



(19)
 Bundesrepublik Deutschland
 Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 102 56 083 A1** 2004.08.12

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **102 56 083.8**
 (22) Anmeldetag: **29.11.2002**
 (43) Offenlegungstag: **12.08.2004**

(51) Int Cl.7: **C12N 15/85**
C12N 15/79

(71) Anmelder:
Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG,
55218 Ingelheim, DE

(72) Erfinder:
Enenckel, Barbara, Dr., 88447 Warthausen, DE;
Fieder, Jürgen, 89619 Unterstadion, DE; Otto, Ralf,
Dr., 88422 Oggelshausen, DE; Grammatikos,
Stefanos, Dr.-Ing., 88524 Uttenweiler, DE

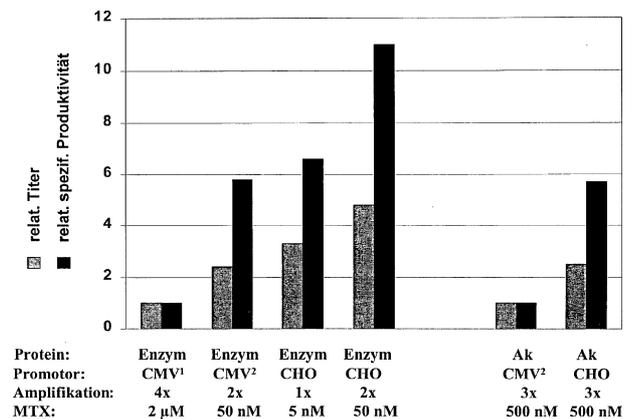
Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Expressionsvektor, Verfahren zur Herstellung von heterologen Genprodukten und Selektionsverfahren für hochproduzierende rekombinante Zellen**

(57) Zusammenfassung: Ein Expressionsvektor für eukaryontische Zellen, umfassend ein Gen, das für ein Protein von Interesse kodiert, in funktioneller Verknüpfung mit einem Hamster-Ubiquitin/S27a-Promotor und ein Gen, das für ein fluoreszierendes Protein kodiert. Vorzugsweise enthält der Expressionsvektor noch ein amplifizierbares Selektionsmarkergen.

Beschrieben werden ferner mit dem Expressionsvektor transfizierte Wirtszellen, vorzugsweise Säugerzellen, Verfahren zur Herstellung heterologer Genprodukte und ein Verfahren zur Selektion hochproduzierender Zellen.



Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Selektionsverfahren für hochproduzierende rekombinante Zellen, ein Verfahren zur Herstellung von heterologen Genprodukten sowie Expressionsvektoren und damit transfizierte Wirtszellen, die in diesen Verfahren verwendbar sind.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Säugerzellen sind die bevorzugten Wirtszellen zur Produktion komplexer biopharmazeutischer Proteine, da die post-translational durchgeführten Modifikationen sowohl in funktionaler als auch in pharmakokinetischer Hinsicht humankompatibel sind. Kommerziell relevante Zelltypen sind Hybridomas, Myelomas, CHO (Chinese Hamster Ovary)-Zellen und BHK (Baby Hamster Kidney)-Zellen. Die Kultivierung der Wirtszellen erfolgt zunehmend unter serum- und proteinfreien Produktionsbedingungen. Gründe hierfür sind die damit verbundene Kostenreduktion, die geringere Interferenz bei der Aufreinigung des rekombinanten Proteins sowie die Reduktion des Potentials zur Einführung von Pathogenen (z.B. Prionen, Viren). Der Einsatz von CHO-Zellen als Wirtszellen findet dabei immer mehr Verbreitung, da diese Zellen sich an Suspensionswachstum in serum- und proteinfreiem Medium adaptieren lassen und sie zudem von den regulatorischen Behörden als sichere Produktionszellen angesehen und akzeptiert werden.

[0003] Zur Erzeugung einer stabilen Säugerzelllinie, die ein heterologes Gen von Interesse exprimiert, wird das heterologe Gen in der Regel gemeinsam mit einem selektierbaren Markergen, wie z.B. Neomycin-Phosphotransferase, durch Transfektion in die gewünschten Zelllinie eingebracht. Das heterologe Gen und das selektierbare Markergen können dabei entweder gemeinsam von einem einzelnen Vektor oder von jeweils separaten Vektoren, die co-transfiziert werden, exprimiert werden. Zwei bis drei Tage nach der Transfektion werden die Zellen in Medium überführt, das ein Selektionsmittel enthält, z.B. G418 bei Verwendung des Neomycin-Phosphotransferase-Gens, und für einige Wochen unter diesen selektiven Bedingungen kultiviert. Die hochwachsenden resistenten Zellen können dann isoliert und hinsichtlich der Expression des gewünschten Genprodukts untersucht werden. Bedingt durch die willkürliche und ungerichtete Integration in das Wirtszellgenom erhält man eine Population von Zellen, die völlig unterschiedliche Expressionsraten des heterologen Gens aufweisen. Darunter können auch nicht-exprimierende Zellen sein, bei denen zwar der Selektionsmarker exprimiert wird, aber nicht das Gen von Interesse. Zur Identifizierung von Zellklonen, die eine sehr hohe Expression des heterologen Gens von Interesse aufweisen, muss deshalb eine Vielzahl von Klonen überprüft und getestet werden, resultierend in einem hohen Zeit-, Arbeits- und Kostenaufwand.

[0004] Genamplifikation ist ein weitverbreitetes Phänomen in tierischen Zellkulturen, das für die Produktion rekombinanter biopharmazeutischer Proteine genutzt wird. Durch die Genamplifikation wird die ursprünglich relativ geringe Produktivität vieler Säugerzelllinien drastisch verbessert. Eine weit verbreitete Amplifikationstechnik stellt das Dihydrofolat-Reduktase (DHFR)-basierte Genamplifikationssystem dar, das sehr häufig in DHFR-defizienten Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellen Verwendung findet. Dabei werden die DHFR-defizienten CHO-Zellen, z.B. CHO-DUKX (ATCC CRL-9096) oder CHO-DG44 (Urlaub et al., 1983), mit einem geeigneten Vektorsystem, das für DHFR und das Protein von Interesse kodiert, transfiziert. Daraufhin werden die Transfektanten in einem Medium ohne Glycin, Hypoxanthin und Thymidin selektioniert. Die Amplifikation und somit die Etablierung von hochproduzierenden Zelllinien wird über die steigende Zugabe von Methotrexat (MTX), einem Inhibitor der Dihydrofolat-Reduktase, erreicht (Kaufman et al., 1982; US 4,656,134). Die anschließende Selektion der erhaltenen hochproduzierenden Zellen unterliegt auch hierbei dem Zufallsprinzip und basiert auf Wahrscheinlichkeiten, wodurch dieser Selektionsschritt überaus arbeits- und zeitintensiv ist.

[0005] Zur besseren und schnelleren Verfolgung der Gentransformation und -expression wurden verschiedenste Methoden entwickelt. Diese beinhalteten zunächst die Verwendung von Reportermolekülen wie z.B. Chloramphenicol-Acetyltransferase, Luciferase, β -Galactosidase oder von Fusionsproteinen, die die Kodierregionen von β -Galactosidase oder Luciferase enthalten. Der Nachteil dieser entsprechenden Reporter- Assays besteht allerdings darin, dass die Zellen fixiert oder lysiert und mit exogen hinzugefügten Substraten und Co-Faktoren inkubiert werden müssen. Eine Weiterkultivierung der analysierten Zellen ist somit ausgeschlossen. Eine neuere Methode, basierend auf der Co-Expression des E.coli Enzyms β -Galactosidase, ermöglicht zwar eine Sortierung von lebenden Zellen mittels eines FACS-Geräts (Nolan et al., 1988), allerdings ist hier zur Beladung der Zellen mit dem fluorogenen Substrat eine hypotonische Vorbehandlung erforderlich. Diese Aktivität muss vor dem FACS-basierten Sortieren noch inhibiert werden.

[0006] Mit der Einführung des grünen fluoreszierenden Proteins (GFP) aus *Aequorea victoria* und den daraus entwickelten GFP-Mutanten als Reportermolekül wurde die Identifizierung von Zellen, die ein heterologes Gen exprimieren, erheblich erleichtert. Die Co-Expression von GFP ermöglichte eine in vivo Echtzeit-Analyse und das Sortieren von Transfektanten auf Basis ihrer Fluoreszenz, ohne dass zusätzliche Substrate oder Co-Fak-

toren benötigt werden. Der Einsatz von GFP als Reportermolekül zur Verfolgung des Gentransfers wurde in verschiedenen Publikationen beschrieben. Chalfie et al. beschreiben in den Patenten US 5,491,084 und US 6,146,826 eine Methode zur Selektion von Zellen, die ein Protein von Interesse exprimieren. Diese Methode beinhaltet die Co-Transfektion von Zellen durch ein DNA-Molekül, das die kodierende Sequenz für das Protein von Interesse enthält, und einem zweiten DNA-Molekül, das das GFP-Gen kodiert. Nachfolgend werden die GFP-exprimierenden Zellen selektioniert. Gubin et al. (1997) untersuchten die Stabilität der GFP-Expression in CHO-Zellen in Abwesenheit von selektiven Wachstumsbedingungen. Die Zellen wurden dabei mit einem Plasmid, das sowohl GFP als auch Neomycin-Phosphotransferase enthielt, transfiziert. Mosser et al. (1997) verwendeten zur Identifizierung und Selektion von Zellen, die induzierbares Produkt exprimierten, ein Plasmid, das eine bicistronische Expressionskassette, kodierend für GFP und ein Zielgen (oder auch Gen von Interesse genannt), enthielt. Das Zielgen stand dabei unter der Kontrolle eines regulierbaren Promotors. Die Kopplung der GFP- und der Zielgenexpression wurde durch die Verwendung eines viralen IRES („Internal Ribosome Entry Site“)-Elements erreicht, wodurch eine bicistronische mRNA, die für GFP und das Protein von Interesse kodierte, exprimiert wurde. Das hierbei verwendete Plasmid enthielt selbst kein selektierbares Markergen. Dieses wurde deshalb durch ein zweites Plasmid in einer Co-Transfektion oder in einer nachfolgenden Transfektion eingebracht. Hingegen verwendeten Levenson et al. (1998) retrovirale Vektoren mit einer bicistronischen Expressionskassette, in der vor der IRES-Sequenz das Gen von Interesse kloniert werden kann. Die auf die IRES-Sequenz folgende Sequenz kodierte hingegen für ein selektionierbares Markergen, wobei es sich dabei entweder um einen Marker handelte, der Resistenz gegen G418, Puromycin, Hygromycin B, Histidinol D oder Phleomycin vermittelte, oder um GFP.

[0007] Es wurden auch bereits Vektoren beschrieben, die ein IRES-Element aus der Familie der Picornaviren enthielten, wobei das IRES-Element zwischen dem Produktgen und einem selektionierbaren Markergen positioniert war (Pelletier et al., 1988; Jang et al., 1989; Davies et al., 1992).

[0008] GFP wurde auch erfolgreich mit Resistenzmarkergenen fusioniert. Zum Beispiel beschreibt Bennett et al. (1998) ein GFP/Zeomycin-Fusionsprotein. Dieser bifunktionale Selektionsmarker konnte erfolgreich zur Identifizierung und Selektion von transfizierten Säugerzellen eingesetzt werden. Primig et al. (1998) hingegen setzten ein Fusionsprotein aus GFP und Neomycin-Phosphotransferase für ihre Enhancer-Studien ein.

[0009] In der Publikation von Meng et al. (2000) und in der internationalen Patentanmeldung WO 01/04306 wurde zur Selektion und Identifizierung von Zellen mit hoher Expression eines rekombinanten Proteins ein Expressionssystem eingesetzt, in dem das Gen von Interesse zusammen mit dem amplifizierbaren Selektionsmarkergen DHFR und einem GFP-Gen von einem einzigen Vektor aus exprimiert wurde. Die drei Gene waren dabei entweder in einer Transkriptionseinheit zusammengefasst oder auf zwei Einheiten verteilt. Durch diese räumliche und transkriptionelle Verknüpfung aller drei Gene in einem einzigen Expressionsvektor sollte deren Wahrscheinlichkeit einer Co-Amplifikation unter Selektionsdruck erhöht werden und somit Hochproduzenten-Klone identifiziert und selektioniert werden. Die besten Klone, die durch Anwendung der kombinierten Selektion mittels amplifizierbarem DHFR-Selektionsmarker und GFP-basierter FACS-Sortierung isoliert wurden, exprimierten das Protein von Interesse in einer Größenordnung von maximal 3 bis 4.5 pg pro Zelle und Tag. Dabei wurden die Experimente mit adhärennten Zellen und in serumhaltigem Medium durchgeführt, also mit Zellen und unter Bedingungen, die bekanntermaßen wesentlich robuster und durch höhere Grundproduktivitäten gekennzeichnet sind.

Zusammenfassung der Erfindung

[0010] Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher die Entwicklung eines Selektionssystems für rekombinante Zellen mit erhöhter Produktivität, das folgende Anforderungen erfüllt:

- (1) Verkürzung der Zeit für die Entwicklung von hochproduzierenden Zellen zur Herstellung biopharmazeutischer Proteine bei gleichzeitiger Senkung der Entwicklungskosten;
- (2) Hoher Durchsatz bei der Selektion von hochproduzierenden Zellen bei geringem Kapazitätsaufwand;
- (3) Einsatz von „fermentationsrobusten“ hochproduzierenden Zellen, die z.B. eine geringere Wachstumsbeeinträchtigung bei erhöhten Methotrexat-Konzentrationen zeigen;
- (4) Transfektion, Selektion und Kultivierung der suspensionsadaptierten Zellen vorzugsweise in serumfreiem Medium;
- (5) Reduktion der erforderlichen Genamplifikationsschritte.

[0011] Aufgabe der Erfindung war ferner die Bereitstellung von Expressionsvektoren und damit transfizierten Wirtszellen, die in diesem Klonselktionssystem verwendbar sind, sowie eines Verfahrens zur Herstellung von heterologen Genprodukten unter Verwendung dieser Wirtszellen.

[0012] Diese Aufgaben werden gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung mit Hilfe eines Expressionsvektors gelöst, der ein Gen, das für ein Protein von Interesse kodiert (im folgenden auch: „Gen von Interesse“), in funktioneller Verknüpfung mit einem Hamster-Ubiquitin/S27a-Promotor und einem Gen, das für ein fluores-

zierendes Protein kodiert, umfasst.

[0013] Der Expressionsvektor enthält vorzugsweise noch ein amplifizierbares Selektionsmarkergen, z.B. das Gen für die Dihydrofolat-Reduktase (DHFR). Ferner enthält ein bevorzugter Expressionsvektor weitere regulatorische Elemente, beispielsweise einen Enhancer in funktioneller Verknüpfung mit dem Promotor. Ferner enthält der Expressionsvektor vorzugsweise zusätzlich eine interne Ribosomenbindungsstelle (IRES), welche die biostronische Expression des Gens, das für ein fluoreszierendes Protein kodiert, und des Gens von Interesse ermöglicht.

[0014] Die Erfindung betrifft auch Basisvektoren, die anstelle des Gens von Interesse eine multiple Klonierungsstelle zum Einbau eines solchen Gens aufweisen, d.h. einen Sequenzbereich mit multiplen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen.

[0015] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung sind Wirtszellen, die mit einem der genannten Expressionsvektoren transfiziert worden sind. Hierbei handelt es sich um eukaryontische Wirtszellen, vorzugsweise Säugerzellen, wobei Nagerzellen wie Hamsterzellen und insbesondere CHO-Zellen oder BHK-Zellen besonders bevorzugt sind.

[0016] Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines heterologen Genprodukts, bei dem eine mit dem erfindungsgemäßen Expressionsvektor transfizierte Wirtszelle unter Bedingungen, die eine Expression des Genprodukts ermöglichen, kultiviert und das Genprodukt aus der Kultur oder dem Kulturmedium isoliert wird.

[0017] In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird die Wirtszelle mit dem erfindungsgemäßen Expressionsvektor sowie zusätzlich mit einem oder mehreren Vektoren mit Genen, die für ein oder mehrere andere Proteine von Interesse kodieren, transfiziert, bevorzugt co-transfiziert.

[0018] In diesem Zusammenhang stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines heterodimeren Proteins zur Verfügung, bei dem man eine derartige Wirtszelle, die mit Expressionsvektoren, welche für unterschiedliche Untereinheiten des heterodimeren Proteins kodieren, co-transfiziert worden ist, unter Bedingungen, die eine Expression des heterodimeren Proteins ermöglichen, kultiviert und das heterodimere Protein aus der Kultur oder dem Kulturmedium isoliert. Ein spezieller Anwendungsfall für ein solches Verfahren ist die Herstellung von Antikörpern und deren Untereinheiten.

