



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 89880 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)

C12N015/00 A

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1989.03.01	(73) <i>Titular(es):</i> BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT EMIL-VON-BEHRING-STRASSE 76 D-35001, MARBURG/LAHN DE
(30) <i>Prioridade:</i> 1988.03.02 DE 3806617	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1989.11.10	(72) <i>Inventor(es):</i> GERD ZETTLMEISSL DE KLAUS-DIETER LANGNER DE MANFRED WIRTH DE HANS-JORG HAUSER DE
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 11/93 1993.11.15	(74) <i>Mandatário(s):</i> JOÃO DE ARANTES E OLIVEIRA RUA DO PATROCÍNIO 94 1350 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE CÉLULAS EUCARÍOTICAS RECOMBINANTES DE ELEVADA EXPRESSÃO

(57) *Resumo:*

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 89 880

REQUERENTE: BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, com sede em D-3550 Marburg, República Federal Alemã.

EPÍGRAFE: " PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS RECOMBINANTES DE ELEVADA EXPRESSÃO ".

INVENTORES: Gerd Zettlmeissl, Dr. Klaus-Dieter Langner, Dr. Manfred Wirth e Dr. Hans-Jorg Hauser.

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883. República Federal Alemã, em 2 de Março de 1988, sob o n.º. P 38 06 617.3.

Descrição referente à patente de invenção de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-3550 Marburg, República Federal Alemã, (inventores: Gerd Zettlmeissl, Dr. Klaus-Dieter Langner, Dr. Manfred Wirth e Dr. Hans Jorg Hauser, residentes na Alemanha Ocidental), para "PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE CÉLULAS EUCARIÓTI-CAS RECOMBINANTES DE ELEVADA EXPRESSÃO".

DESCRIÇÃO

A transfecção de DNA é um método de grande expansão para a transferência de genes estranhos para células animais em cultura. Por meio desta técnica conseguiu-se, nos últimos anos, por um lado identificar uma série de regiões de DNA regulatórias, de vários genes, e analisar as suas funções e, por outro lado, preparar proteínas de interesse farmacêutico na sua forma nativa ou nativa contínua.

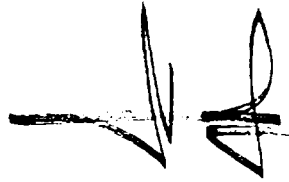
Para a transferência de genes pode utilizar-se hoje em dia uma série de técnicas diferentes. Conforme a técnica utilizada integram-se os genes transfeccionados, como cópias únicas ou como concâtemeros associados, num processo estatístico, no cromossoma da célula hospedeira. A razão de expressão para o(s) gene(s) transfeccionado(s) depende de uma série de fac

tores; por exemplo do número de cópias, do tipo de integração, da força do promotor utilizado ou do "enhancer" utilizado e da estabilidade do mRNA.

No actual estado da técnica, a introdução dirigida de DNA estranho na zona do cromossoma com elevada actividade transcripcional, continua ainda a representar um problema sem solução. O número de cópias pode contudo manipular-se. Uma vez que existe uma relação entre o número de cópias e os níveis de expressão, têm interesse os sistemas que oferecem a possibilidade da amplificação de genes, para se poder exprimir um gene com elevado rendimento. Nos últimos anos descreveu-se uma série de genes eucarióticos amplificáveis. Entre estes, encontra-se bem caracterizado o gene da dihidrofolatoreductase (DHFR) que se amplifica nas células como resposta a uma concentração crescente do inibidor Metotrexato (MTX). Uma linha celular de "ovário de hamster chinês" (CHO) que já não contém qualquer gene endógeno funcional DHFR (Urlaub e Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216-4220), é particularmente adequada para a amplificação de um gene exógeno DHFR e dos genes a ele acoplados (Kaufman e Sharp, 1982, J. Mol. Biol. 159, 601-621).

Contudo, o "Screening" de boas linhas celulares produtoras através deste método é muito trabalhoso e demorada, pois que para uma amplificação e expressão suficientes são em geral necessários 4 a 8 meses. Além disso, a amplificação através de MTX está até agora limitada ao sistema CHO ou a linhas celulares equivalentes, uma vez que é frequentemente acompanhada, em outras células não deficientes em DHFR, de resistência não específica. Além disso, não pode ser excluída uma amplificação competitiva do gene endógeno DHFR, o que pode eventualmente prejudicar o desejado efeito de amplificação.

