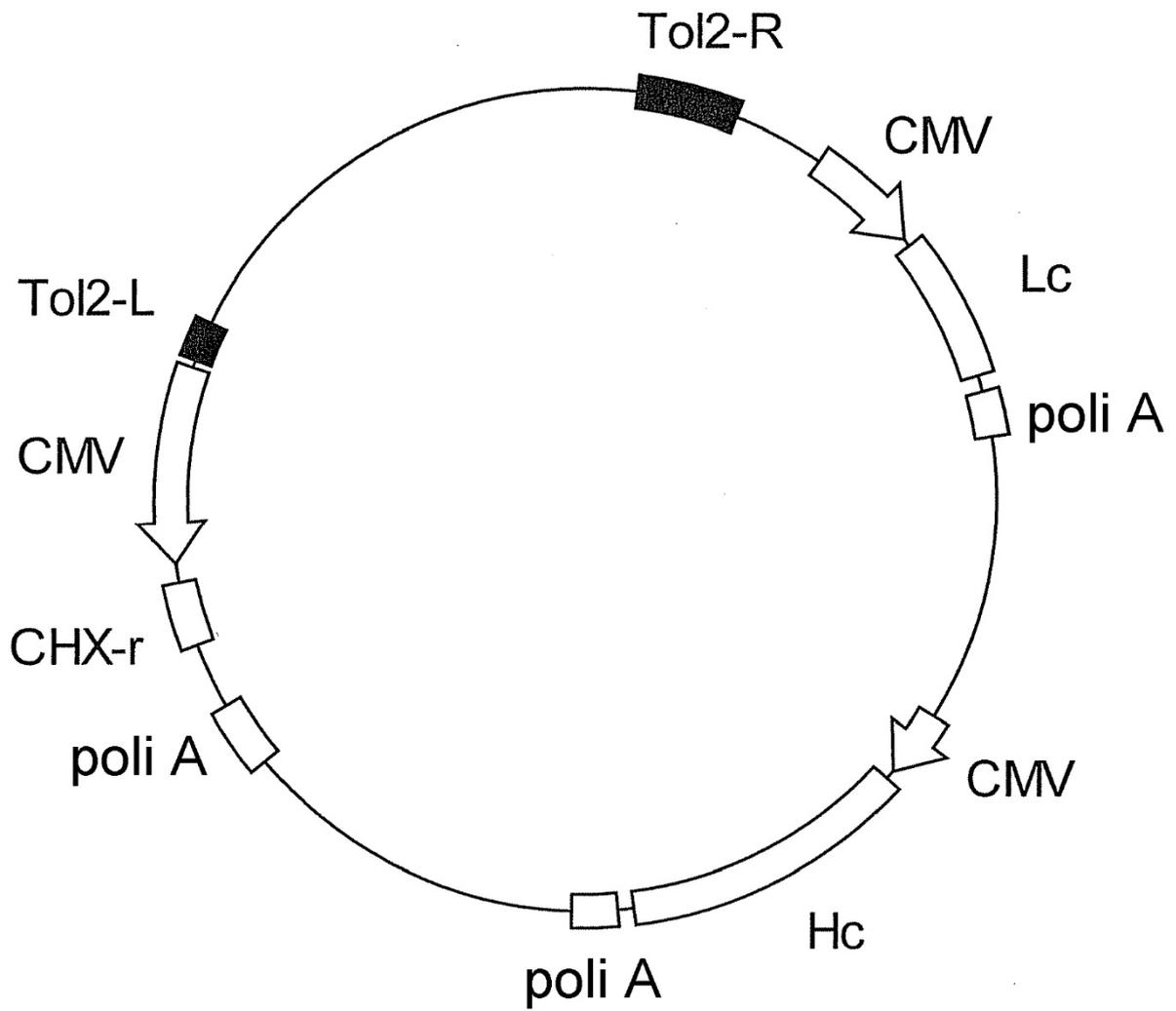
Leu Lys Lys Thr Glu Gln Ser Leu Gln Ser Tyr Arg Ala Asn Gly Phe  
 610 615 620  
 Val Asn Ala Gln Met Ala Ala Lys Glu Met Cys Lys Glu Met Asn Val  
 625 630 635 640  
 Glu Ala Ile Leu Lys Gln Lys Arg Ile Arg Ser Thr Lys Cys Gln Phe  
 645 650 655  
 Ser Tyr Glu Ser His Asp Glu Pro Phe Ser Asp Ala Leu 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

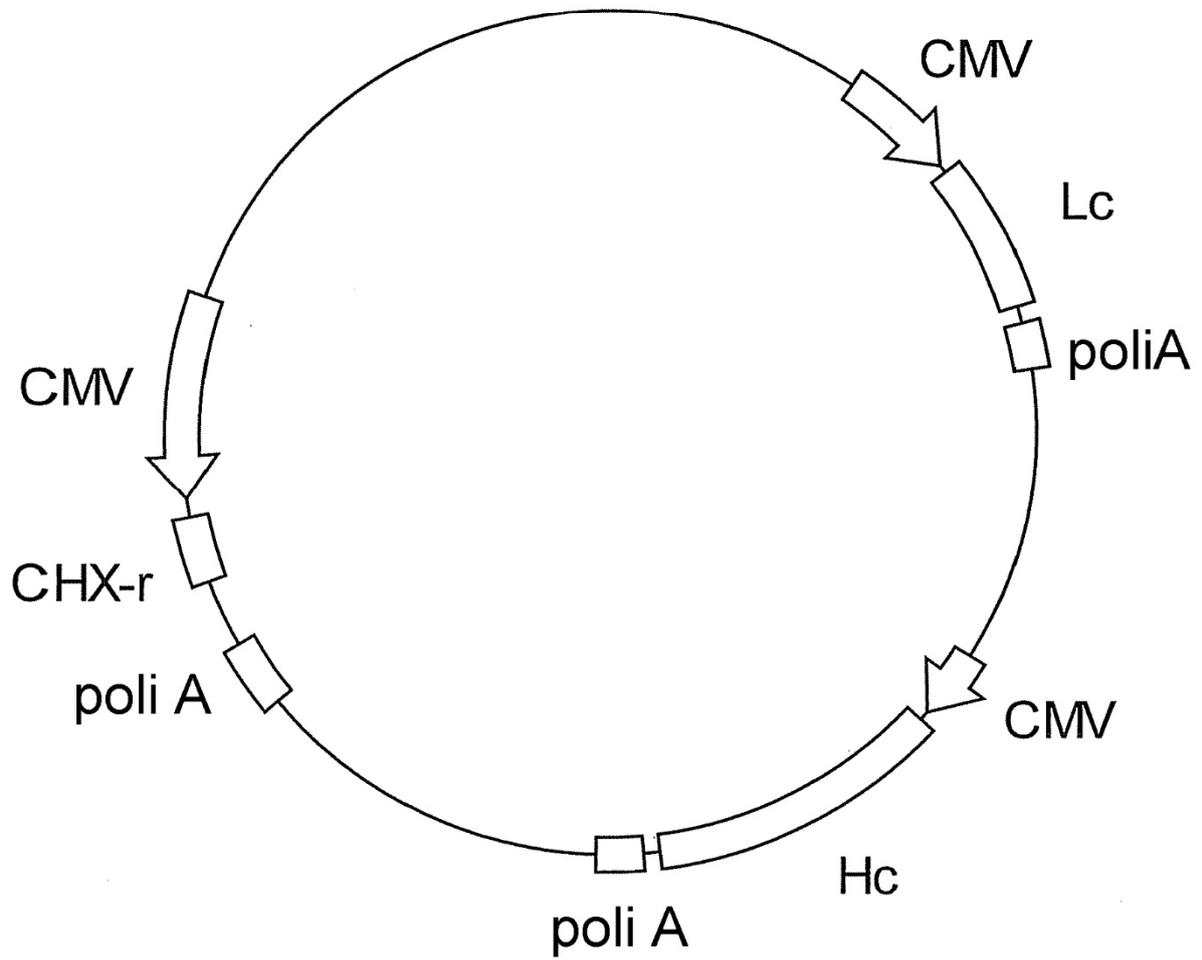
1. Procedimiento para producir una proteína de interés, que comprende introducir un vector de expresión de proteína (a) que comprende un fragmento génico que comprende un ADN que codifica una proteína de interés y un gen marcador seleccionable y, en ambos extremos del fragmento génico, un par de secuencias de transposón 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 transposón y presenta una actividad de transferir un fragmento génico insertado entre las secuencias de transposón en un cromosoma en la célula de CHO; integrar el fragmento génico insertado entre las secuencias de transposón 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.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende:
- (A) introducir simultáneamente los vectores de expresión (a) y (b) en la célula de CHO,
- (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 transposón en un cromosoma de la célula de CHO para obtener dicha célula de CHO en suspensión apta para expresar la proteína de interés, y
- (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.