[0019] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Selektion einer Wirtszelle, die ein Protein von Interesse exprimiert, bei dem eine Population von Wirtszellen, die mit einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor transfiziert worden sind, unter Bedingungen kultiviert wird, die eine Expression des Proteins von Interesse und des fluoreszierenden Proteins ermöglichen, und die Zelle(n) identifiziert und/oder selektiert werden, welche die höchsten Expressionsraten an fluoreszierendem Protein zeigen. Die Selektion erfolgt dabei vorzugsweise mit Hilfe eines Fluoreszenz-aktivierten Zellsortiergeräts (FACS).

[0020] Es wurde überraschenderweise gefunden, dass mit dem erfindungsgemäß bereitgestellten System in kürzester Zeit Zellpools isoliert werden können, die ohne Genamplifikationsschritt durchschnittliche spezifische Produktivitäten von über 15 pg (einkettiges Protein) bzw. 10 pg (humanisierter Antikörper) rekombinantes Protein pro Zelle und Tag exprimieren. Durch einen einzigen DHFR-basierten Genamplifikationsschritt konnten die spezifischen Produktivitäten noch auf über 30 pg pro Zelle und Tag gesteigert werden. Die bei den Zellpools erzielten Produktivitäten liegen damit um den Faktor 8 bis 10 höher als die maximalen Produktivitäten der besten bisher publizierten Zellklone.

[0021] Erstaunlicherweise besteht auch eine sehr gute Korrelation zwischen der Expression des Proteins von Interesse und des fluoreszierenden Proteins. Diese ist sogar bei einer Co-Transfektion gegeben, wenn – wie im Fall eines exprimierten Antikörpers – beide Immunglobulinketten jeweils von einem eigenen Vektor exprimiert werden und bei der FACS-Sortierung nur auf die Expression der einen Kette, bedingt durch deren transkriptionelle Kopplung mit dem fluoreszierenden Protein, selektioniert werden kann. Die hohen Expressionsraten des fluoreszierenden Proteins haben dabei keinerlei negativen Einfluss auf Zellwachstum und -vitalität. Zudem kann die Entwicklungszeit zur Selektion von hochproduzierenden Zellen im Vergleich zu einer konventionellen stufenweisen Genamplifikationsstrategie zumindest um die Hälfte reduziert werden, einhergehend mit einer signifikanten Reduktion der Entwicklungskapazitäten und -kosten.

Beschreibung der Abbildungen

[0022] **Abb. 1** zeigt einen Vergleich der erzielten Expressionslevel von rekombinanten Zellklonen, in denen das heterologe Genprodukt entweder unter der Kontrolle des CMV-Promotors oder unter der des Hamster-Ubiquitin/S27a-Promotors exprimiert wird. Beide Promotoren sind dabei funktionell mit dem CMV-Enhancer verknüpft und die Terminationssequenz, BGH poly A, ist in allen Fällen identisch. Im Fall von CMV¹ handelt es sich um einen pcDNA3- (Invitrogen, Kalsruhe, DE), in CMV² um einen pBluescript- (Stratagene, La Jolla, CA, US) und bei CHO um einen pAD-CMV-basierten Expressionsvektor (Werner et al., 1998). Bei der Expression des lysosomalen Enzyms enthalten sämtliche Expressionsvektoren den amplifizierbaren Selektionsmarker Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) und die Expression des heterologen Gens wurde durch nachfolgende Amplifikati-

onsschritte mit Methotrexat (MTX) gesteigert. Zur Expression der beiden Ketten des Antikörpers (Ak) wurde eine Co-Transfektion mit einem zweiten Vektor, der als Selektionsmarker ein Neomycin-Resistenzgen enthält, durchgeführt. Die erzielten Titer bzw. spezifischen Produktivitäten sind in Relation zur CMV Promotor-basierten Expression, die als 1 gesetzt wurde (CMV¹ für Enzym, CMV² für Ak), angegeben.

[0023] **Abb. 2** zeigt eine schematische Darstellung der Basisvektoren, die zur Expression der rekombinanten Proteine in CHO-DG44 Zellen verwendet wurden. Bei „P/E“ handelt es sich um eine Kombination aus CMV-Enhancer und Hamster-Ubiquitin/S27a-Promotor, bei „P“ lediglich um ein Promotorelement und bei „T“ um ein Terminationssignal für die Transkription, das zur Polyadenylierung der transkribierten mRNA benötigt wird. Die Position und Richtung der Transkriptionsinitiation innerhalb jeder Transkriptionseinheit wird durch einen Pfeil angezeigt. Zur Klonierung der heterologen Gene ist nach dem Promotorelement ein Sequenzbereich mit multiplen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen (multiple cloning sites – mcs) eingefügt. Der amplifizierbare Selektionsmarker Dihydrofolat-Reduktase ist mit „dhfr“ und der Selektionsmarker Neomycin-Phosphotransferase mit „neo“ abgekürzt. Das aus dem Encephalomyocarditis-Virus stammende IRES-Element dient als interne Ribosomenbindungsstelle innerhalb der bicistronischen Transkriptionseinheit und ermöglicht die Translation des nachfolgenden grünen fluoreszierenden Proteins „GFP“.

[0024] **Abb. 3** zeigt eine schematische Darstellung der eukaryontische Expressionsvektoren, die jeweils für ein biopharmazeutisches Protein kodieren und zur Transfektion von CHO-DG44 Zellen eingesetzt wurden. Bei „P/E“ handelt es sich um eine Kombination aus CMV-Enhancer und Hamster Ubiquitin/S27a Promotor, bei „P“ lediglich um ein Promotorelement und bei „T“ um ein Terminationssignal für die Transkription, das zur Polyadenylierung der transkribierten mRNA benötigt wird. Die Position und Richtung der Transkriptionsinitiation innerhalb jeder Transkriptionseinheit wird durch einen Pfeil angezeigt. Der amplifizierbare Selektionsmarker Dihydrofolat-Reduktase ist mit „dhfr“ und der Selektionsmarker Neomycin-Phosphotransferase mit „neo“ abgekürzt. Das aus dem Encephalomyocarditis-Virus stammende IRES-Element dient als interne Ribosomenbindungsstelle innerhalb der bicistronischen Transkriptionseinheit und ermöglicht die Translation des nachfolgenden grünen fluoreszierenden Proteins „GFP“. „sICAM“ kodiert für das lösliche intrazelluläre Adhäsionsmolekül (US 5,412,216), wohingegen „F19HC“ und „F19LC“ für die schwere bzw. leichte Kette des humanisierten Antikörpers F19 kodieren (EP 953 639).

[0025] **Abb. 4** zeigt die Korrelation zwischen der sICAM-Produktivität und der GFP-Fluoreszenz am Beispiel des Zellpools ZB1. Dieser Zellpool wurde aus der Transfektion mit dem Vektor pBIDG-sICAM erhalten, bei dem das therapeutische Protein sICAM und GFP gemeinsam von einer bicistronischen Transkriptionseinheit exprimiert werden. Der Pool wurde einem sequentiellen GFP-basierten FACS-Sortierung unterzogen. Nach jedem Sortierungsschritt (Sort) wurde die Konzentration des sICAMs im Zellkulturüberstand des Pools durch ELISA ermittelt und die spezifische Produktivität pro Zelle und Tag (pg/c*d) berechnet. Jeder Datenpunkt stellt dabei den Durchschnitt aus mindestens drei Kultivierungspassagen dar. Insgesamt wurden sechs Sorts durchgeführt.

[0026] **Abb. 5** zeigt die Isolierung von hochexprimierenden sICAM Zellen durch GFP-basierte FACS-Sortierung am Beispiel des Zellpools ZB1. Dieser Zellpool wurde aus der Transfektion mit dem Vektor pBIDG-sICAM erhalten, bei dem das therapeutische Protein sICAM und GFP gemeinsam von einer bicistronischen Transkriptionseinheit exprimiert werden. Der Pool wurde einer sequentiellen GFP-basierten FACS-Sortierung unterzogen. Nach jedem Sort wurde die Konzentration des sICAMs im Zellkulturüberstand des Pools durch ELISA ermittelt und die spezifische Produktivität pro Zelle und Tag (pg/c*d) berechnet. Jeder Datenpunkt stellt dabei den Durchschnitt aus mindestens drei Kultivierungspassagen dar. Insgesamt wurden sechs Sorts durchgeführt.

[0027] **Abb. 6** zeigt die durch Kombination einer GFP-basierten Selektion mit einem MTX-Amplifikations-schritt erzielten Steigerungen in der sICAM-Produktivität am Beispiel des Zellpools ZB1. Dieser Zellpool, der aus der Transfektion mit dem Vektor pBIDG-sICAM erhalten wurde, wurde einer sequentiellen GFP-basierten FACS-Sortierung unterzogen. Nach dem vierten Sort bzw. sechsten Sort wurde eine DHFR-vermittelte Genamplifikation durch Zusatz von Methotrexat (MTX) zum Kultivierungsmedium durchgeführt (5 nM, 50 nM, 500 nM oder 2 µM MTX). Die Konzentration des sICAMs im Zellkulturüberstand des Pools wurde durch ELISA ermittelt und die spezifische Produktivität pro Zelle und Tag (pg/c*d) berechnet. Jeder Datenpunkt stellt dabei den Durchschnitt aus mindestens drei Kultivierungspassagen dar.

[0028] **Abb. 7** zeigt den Viabilitätsverlauf von Zellpools nach Zugabe von unterschiedlichen hohen Dosen an Methotrexat zum Kultivierungsmedium. Der Zellpool ZB1, der aus der Transfektion mit dem Vektor pBIDG-sICAM (**Abb. 3**) erhalten wurde, wurde einer sequentiellen GFP-basierten FACS-Sortierung unterzogen. Nach dem vierten Sort bzw. sechsten Sort wurde eine DHFR-vermittelte Genamplifikation durch Zusatz von Methotrexat (MTX) zum Kultivierungsmedium durchgeführt. Die Zellzahlen sowie die Viabilität wurden während der Selektionsphase durch Trypanblau-Färbung bestimmt und über mehrere Kultivierungstage (dic) hinweg verfolgt.

[0029] **Abb. 8** zeigt die Korrelation zwischen der Antikörper-Produktivität (mAk F19) und der GFP-Fluoreszenz am Beispiel des Zellpools ZB1. Dieser Zellpool wurde aus der Transfektion mit der Vektorkombination

pBIDG-F19HC und pBIN-F19LC (**Abb. 3**) erhalten. Der Pool wurde einer sequentiellen GFP-basierten FACS-Sortierung unterzogen. Nach jedem Sort wurde die Konzentration des Antikörpers F19 im Zellkulturüberstand des Pools durch ELISA ermittelt und die spezifische Produktivität pro Zelle und Tag (pg/c*d) berechnet. Jeder Datenpunkt stellt dabei den Durchschnitt aus mindestens drei Kultivierungspassagen dar. Insgesamt wurden sechs Sorts durchgeführt.

[0030] **Abb. 9** zeigt die Isolierung von hochexprimierenden mAk F19 Zellpools durch eine GFP-basierte Selektion mittels FACS am Beispiel des Zellpools ZB1. Dieser Zellpool, der aus der Co-Transfektion mit den Vektoren pBIDG-F19HC und pBIN-F19LC (**Abb. 3**) erhalten wurde, wurde einem sequentiellen GFP-basierten FACS-Sorting unterzogen. Die Konzentration des Antikörpers F19 im Zellkulturüberstand des Pools wurde nach jedem Sort durch ELISA ermittelt und die spezifische Produktivität pro Zelle und Tag (pg/c*d) berechnet. Jeder Datenpunkt stellt dabei den Durchschnitt aus mindestens drei Kultivierungspassagen dar.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung und bevorzugte Ausführungsformen

[0031] Der erfindungsgemäße Expressionsvektor enthält ein Gen, das für ein Protein von Interesse kodiert („Gen von Interesse“), in funktioneller Verknüpfung mit einem Hamster-Ubiquitin/S27a-Promotor und einem Gen, das für ein fluoreszierendes Protein kodiert. Vorzugsweise enthält der Expressionsvektor noch ein amplifizierbares Selektionsmarkergen.

Hamster-Ubiquitin/S27a-Promotor

[0032] sDer Ubiquitin/S27a-Promotor des Hamsters ist ein starker homologer Promotor, der in der WO 97/15664 beschrieben ist. Ein solcher Promotor weist vorzugsweise mindestens eines der folgenden Merkmale auf: GC-reicher Sequenzbereich, Sp1-Bindungsstelle, Polypyrimidinelement, Abwesenheit einer TATA-Box. Besonders bevorzugt ist ein Promotor, der eine Sp1-Bindungsstelle bei Abwesenheit einer TATA-Box aufweist. Ferner ist ein solcher Promotor bevorzugt, der konstitutiv aktiviert ist und insbesondere unter serumhaltigen, serumarmen und serumfreien Zellkulturbedingungen gleichermaßen aktiv ist. In einer anderen Ausführungsform handelt es sich um einen induzierbaren Promotor, insbesondere um einen Promotor, der durch Serumentzug aktiviert wird.

[0033] Eine besonders vorteilhafte Ausführungsform ist ein Promotor mit einer Nukleotidsequenz, die in **Fig. 5** der WO 97/15664 enthalten ist. Besonders bevorzugt sind dabei Promotorsequenzen, in denen die Sequenz von Position -161 bis -45 von **Fig. 5** enthalten ist.

[0034] Die in den Beispielen der vorliegenden Patentbeschreibung verwendeten Promotoren beinhalten jeweils ein DNA-Molekül mit der Sequenz von Position 1923 bis 2406 der SEQ ID NO: 1 des beiliegenden Sequenzprotokolls. Diese Sequenz entspricht dem Fragment -372 bis +111 aus **Fig. 5** der WO 97/15664 und repräsentiert den bevorzugten Promotor, d.h. ein bevorzugter Promotor sollte diesen Sequenzbereich umfassen. Ein anderer geeignetes Promotorfragment enthält die Sequenz von Position 2134 bis 2406 (entspricht -161 bis +111 in **Fig. 5** der WO 97/15664). Ein Promotor, der lediglich die Sequenz von Position 2251 bis 2406 beinhaltet, ist nicht mehr funktionsfähig (entspricht Position -45 bis +111 in **Fig. 5** der WO 97/15664). Eine Verlängerung der Promotorsequenz in 5'-Richtung ausgehend von Position 2134 ist möglich.

[0035] Es können auch funktionelle Subfragmente der vollständigen Hamster-Ubiquitin/S27a-Promotorsequenz sowie funktionelle Mutanten/Varianten der vollständigen Sequenz oder Subfragmente hiervon eingesetzt werden, die z.B. durch Substitutionen, Insertionen oder Deletionen modifiziert worden sind. Entsprechende Subfragmente, Mutanten oder Varianten werden nachfolgend auch als „modifizierter Promotor“ bezeichnet.

[0036] Ein modifizierter Promotor, gegebenenfalls kombiniert mit weiteren regulatorischen Elementen, weist vorzugsweise eine Transkriptionsaktivität auf, die der des Promotorfragments von Position 1923 bis 2408 der in SEQ ID NO: 1 angegebenen Nukleotidsequenz (-372 bis +111 aus **Fig. 5** der WO 97/15664) entspricht. Ein modifizierter Promotor erweist sich als tauglich im Sinne der Erfindung, wenn er über eine Transkriptionsaktivität verfügt, die mindestens 50%, besser mindestens 80%, noch besser mindestens 90%, und noch mehr bevorzugt mindestens 100% der Aktivität des 1923 bis 2406 Fragments (-372 bis +111 Fragments) in einem vergleichenden Reporteragen-Assay aufweist. Insbesondere bevorzugt sind modifizierte Promotoren, die eine minimale Sequenzhomologie zur Wildtyp-Sequenz SEQ ID NO:1 des Hamster-Ubiquitin/S27a-Promotors von mindestens 80%, besser mindestens 85%, bevorzugt mindestens 90%, weiter bevorzugt mindestens 95% und besonders bevorzugt mindestens 97% aufweisen und über eine entsprechende Promotoraktivität in einem vergleichenden Reporteragen-Assay verfügen.

[0037] In einem entsprechenden vergleichenden Reporteragen-Assay werden die zu testenden Promotorfragmente einschließlich der Referenzsequenz jeweils vor ein promotorloses Reporteragen kloniert, das z.B. für Luciferase, sezernierte Alkalische Phosphatase oder grünes fluoreszierendes Protein (GFP) kodiert. Diese Konstrukte (Promotorsequenz + Reporteragen) werden anschließend in die Testzellen, z.B. CHO-DG44, mittels Transfektion eingeführt und die Induktion der Reporteragenexpression durch das jeweilige Promotorfragment

über die Bestimmung des Proteingehalts des Reportergens ermittelt. Ein entsprechender Test findet sich beispielhaft auch in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, 1994, updated.