A presente invenção é um método de "Screening" directo e rápido em linhas celulares de elevada produtividade, de preferência linhas celulares originais ou nativas. Neste método co-transfeccionam-se em primeiro lugar com o gene ou genes não seleccionáveis de interesse, pelo menos dois genes seleccionáveis, na célula correspondente ou na célula nativa. Sabe-se que a co-transfecção é um método muito eficiente para in-



troduzir simultâneamente genes separados em células animais. Aqui deve entender-se também por co-transfecção a transfecção em geral de vectores ou de estruturas de DNA. Os fragmentos de DNA cotransfectados integram-se em geral em vizinhança directa entre si no cromossoma hospedeiro e exprimem-se em muitos casos com elevada correlação. Em seguida, num primeiro passo, seleccionam-se todos os marcadores em relação à resistência, por meio de adição simultânea ou imediatamente sucessiva da correspondente substância (inibidora) ao meio. Prefere-se a adição simultânea ou a adição no espaço de uma hora, mas a invenção refere-se também à adição com espaços de 1 hora a 20 horas. Obtêm-se assim linhas celulares com razões de expressão apreciavelmente elevadas para o gene não seleccionável, em comparação com as células que foram seleccionadas apenas em relação a um gene marcador. Daqui resulta não só um efeito aditivo mas também multiplicativo para a expressão desejada. Por meio da utilização de dois ou mais marcadores seleccionáveis evitam-se neste sistema dificuldades resultantes de resistências não específicas. Os chamados genes marcadores podem encontrar-se num vector em conjunto com o gene não seleccionável de interesse ou estar distribuídos por vários vectores.

Além disso, é agora possível, por aumento da concentração de uma (ou mais) das substâncias a seleccionar no meio de cultura, mantendo constantes as outras, seleccionar células com um maior número de cópias para todos os genes transfectados e, em especial, com elevadas razões de expressão para o gene não seleccionável.

A vantagem deste método consiste na sua larga aplicabilidade às linhas celulares pretendidas e em evitar processos de selecção e de "Screening" morosos. Através dele podem produzir-se por engenharia genética, por exemplo mutantes de proteínas em pouco tempo, em quantidades necessárias para estudos de eficácia, podendo ainda testar-se em seguida.

A invenção refere-se por isso ao processo acima mencionado para a produção de células recombinantes de elevada expressão, bem como à sua utilização para o "Screening" de mutantes de genes não seleccionáveis. Os outros aspectos da

invenções serão esclarecidos nos exemplos seguintes e nas reivindicações da patente.

EXEMPLOS

1. Seleção dupla de células de rim de hamster bebê (BHK)

O número dos genes transfeccionados, no método de co-transfecção acima descrito, não é o factor limitante, de modo que se podem introduzir na célula simultaneamente mais do que dois genes. No exemplo da cotransfecção de uma unidade de transcrição para a antitrombina III humana com várias combinações de marcadores de seleção (resistência à neomicina/DHFR; resistência à neomicina/resistência à puromicina) em células BHK, podem mostrar-se as propriedades vantajosas do sistema de seleção dupla apresentado para a expressão de um gene estrutural heterólogo de interesse.

1. a) Cotransfecção do plasmídeo pSVATIII com os plasmídeos pAG60/pAddDHFR (resistência à neomicina/cDNA de DHFR)

Para esta experiência, multiplicaram-se células BHK 21 (ATCC CCL-10) em meio de Dulbecco modificado Eagles (DME) com 10% de soro bovino fresco (NCS).

Para a transfecção coprecipitaram-se os seguintes DNA-plasmídeos circulares, pela técnica do fosfato de cálcio, (Graham e van der Eb (1973), Virology 52, 456-467) num volume de 0,5 ml: 2 µg de pSVATIII (Zettlmeißl et al. (1987), Biotechnology 5, 720-725), 0,8 µg de pAddDHFR (Kaufman e Sharp, 1982, vide acima) e 0,2 µg de pAG60 (Colbère-Garapin et al. (1981), J. Mol. Biol. 150, 1-14). Colocou-se o coprecipitado, com 5 ml de meio de cultura numa concentração de $1,2 \times 10^5$ células, num recipiente de cultura com uma superfície de 25 cm^2 e incubou-se durante 16 horas a 37°C. Após mais 48 horas de incubação das células com 5 ml de DME/10% de NCS, misturaram-se as células na razão 1:3 com DME/10% de meio NCS + 500 µg/ml de G418 (geneticina, Gibco) + 0 - 300 nM MTX. Após 6 a 14 dias de tempo de seleção (mudança média de 3 em 3 ou 4 em 4 dias) contaram-se os clones resistentes, removeu-se a

tripsina e multiplicaram-se como mistura de clones (cloro misto, isto é, mistura dos clones obtidos).

Para a determinação da razão de expressão de AT III colocaram-se 5×10^5 células da mistura de clones anterior num recipiente de cultura de 25 cm^2 com 5 ml de meio de cultura. Após 24 horas adicionou-se meio fresco para mais 24 horas.

Contaram-se as células e determinou-se o teor em AT III num ensaio específico imuno-sorvente ligado a um enzima (ELISA) (proposto na DPA P3624453.8).