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 transposón 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 transposón y presenta una actividad de transferir un fragmento génico insertado entre las secuencias de transposón en un cromosoma en la célula de CHO; e integrar el fragmento génico insertado entre las secuencias de transposón, en un cromosoma de la célula de CHO.
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.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el gen marcador seleccionable es un gen de resistencia a cicloheximida.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el gen de resistencia a cicloheximida es un gen que codifica un mutante de la proteína ribosómica humana L36a.
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.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el otro aminoácido es la glutamina.
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 transposón 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 transposón y presenta una actividad de transferir el fragmento génico insertado entre las secuencias de transposón en un cromosoma para integrar el fragmento génico insertado entre las secuencias de transposón en un cromosoma de la célula de CHO.
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.
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 transposón 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
- 15 secuencias de transposón y presenta una actividad de transferir un fragmento génico insertado entre las secuencias de transposón en un cromosoma, para integrar el fragmento génico insertado entre las secuencias de transposón en un cromosoma de una célula de CHO en suspensión apta para sobrevivir y proliferar en un medio sin suero.

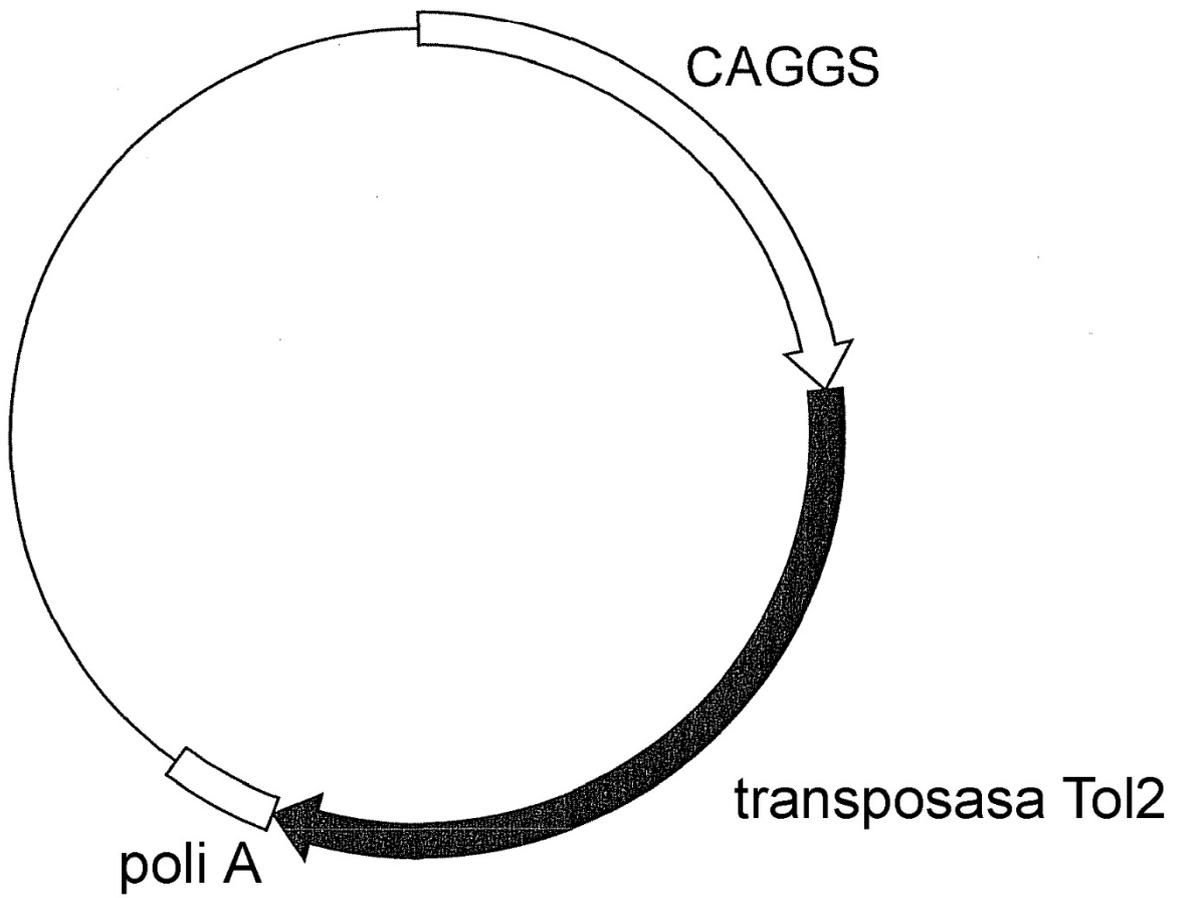
*Fig. 1*



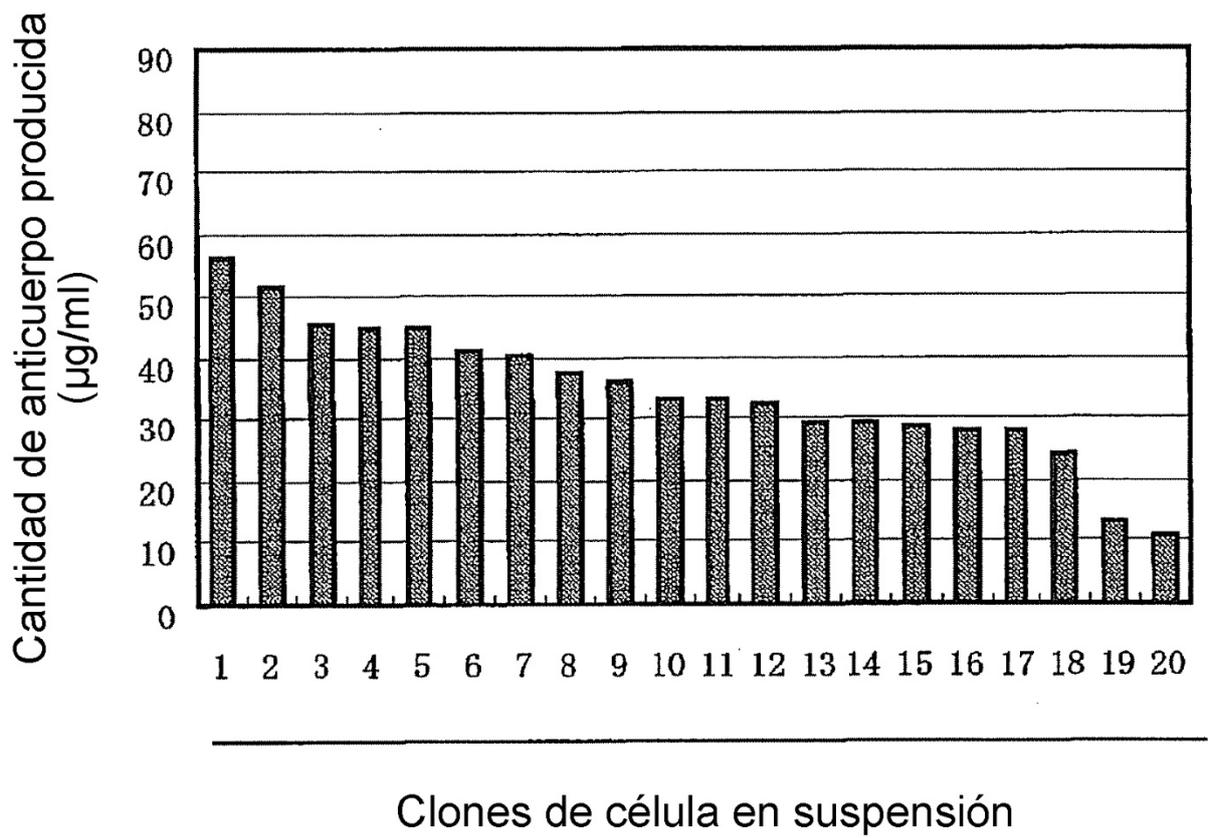
*Fig.2*



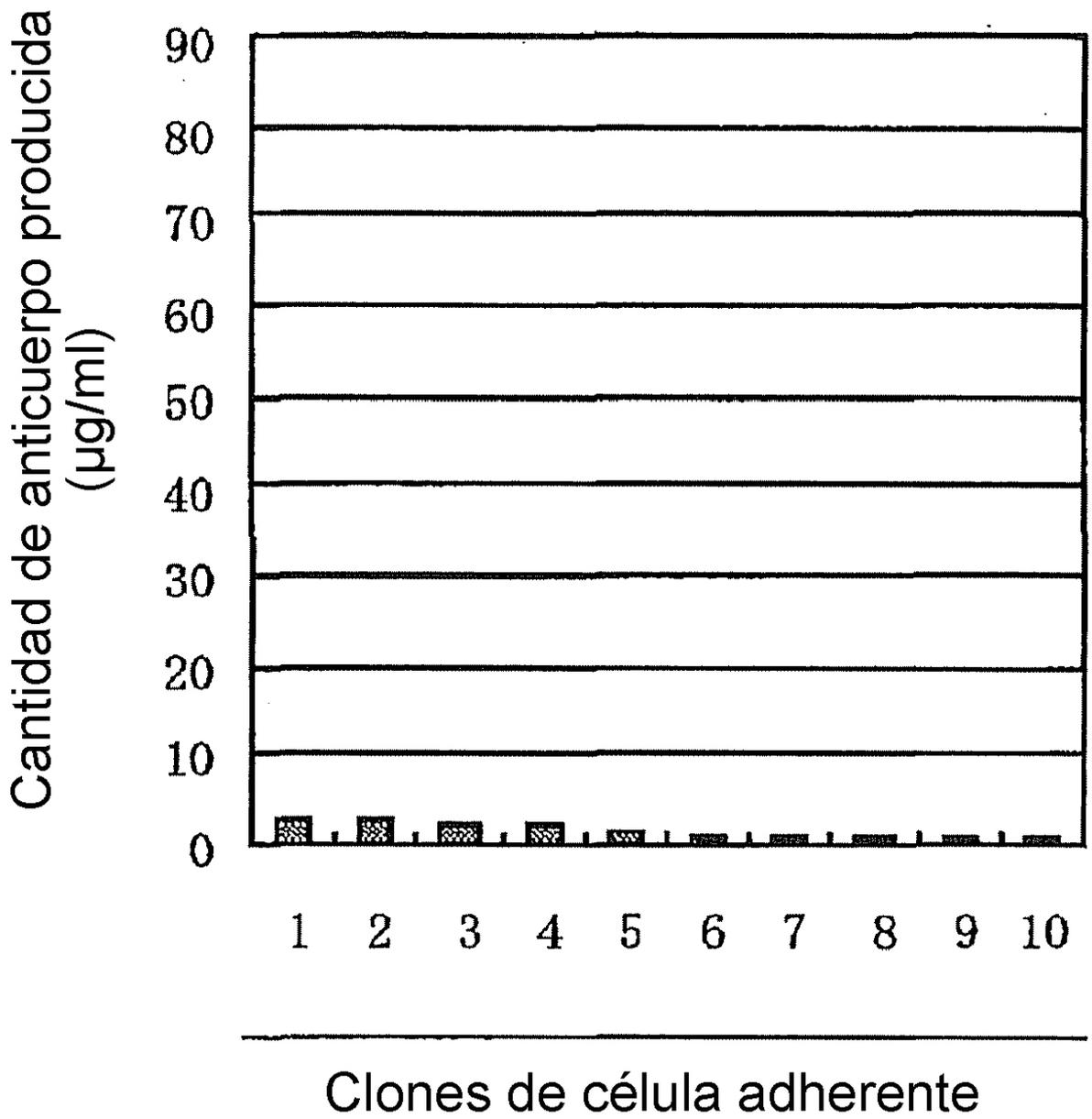
*Fig.3*



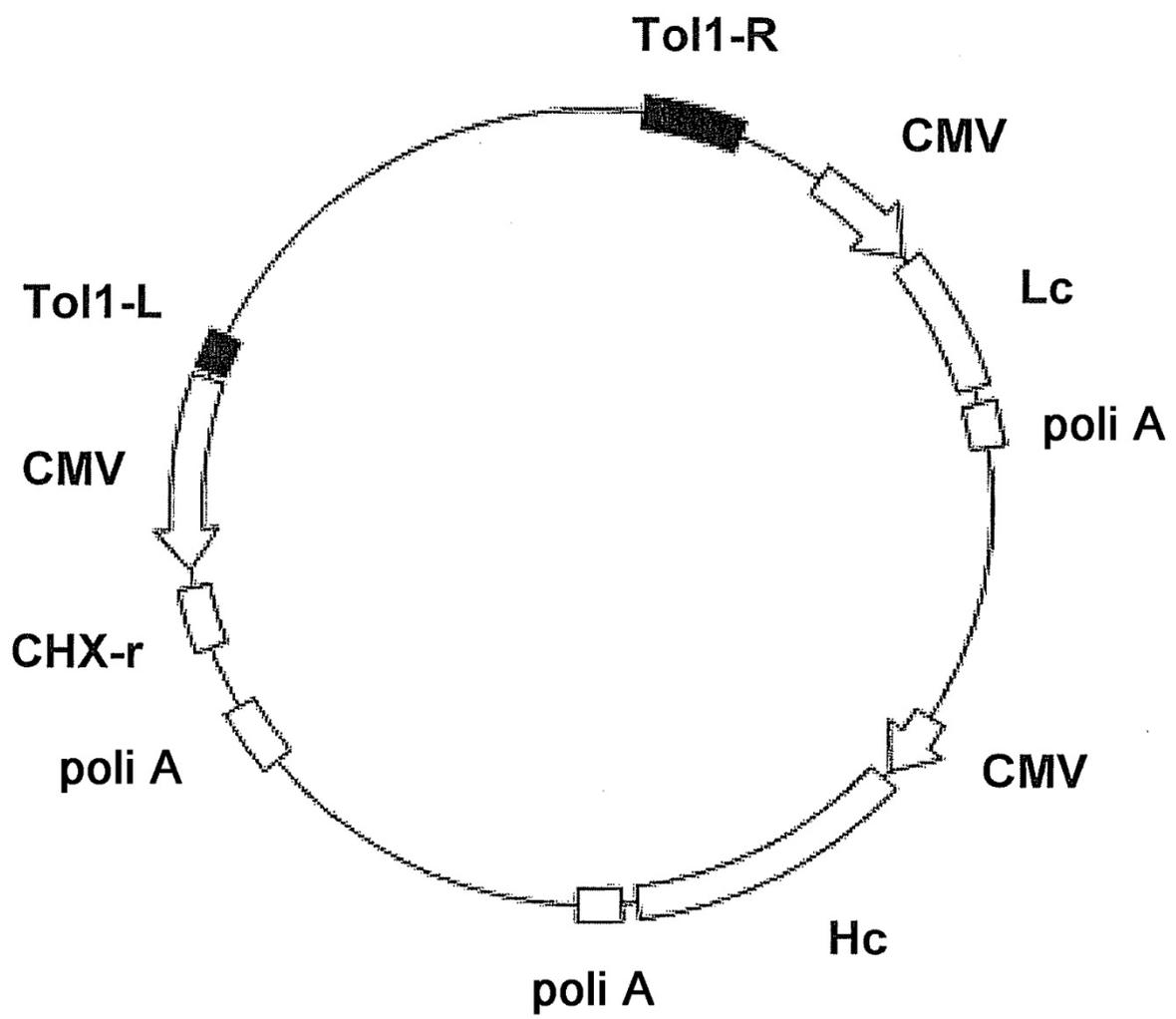
*Fig.4A*



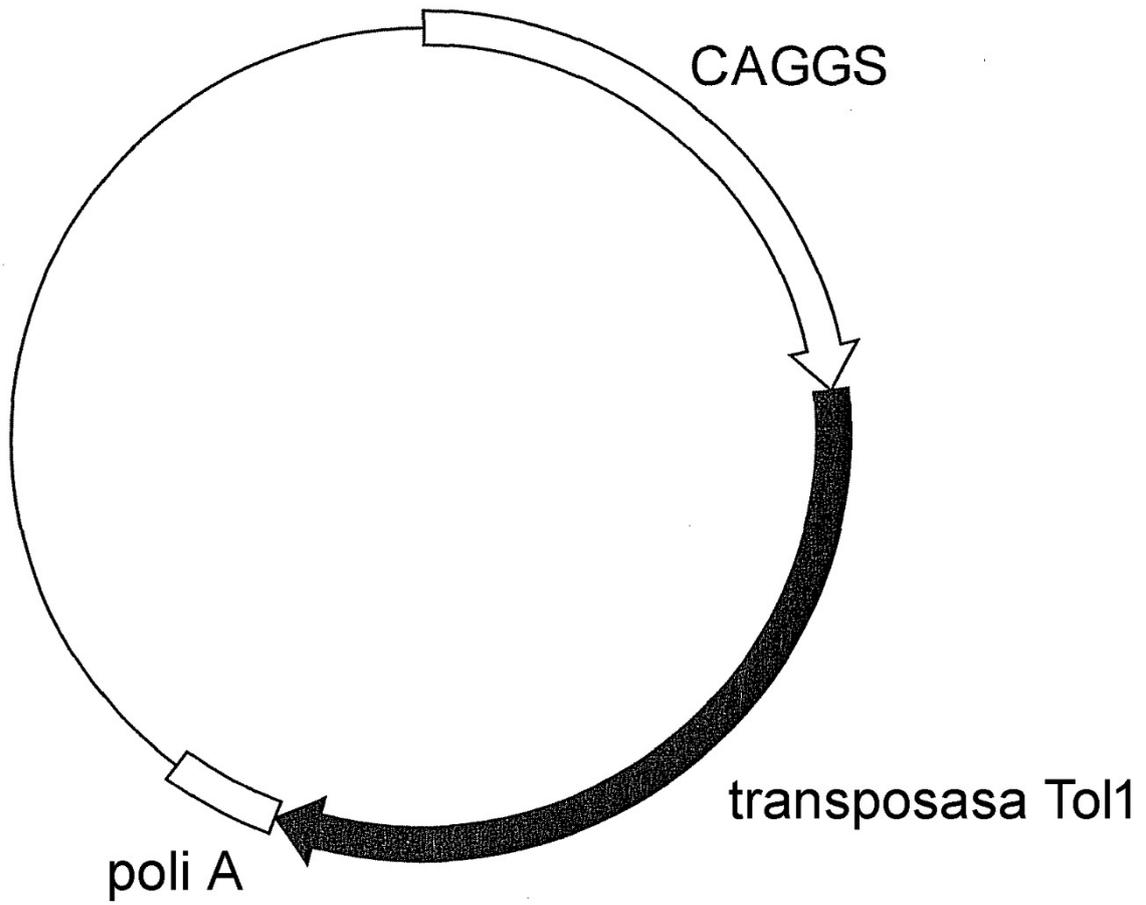
*Fig. 4B*



*Fig.5*



*Fig.6*



*Fig.7*