[0038] Die Promotorsequenz des Hamster-Ubiquitin/S27a-Promotors sowie die modifizierter Promotoren, die z.B. auch die 5'-untranslatierte Region bzw. ausgewählte Fragmente hiervon umfassen können, und die kodierende Region des Ubiquitin/S27a-Gens bzw. ausgewählte Fragmente hiervon, können von einem Fachmann in Kenntnis der in der WO 97/15664 beschriebenen Sequenz mit verschiedenen Standardmethoden erhalten werden, wie z.B. in Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1994 beschrieben. Ausgehend von der in WO 97/15664 beschriebenen Sequenz kann beispielsweise ein geeigneter Abschnitt ausgewählt und eine Oligonukleotid-Sonde chemisch synthetisiert werden, die die Sequenz dieses Abschnitts enthält. Mit einer solchen Sonde kann z.B. durch Hybridisierung aus einer genomischen Bibliothek des Hamsters das Ubiquitin/S27a-Gen bzw. dessen 5'-untranslatierte Region oder sonstige Fragmente kloniert werden. Mittels des oben beschriebenen Reportergen-Assays ist der Fachmann in der Lage, ohne erheblichen Aufwand promotoraktive Fragmente zu identifizieren und im Sinne der vorliegenden Erfindung zu verwenden. Die 5'-untranslatierte Region bzw. spezielle Fragmente davon können auch leicht durch PCR-Amplifikation mit entsprechenden Primern aus genomischer DNA oder einer genomischen Bibliothek erhalten werden. Fragmente der 5'-untranslatierten Region können auch durch limitierten Exonuklease III-Verdau aus größeren DNA-Fragmenten erhalten werden. Solche DNA-Moleküle können auch chemisch synthetisiert oder aus chemisch synthetisierten Fragmenten durch Ligation erzeugt werden.

[0039] Deletions-, Insertions- und Substitutionsmutanten lassen sich mittels „ortsspezifischer Mutagenese“ und/oder „PCR-basierter Mutagenese-Techniken“ erzeugen. Entsprechende Methoden sind beispielhaft in Lottspeich und Zorbas (1998) (Kapitel 36.1), mit weiteren Verweisen, aufgeführt.

[0040] Es ist auch möglich über Kreuzhybridisierung mit Sonden aus dem 5'-untranslatierten Bereich des Hamster-Ubiquitin/S27a-Gens oder aus dem S27a-Anteil des Hamster-Ubiquitin/S27a-Gens geeignete Promotorsequenzen aus korrespondierenden homologen Genen anderer, bevorzugt Säugerspezies, zu identifizieren und zu isolieren. Entsprechende Techniken sind beispielhaft in Lottspeich und Zorbas (1998) (Kapitel 23) beschrieben. „Homolog“ im Sinne der Erfindung sind Gene, sofern ihre Nukleotidsequenz mindestens 70%, besser mindestens 80%, bevorzugt mindestens 90%, weiter bevorzugt mindestens 95% und besonders bevorzugt mindestens 97% Übereinstimmung mit der Nukleotidsequenz des Gens zeigt, zu dem es homolog ist.

Gen von Interesse

[0041] Das im erfindungsgemäßen Expressionsvektor enthaltene Gen von Interesse umfasst eine Nukleotidsequenz beliebiger Länge, die für ein Produkt von Interesse kodiert. Das Genprodukt oder auch „Produkt von Interesse“ ist in der Regel ein Protein, Polypeptid, Peptid bzw. Fragment oder Derivat davon. Es kann aber auch RNA oder antisense RNA sein. Das Gen von Interesse kann in voller Länge, in verkürzter Form, als Fusionsgen oder markiertes Gen vorliegen. Es kann sich um genomische DNA oder vorzugsweise cDNA bzw. entsprechende Fragmente oder Fusionen handeln. Das Gen von Interesse kann die native Gensequenz darstellen, mutiert oder auf sonstige Weise modifiziert sein. Derartige Modifikationen schließen Codon-Optimierungen zur Anpassung an eine bestimmte Wirtszelle und eine Humanisierung ein. Das Gen von Interesse kann z.B. für ein sekretiertes, zytoplasmatisches, kernlokalisiertes, membrangebundenes oder zelloberflächengebundenes Polypeptid kodieren.

[0042] Der Ausdruck „Nukleotidsequenz“ oder „Nukleinsäuresequenz“ bezeichnet ein Oligonukleotid, Nukleotide, Polynukleotide und deren Fragmente sowie DNA oder RNA genomischen oder synthetischen Ursprungs, die als Einzel- oder Doppelstrang vorliegen und den kodierenden oder den nicht-kodierenden Strang eines Gens repräsentieren kann. Zur Modifikation von Nukleinsäuresequenzen können Standardtechniken, wie z.B. ortsspezifische Mutagenese oder PCR-vermittelte Mutagenese (z.B. in Sambrook et al., 1989 oder Ausubel et al., 1994 beschrieben), eingesetzt werden.

[0043] Unter „kodieren“ versteht man die Eigenschaft oder Fähigkeit einer spezifischen Sequenz von Nukleotiden in einer Nukleinsäure, beispielsweise einem Gen in einem Chromosom oder einer mRNA, als Matrize für die Synthese von anderen Polymeren und Makromolekülen wie z.B. rRNA, tRNA, mRNA, anderen RNA-Molekülen, cDNA oder Polypeptiden in einem biologischen Prozess zu dienen. Demnach kodiert ein Gen für ein Protein, wenn durch Transkription und nachfolgende Translation der mRNA das gewünschte Protein in einer Zelle oder einem anderen biologischen System produziert wird. Sowohl der kodierende Strang, dessen Nukleotidsequenz identisch mit der mRNA-Sequenz ist und normalerweise auch in Sequenzdatenbanken, z.B. EMBL oder GenBank, angegeben wird, als auch der als Matrize für die Transkription dienende nicht-kodierende Strang eines Gens oder cDNA kann dabei als kodierend für ein Produkt oder Protein bezeichnet werden. Eine Nukleinsäure, die für ein Protein kodiert, schließt auch Nukleinsäuren mit ein, die auf Grund des degenerierten genetischen Codes eine andere Nukleotidsequenzabfolge aufweisen, aber in der gleichen Aminosäuresequenz des Proteins resultieren Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine kodieren, können auch Introns

enthalten.

[0044] Mit dem Ausdruck „cDNA“ werden Desoxyribonukleinsäuren bezeichnet, die durch reverse Transkription und Synthese des zweiten DNA-Strangs aus einer von einem Gen produzierten mRNA oder anderen RNA hergestellt werden. Liegt die cDNA als doppelsträngiges DNA-Molekül vor, dann enthält sie sowohl einen kodierenden als auch einen nicht-kodierenden Strang.

[0045] Mit dem Ausdruck „Intron“ werden nicht-kodierende Nukleotidsequenzen beliebiger Länge bezeichnet. Sie kommen natürlicherweise in vielen eukaryontischen Genen vor und werden von einem zuvor transkribierten mRNA-Vorläufer durch einen als Spleissen bezeichneten Prozess entfernt. Hierfür ist ein exaktes Herausschneiden des Introns am 5'- und 3'-Ende und eine korrekte Verbindung der entstehenden mRNA-Enden erforderlich, damit eine reife prozessierte mRNA mit dem für die erfolgreiche Proteinsynthese richtigen Leseraster hergestellt wird. Viele der an diesem Spleissing-Prozess beteiligten Spleiss-Donor- und Spleiss-Akzeptor-Stellen, das sind die unmittelbar an den Exon-Intron- bzw. Intron-Exon-Grenzen vorliegenden Sequenzen, sind mittlerweile charakterisiert worden. Für einen Überblick siehe Ohshima et al., 1987.

Protein von Interesse

[0046] Biopharmazeutisch bedeutsame Proteine/Polypeptide umfassen z.B. Antikörper, Enzyme, Cytokine, Lymphokine, Adhäsionsmoleküle, Rezeptoren sowie deren Derivate bzw. Fragmente, sind aber nicht auf diese beschränkt. Im allgemeinen sind alle Polypeptide bedeutsam, die als Agonisten oder Antagonisten wirken und/oder therapeutische oder diagnostische Anwendung finden können.

[0047] Der Ausdruck „Polypeptide“ wird für Aminosäuresequenzen oder Proteine verwendet und bezeichnet Polymere von Aminosäuren beliebiger Länge. Dieser Ausdruck schließt auch Proteine ein, die posttranslational durch Reaktionen wie beispielsweise Glykosylierung, Phosphorylierung, Acetylierung oder Proteinprozessierung modifiziert werden. Die Struktur des Polypeptids kann z.B. durch Substitutionen Deletionen oder Insertion von Aminosäuren, Fusion mit anderen Proteinen: unter Beibehaltung seiner biologischen Aktivität modifiziert werden.

[0048] Beispiele für therapeutische Proteine sind Insulin, Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor, humanes Wachstumshormon (hGH) und andere Wachstumsfaktoren, Gewebeplasminogenaktivator (tPA), Erythropoetin (EPO), Cytokine, beispielsweise Interleukine (IL) wie IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, Interferon (IFN)-alpha, beta, gamma, omega oder tau, Tumornekrosefaktor (TNF) wie z.B. TNF-alpha, beta oder gamma, TRAIL, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, MCP-1 und VEGF. Weitere Beispiele sind monoklonale, polyklonale, multispezifische und einzelkettige (single chain) Antikörper und Fragmente davon, wie z.B. Fab, Fab', F(ab')₂, Fc und Fc'-Fragmente, leichte (L) und schwere (H) Immunglobulinketten und deren konstante, variable oder hypervariable Regionen sowie Fv- und Fd-Fragmente (Chamov et al., 1999). Die Antikörper können humanen oder nicht-humanen Ursprungs sein. Auch humanisierte und chimäre Antikörper kommen in Frage.

[0049] Fab-Fragmente (Fragment antigen-binding = Fab) bestehen aus den variablen Regionen beider Ketten, die durch die angrenzenden konstanten Regionen zusammengehalten werden. Sie können z.B. durch Behandlung mit einer Protease, wie beispielsweise Papain, aus konventionellen Antikörpern erzeugt werden oder aber auch durch DNA-Klonierung. Weitere Antikörperfragmente sind F(ab')₂-Fragmente, die durch proteolytischen Verdau mit Pepsin hergestellt werden können.

[0050] Durch Genklonierung können auch verkürzte Antikörperfragmente hergestellt werden, die nur aus den variablen Region der schweren (VH) und der leichten Kette (VL) bestehen. Diese werden als Fv-Fragmente (Fragment variable = Fragment des variablen Teils) bezeichnet. Da bei diesen Fv-Fragmenten die kovalente Verbindung über die Cysteinreste der konstanten Ketten nicht möglich ist, werden diese Fv-Fragmente oft anderweitig stabilisiert. Dazu werden die variablen Region der schweren und leichten Kette häufig mittels eines kurzen Peptidfragments von ca. 10 – 30 Aminosäuren besonders bevorzugt 15 Aminosäuren, miteinander verknüpft. Auf diese Weise entsteht eine einzelne Polypeptidkette, in der VH und VL durch einen Peptidlinker miteinander verbunden sind. Solche Antikörperfragmente werden auch als single-chain Fv-Fragment (scFv) bezeichnet. Beispiele von scFv-Antikörpern sind bekannt und beschrieben, siehe z.B. Huston et al. (1988).

[0051] In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Strategien entwickelt um multimere scFv-Derivate herzustellen. Die Intention besteht in der Erzeugung von rekombinanten Antikörpern mit verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften und verstärkter Bindungsavidität. Zur Erreichung der Multimerisierung der scFv-Fragmente werden diese als Fusionsproteine mit Multimerisierungsdomänen hergestellt. Als Multimerisierungsdomänen können dabei z.B. die CH3-Region eines IgGs oder Helixstrukturen („coiled coil structure“) wie die Leucin-Zipper-Domänen fungieren. In anderen Strategien wird die Interaktion zwischen den VH- und VL-Regionen des scFv-Fragments für eine Multimerisierung genutzt (z.B. Dia-, Tri- und Pentabodies).

[0052] Als „Diabody“ bezeichnet ein Fachmann ein bivalentes homodimeres scFv-Derivat. Die Verkürzung des Peptidlinkers im scFv-Moleküle auf 5 – 10 Aminosäuren resultiert in der Bildung von Homodimeren durch Überlagerung von VH/VL-Ketten. Die Diabodies können zusätzlich durch eingeführte Disulfidbrücken stabili-

siert werden. Beispiele von Diabodies finden sich in der Literatur, z.B. bei Perisic et al. (1994).

[0053] Als „Minibody“ bezeichnet der Fachmann ein bivalentes, homodimeres scFv-Derivat. Es besteht aus einem Fusionsprotein, das die CH3-Region eines Immunglobulins, vorzugsweise IgG, besonders bevorzugt IgG1, als Dimerisierungsregion enthält. Diese verbindet die scFv-Fragmente über eine Hinge-Region, ebenfalls von IgG, und eine Linker-Region. Beispiele solcher Minibodies sind bei Hu et al. (1996) beschrieben.

[0054] Mit „Triabody“ bezeichnet der Fachmann ein trivalentes homotrimeres scFv-Derivat (Kortt et al., 1997). Die direkte Fusion von VH-VL ohne Verwendung einer Linkersequenz führt zur Ausbildung von Trimeren.

[0055] Bei den vom Fachmann als Mini-Antikörper bezeichneten Fragmenten, die eine bi-, tri- oder tetravalente Struktur haben, handelt es sich ebenfalls um Derivate von scFv-Fragmenten. Die Multimersierung wird dabei über di-, tri- oder tetramere „coiled coil“-Strukturen erzielt (Pack et al., 1993 und 1995; Lovejoy et al., 1993).

Gen, das für ein fluoreszierendes Protein kodiert

[0056] Der erfindungsgemäße Expressionsvektor enthält ein für ein fluoreszierendes Protein kodierendes Gen in funktioneller Verknüpfung mit dem Gen von Interesse und unter der Kontrolle des Hamster-Ubiquitin/S27a-Promotors, eines modifizierten Hamster-Ubiquitin/S27a-Promotors oder eines Homologen hiervon.

[0057] Bei dem fluoreszierenden Protein kann es sich z.B. um ein grün, blaugrün, blau, gelb oder andersfarbig fluoreszierendes Protein handeln. Ein spezielles Beispiel ist das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus *Aequorea victoria* oder *Renilla reniformis* und daraus entwickelte Mutanten; siehe z.B. Bennet et al. (1998); Chalfie et al. (1994); WO 01/04306 und die dort zitierte Literatur.

[0058] Weitere fluoreszierende Proteine und dafür kodierende Gene sind in WO 00/34318, WO 00/34326, WO 00/34526 und WO 01/27150 beschrieben, die durch Bezugnahme hierin inkorporiert werden. Bei diesen fluoreszierenden Proteinen handelt es sich um Fluorophore von nicht-biolumineszierenden Organismen der Spezies Anthozoa, beispielsweise von *Anemonia majano*, *Clavularia* sp., *Zoanthus* sp. I, *Zoanthus* sp. II, *Discosoma striata*, *Discosoma* sp. „red“, *Discosoma* sp. „green“, *Discosoma* sp. „Magenta“, *Anemonia sulcata*.

[0059] Die erfindungsgemäß eingesetzten Fluoreszenzproteine beinhalten neben den Wildtyp-Proteinen auch natürliche oder gentechnologisch hergestellte Mutanten und -varianten, deren Fragmente, Derivate oder z.B. mit anderen Proteinen oder Peptiden fusionierte Varianten. Die eingebrachten Mutationen können dabei beispielsweise das Exzitations- oder Emissionsspektrum, die Chromophorenbildung, den Extinktionskoeffizienten oder die Stabilität des Proteins verändern. Durch Codon-Optimierung kann zudem die Expression in Säugerzellen oder anderen Spezies verbessert werden. Erfindungsgemäß kann das fluoreszierende Protein auch in Fusion mit einem Selektionsmarker, bevorzugterweise mit einem amplifizierbaren Selektionsmarker wie beispielsweise der Dihydrofolat-Reduktase (DHFR), eingesetzt werden.

[0060] Die von den fluoreszierenden Proteinen emittierte Fluoreszenz ermöglicht die Detektion der Proteine z.B. durch Durchflusszytometrie mit einem Fluoreszenzaktivierten Zellsortierer (FACS) oder durch Fluoreszenzmikroskopie.