A Fig. 1 mostra que o número de clones por transfecção diminui com o aumento da concentração de MTX, enquanto que, pelo contrário, a quantidade do AT III de composto é até 4 vezes maior no caso da selecção dupla do que no caso da selecção simples com G418.

A partir dos clones BHK seleccionados duplamente a várias concentrações de MTX isolou-se o DNA cromossomal e hidridizou-se pelo processo "Dot-Blot" (Maniatis et al. (1982), Molecular Cloning - a Laboratory Manual, Cold Spring Harbour, 158, 393 - 401) com um fragmento do cDNA de AT III marcado com ^{32}P por meio de transacção "nick". Os resultados mostram que o aumento da resistência em relação a MTX está relacionado com um aumento do número médio de cópias do gene de AT III da mistura de clones e com a razão de expressão de AT III.

1. b) Cotransfecção do plasmídeo pAB3-1 (AT III) com os plasmídeos pRMH140/pSV2dhfr (resistência à neomicina/cDNA de DHFR).

Este exemplo destina-se a mostrar que o sistema apresentado no exemplo la também se pode efectuar, com um protocolo ligeiramente diferente, com vectores que possuem outras sequências reguladoras de transcrição para os respectivos genes (AT III, resistência à neomicina, DHFR).

Para esta experiência, multiplicam-se células BHK em meio DME contendo 10% de soro bovino fetal (FKS) (meio de cultura). Para a transfecção coprecipitaram

-se os seguintes DNA plasmídeos circulares pela técnica do fosfato de cálcio (vide acima), num volume de 1 ml: 20 µg de pAB3-1, 5 µg de pSV2dhfr (Lee et al. (1981), Nature 294, 228 232) e 5 µg de pRMH140 (Hudziak et al. (1982), Cell et al. 31, 137 - 146). O pAB3-1 é composto pelo plasmídeo pSVATIII em cuja posição de corte EcoRI se ligou a "Enhancer-Region" do Cytomegalovirus humano, nas posições 147 a 598 (Boshart et al. (1985), Cell 41, 521 - 530). O coprecipitado colocou-se directamente num recipiente de cultura de 25 cm², numa concentração de 5 x 10⁵ células, durante 30 minutos a 37° C. Após adição de 5 ml de meio de cultura incubaram-se as células durante mais 5 a 6 horas a 37° C. Trataram-se em seguida as células durante 3 minutos a 37° C com glicerina a 15% (v/v) no meio de cultura. Após duas lavagens com o meio decultura incubaram-se as células durante 72 horas a 37° C no meio de cultura. Para a selecção trataram-se as células na razão 1:3 a 1:4 no meio de cultura com 400 µg/ml de G418 com e sem 1 µM MTX.

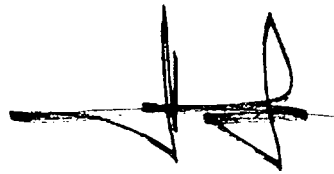
Após 10 a 15 dias de tempo de selecção (mudança média de 3 em 3 ou 4 em 4 dias) contaram-se os clones resistentes, separou-se a tripsina e multiplicaram-se como mistura de clones. A determinação da razão de expressão de AT III efectuou-se como descrito no exemplo ia).

A Tabela 1 mostra que no caso da selecção dupla o número dos clones obtidos por transfecção é cerca de um factor cinco menor que o número de clones no caso da selecção apenas com G418. É ainda evidente as razões de expressão de AT III após dupla selecção são cerca de um factor seis mais elevadas.

TABELA 1

G418 [µg/ml]	MTX [µM]	Colónias/ # Transfecção	Expressão de ATIII [µg]/10 ⁶ células # Zellen/24 h]
400	0	300 ± 30	1 ± 0,2
400	1	60 ± 15	6 ± 0,3

Valor médio de três experiências de transfecção independentes



Adicionou-se um clono misto duplamente seleccionado (3MK1; ver Tabela 2) a concentrações sucessivamente crescentes de MTX no meio de cultura (1 → 10M). Obteve-se assim uma duplicação da razão de expressão de AT III. O número médio de cópias de AT III, determinado pelo método de "Southernblot" quantitativo (Zettlmeißl et al. vide acima), aumenta também no caso desta selecção secundária de MTX (Tabela 2).

TABELA 2

G418 [$\mu\text{g/ml}$]	MTX [μM]	ATIII cópias do gene células Zelle (3MK1)	Expressão de ATIII [$\mu\text{g}/10^6$ células Zellen/24 h]
400	1	40	6 \pm 0,2
400	10	150	12 \pm 0,4

1. c) Cotransfecção do plasmídeo pSVATIII com os plasmídeos pAG60/pSV2PAC (resistência à neomicina/resistência à puromicina)

Cotransfeccionaram-se células BHK como descrito no exemplo 1a), utilizando-se em vez do plasmídeo pAddHFR 0,8 μg do plasmídeo pSV2PAC (vara et al. (1986), Nucl. Acids Res. 11, 4617 - 4624). (O pSV2PAC codifica para uma N-acetiltransferase do Streptomyces alboniger e confere, na expressão em células animais, resistência em relação ao antibiótico puromicina). As células transfeccionadas seleccionaram-se num meio DME com 10% do NCS + 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de G418 + 0 - 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de puromicina, multiplicaram-se como clono misto e testaram-se, como descrito acima, em relação à expressão de ATIII. Também nesta experiência, o número dos clones obtidos por transfecção diminui com o aumento da concentração de puromicina. Pelo contrário, as razões de expressão de ATIII são, no caso das células duplamente seleccionadas, de um factor 4 a 6 mais elevadas do que no caso das células apenas seleccionadas com G418 (Fig. 2).



2. Selecção dupla em outros sistemas celulares

Os exemplos seguintes destinam-se a mostrar que o princípio da selecção dupla se pode aplicar também a outras células animais em cultura.

2. a) Cotransfecção do plasmídeo pSVtss⁺ (contendo cDNA para o interferão- β humano) com os plasmídeos pAG60/pSV2PAC (resistência à neomicina/resistência à puromicina) em células CHO e L TK⁻ de rato.

Cotransfeccionaram-se células CHO dhfr⁻ (Urlaub e Chasin (1980), vide acima) e L TK⁻ (ATCC CCL1.3), como descrito nos exemplos 1a) e 1c), com os seguintes DNA-plasmídeos circulares: 2 μ g de pSVtss⁺ (Reiser e Hauser (1987), Drug Res., 37, 482 - 485), 0,2 μ g de pAG60 e 0,8 μ g de pSVPAC. Após selecção em meio DME com 10% de NCS + G418 (360 μ g/ml para as células CHO; 700 μ g/ml para as células L TK⁻) + puromicina (0 - 10 μ g/ml) contou-se o número dos transfectantes estáveis, multiplicaram-se as células como clono misto e determinou-se a razão de expressão do interferão β por meio de um teste antiviral (Finter (1969), J. Gen. Virol. 5, 419 - 427). Para tal trataram-se as células confluentes durante 5 horas com poli (I): poli (C). Para o teste recolheram-se as camadas sobrenadantes durante 15 horas (Dinter e Hanser (1987) EMBO J. 6, 599 - 604). Os clones mistos de CHO, duplamente seleccionados com 10 μ g/ml de puromicina e G418, exprimiram 20 vezes mais o interferão β do que os que tinham sido seleccionados apenas com G418 (Fig. 3A).

Os clones mistos de L TK⁻, seleccionados duplamente com 10 μ g/ml de puromicina e G418, exprimiram cerca de 6 vezes mais o interferão β do que os que tinham sido seleccionados apenas com G418 (Fig. 3B).

2. b) Cotransfecção do plasmídeo pAB3788 (contendo cDNA para o factor VIII:C humano) com os plasmídeos pRMH140/pSV2dhfr em células HE 7 (de hamster)

Para a construção do plasmídeo 3788, clonou-se no vector pAB3-1 (vide exemplo 1b) um cDNA que

codifica para um mutante de selecção do factor VIII: C humano (delecção dos aminoácidos 741 a 1689, como proposto no registo de patente alemão P 37 20 246.4), e que se encontra flanqueado por posições HhoI. Para tal, cortou-se o pAB3-1 com SalI/XbaI, encheram-se os extremos 5' concavos com o fragmento de Klenow da E. coli DNA-polimerase e purificou-se como fragmento de vector (3.3 kb). Após se terem enchido também os extremos 5' côncavos das posições XhoI do fragmento de DNA purificado do factor VIII:C, obteve-se por ligação o vector pAB3788. Cotransfeccionaram-se 20 µg do plasmídeo pAB3788, como descrito no exemplo 1b), com os plasmídeos pRMH140 e pSV2dhfr, em células HE7 (Cook, J.L. e Lewin, A.M. (1979) Cancer Res. 39, 1455 - 1461). Por selecção, como descrito no exemplo 1b), obtiveram-se cerca de 300 ± 30 clonos por mistura de transfecção. Os transfectantes multiplicados como clonos mistos exprimiram $0,7 \pm 0,1$ unidades (U) de factor VIII : C por 10^6 células por 24 horas. As células duplamente seleccionadas exprimiram cerca de um factor 3 a 6 mais mutantes de factor VIII : C do que no caso de clonos mistos seleccionados com G418 em experiências independentes. A actividade do factor VIII : C determinou-se por meio do teste COA (Kabi Vitrum, Uppsala, Suécia).