Weitere regulatorische Elemente

[0061] Der Hamster-Ubiquitin/S27a-Promotor kann zur Steigerung/Regulierung der Transkriptionsaktivität in einer Expressionskassette in funktionellen Zusammenhang mit weiteren regulatorischen Sequenzen gebracht werden.

[0062] Beispielsweise kann der Promotor mit Enhancer-Sequenzen funktionell verknüpft werden, um die Transkriptionsaktivität zu steigern. Hierzu können ein oder mehrere Enhancer und/oder mehrere Kopien einer Enhancer-Sequenz verwendet werden, beispielsweise ein CMV- oder SV40-Enhancer.

[0063] Mit dem Ausdruck „Enhancer“ wird eine Polynukleotidsequenz bezeichnet, die in cis-Lokalisierung auf die Aktivität eines Promotors einwirkt und so die Transkription eines mit diesem Promotor funktionell verknüpften Gens stimuliert. Im Gegensatz zu Promotoren ist die Wirkung der Enhancer positions- und orientierungsunabhängig und können somit vor oder hinter eine Transkriptionseinheit, innerhalb eines Introns oder selbst innerhalb der Kodierregion positioniert werden. Der Enhancer kann dabei sowohl in unmittelbarer Nähe der Transkriptionseinheit als auch in beträchtlichem Abstand zum Promotor lokalisiert sein. Auch eine physikalische und funktionelle Überlappung mit dem Promotor ist möglich. Dem Fachmann sind eine Vielzahl von Enhancern aus verschiedenen Quellen bekannt (und in Datenbanken wie GenBank hinterlegt, z.B. SV40 Enhancer, CMV Enhancer, Polyoma Enhancer, Adenovirus Enhancer). und als eigenständige oder innerhalb von Polynukleotidsequenzen klonierte Elemente verfügbar (z.B. bei ATCC hinterlegt oder aus kommerziellen und individuellen Quellen). Eine Vielzahl von Promotorsequenzen beinhalten auch Enhancersequenzen, wie z.B. der häufig verwendete CMV Promotor. Der humane CMV-Enhancer gehört dabei zu den stärksten bisher identifizierten Enhancern. Ein Beispiel für einen induzierbaren Enhancer ist der Metallothionein-Enhancer, der durch Glucocorticoide oder Schwermetalle stimuliert werden kann.

[0064] Eine weitere mögliche Modifikation ist z.B. die Einführung multipler Sp1-Bindungsstellen. Die Promotorsequenzen können ferner mit regulatorischen Sequenzen kombiniert werden, die eine Steuerung/Regulierung der Transkriptionsaktivität gestatten. So kann der Promotor reprimierbar/induzierbar gemacht werden. Dies kann beispielsweise durch die Verknüpfung mit Sequenzen geschehen, die Bindungsstellen für positiv oder negativ regulierende Transkriptionsfaktoren darstellen. Der oben genannte Transkriptionsfaktor SP-1 beispielsweise hat einen positiven Einfluß auf die Transkriptionsaktivität. Ein weiteres Beispiel ist die Bindungsstelle für das Aktivatorprotein AP-1, das sowohl in positiver als auch in negativer Weise auf die Transkription einwirken kann. Die Aktivität des AP-1 kann durch verschiedenste Faktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokine und Serum, gesteuert werden (Faisst et al., 1992, und Referenzen darin). Die Transkriptionseffizienz kann auch dadurch gesteigert werden, dass die Promotorsequenz durch Mutation (Substitution, Insertion oder Deletion) von einer, zwei, drei oder mehr Basen verändert wird und dann in einem Reporter-Gen-Assay bestimmt wird, ob sich dadurch die Promotoraktivität erhöht.

[0065] Grundsätzlich umfassen die zusätzlichen regulatorischen Elemente andere Promotoren als den Hamster-Ubiquitin/S27a-Promotor, Enhancer, Terminations- und Polyadenylierungssignale und weitere Expressionskontrollelemente. Für die verschiedenen Zelltypen sind sowohl induzierbare als auch konstitutive regulatorische Sequenzen bekannt. „Transkriptionsregulatorische Elemente“ umfassen gewöhnlich einen Promotor stromaufwärts von der zu exprimierenden Gensequenz, Transkriptionsinitiations- und -terminationsstellen sowie ein Polyadenylierungssignal.

[0066] Als "Promotor" wird eine Polynukleotidsequenz bezeichnet, die die Transkription der mit ihr funktionell verknüpften Gene oder Sequenzen ermöglicht und kontrolliert. Ein Promotor enthält Erkennungssequenzen für die Bindung der RNA-Polymerase und die Initiationsstelle der Transkription (Transkriptionsinitiationsstelle). Zur Expression einer gewünschten Sequenz in einem bestimmten Zelltyp oder einer Wirtszelle muss jeweils ein geeigneter, funktionaler Promotor gewählt werden. Der Fachmann kennt eine Vielzahl von Promotoren aus verschiedenen Quellen, einschließlich konstitutiver, induzierbarer und reprimierbarer Promotoren. Sie sind in Datenbanken, z.B. GenBank, hinterlegt und können als eigenständige oder innerhalb von Polynukleotidsequenzen klonierte Elemente von kommerziellen oder individuellen Quellen bezogen werden. In induzierbaren Promotoren kann die Aktivität des Promotors in Reaktion auf ein Signal reduziert oder verstärkt werden. Ein Beispiel für einen induzierbaren Promotor stellt der Tetracyclin (tet)-Promotor dar. Dieser enthält Tetracyclin-Operatorsequenzen (tetO), die durch ein Tetracyclin-reguliertes Transaktivatorprotein (tTA) induziert werden können. In der Anwesenheit von Tetracyclin wird die Bindung von tTA an tetO inhibiert. Beispiele für weitere induzierbare Promotoren sind der jun-, fos-, Metallothionin- und Hitzeschockpromotor (siehe auch Sambrook et al., 1989; Gossen et al., 1994). Unter den Promotoren, die für eine hohe Expression in Eukaryonten besonders gut geeignet sind, befinden sich der SV40 early Promotor, der Adenovirus major late Promotor, der Maus Metallothionin-I Promotor, die lange terminale Repeatregion des Rous Sarcoma Virus und der early Promotor des humanen Cytomegalie-Virus. Beispiele für andere heterologe Säugerpromotoren sind der/die Aktin-, Immunglobulin-, oder Hitzeschockpromotor(en).

[0067] Der Ausdruck „Transkriptionsinitiationsstelle“ bezieht sich auf eine Nukleinsäure in dem Konstrukt, die der ersten Nukleinsäure entspricht, welche in das primäre Transkript, d.h. den mRNA-Precursor, inkorporiert wird. Die Transkriptionsinitiationsstelle kann mit den Promotorsequenzen überlappen.

[0068] Der Ausdruck „Transkriptionsterminationsstelle“ bezieht sich auf eine Nukleotidsequenz, die normalerweise am 3'-Ende des Gens von Interesse oder des zu transkribierenden Genabschnitts vorhanden ist und eine den Abbruch der Transkription durch RNA-Polymerase bewirkt.

[0069] Das „Polyadenylierungssignal“ ist eine Signalsequenz, welche die Spaltung an einer spezifischen Stelle am 3'-Ende der eukaryontischen mRNA und den posttranskriptionellen Einbau einer Sequenz von etwa 100-200 Adeninukleotiden (polyA-Schwanz) am gespaltenen 3'-Ende verursacht. Das Polyadenylierungssignal umfasst die Sequenz AATAAA etwa 10-30 Nukleotide stromaufwärts von der Spaltstelle sowie eine stromabwärts gelegene Sequenz. Es sind verschiedene Polyadenylierungselemente bekannt, z.B. tk polyA, SV40 late und early polyA oder BGH polyA (z.B. beschrieben in US 5,122,458).

[0070] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung verfügt jede Transkriptionseinheit über einen Promotor oder ein Promotor/Enhancer-Element, ein Gen von Interesse und/oder ein Markergen, sowie über ein Transkriptionsterminationselement. In einer weiter bevorzugten Ausführungsform enthält die Transkriptionseinheit weitere translationsregulatorische Einheiten.

[0071] „Translationsregulatorische Elemente“ umfassen eine Translationsinitiationsstelle (AUG), ein Stoppcodon und ein polyA-Signal für jedes zu exprimierende Polypeptid. Für eine optimale Expression kann es günstig sein, 5'- und/oder 3'-nichttranslatierte Bereiche der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz zu entfernen, hinzuzufügen oder zu ändern, um potentielle zusätzliche ungeeignete Translationsinitiationscodons oder andere Sequenzen, welche die Expression auf dem Niveau der Transkription oder Expression beeinträchtigen können, zu eliminieren. Um die Expression zu fördern, kann man alternativ ribosomale Konsensus-Bindungsstellen unmittelbar stromaufwärts vom Startcodon insertieren. Um ein sekretiertes Polypeptid zu produzieren, enthält das Gen von Interesse gewöhnlich eine Signalsequenz, welche für ein Signalvorläuferpeptid kodiert,

die das synthetisierte Polypeptid zu und durch die ER-Membran transportiert. Die Signalsequenz befindet sich oft, jedoch nicht immer, am Aminoterminus des sekretierten Proteins und wird durch Signal-Peptidasen abgespalten, nachdem das Protein durch die ER-Membran geschleust wurde. Die Gensequenz wird gewöhnlich, jedoch nicht notwendigerweise, eine eigene Signalsequenz enthalten. Wenn die native Signalsequenz nicht vorhanden ist, kann in bekannter Weise eine heterologe Signalsequenz eingeführt werden. Dem Fachmann sind zahlreiche solcher Signalsequenzen bekannt und in Sequenzdatenbanken wie GenBank und EMBL hinterlegt.

[0072] Ein erfindungsgemäß besonderes bedeutsames regulatorisches Element ist die interne Ribosomenbindungsstelle (IRES). Das „IRES-Element“ umfasst eine Sequenz, welche die Translationsinitiation unabhängig von einer 5'-terminalen Methylguanosiinukappe (CAP-Struktur) sowie dem stromaufwärts gelegenen Gen funktionell bewerkstelligt und in einer tierischen Zelle die Translation zweier Cistronen (offener Leseraster) von einem einzigen Transkript ermöglicht. Das IRES-Element stellt eine unabhängige Ribosomenbindungsstelle für die Translation des unmittelbar stromabwärts gelegenen offenen Leserasters zur Verfügung. Im Gegensatz zu bakterieller mRNA, die multicistronisch sein kann, d.h. für mehrere verschiedene Polypeptide oder Produkte kodieren kann, die nacheinander von der mRNA translatiert werden, sind die meisten mRNAs von Tierzellen monocistronisch und kodieren nur für ein einziges Protein oder Produkt. Bei einem multicistronischen Transkript in einer eukaryontischen Zelle würde die Translation von der stromaufwärts am nächsten gelegenen Translationsinitiationsstelle initiiert und vom ersten Stoppcodon beendet werden, worauf das Transkript aus dem Ribosom freigesetzt würde. Bei der Translation entstünde somit nur das erste von der mRNA kodierte Polypeptid oder Produkt. Dagegen ermöglicht ein multicistronisches Transkript mit einem IRES-Element, das mit dem zweiten oder weiteren offenen Leserastern in dem Transkript funktionell verknüpft ist, die anschließende Translation des stromabwärts gelegenen offenen Leserasters, so dass in der eukaryontischen Zelle zwei oder mehr, von demselben Transkript kodierte Polypeptide oder Produkte produziert werden.

[0073] Das IRES-Element kann von verschiedener Länge und von verschiedenem Ursprung sein und z.B. vom Encephalomyocarditisvirus (EMCV) oder anderen Picornaviren stammen. In der Literatur sind verschiedene IRES-Sequenzen und deren Anwendung bei der Konstruktion von Vektoren beschrieben worden; siehe z.B. Pelletier et al., 1988 et al., 1989; Davies et al., 1992; Adam et al., 1991; Morgan et al., 1992; Sugimoto et al., 1994; Ramesh et al., 1996; Mosser et al., 1997.

[0074] Die stromabwärts gelegene Gensequenz ist mit dem 3'-Ende des IRES-Elements funktionell verknüpft, d.h. der Abstand wird so gewählt, dass die Expression des Gens nicht oder nur marginal beeinflusst wird bzw. eine für den Zweck ausreichende Expression aufweist. Der optimale und zulässige Abstand zwischen dem IRES-Element und dem Startcodon des stromabwärts gelegenen Gens für eine noch ausreichende Expression lässt sich in einfachen Versuchen durch Variation des Abstands und Bestimmung der Expressionsrate als Funktion des Abstandes mit Hilfe von Reporter-Gen-Assays ermitteln.

[0075] Durch die geschilderten Maßnahmen kann eine optimierte Expressionskassette erhalten werden, die von hohem Nutzen für die Expression heterologer Genprodukte ist. Eine durch eine oder mehrere solcher Maßnahmen erhaltene Expressionskassette ist daher ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Amplifizierbares Selektionsmarkergen

[0076] Ein bevorzugter erfindungsgemäßer Vektor enthält zusätzlich ein amplifizierbares Selektionsmarkergen, das eine Amplifikation des amplifizierbaren Markergens und vorzugsweise die Co-Amplifikation einer Transkriptionseinheit, bestehend aus dem Hamster-Ubiquitin/S27a-Gen, dem Gen von Interesse und dem Gen für das fluoreszierende Protein, ermöglicht. Hierzu werden die mit einem entsprechenden Expressionsvektor transfizierten Wirtszellen in Gegenwart eines geeigneten Selektionsmittels kultiviert, so dass sich nur solche Wirtszellen vermehren (lassen), die über mehrere Genkopien zumindest des amplifizierbaren Selektionsmarkergens verfügen. Vorzugsweise wird dies durch eine stufenweise Kultivierung der Zellen in Gegenwart steigender Mengen an Selektionsmittel erreicht.

[0077] Das amplifizierbare Selektionsmarkergen kodiert gewöhnlich für ein Enzym, das für das Wachstum von eukaryontischen Zellen unter bestimmten Kultivierungsbedingungen erforderlich ist. Beispielsweise kann das amplifizierbare Selektionsmarkergen für Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) kodieren. In diesem Fall wird das Gen amplifiziert, wenn man eine damit transfizierte Wirtszelle in Gegenwart des Selektionsmittels Methotrexat (MTX) kultiviert.

[0078] In der folgenden Tabelle 1 sind Beispiele für weitere erfindungsgemäß verwendbare amplifizierbare Selektionsmarkergene und die dazugehörigen Selektionsmittel angegeben, die in einem Überblick bei Kaufman, *Methods in Enzymology*, 185:537-566 (1990) beschrieben sind.