3. Selecção dupla como método de obtenção de elevadas concentrações de partículas de retrovirus recombinantes.

Para a construção do vector de expressão retroviral pM5ATIII, clonou-se um fragmento BglII/bamHI de 1,4 kb (cDNA de ATIII) na posição singular BamHI do pM5neo, que se encontra flanqueada por uma posição dadora ou aceitadora de "splicing" do sarcomavirus mieloproliferativo. O fragmento ATIII obteve-se por ligação de lincantes BglII ao fragmento Sal I/EcoRI de 1,6 kb do vector pSVAT III (vide acima), seguido por uma cisão com Bam HI/Bgl II. O pM5neo contém, para além da espinha dorsal pBR, entre outros, as posições de "splicing" acima referidas e o gene resistente à neomicina, bem como os LTRs (long terminal repeats) do sarcomavirus micloproliferativo (Ostertag

et al. (1980), J. Virol. 33, 573 - 582; Stacey et al. (1984), J. Virol. 50, 725 - 732).

A linha celular secundária Psi2 (Mann et al. (1983), Cell 33, 153 - 159) multiplicou-se em meio DME com 10% de FKS. Para a transfecção coprecipitou-se uma mistura de DNA-plasmídeo circular (5 μ g de pM5AT II e 2 μ g de pSV2PAC) e 8 μ g de DNA cortado de células L de rato, num volume de 0,5 ml, com fosfato de cálcio, e após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente colocaram-se em 5 ml de meio de cultura numa concentração de 2×10^5 células Psi2. Após cerca de 12 horas de incubação a 37°C mudou-se o meio e substituiu-se 24 horas mais tarde por meio de selecção (selecção simples com 1 mg/ml de G418, selecção dupla com 1 mg/ml de G418 e 2 ou 5 μ g/ml de puromicina em meio DME mais 10% de FKS). Os clones obtidos contaram-se após 10 - 14 dias e misturaram-se.

Para a determinação da concentração do vírus semearam-se 5×10^5 células Psi2 e mudou-se o meio após 24 horas. Após 24 horas utilizou-se a camada sobrenadante, contendo partículas de retrovirus recombinantes, ou diluições desta para a infecção de células HIH 3T3 (ATCC CRL 1658; 1000 - 3000 células por placa de 24 orifícios). A infecção efectuou-se por adição de 8 μ g/ml de polibreno durante cerca de 12 horas. Em seguida mudou-se o meio e após 24 horas substituiu-se por meio de selecção (1 μ g/ml de G418). Os clones obtidos coraram-se 10 dias depois da mudança para o meio de selecção e contaram-se. As misturas de clones resultantes da selecção dupla tinham concentrações vitais cerca de 10 vezes superiores às das misturas de clones obtidas por selecção simples (Fig. 4).

Legendas das Figuras 1 - 3

O número dos transformantes estáveis refere-se às ordenadas à esquerda e está representado por quadradinhos abertos. A quantidade do produto genético de interesse (AT III ou interferão) refere-se às ordenadas à direita e está representada por círculos abertos. Nas abcissas representa-se a concentração dos inibidores variados em cada caso (Metotrexato ou puromicina).

•
•
•

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

- 1^a -

Processo para a expressão de genes não seleccionáveis em células eucarióticas, caracterizado por se transfeccionarem dois ou mais genes marcadores de selecção com os genes não seleccionáveis, encontrando-se os genes marcadores de selecção e os genes não seleccionáveis num ou mais vectores ou estruturas de DNA, e se efectuar em seguida a selecção em todos os marcadores de selecção transfeccionados.

- 2^a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se efectuar a selecção em todos os marcadores de selecção transfeccionados, ao mesmo tempo ou no intervalo de uma hora.

- 3^a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se efectuar sucessivamente a selecção nos marcadores de selecção transfeccionados, com intervalos de 1 a 120 horas, de preferência de 2 a 72 horas.

- 4^a -

Processo de acordo com as reivindica-

- 12 -

ções 1, 2 ou 3, caracterizado por se co-transfeccionar um gene isolado, não seleccionável.

- 5^a -

Processo de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 ou 4, caracterizado por, em passos de selecção consecutivos, se aumentar a concentração de uma ou mais substâncias inibidoras, de preferência de uma substância inibidora, de um factor de 2 a 100, de preferência de um factor de 8 a 12.

- 6^a -

Processo de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4 ou 5, caracterizado por o gene não seleccionável codificar para AT III, F VIII, C, F XIII a, t-PA, EPO, G-CSF, GM-CSF, PAI, Proteíne C ou IL-3.

- 7^a -

Processo de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4 ou 5, caracterizado por se efectuar a selecção ("Screening") de mutantes de genes não seleccionáveis.

A requerente declara que o primeiro pedido desta patente foi apresentado na República Federal Alemã, em 2 de Março de 1988, sob o nº. P 38 06 617.3.

.
. .
.

Lisboa, 1 de Março de 1989
AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

A handwritten signature in black ink, consisting of several stylized, overlapping loops and a horizontal base line.