Tabelle 1: Amplifizierbare Selektionsmarkergene

Amplifizierbares Selektionsmarkergen	Hinterlegungsnummer	Selektionsmittel
Dihydrofolat-Reduktase	M19869 (Hamster) E00236 (Maus)	Methotrexat (MTX)
Metallothionein	D10551 (Hamster) M13003 (Human) M11794 (Ratte)	Cadmium
CAD (Carbamoylphosphat-Synthetase : Aspartat-	M23652 (Hamster) D78586 (Human)	N-Phosphoacetyl-L-aspartat

Transcarbamylyase: Dihydroorotase)		
Adenosin-Deaminase	K02567 (Human) M10319 (Maus)	Xyl-A- oder Adenosin, 2'Deoxycoformycin
AMP (Adenylat)- Deaminase	D12775 (Human) J02811 (Ratte)	Adenin, Azaserin, Coformycin
UMP-Synthase	J03626 (Human)	6-Azaauridin, Pyrazofuran
IMP 5'-Dehydrogenase	J04209 (Hamster) J04208 (Human) M33934 (Maus)	Mycophenolsäure
Xanthin-Guanin- Phosphoribosyltransferase	X00221 (E. coli)	Mycophenolsäure mit limitierendem Xanthin
Mutanten-HGPRTase oder Mutanten-Thymidin-Kinase	J00060 (Hamster) M13542, K02581 (Human) J00423, M68489(Maus) M63983 (Ratte) M36160 (Herpes virus)	Hypoxanthin, Aminopterin, und Thymidin (HAT)
Thymidylat-Synthetase	D00596 (Human) M13019 (Maus) L12138 (Ratte)	5-Fluordeoxyuridin
P-Glycoprotein 170 (MDR1)	AF016535 (Human) J03398 (Maus)	mehrere Arzneistoffe, z.B. Adriamycin, Vincristin, Colchicin
Ribonukleotid-Reduktase	M124223, K02927 (Maus)	Aphidicolin
Glutamin-Synthetase	AF150961 (Hamster) U09114, M60803 (Maus) M29579 (Ratte)	Methioninsulfoximin (MSX)
Asparagin-Synthetase	M27838 (Hamster) M27396 (Human) U38940 (Maus) U07202 (Ratte)	β -Aspartyhydroxamat, Albizziin, 5'Azacytidin
Argininosuccinat- Synthetase	X01630 (Human) M31690 (Maus) M26198 (Rind)	Canavanin
Ornithin-Decarboxylase	M34158 (Human) J03733 (Maus) M16982 (Ratte)	α -Difluormethylornithin
HMG-CoA-Reduktase	L00183, M12705 (Hamster) M11058 (Human)	Compactin
N-Acetylglucosaminy- Transferase	M55621 (Human)	Tunicamycin
Threonyl-tRNA-Synthetase	M63180 (Human)	Borrelidin
Na ⁺ K ⁺ -ATPase	J05096 (Human) M14511 (Ratte)	Ouabain

[0079] Als amplifizierbares Selektionsmarkergen wird erfindungsgemäß ein Gen bevorzugt, das für ein Polypeptid mit der Funktion von DHFR kodiert, z.B. für DHFR oder ein Fusionsprotein aus dem fluoreszierenden Protein und DHFR. DHFR ist für die Biosynthese von Purinen erforderlich. Zellen, denen das DHFR-Gen fehlt, können in Purin-defizientem Medium nicht wachsen. Das DHFR-Gen ist deshalb ein nützlicher Selektionsmarker zur Selektion und Amplifikation von Genen in Zellen, die in Purinfreiem Medium kultiviert werden. Das Selektionsmittel, das in Verbindung mit dem DHFR-Gen verwendet wird, ist Methotrexat (MTX). Die vorliegende Erfindung schließt deshalb eine Methode zur Herstellung von hochproduzierenden rekombinanten Wirtszellen ein, wobei sie folgende Schritte enthält: (i) Transfektion der Wirtszellen mit Genen, die zumindest für ein Protein

von Interesse, ein fluoreszierendes Protein und DHFR kodieren, (ii) Kultivierung der Zellen unter Bedingungen, die eine Expression der verschiedenen Gene ermöglichen, und (iii) die Amplifikation dieser co-integrierten Gene durch Kultivierung der Zellen in Gegenwart eines Selektionsmittels, das die Amplifikation zumindest des amplifizierbaren selektionierbaren Markergens erlaubt, wie z.B. Methotrexat. Bevorzugt werden die transfizierten Zellen hierbei in Hypoxanthin/Thymidin-freiem Medium in der Abwesenheit von Serum und unter Zugabe steigender Konzentrationen an MTX kultiviert. Vorzugsweise beträgt die Konzentration an MTX bei dem ersten Amplifikationsschritt zumindest 200 nM, in einer noch mehr bevorzugten Ausführungsform zumindest 500 nM und kann stufenweise auf bis zu 1 µM gesteigert werden. Im Einzelfall können auch Konzentration von über 1 µM verwendet werden.

[0080] Säugerzellen, vorzugsweise Mausmyeloma- und Hamsterzellen, sind bevorzugte Wirtszellen für den Einsatz von DHFR als amplifizierbaren Selektionsmarker. Besonders bevorzugt sind die Zelllinien CHO-DUKX (ATCC CRL-9096) und CHO-DG44 (Urlaub et al., 1983), da sie bedingt durch Mutation keine eigene DHFR-Aktivität aufweisen. Um die DHFR-bedingte Amplifikation auch in anderen Zelltypen anwenden zu können, die über eine eigene endogene DHFR-Aktivität verfügen, kann bei der Transfektion ein mutiertes DHFR-Gen verwendet werden, das für ein Protein mit einer reduzierten Sensitivität gegenüber Methotrexat kodiert (Simonson et al., 1983; Wigler et al., 1980; Haber et al., 1982).

Herstellung erfindungsgemäßer Expressionsvektoren

[0081] Die Herstellung des erfindungsgemäßen Expressionsvektors kann grundsätzlich nach herkömmlichen, dem Fachmann geläufigen Methoden, wie z.B. bei Sambrook et al. (1989), beschrieben, erfolgen. Dort findet sich auch eine Beschreibung der funktionellen Komponenten eines Vektors, z.B. geeigneter Promotoren (zusätzlich zum Hamster-Ubiquitin/S27a-Promotor), Enhancer, Terminations- und Polyadenylierungssignale, Antibiotikaresistenzgene, Selektionsmarker, Replikationsstartpunkte und Spleissignale. Zur Herstellung können herkömmliche Klonierungsvektoren verwendet werden, z.B. Plasmide, Bacteriophagen, Phagemide, Cosmide oder virale Vektoren wie Baculovirus, Retroviren, Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren und Herpes simplex-Virus, aber auch künstliche Chromosomen/Mini-Chromosomen. Die eukaryontischen Expressionsvektoren enthalten typischerweise auch prokaryontische Sequenzen wie z.B. Replikationsursprung und Antibiotikaresistenzgene, die die Vermehrung und Selektion des Vektors in Bakterien ermöglichen. Eine Vielzahl von eukaryontischen Expressionsvektoren, die multiple Klonierungsstellen zur Einführung einer Polynukleotidsequenz enthalten, sind bekannt und einige sind kommerziell bei verschiedenen Firmen wie Stratagene; La Jolla, CA, USA; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; Promega, Madison, WI, USA oder BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA erhältlich.

[0082] Auf eine dem Fachmann geläufige Weise werden der Hamster-Ubiquitin/S27a-Promotor, das Gen von Interesse, das für ein fluoreszierendes Protein kodierende Gen, vorzugsweise auch das amplifizierbare Selektionsmarkergen, z.B. Dihydrofolat-Reduktase, sowie gegebenenfalls zusätzliche regulatorische Elemente wie die interne Ribosomenbindungsstelle (IRES), Enhancer oder ein Polyadenylierungssignal in den Expressionsvektor eingeführt. Ein erfindungsgemäßer Expressionsvektor enthält minimal einen Ubiquitin/S27a-Promotor, das Gen von Interesse, und das für ein fluoreszierendes Protein kodierende Gen. Vorzugsweise enthält der Expressionsvektor noch ein amplifizierbares Selektionsmarkergen. Erfindungsgemäß ist hierbei auch die Verwendung modifizierter Ubiquitin/S27a-Promotoren, z.B. wie die in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen modifizierten Ubiquitin/S27a-Promotoren. Besonders bevorzugt ist ein Expressionsvektor, bei dem der Ubiquitin-Promotor, das Gen von Interesse und das Gen, welches für ein fluoreszierendes Protein kodiert, funktionell miteinander verknüpft sind oder in funktioneller Verknüpfung stehen.

[0083] Im Rahmen der vorliegenden Beschreibung bezieht sich der Ausdruck „funktionelle Verknüpfung“ bzw. „funktionell verknüpft“ auf zwei oder mehr Nukleinsäuresequenzen oder -teilsequenzen, die so positioniert sind, dass sie ihre beabsichtigte Funktion ausüben können. Beispielsweise ist ein Promotor/Enhancer funktionell mit einer kodierenden Gensequenz funktionell verknüpft, wenn er in cis-Stellung die Transkription der verknüpften Gensequenz kontrollieren oder modulieren kann. Im Allgemeinen, jedoch nicht notwendigerweise, befinden sich funktionell verknüpfte DNA-Sequenzen in enger Nachbarschaft und, sofern zwei kodierende Gensequenzen verknüpft werden oder im Falle einer Sekretionssignalsequenz, im gleichen Leseraster. Obwohl sich ein funktionell verknüpfter Promotor im Allgemeinen stromaufwärts von der kodierenden Gensequenz befindet, muss er nicht notwendigerweise eng benachbart sein. Enhancer müssen ebenfalls nicht in enger Nachbarschaft vorliegen, solange sie die Transkription der Gensequenz begünstigen. Zu diesem Zweck können sie sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts von der Gensequenz vorliegen, gegebenenfalls in einigem Abstand. Eine Polyadenylierungsstelle ist funktionell mit einer Gensequenz verknüpft, wenn sie am 3'-Ende der Gensequenz derart positioniert ist, dass die Transkription über die kodierende Sequenz bis hin zum Polyadenylierungssignal fortschreitet. Die Verknüpfung kann nach üblichen rekombinanten Methoden erfolgen, z.B. mittels der PCR-Technik, durch Ligation an geeigneten Restriktionsschnittstellen oder durch Spleissen. Wenn keine geeigneten Restriktionsschnittstellen vorhanden sind, können in an sich bekannter

Weise synthetische Oligonukleotid-Linker oder Adaptoren verwendet werden. Erfindungsgemäß erfolgt die funktionelle Verknüpfung vorzugsweise nicht über Intronsequenzen.

[0084] In einer der beschriebenen Ausführungsformen sind Ubiquitin/S27a-Promotor bzw. eine modifizierte Form hiervon, das Gen von Interesse und das für ein fluoreszierendes Protein kodierende Gen funktionell miteinander verknüpft. Dies meint z.B. das sowohl das Gen von Interesse als auch das für ein fluoreszierendes Protein kodierende Gen ausgehend von dem selben Ubiquitin/S27a-Promotor bzw. einer modifizierten Form hiervon, exprimiert werden. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die funktionelle Verknüpfung über ein IRES-Element, so dass von beiden Genen eine bicistronische mRNA synthetisiert wird. Der erfindungsgemäße Expressionsvektor kann zusätzlich Enhancer-Elemente enthalten, die funktionell auf einen oder mehrere Promotoren wirken. Besonders bevorzugt ist ein Expressionsvektor, bei dem der Ubiquitin/S27a-Promotor bzw. eine modifizierte Form hiervon mit einem Enhancer-Element, z.B. einen SV40-Enhancer oder einem CMV-Enhancer-Element verknüpft ist.

[0085] Grundsätzlich kann die Expression der Gene innerhalb eines Expressionsvektors von einer oder mehreren Transkriptionseinheiten aus erfolgen. Als „Transkriptionseinheit“ wird dabei eine Region definiert, die ein oder mehr zu transkribierende Gene enthält. Dabei sind die Gene innerhalb einer Transkriptionseinheit funktionell derart miteinander verknüpft, dass alle Gene innerhalb einer solchen Einheit unter der transkriptionellen Kontrolle desselben Promotors oder Promotors/Enhancers stehen. Als Resultat dieser transkriptionellen Verknüpfung von Genen kann mehr als ein Protein oder Produkt von einer Transkriptionseinheit aus transkribiert und somit exprimiert werden. Jede Transkriptionseinheit enthält dabei die regulatorischen Elemente, die für die Transkription und die Translation der in ihr enthaltenen Gensequenzen erforderlich sind. Jede Transkriptionseinheit kann dabei die gleichen oder verschiedene regulatorische Elemente enthalten. Für die funktionelle Verknüpfung der Gene innerhalb einer Transkriptionseinheit können IRES-Elemente oder Introns verwendet werden.

[0086] Der Expressionsvektor kann eine einzige Transkriptionseinheit zur Expression des Gens von Interesse, des Gens für das Fluoreszenzprotein und des amplifizierbaren Selektionsmarker enthalten. Alternativ können diese Gene auch in zwei oder mehr Transkriptionseinheiten angeordnet sein. Dabei sind verschiedene Kombinationen der Gene innerhalb einer Transkriptionseinheit möglich. In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann mehr als ein Expressionsvektor, bestehend aus ein, zwei oder mehr Transkriptionseinheiten, in eine Wirtszelle durch Co-Transfektion oder in aufeinanderfolgenden Transfektionen in beliebiger Reihenfolge eingeführt werden. Jede Kombination von regulatorischen Elementen und Genen auf jedem Vektor kann gewählt werden, so lange eine ausreichende Expression der Transkriptionseinheiten gewährleistet ist. Falls erforderlich können weitere regulatorische Elemente und Gene, wie z.B. zusätzliche Gene von Interesse oder Selektionsmarker, auf den Expressionsvektoren positioniert werden.

[0087] Demnach kann der erfindungsgemäße Expressionsvektor das Gen, das für ein fluoreszierendes Protein kodiert, und das amplifizierbare Selektionsmarkergen in einer oder in zwei separaten Transkriptionseinheiten enthalten. Jede Transkriptionseinheit kann ein oder mehrere Genprodukte transkribieren und exprimieren. Wenn beide Gene in einer Transkriptionseinheit enthalten sind, stehen sie unter der Kontrolle desselben Promotors oder Promotors/Enhancers, wobei vorzugsweise ein IRES-Element verwendet wird, um die funktionelle Verknüpfung aller Komponenten zu gewährleisten. Wenn das Gen, das für ein fluoreszierendes Protein kodiert, und das amplifizierbare Selektionsmarkergen in zwei separaten Transkriptionseinheiten enthalten sind, können sie unter der Kontrolle desselben oder verschiedener Promotoren/Enhancer stehen. Vorzugsweise verwendet man jedoch für das Selektionsmarkergen seinen natürlichen oder einen schwächeren heterologen Promotor, z.B. den SV40 early Promotor, und setzt vorzugsweise auch keinen Enhancer ein. Expressionsvektoren mit zwei separaten Transkriptionseinheiten sind im Rahmen der Erfindung bevorzugt. Hierbei enthält die eine (bicistronische) Transkriptionseinheit das Gen von Interesse und das für ein fluoreszierendes Protein kodierende Gen, während die andere Transkriptionseinheit das amplifizierbare Selektionsmarkergen enthält. Vorzugsweise ist jede Transkriptionseinheit am 3'-Ende durch eine Sequenz begrenzt, die für ein polyA-Signal, vorzugsweise tk polyA, BGH polyA oder SV40 polyA kodiert.

[0088] Erfindungsgemäß sind auch solche Vektoren, die anstelle des Gens von Interesse lediglich eine multiple Klonierungsstelle aufweisen, die die Klonierung des Gens von Interesse über Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen ermöglicht. Im Stand der Technik sind zahlreiche Erkennungssequenzen für die verschiedensten Restriktionsendonukleasen, sowie die hierzu gehörigen Restriktionsendonukleasen bekannt. Bevorzugt werden Sequenzen verwendet, die aus zumindest 6 Nukleotiden als Erkennungssequenz bestehen. Eine Auflistung geeigneter Erkennungssequenzen finden sich beispielsweise in Sambrook et al. (1989).

Wirtszellen

[0089] Zur Transfektion mit dem erfindungsgemäßen Expressionsvektor werden eukaryontische Wirtszellen verwendet, vorzugsweise Säugerzellen und insbesondere Nagerzellen wie z.B. Mäuse-, Ratten- und Hamster-Zelllinien. Die erfolgreiche Transfektion der entsprechender Zellen mit einem erfindungsgemäßen Expres-

sionsvektor resultiert in transformierten, genetisch modifizierten, rekombinanten oder transgenen Zellen, die ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind.

[0090] Im Rahmen der Erfindung bevorzugte Wirtszellen sind Hamsterzellen wie z.B. BHK21, BHK TK, CHO CHO-K1, CHO-DUKX, CHO-DUKX B1 und CHO-DG44 Zellen oder Derivate/Abkömmlinge dieser Zelllinien. Besonders bevorzugt sind CHO-DG44, CHO-DUKX, CHO-K1 und BHK21 Zellen, insbesondere CHO-DG44 und CHO-DUKX Zellen. Ebenfalls geeignet sind Myelomzellen der Maus, vorzugsweise NS0 und Sp2/0 Zellen sowie Derivate/Abkömmlinge dieser Zelllinien.

[0091] Beispiele für Hamster- und Mäusezellen, die erfindungsgemäß angewandt werden können, sind in der folgenden Tabelle 2 angegeben. Aber auch Derivate und Abkömmlinge dieser Zellen, andere Säugerzellen, einschließlich aber nicht beschränkt auf Zelllinien von Mensch, Maus, Ratte, Affen, Nagetieren, oder eukaryontische Zellen, einschließlich aber nicht beschränkt auf Hefe-, Insekten- und Pflanzenzellen, können ebenfalls als Wirtszellen zur Produktion von biopharmazeutischen Proteinen verwendet werden.

Tabelle 2: Hamster- and Mäuse-Produktionszelllinien

Zelllinie	Hinterlegungsnummer
NS0	ECACC No. 85110503
Sp2/0-Ag14	ATCC CRL-1581
BHK21	ATCC CCL-10
BHK TK	ECACC No. 85011423

HaK	ATCC CCL-15
2254-62.2 (BHK-21-Derivat)	ATCC CRL-8544
CHO	ECACC No. 8505302
CHO-K1	ATCC CCL-61
CHO-DUKX (= CHO duk ⁻ , CHO/dhfr ⁻)	ATCC CRL-9096
CHO-DUKX B1	ATCC CRL-9010
CHO-DG44	Urlaub et al., Cell 33[2], 405-412, 1983
CHO Pro-5	ATCC CRL-1781
V79	ATCC CCC-93
B14AF28-G3	ATCC CCL-14
CHL	ECACC No. 87111906

[0092] Die Transfektion der eukaryontischen Wirtszellen mit einem Polynukleotid oder einem der erfindungsgemäßen Expressionsvektor erfolgt nach üblichen Methoden (Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1994). Geeignete Transfektionsmethoden sind z.B. die Liposomen-vermittelte Transfektion, Calciumphosphat-Copräzipitation, Elektroporation, Polykationen (z.B. DEAE-Dextran)-vermittelte Transfektion, Protoplastenfusion, Mikroinjektion und virale Infektionen. Erfindungsgemäß wird vorzugsweise eine stabile Transfektion durchgeführt, wobei die Konstrukte entweder in das Genom der Wirtszelle oder ein artifizielles Chromosom/Minichromosom integriert werden oder in stabiler Weise episomal in der Wirtszelle enthalten sind. Die Transfektionsmethode, die die optimale Transfektionsfrequenz und Expression des heterologen Gens in der jeweiligen Wirtszelle ermöglicht, ist dabei bevorzugt. Per Definition wird jede Sequenz oder jedes Gen, das in eine Wirtszelle eingebracht wird, in Bezug auf die Wirtszelle als „heterologe Sequenz“ oder „heterologes Gen“ bezeichnet. Selbst dann, wenn die einzubringende Sequenz oder das einzubringende Gen identisch zu einer endogenen Sequenz oder einem endogenen Gen der Wirtszelle ist. Beispielsweise ist ein Hamster-Aktingen, das in eine Hamster-Wirtszelle eingebracht wird, per Definition ein heterologes Gen.

[0093] Bei der rekombinanten Herstellung heterodimerer Proteine, wie z.B. monoklonaler Antikörper (mAk), kann die Transfektion geeigneter Wirtszellen prinzipiell auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Derartige mAk sind aus mehreren Untereinheiten, den schweren und leichten Ketten, aufgebaut. Für diese Untereinheiten kodierende Gene können in unabhängigen oder in multicistronischen Transkriptionseinheiten auf einem einzigen Plasmid untergebracht werden, mit dem dann die Wirtszelle transfiziert wird. Dies soll die stöchiometrische Repräsentanz der Gene nach Integration in das Genom der Wirtszelle sichern. Allerdings muss hierbei im Falle unabhängiger Transkriptionseinheiten sichergestellt werden, dass die mRNAs, die für die verschiedenen Proteine kodieren, die gleiche Stabilität, Transkriptions- und Translationseffizienz aufweisen. Im zweiten Fall erfolgt die Expression der Gene innerhalb einer multicistronischen Transkriptionseinheit durch einen einzigen Promotor und es entsteht nur ein Transkript. Durch Verwendung von IRES-Elementen wird eine recht

effiziente interne Translationsinitiation der Gene in dem zweiten und den nachfolgenden Cistrons ermöglicht. Dennoch sind die Expressionsraten für diese Cistrons geringer als die des ersten Cistrons, dessen Translationsinitiation über einen sogenannten „cap“-abhängigen Prä-Initiationskomplex wesentlich effizienter ist als die IRES-abhängige Translationsinitiation. Um eine tatsächlich äquimolare Expression der Cistrons zu erreichen, können beispielsweise noch zusätzliche intercistronische Elemente eingeführt werden, die im Zusammenwirken mit den IRES-Elementen für einheitliche Expressionsraten sorgen (WO 94/05785).

[0094] Eine andere und erfindungsgemäß bevorzugte Möglichkeit der simultanen Herstellung mehrerer heterologer Proteine ist die Co-Transfektion, bei der die Gene getrennt in verschiedene Expressionsvektoren integriert werden. Dies hat den Vorteil, dass bestimmte Verhältnisse der Gene und Genprodukte zueinander eingestellt werden können, wodurch Unterschiede in der mRNA-Stabilität sowie in der Transkriptions- und Translationseffizienz ausgeglichen werden können. Außerdem sind die Expressionsvektoren wegen ihrer geringeren Größe stabiler und sowohl bei der Klonierung als auch bei der Transfektion einfacher handhabbar.

[0095] In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung werden daher die Wirtszellen zusätzlich mit einem oder mehreren Vektoren mit Genen, die für ein oder mehrere andere Proteine von Interesse kodieren, transfiziert, bevorzugt co-transfiziert. Der oder die zur Co-Transfektion verwendeten weiteren Vektoren kodieren z.B. für das oder die anderen Proteine von Interesse unter der Kontrolle der gleichen Promotor/Enhancer-Kombination sowie für zumindest einen weiteren Selektionsmarker, beispielsweise Neomycin-Phosphotransferase.

[0096] Erfindungsgemäß werden die Wirtszellen vorzugsweise unter serumfreien Bedingungen etabliert, adaptiert und kultiviert, gegebenenfalls in Medien, die frei von tierischen Proteinen/Peptiden sind. Beispiele für im Handel erhältliche Medien sind Ham's F12 (Sigma, Deisenhofen, DE), RPMI-1640 (Sigma), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma), Minimal Essential Medium (MEM; Sigma), Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Sigma), CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, Ca., USA), CHO-S-SFMII (Invitrogen), serumfreies CHO-Medium (Sigma) und proteinfreies CHO-Medium (Sigma). Jedes dieser Medien kann gegebenenfalls mit verschiedenen Verbindungen ergänzt werden, z.B. Hormonen und/oder anderen Wachstumsfaktoren (z.B. Insulin, Transferrin, epidermale Wachstumsfaktor, Insulin-ähnlichem Wachstumsfaktor), Salzen (z.B. Natriumchlorid, Calcium, Magnesium, Phosphat), Puffern (z.B. HEPES), Nukleosiden (z.B. Adenosin, Thymidin), Glutamin, Glukose oder anderen äquivalenten Nährstoffen, Antibiotika und/oder Spurenelementen. Obwohl erfindungsgemäß serumfreie Medien bevorzugt sind, können zur Züchtung der Wirtszellen auch Medien verwendet werden, die mit einer geeigneten Menge an Serum versetzt wurden. Zur Selektion von genetisch modifizierten Zellen, die ein oder mehrere Selektionsmarkergene exprimieren, wird dem Medium ein oder mehrere geeignete Selektionsmittel zugefügt.

[0097] Als „Selektionsmittel“ wird eine Substanz bezeichnet, die das Wachstum oder das Überleben von Wirtszellen mit einer Defizienz für das jeweilige Selektionsmarkergene beeinträchtigt. Beispielsweise wird zur Selektion auf die Anwesenheit eines exprimierten Antibiotikaresistenzgens wie z.B. der Neomycin-Phosphotransferase das Antibiotikum Geneticin (G418) als Mediumzusatz verwendet. Das Selektionsmittel kann auch ein Stoff sein, der eine Amplifikation des Selektionsmarkergens auslöst, wenn es sich beim dem verwendeten Gen um einen amplifizierbaren Selektionsmarker handelt (siehe Tabelle 1). Methotrexat ist z.B. ein Selektionsmittel, das sich zur Amplifikation des DHFR-Gens eignet. Beispiele für andere amplifikationsauslösende Selektionsmittel sind in der Tabelle 1 aufgeführt.

[0098] Ein „Selektionsmarkergene“ ist ein Gen, das die spezifische Selektion von Zellen, die dieses Gen erhalten, durch Zugabe eines entsprechenden Selektionsmittels in das Kultivierungsmedium ermöglicht. Zur Verdeutlichung, ein Antibiotika-Resistenzgen kann als positiver Selektionsmarker verwendet werden. Nur Zellen, die mit diesem Gen transformiert wurden, können in der Gegenwart des entsprechenden Antibiotikums wachsen und somit selektioniert werden. Nichttransformierte Zellen hingegen können unter diesen Selektionsbedingungen nicht wachsen oder überleben. Es gibt positive, negative und bifunktionale Selektionsmarker. Positive Selektionsmarker ermöglichen die Selektion und damit Anreicherung von transformierten Zellen durch Vermittlung einer Resistenz gegenüber dem Selektionsmittel oder durch Kompensierung eines metabolischen oder katabolischen Defekts der Wirtszelle. Im Gegensatz dazu können durch negative Selektionsmarker Zellen, die das Gen für den Selektionsmarker erhalten haben, selektiv eliminiert werden. Ein Beispiel hierfür ist das Thymidinkinasegen des Herpes simplex Virus, dessen Expression in Zellen bei gleichzeitiger Gabe von Acyclovir oder Gancyclovir zu deren Elimination führt. Die in dieser Erfindung verwendeten Selektionsmarker, einschließlich der amplifizierbaren Selektionsmarker, schließt gentechnologisch veränderte Mutanten und Varianten, Fragmente, funktionelle Äquivalente, Derivate, Homologe und Fusionen mit anderen Proteinen oder Peptiden ein, solange der Selektionsmarker seine selektiven Eigenschaften beibehält. Solche Derivate weisen eine beträchtliche Homologie in der Aminosäuresequenz in den Bereichen oder Domänen auf, denen die selektive Eigenschaft zugeschrieben wird. In der Literatur sind eine Vielzahl von Selektionsmarkergenen, einschließlich bifunktionaler (positiv/negativ) Marker, beschrieben (siehe z.B. WO 92/08796 und WO 94/28143). Beispiele für Selektionsmarker, die für gewöhnlich in eukaryontischen Zellen verwendet werden, beinhalten die Gene für Aminoglykosid-Phosphotransferase (APH), Hygromycin-Phosphotransferase (HYG), Dihydrofolat-Reduktase

(DHFR), Thymidinkinase (TK), Glutamin-Synthetase, Asparagin-Synthetase und Gene, die Resistenz gegenüber Neomycin (G418), Puromycin, Histidinol D, Bleomycin, Phleomycin und Zeocin vermitteln.

[0099] Eine Selektion von transformierten Zellen ist auch durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) möglich. Hierzu werden beispielsweise bakterielle β -Galaktosidase, Zelloberflächenmarker oder fluoreszierende Proteine (z.B. grünes fluoreszierendes Protein (GFP) und dessen Varianten von *Aequorea victoria* und *Renilla reniformis* oder anderer Spezies, rote fluoreszierende Protein und in anderen Farben fluoreszierende Proteine und deren Varianten von nicht-biolumineszierenden Organismen wie z.B. *Discosoma sp.*, *Anemonia sp.*, *Clavularia sp.*, *Zoanthus sp.*) zur Selektion von transformierten Zellen eingesetzt.

[0100] In der vorliegenden Erfindung wird für die Selektion von genetisch modifizierten (rekombinanten) Wirtszellen als amplifizierbares Selektionsmarkergen der Einsatz des DHFR-Gens bevorzugt. Dieser Marker ist bei der Verwendung von DHFR-negativen Grundzellen wie CHO-DG44 oder CHO-DUKX besonders gut zur Selektion und nachfolgenden Amplifikation geeignet, da diese Zellen kein endogenes DHFR exprimieren und somit nicht in Purin-freiem Medium wachsen. Deshalb kann hier das DHFR-Gen als dominanter Selektionsmarker eingesetzt werden und die transformierten Zellen werden in Hypoxanthin/Thymidin freiem Medium selektioniert. Zur Erzielung einer DHFR-vermittelten Genamplifikation wird Methotrexat (MTX) eingesetzt. Die Wachstumseigenschaften werden maßgeblich durch die Zugabe von MTX beeinflusst. Hierbei ist üblicherweise eine wesentliche Verschlechterung der Fermentationsrobustheit der Zellen mit zunehmender MTX-Konzentration und Amplifikationsstufe zu beobachten. Überraschenderweise wurde jedoch gefunden, dass über das erfindungsgemäße Klonselktionssystem rekombinante Wirtszellen angereichert werden können, die ein erheblich robusteres Verhalten gegenüber hohen MTX-Konzentrationen zeigen (siehe **Abb. 7**). So konnten Wirtszellen, die mit Hilfe eines Fluoreszenz-aktivierten Zellsortiergeräts (FACS) identifiziert und aussortiert wurden, in Gegenwart von 500 nM, vorzugsweise in Gegenwart von 1 μ M MTX, kultiviert und amplifiziert werden, was zu einer deutlichen Steigerung der Produktivität führte. Somit gilt ein Verfahren zur Selektion von hochproduzierenden Wirtszellen als besonders erfindungsgemäß, bei dem Wirtszellen, die mit einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor transfiziert werden und zumindest das Gen von Interesse, das fluoreszierende Protein und ein DHFR-Gen exprimieren, über FACS-Sortierung aussortiert werden, und zumindest einem Genamplifikationsschritt in Gegenwart von zumindest 500 nM, vorzugsweise 1 μ M MTX unterzogen werden.

[0101] Unter „Fermentationsrobustheit“ versteht man hierbei Wachstumseigenschaften der Zellen wie z.B. das Einhalten bestimmter Wachstumsraten, Robustheit gegenüber „Upscaling“ (größere Dimensionierung der Bioreaktoren) und Erreichen hoher Zellzahlen und Vitalitäten in der Stammhaltung, um den industriellen Passagierungsraten beim „Upscaling“ gerecht zu werden.

Expression

[0102] Der Ausdruck „Expression“ bezieht sich auf die Transkription und/oder Translation einer heterologen Gensequenz in einer Wirtszelle. Die Expressionsrate kann hierbei allgemein bestimmt werden, entweder auf Basis der Menge der entsprechenden mRNA, die in der Wirtszelle vorhanden ist, oder auf Basis der produzierten Menge an Genprodukt, das von dem Gen von Interesse kodiert wird. Die Menge der durch Transkription einer ausgewählten Nukleotidsequenz erzeugten mRNA kann beispielsweise durch Northern Blot Hybridisierung, Ribonuklease-RNA-Protektion. In situ Hybridisierung von zellulärer RNA oder durch PCR-Methoden bestimmt werden (Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1994). Proteine, die von einer ausgewählten Nukleotidsequenz kodiert werden, können ebenfalls durch verschiedene Methoden, wie z.B. durch ELISA, Western Blot, Radioimmunoassay, Immunpräzipitation, Nachweis der biologischen Aktivität des Proteins oder durch Immunfärbung des Proteins mit nachfolgender FACS-Analyse, bestimmt werden (Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1994).

[0103] Mit „hohem Expressionslevel (-rate)“, „hoher Expression“, „verstärkter Expression“ oder „hoher Produktivität“ wird die anhaltende und ausreichend hohe Expression oder Synthese einer in eine Wirtszelle eingebrachten heterologen Sequenz, beispielsweise eines für ein therapeutisches Protein kodierenden Gens, bezeichnet. Eine verstärkte oder hohe Expression bzw. eine (hoher) Expressionslevel (-rate) oder eine hohe Produktivität liegt vor, wenn eine erfindungsgemäße Zelle nach einem hier beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren kultiviert wird, und wenn diese Zelle zumindest mehr als ungefähr 5 pg des gewünschten Genprodukts pro Tag produziert (5 pg/Tag/Zelle). Eine verstärkte oder hohe Expression bzw. eine (hoher) Expressionslevel (-rate) oder eine hohe Produktivität liegt auch dann vor, wenn die erfindungsgemäße Zelle zumindest mehr als ungefähr 10 pg des gewünschten Genprodukts pro Tag produziert (10 pg/Tag/Zelle). Eine verstärkte oder hohe Expression bzw. eine (hoher) Expressionslevel (-rate) oder eine hohe Produktivität liegt insbesondere auch vor, wenn die erfindungsgemäße Zelle zumindest mehr als ungefähr 15 pg des gewünschten Genprodukts pro Tag produziert (15 pg/Tag/Zelle). Eine verstärkte oder hohe Expression bzw. eine (hoher) Expressionslevel (-rate) oder eine hohe Produktivität liegt insbesondere dann vor, wenn die erfindungsgemäße Zelle zumindest mehr als ungefähr 20 pg des gewünschten Genprodukts pro Tag produziert (20 pg/Tag/Zelle). Eine

besonders verstärkte oder hohe Expression bzw. eine) besonders hoher) Expressionslevel (rate) oder eine besonders hohe Produktivität liegt dann vor, wenn die erfindungsgemäße Zelle zumindest mehr als ungefähr 30 pg des gewünschten Genprodukts pro Tag produziert (30 pg/Tag/Zelle).