RESUMO

"PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS
RECOMBINANTES DE ELEVADA EXPRESSÃO"

A invenção refere-se a um processo para a expressão de genes não seleccionáveis em células eucarióticas que compreende transfeccionarem-se dois ou mais genes marcadores de selecção com os genes não seleccionáveis, encontrando-se os genes marcadores de selecção e os genes não seleccionáveis num ou mais vectores ou estruturas de DNA, e se efectuar em seguida a selecção em todos os marcadores de selecção transfectados.

89880

H

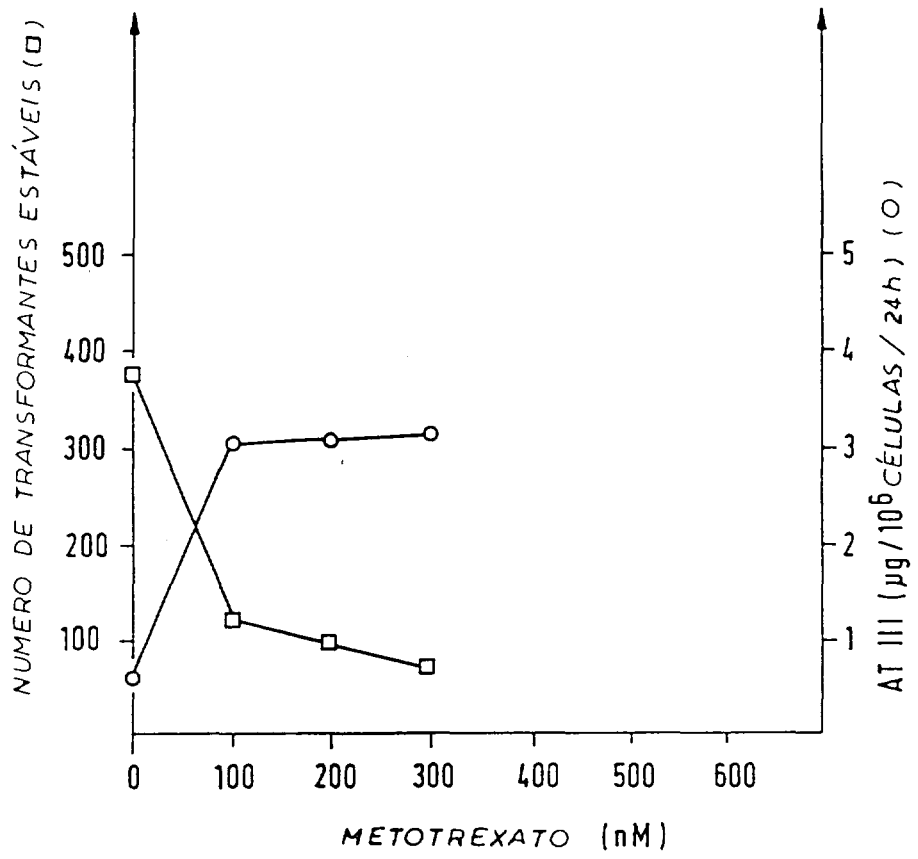


FIG. 1

89880

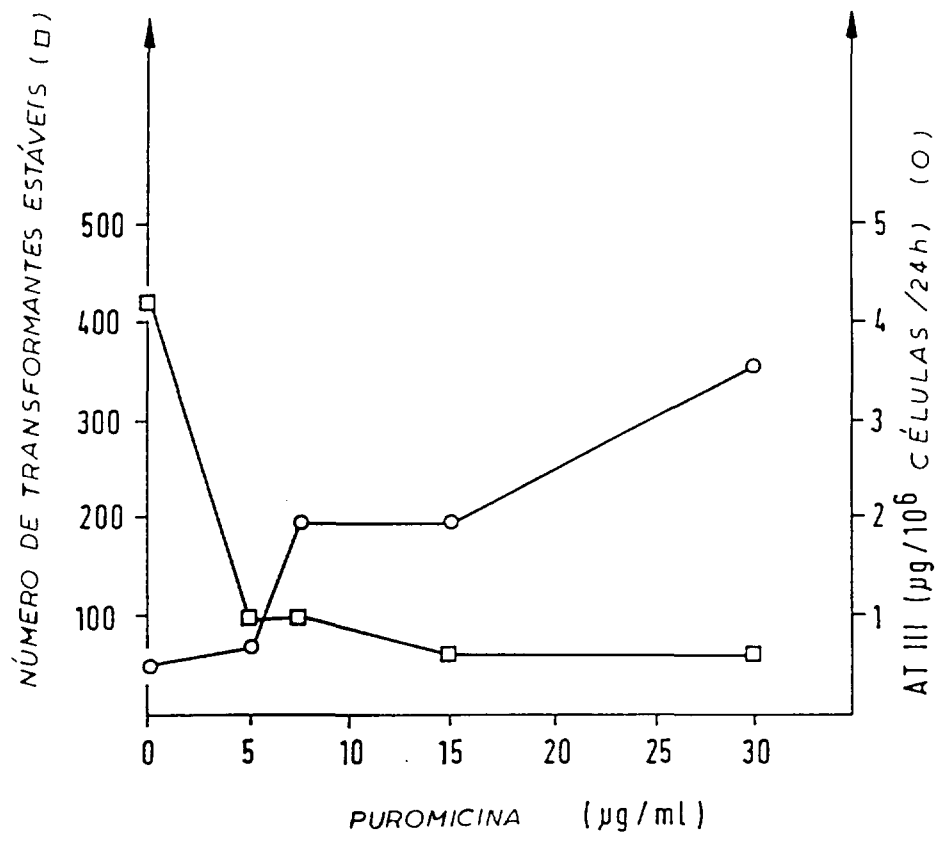


FIG. 2

89880

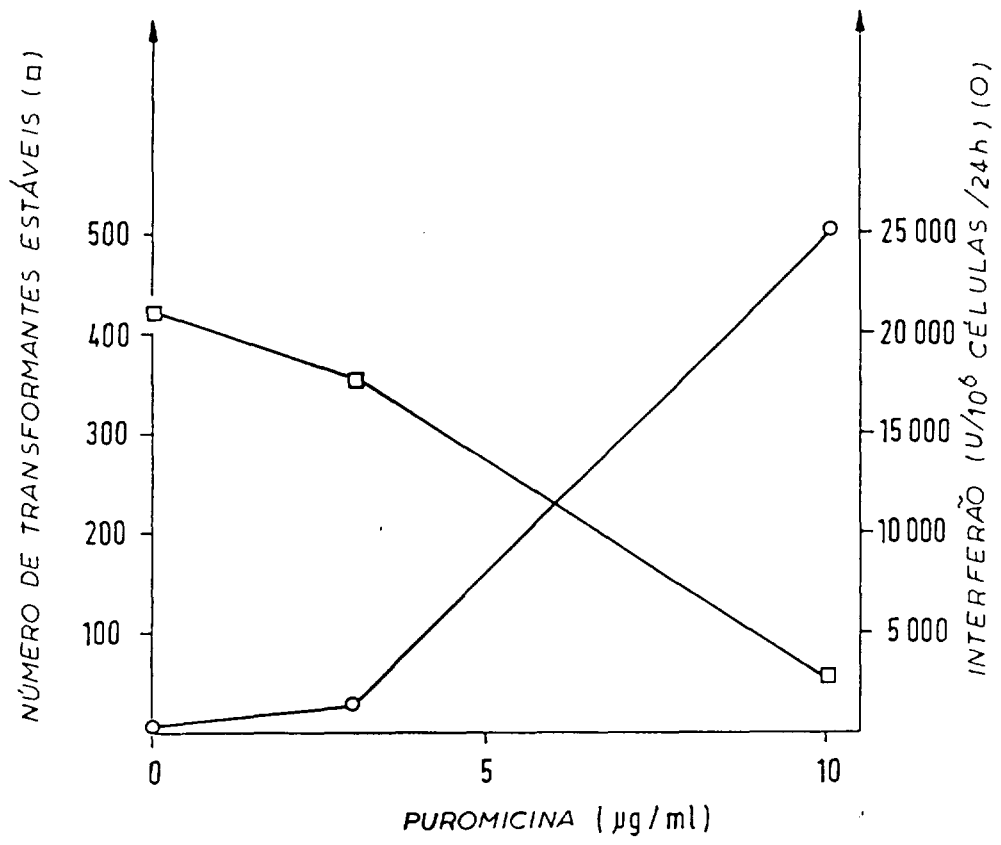


FIG. 3A

89880

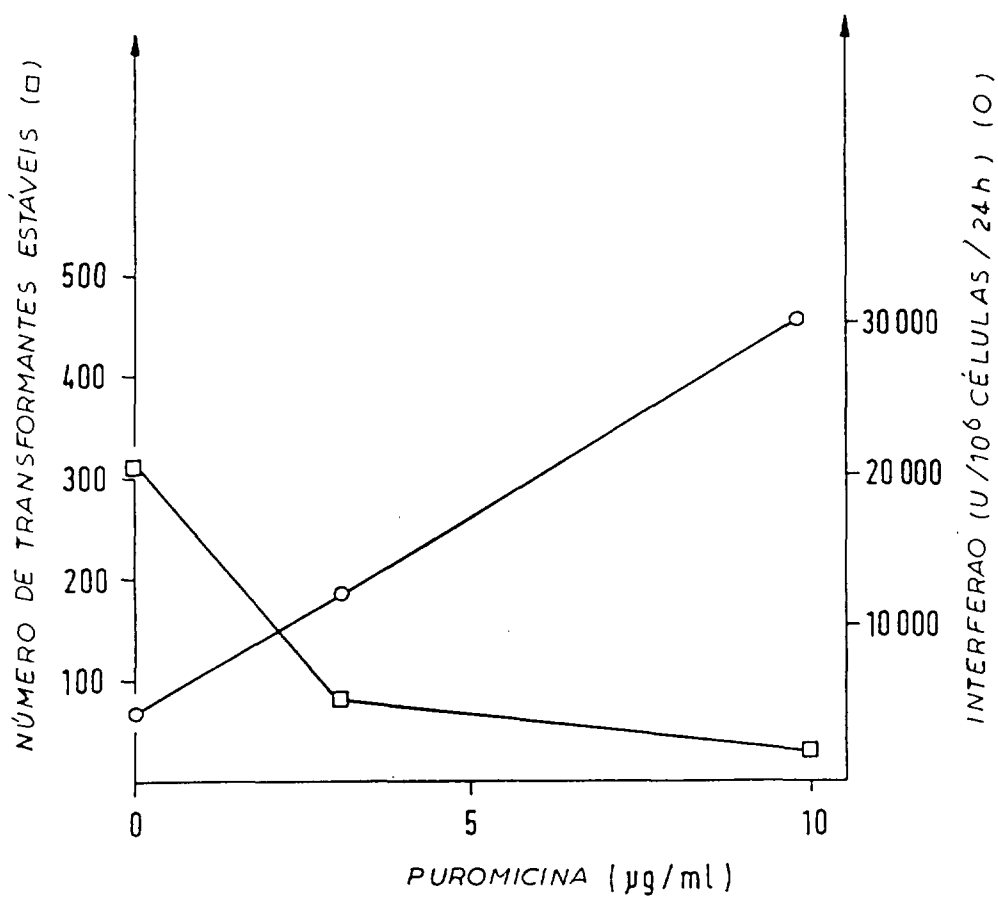


FIG. 3B

89880

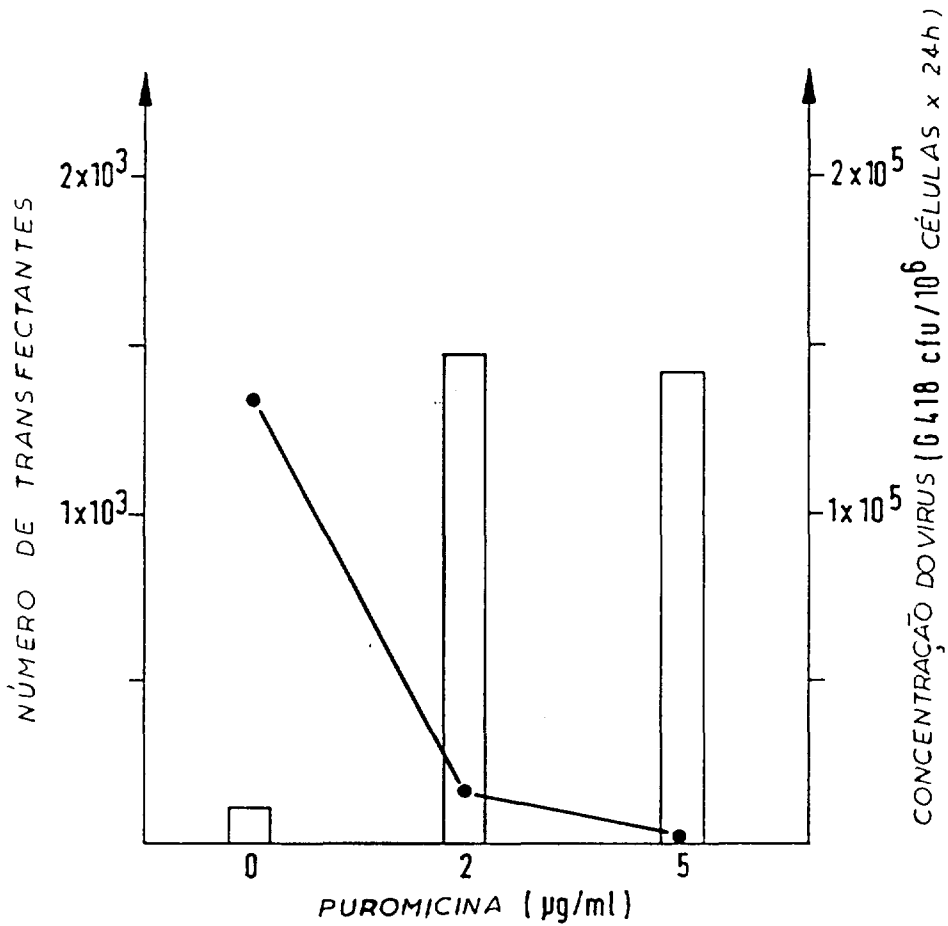


FIG.4