[0104] Eine hohe oder verstärkte Expression, eine hohe Produktivität oder ein(e) hohe(r) Expressionslevel (-rate) im Sinne der vorliegenden Erfindung kann auf verschiedene Weisen erzielt werden. Beispielsweise können durch die Co-Expression des Gens von Interesse mit einem Gen für einen amplifizierbaren Selektionsmarker Zellen selektioniert und identifiziert werden, die das heterologe Gen in hohem Maße exprimieren. Der amplifizierbare Selektionsmarker ermöglicht dabei nicht nur die Selektion von stabil transfizierten Wirtszellen sondern auch die Genamplifikation des heterologen Gens von Interesse. Die Integration der zusätzlichen Kopien der Nukleinsäuren kann dabei in das Genom der Wirtszellen, in zusätzliche artifizielle/Mini-Chromosomen oder in episomal lokalisierte Polynukleotide erfolgen. Diese Vorgehensweise kann mit einer durch FACS gestützten Selektion von rekombinanten Wirtszellen, die als weiteren Selektionsmarker beispielsweise ein (oder mehrere) Fluoreszenzprotein(e) (z.B. GFP) oder einen Zelloberflächenmarker enthalten, kombiniert werden. Andere Methoden zur Erzielung einer verstärkten Expression, wobei auch eine Kombination verschiedener Methoden möglich ist, beruhen beispielsweise auf der Verwendung von (artifizialen) Transkriptionsfaktoren, Behandlung der Zellen mit natürlichen oder synthetischen Agentien zur Hochregulation endogener oder heterologer Genexpression, Verbesserung der Stabilität (Halbwertszeit) der mRNA oder des Proteins, Verbesserung der mRNA-Translationsinitiation, Erhöhung der Gendosis durch Verwendung von episomalen Plasmiden (basierend auf der Verwendung von viralen Sequenzen als Replikationsursprung, z.B. von SV40, Polyoma, Adenovirus, EBV oder BPV), Einsatz von amplifikationsfördernden Sequenzen (Hemann et al., 1994) oder auf DNA-Konkatemeren basierenden in vitro Amplifikationssystemen (Monaco et al., 1996).

[0105] Erfindungsgemäß ist eine gekoppelte Transkription des Gens von Interesse und des Gens, das für das fluoreszierende Protein kodiert. Von der resultierenden bicistronischen mRNA werden sowohl das Protein von Interesse als auch das fluoreszierende Protein exprimiert. Aufgrund dieser Kopplung der Expression des Proteins von Interesse und des fluoreszierenden Proteins ist es erfindungsgemäß leicht möglich, hochproduzierende rekombinante Wirtszellen über das exprimierte fluoreszierende Protein zu selektionieren und zu isolieren, z.B. durch Sortieren mit Hilfe eines Fluoreszenz-aktivierten Zellsortiergeräts (FACS).

[0106] Die Selektion von rekombinanten Wirtszellen, die eine hohe Vitalität und erhöhte Expressionsrate des gewünschten Genprodukts zeigen, ist ein mehrstufiger Prozess. Die mit dem erfindungsgemäßen Expressionsvektor transfizierten oder gegebenenfalls einem weiteren Vektor z.B. co-transfizierten Wirtszellen werden zumindest auf die Expression des mit dem Gen von Interesse gekoppelten Gens, das für ein fluoreszierendes Protein kodiert, untersucht, um die Zellen/Zellpopulation zu identifizieren und zu selektionieren, die die höchsten Expressionsraten an fluoreszierendem Protein zeigen. Vorzugsweise werden nur die Zellen aussortiert und weiter kultiviert, die zu den 10% Zellen mit der höchsten Expressionsrate an fluoreszierendem Protein gehören. In der Praxis bedeutet dies, dass die hellsten 10% der fluoreszierenden Zellen herausortiert und weiter kultiviert werden. Entsprechend können auch die hellsten 5%, vorzugsweise die hellsten 3%, oder auch nur die hellsten 1 % der fluoreszierenden Zellen eines Zellgemisches herausortiert und vermehrt werden. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden lediglich die hellsten 0.5% bzw. die hellsten 0,1% der fluoreszierenden Zellen herausortiert und vermehrt.

[0107] Hierzu kultiviert man die zuvor mit dem erfindungsgemäßen Expressionsvektor transformierten Zellen in einem Selektionsmedium, das gegebenenfalls auch ein für den amplifizierbaren Selektionsmarker spezifisches Selektionsmittel enthält. Dabei können schrittweise erhöhte Konzentrationen an Selektionsmittel verwendet werden, um einen stufenweise erhöhten Selektionsdruck auszuüben.

[0108] Der Selektionsschritt kann an Zellpools oder mit bereits vorsortierten Zellpools/ Zellklonen durchgeführt werden. Es können ein oder mehrere, vorzugsweise zwei oder mehr und insbesondere drei oder mehr Sortierungsschritte durchgeführt werden, wobei zwischen den einzelnen Sortierungsschritten die Zellen über einen bestimmten Zeitraum, z.B. etwa zwei Wochen bei Pools, kultiviert und vermehrt werden.

[0109] Gegebenenfalls kann man die Wirtszellen einem oder mehreren Genamplifikationsschritten unterziehen, um die Kopienzahl zumindest des Gens von Interesse und des amplifizierbaren selektionierbaren Markergens zu erhöhen. Verfahren zur stufenweise Genamplifikation mit Hilfe von Methotrexat sind beispielhaft in US 5,179,017 beschrieben. Erfindungsgemäß ist die erzielbare hohe Produktivität nicht an eine erhöhte Anzahl von Genkopien gebunden. Sie ist vielmehr Ausdruck einer erhöhten Stabilität und Fermentationsrobustheit der Hochleistungsklone. Es ist daher möglich, die Anzahl der erforderlichen Genamplifikationsschritte zu reduzieren und z.B. nur eine einzige Genamplifikation durchzuführen.

[0110] Demnach ist ein Verfahren zur Selektion von Zellen erfindungsgemäß, das folgende Schritte enthält:

- i) Transformation geeigneter Wirtszellen zumindest mit einem der erfindungsgemäßen Vektoren, wobei die DNA der Expressionsvektoren vorzugsweise stabil in das Wirtszellgenom oder in artifizielle Chromosomen/Minichromosomen eingebaut wird;
- ii) die transformierten Zellen unter Bedingungen kultiviert werden, die eine Expression des Gens von Interesse und des fluoreszierenden Proteins erlauben;

- iii) die Zellen in Anwesenheit zumindest eines Selektionsmittels kultiviert werden, sodass nur solche Zellen vermehrt werden, die in Gegenwart des besagten Selektionsmittel wachsen können;
- iv) das Aussortieren von Zellen aus einem Zellgemisch, die die höchste Expressionsrate an fluoreszierendem Protein zeigen, wobei die Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenz-aktivierten Zellsortiergeräts (FACS) detektiert und sortiert werden;
- v) die Kultivierung der aussortierten Zellen mit den höchsten Expressionsraten für das fluoreszierende Protein.

[0111] Optional können die Schritte ii) – v) mit den nach Schritt v) gewonnenen Zellen einfach oder mehrfach wiederholt werden. Ferner können die transformierten Zellen optional auch zusätzlich einem oder mehreren Genamplifikationsschritten unterzogen werden, in dem sie in Gegenwart eines Selektionsmittels kultiviert werden, dass zu einer Amplifikation des amplifizierbaren selektierbaren Markergens führt. Dieser Schritt kann sowohl mit noch nicht sortierten Zellen als auch mit bereits einfach oder mehrfach vorsortierten Zellen erfolgen.

[0112] Weiterhin erfindungsgemäß ist ein Verfahren, bei dem entsprechend aussortierte Zellen vermehrt werden und zur Herstellung des kodierenden Genprodukt von Interesse verwendet wird. Hierzu werden die selektionierten hoch-produzierenden Zellen vorzugsweise in einem serumfreien Kulturmedium und vorzugsweise in Suspensionskultur unter Bedingungen gezüchtet, die eine Expression des Gens von Interesse erlauben. Das Protein von Interesse wird dabei vorzugsweise als sekretiertes Genprodukt aus dem Zellkulturmedium gewonnen. Bei Expression des Proteins ohne Sekretionssignal kann das Genprodukt aber auch aus Zelllysaten isoliert werden. Um ein reines, homogenes Produkt zu erhalten, das im Wesentlichen frei ist von anderen rekombinanten Proteinen und Wirtszellproteinen, werden übliche Reinigungsschritte durchgeführt. Hierzu entfernt man häufig zunächst Zellen und Zelltrümmer aus dem Kulturmedium oder Lysat. Das gewünschte Genprodukt kann dann von kontaminierenden löslichen Proteinen, Polypeptiden und Nukleinsäuren befreit werden, z.B. durch Fraktionierung an Immunaффinitäts- und Ionenaustauschsäulen, Ethanol-fällung, Umkehrphasen-HPLC oder Chromatographie an Sephadex, Silica oder Kationenaustauscherharzen wie DEAE. Methoden, die zur Aufreinigung eines von rekombinanten Wirtszellen exprimierten heterologen Proteins führen, sind dem Fachmann bekannt und sind in der Literatur beschrieben, z.B. bei Harris et al. (1995) und Scopes (1988).

[0113] Im folgenden wird die Erfindung anhand nicht-beschränkender Ausführungsbeispiele näher erläutert.

BEISPIELE Abkürzungen

AP: alkalische Phosphatase
 sbp: Basenpaar
 CHO: Chinese hamster ovary
 DHFR: Dihydrofolat-Reduktase
 ELISA: enzyme-linked immunosorbant assay
 FACS: fluorescence-activated cell sorter
 FAP: Fibroblasten-aktiviertes Protein
 GFP: grünes fluoreszierendes Protein
 HBSS: Hanks Balanced Salt Solution
 HT: Hypoxanthin/Thymidin
 HRPO: horseradish peroxidase
 IRES: internal ribosomal entry site
 kb: Kilobase
 mAk: monoklonaler Antikörper
 MTX: Methotrexat
 PCR: polymerase chain reaction
 SICAM: soluble intracellular adhesion molecule

Methoden

1. Zellkultur und Transfektion

[0114] Die Zellen CHO-DG44/DHFR^{-/-} (Urlaub et al., 1983) wurden permanent als Suspensionzellen in serum-freiem und mit Hypoxanthin und Thymidin supplementiertem CHO-S-SFMII Medium (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE) in Zellkulturflaschen bei 37°C in feuchter Atmosphäre und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellzahlen sowie die Viabilität wurden mit einem CASY1 Cell Counter (Schärfe System, DE) oder durch Trypanblau-Färbung bestimmt und die Zellen dann in einer Konzentration von 1 – 3 × 10⁵/mL eingesät und alle 2 – 3 Tage passagiert.

[0115] Zur Transfektion von CHO-DG44 wurde Lipofectamine Plus Reagenz (Invitrogen GmbH) eingesetzt.

Pro Transfektionsansatz wurden dabei insgesamt 1 µg Plasmid-DNA, 4 µL Lipofectamine und 6 µL Plus-Reagenz nach den Angaben des Herstellers gemischt und in einem Volumen von 200 µL zu 6×10^5 exponentiell wachsenden CHO-DG44 Zellen in 0,8 mL NT-supplementiertem CHO-S-SFMII Medium gegeben. Nach dreistündiger Inkubation bei 37°C in einem Zellinkubator erfolgte eine Zugabe von 2 mL HT-supplementiertem CHO-S-SFMII Medium. Zur DHFR-basierten Selektion von stabil transfizierten CHO-DG44 wurden die Zellen 2 Tage nach Transfektion in CHO-S-SFMII Medium ohne Hypoxanthin- und Thymidinzusatz transferiert, wobei das Medium alle 3 bis 4 Tage gewechselt wurde. Bei einer DHFR- und Neomycin-Phosphotransferase-basierter Selektion im Falle einer Co-Transfektion, in der der eine Expressionsvektor einen DHFR- und der andere Expressionsvektor einen Neomycin-Phosphotransferase-Selektionsmarker enthielt, wurde dem Medium außerdem noch G418 (Invitrogen) in einer Konzentration von 400 µg/mL zugesetzt.

[0116] Eine DHFR-basierte Genamplifikation der integrierten heterologen Gene wurde durch Zugabe des Selektionsmittels MTX (Sigma, Deisenhofen, DE) in einer Konzentration von 5 – 2000 nM zum HT-freien CHO-S-SFMII Medium erreicht.

2. Expressionsvektoren

[0117] Zur Expressionsanalyse wurden eukaryontische Expressionsvektoren eingesetzt, die auf dem pAD-CMV Vektor (Werner et al., 1998) basieren und die konstitutive Expression eines heterologen Gens über die Kombination CMV Enhancer/Hamster Ubiquitin/S27a Promotor (WO 97/15664) vermitteln. Während der Basisvektor pBID das DHFR-Minigen enthält, das als amplifizierbarer Selektionsmarker dient (siehe z.B. EP 0 393 438), ist im Vektor pBIN das DHFR-Minigen durch ein Neomycinresistenzgen ersetzt worden (**Abb. 2**). Hierzu wurde der Selektionsmarker Neomycin-Phosphotransferase, inklusive SV40 early Promotor und TK-Polyadenylierungssignal, aus dem kommerziellen Plasmid pBK-CMV (Stratagene, La Jolla, CA, USA) als 1640 by Bsu36I-Fragment isoliert. Nach einer Auffüllreaktion der Fragmentenden durch Klenow-DNA-Polymerase wurde das Fragment mit dem 3750 by Bsu36I/StuI-Fragment des Vektors pBID, das ebenfalls mit Klenow-DNA-Polymerase behandelt wurde, ligiert.

[0118] Im bicistronischen Basisvektor pBIDG (**Abb. 2**) wurde die IRES-GFP-Genregion aus dem Vektor pIRES2-EGFP (Clontech, Palo Alto, CA, USA) isoliert und in einer Weise unter die Kontrolle des CMV Enhancer/Promotors im Vektor pBID gebracht, dass die multiple Klonierungsstelle zwischen Promotorregion und IRES-Element erhalten blieb. Dabei wurde wie folgt vorgegangen. In einer PCR-Mutagenese, wobei das Plasmid pIRES2-EGFP als Template diente, wurde zum einen die HindIII-Schnittstelle AAGCTT innerhalb der IRES-Sequenz durch den Einsatz mutagener Primer in die Sequenzabfolge ATGCTT umgewandelt und somit entfernt. Zum anderen wurde mittels eines Primers mit Komplementarität zum 5'Ende der IRES-Sequenz eine XbaI-Schnittstelle und bzw. mit Komplementarität zum 3'Ende der GFP-Sequenz eine SpeI-Schnittstelle eingeführt. Das resultierende PCR-Fragment das die komplette IRES- und GFP-Sequenz umfasste, wurde mit XbaI und SpeI verdaut und in die singuläre XbaI-Schnittstelle am 3'Ende der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pBID kloniert.

[0119] Das humane sICAM-Gen wurde als HindIII/SalI Fragment aus pAD-sICAM (Werner et al., 1998) isoliert und in die entsprechenden Schnittstellen des Vektors pBIDG kloniert, wobei der Vektor pBIDG-sICAM resultierte (**Abb. 3**).

[0120] Zur Expression des monoklonalen humanisierten F19 Antikörpers wurde die schwere Kette als 1,5 kb NaeI/HindIII-Fragment aus dem Plasmid pG1D105F19HC (NAGENESEQ: AAZ32786) isoliert und in den mit EcoRI (mit Klenow-DNA-Polymerase aufgefüllt) und HindIII-verdauten Vektor pBIDG kloniert, wobei der Vektor pBIDG-F19HC resultierte (**Abb. 3**). Die leichte Kette hingegen wurde als 1,3 kb HindIII/EcoRI-Fragment aus dem Plasmid pKN100F19LC (NAGENESEQ: AAZ32784) isoliert und in die entsprechenden Schnittstellen des Vektors pBIN kloniert, wodurch der Vektor pBIN-F19LC entstand (**Abb. 3**).

3. FACS

[0121] Die flowcytometrischen Analysen und Sorting wurden mit einem Coulter Epics Altra-Gerät durchgeführt. Das FACS ist mit einem Helium-Argon-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm ausgestattet. Die Fluoreszenzintensität wird bei einer dem Fluoreszenzprotein adäquaten Wellenlänge aufgenommen und mittels der angeschlossenen Software Coulter Expo32 prozessiert. Das Sorting wurde mit einer Rate von 8000 – 10000 Events/Sekunde durchgeführt. Die suspendierten Zellen wurden abzentrifugiert (5 min bei 180×g) und in HBSS auf eine Zellkonzentration von $1 - 1,5 \times 10^7$ /mL eingestellt. Anschließend erfolgte ein Sorting der Zellen entsprechend ihres Fluoreszenzprotein-Signals. Die Zellen wurden in Röhrchen mit vorgelegtem Kultivierungsmedium aufgenommen, abzentrifugiert und abhängig von der aussortierten Zellzahl in entsprechende Kultivierungsgefäße eingesät.

4. ELISA

[0122] Die sICAM-Titer in Überständen von stabil transfizierten CHO-DG44 Zellen wurden mittels ELISA nach Standardprotokollen quantifiziert (Ausubel et al., 1994, updated), wobei zwei im Haus entwickelte sICAM-spezifische mAk verwendet wurden (z.B. in US 5,284,931 und US 5,475,091 beschrieben). Bei einem der beiden Antikörper handelt es sich dabei um einen HRPO-konjugierten Antikörper. Als Standard wurde gereinigtes sICAM-Protein eingesetzt.

[0123] Die Quantifizierung des F19 mAks in den Überständen von stabil transfizierten CHO-DG44 Zellen erfolgte mittels ELISA nach Standardprotokollen (Ausubel et al., 1994, updated), wobei zum einen ein Ziege anti-Human IgG Fc-Fragment (Dianova, Hamburg, DE) und zum anderen ein AP-konjugierter Ziege anti Human Kappa light chain Antikörper (Sigma) eingesetzt wurde. Als Standard diente gereinigter F19 Antikörper. Produktivitäten (pg/Zelle/Tag) wurden dabei mit der Formel $pg/((Ct-Co) t / \ln (Ct-Co))$ berechnet, wobei Co und Ct die Zellzahl bei Aussaat bzw. Ernte und t die Kultivierungsdauer angibt.

Beispiel 1: Vergleich der CMV- und der Hamster-Ubiquitin/S27a-Promotoraktivität

[0124] Um die Aktivität des Hamster-Ubiquitin/S27a-Promotors mit der des häufig in eukaryontischen Expressionsvektoren verwendeten CMV-Promotors zu vergleichen, wurden CHO-DG44 Zellen mit diversen rekombinanten Vektoren transfiziert. Das heterologe Genprodukt, zum einen ein lysosomales Enzym, zum anderen ein IgG1-Antikörper, wurde dabei entweder unter der Kontrolle des CMV-Promotors oder unter der des Hamster-Ubiquitin/S27a-Promotors exprimiert. Beide Promotoren waren dabei funktionell mit dem CMV-Enhancer verknüpft. Als Terminationssignal für das heterologe Gen wurde das BGH polyA verwendet. Die Expressionsvektoren, die den CMV-Promotor beinhalteten, basierten dabei entweder auf einem modifizierten pcDNA3 („CMV¹“, Invitrogen) oder pBluescript-Vektor („CMV²“, Stratagene) und kodierten zusätzlich für den amplifizierbaren Selektionsmarker Dihydrofolat-Reduktase. Der Expressionsvektor mit dem Hamster-Promotor basiert hingegen auf dem pAD-CVM Vektor (Werner et al., 1998). Zur Expression der schweren und leichten Kette des Antikörpers würde eine Co-Transfektion mit einem zweiten Vektor durchgeführt, der als Selektionsmarker ein Neomycin-Resistenzgen enthielt. Der CMV-Enhancer kann aber auch durch den SV40-Enhancer ersetzt werden.

[0125] Durch limitierte Verdünnung in 96Well-Platten wurden nach der Transfektion Zellklone in HT-freiem Medium (im Falle der Co-Transfektion noch Zusatz von 400 µg/mL G418) selektioniert und isoliert. Zellklone mit der höchsten Produktivität hinsichtlich des rekombinanten Proteins wurden einer stufenweisen DHFR-basierten Genamplifikation durch schrittweise Erhöhung der Methotrexat-Konzentration von 5 nM über 50 nM, 500 nM auf 2 µM unterzogen, jeweils verbunden mit einer Verdünnungsklonierung. Auf jeder Amplifikationsstufe wurden dabei ca. 20 bis 30 Klone mit der jeweils höchsten Produktivität ausgewählt.

[0126] Generell erwies sich der Hamster-Promotor als leistungsstärker. Sowohl bei der Expression des lysosomalen Enzyms als auch bei der Expression des Antikörpers wurden Produktivitäten bzw. Titer erzielt, die um den Faktor 2 bis 5 höher lagen als bei den Zellen, in denen das heterologe Gen unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert wurde. In **Abb. 1** sind beispielhaft die relativen Titer und relativen spezifischen Produktivitäten der jeweils besten Zellklone auf der jeweiligen Amplifikationsstufe dargestellt, wobei die auf den CMV-Promotor basierte Expression für das jeweilige heterologe Gen als 1 gesetzt wurde (CMV¹ für das lysosomale Enzym, CMV² für den Antikörper).

Beispiel 2: Isolierung von hochexprimierenden sICAM-Zellen durch GFP-basiertes FACS-Sorting

[0127] Die lösliche Form des interzellulären Adhäsionsmoleküls ICAM1, sICAM, ist ein mögliches Therapeutikum bei Erkältungen, da es mit dem ICAM-Rezeptor um die Bindung von Rhinoviren kompetiert und auf diese Weise deren Interaktion mit dem ICAM-Rezeptor, Voraussetzung für den Eintritt in die Zellen und die nachfolgende Infektion (Bella et al., 1999; Martin et al., 1990), reduzieren oder sogar verhindern kann.

[0128] sICAM wurde als Beispiel für die Expression eines einzelkettigen Proteins (480 Aminosäuren) in CHO-Zellen gewählt. Dazu wurden CHO-DG44 mit pBIDG-sICAM transfiziert (**Abb. 3**). Die zusätzliche Expression von GFP in pBIDG-sICAM transfizierten Zellen ermöglichte die Anwendung einer FACS-basierten Selektionsstrategie. Das therapeutische Protein sICAM und GFP wurden dabei gemeinsam von einer bicistronischen und das DHFR von einer separaten Transkriptionseinheit exprimiert. Zwei bis drei Wochen nach der ersten Selektion in HT-freiem CHO-S-SFMII Medium wurden die 5% der Zellen mit der höchsten GFP-Fluoreszenz herausortiert. Nach ca. zweiwöchiger Kultivierung wurden wiederum die 5% Zellen mit der höchsten GFP-Fluoreszenz isoliert. Insgesamt wurde diese sequentielle Sortierung sechsmal durchgeführt. Dabei konnte eine gute Korrelation zwischen sICAM-Produktivität und GFP-Fluoreszenz gezeigt werden (**Abb. 4**). Allein durch die FACS-gestützte Selektion, ohne jeglichen MTX-Amplifikationsschritt, wurden so in kürzester Zeit Zellpools mit hohen spezifischen Produktivitäten von bis zu 16 pg/Zelle/Tag isoliert (**Abb. 5**). Durch Kombina-

tion der GFP-basierten Selektion mit einem einzigen nachfolgenden MTX-Amplifikationsschritt war sogar eine Steigerung der Produktivität auf über 30 pg/Zelle/Tag möglich (**Abb. 6**). Diese Produktivitäten wurden sowohl bei einer Amplifikation eines Pools nach dem vierten Sorting mit 500 nM MTX als auch bei der Amplifikation eines Pools nach dem sechsten Sorting mit 2 µM MTX erreicht. Im Gegensatz zu einer stufenweisen Amplifikation, bei der in der Regel mit sehr geringen MTX-Konzentrationen im Bereich von 5 – 20 nM MTX begonnen wird, musste hier zur Erzielung eines Amplifikationseffekts eine von Anfang an höhere MTX-Konzentration eingesetzt werden. So resultierte aus der Zugabe von 5 oder 50 nM MTX zu Zellen aus dem vierten Sorting beziehungsweise 500 nM zu Zellen aus dem sechsten Sorting keine signifikante Steigerung der Produktivität (**Abb. 6**). Offensichtlich war der in den Ausgangspools vorliegende Level an DHFR schon so hoch, dass nur mit einer hohen MTX-Dosis eine komplette DHFR-Inhibierung erzielt werden konnte. Außerdem überstanden die vorsortierten Zellpools trotz der hohen initialen MTX-Dosis die Selektionsphase viel besser, d.h. es wurde in kürzerer Zeit wieder eine Zellpopulation mit hoher Vitalität erhalten als bei der konventionellen stufenweisen Genamplifikationsstrategie (**Abb. 7**).

Beispiel 3: Isolierung von Zellen mit hoher Expression des mAbs F19 durch GFP-basirtes FACS-Sorting

[0129] In einer Co-Transfektion wurden CHO-DG44 Zellen mit der Plasmidkombination pBIDG-F19HC und pBIN-F19LC transfiziert (**Abb. 3**). Der exprimierte humanisierte Antikörper F19 ist dabei gegen das Oberflächenmolekül FAP gerichtet, das von reaktiven Stroma-Fibroblasten synthetisiert wird (siehe dazu auch Patent EP 0 953 639). In den eingesetzten Vektorkonfigurationen werden die beiden Proteinketten des Antikörpers jeweils von einem eigenen Vektor, der zusätzlich noch für einen DHFR- bzw. Neomycin-Phosphotransferase-Selektionsmarker in einer separaten Transkriptionseinheit kodiert, exprimiert. Zusätzlich ist im Vektor pBIDG-F19HC ein weiterer Selektionsmarker, das GFP, enthalten. Durch die transkriptionelle Verknüpfung der Expression des GFPs und der schweren Kette mittels eines IRES-Elements konnten bei der Co-Transfektion von CHO-DG44 mit den Vektoren pBIDG-F19HC/pBIN-F19LC in kurzer Zeit Zellen mit einer hohen Expression des Antikörpers F19 allein dadurch isoliert werden, dass mittels sequentiell FACS-Sorting die Zellen mit einem hohen GFP-Gehalt selektioniert wurden. Hierzu wurden nach einer ersten zwei- bis dreiwöchigen Selektion der transfizierten Zellpools in HT-freiem CHO-S-SFMII Medium mit Zusatz von 400 µg/mL G418 die 5% der Zellen mit der höchsten GFP-Fluoreszenz durch FACS herausortiert. Dieses Sorting wurde insgesamt bis zu sechsmal durchgeführt, wobei zwischen jedem Sorting eine Kultivierungsperiode von ca. 2 Wochen lag. Erstaunlicherweise konnte dabei eine gute Korrelation zwischen F19-Produktivität und GFP-Fluoreszenz gezeigt werden (**Abb. 8**), obwohl beide Proteinketten jeweils von einem eigenen Vektor aus exprimiert wurden und beim GFP-basierten FACS-Sorting zudem auch nur auf die Expression der schweren Kette, bedingt durch deren transkriptionelle Kopplung mit GFP, selektioniert werden konnte. Die Produktivitäten konnten auf bis zu 10 pg/Zelle/Tag gesteigert (**Abb. 9**) und durch einen einzigen nachfolgenden MTX-Amplifikationsschritt, ausgehend von dem Zellpool aus dem fünften Sorting, durch Zugabe von 1000 nM MTX zum Selektionsmedium noch auf durchschnittlich 37 pg/Zelle/Tag erhöht werden. Vergleichbare Daten konnten auch bei einer funktionellen Verknüpfung des Hamster-Promotors mit dem SV40-Enhancer anstelle des CMV-Enhancers erzielt werden. Gleichzeitig konnte dadurch auch die Entwicklungszeit zur Selektion von hoch-produzierenden Zellen im Vergleich zu einer konventionellen stufenweisen Genamplifikationsstrategie, die in der Regel 4 Stufen umfasst, um die Hälfte auf ca. 120 Tage reduziert werden, einhergehend mit einer signifikanten Reduktion der Entwicklungskapazitäten und -kosten.

LITERATUR

- Adam, M.A. et al., *J Virol* 1991, 65, 4985 – 4990
 Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in molecular biology*. New York : Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. 1994 (updated)
 Bella, J. et al., *J. Struct. Biol.* 1999, 128, 69 – 74
 Bennett, R.P. et al., *BioTechniques* 1998, 24, 478 – 482
 Chalfie, M. et al., *Science* 1994, 263, 802 – 805
 Chamov, S.M. et al., *Antibody Fusion Proteins*, Wiley-Liss Inc., 1999
 Davies, M.V. et al., *J Virol* 1992, 66, 1924 – 1932
 Faisst, S. et al., *Nucleic Acids Research* 1992, 20, 3 – 26
 Gossen, M. et al., *Curr Opi Biotech* 1994, 5, 516 – 520
 Gubin, A.N. et al., *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 236, 347 – 350
 Haber, D.A. et al., *Somatic Cell Genetics* 1982, 8, 499 – 508
 Harris et al., *Protein Purification : A Practical Approach*, Pickwood and Hames, eds., IRL Press, 1995
 Hemann, C. et al., *DNA Cell Biol* 1994, 13 (4), 437 – 445
 Huston, C. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85 (16), 5879 – 5883

- Hu, S. et al., *Cancer Res.* 1996, 56 (13), 3055 – 3061
Jang, S.K. et al., *J Virol* 1989, 63, 1651 – 1660
Kaufman, R.J. et al., *J Mol Biol* 1982, 159, 601 – 621
Kaufman, R.J., *Methods in Enzymology* 1990, 185, 537 – 566
Kortt, A.A. et al., *Protein Engineering* 1997, 10 (4), 423 – 433
Levenson, V.V. et al., *Human Gene Therapy* 1998, 9, 1233 – 1236
Lottspeich F. and Zorbas H. eds., *Bioanalytic, Spektrum Akad. Verl.*, 1998
Lovejoy, B. et al., *Science* 1993, 259, 1288 – 1293
Marlin, S.D. et al., *Nature* 1990, 344, 70 – 77
Meng, Y.G. et al., *Gene* 2000, 242, 201 – 207
Monaco; L. et al., *Gene* 1996, 180, 145 – 153
Morgan, R.A. et al., *Nucleic Acids Research* 1992, 20, 1293 – 1299
Mosser, D.D. et al., *BioTechniques* 1997, 22, 150 – 161
Nolan, G.P. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85, 2603 – 2607
Ohshima, Y. et al., *J Mol Biol* 1987, 195, 247 – 259
Pack, P. et al., *Biotechnology* 1993, 11, 1271 – 1277
Pack, P. et al., *J Mol Biol* 1995, 246 (11), 28 – 34
Pelletier, J. et al., *Nature* 1988, 334, 320 – 325
Perisic, O. et al., *Structure* 1994, 2, 1217 – 1226
Primig, M. et al., *Gene* 1998, 215, 181 – 189
Ramesh, N. et al., *Nucleic Acids Research* 1996, 24, 2697 – 2700
Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989*
Scopes, R., *Protein Purification, Springer Verlag, 1988*
Simonson, C.C. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1983, 80, 2495 – 2499
Sugimoto et al., *Biotechnology* 1994, 12, 694 – 698
Urlaub, G. et al., *Cell* 1983, 33, 405 – 412
Werner, R.G. et al., *Arzneim.-Forsch./Drug.Res.* 1998, 48, 870 – 880
Wigler, M. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1980, 77, 3567 – 3570

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA KG

<120> EXPRESSIONSVEKTOR, VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON
HETEROLOGEN GENPRODUKTEN UND SELEKTIONSVERFAHREN FÜR
HOCHPRODUZIERENDE REKOMBINANTE ZELLEN

<130> Case 1-1412

<140>

<141>

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2406

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<300>

<310> PCT/EP/96/04631

<311> 1996-10-24

<312> 1997-05-01

<400> 1

```

gatctccagg acagccatgg ctattacaca gagaaaccct gtctggaaaa acaaaaaatt 60
agtgtccatg tgtaaatgtg tggagtatgc ttgtcatgcc acatacagag gtagagggca 120
gtttatggga gtcagttcct attcttcctt tatgggggac ctggggactg aactcaggtc 180
atcaggcctt gcagaaagtg cattagctca cggagcctta tcattggcga aagctctctc 240
aagtagaaaa tcaatgtgtt tgctcatagt gcaatcatta tgtttcgaga ggggaagggt 300
acaatcgttg gggcatgtgt ggtcacatct gaatagcagt agctccctag gagaattcca 360
agttcttttg tgggtgatca atgcccttaa aggggtcaac aacttttttt ccctctgaca 420
aaactatctt cttatgtcct tgtccctcat atttgaagta ttttattctt tgcagtgttg 480
aatatcaatt ctagcacctc agacatgtta ggtaagtacc ctacaactca ggtaactaa 540
tttaatttaa ctaatttaac cccaacactt tttctttggt tatccacatt tgtggagtgt 600
gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgc 660
gcgcgcgcg cgctcggat cattctacct tttgtttaaa aaatgttagt ccaggggtgg 720
ggtgcactgt gaaagtctga gggtaacttg ctggggctcag ttctttccac tataggacag 780
aactccagggt gtcaactctt tactgacaga accatccaaa tagccctatc taattttagt 840
tttttattta tttatttttt gtttttcgag acagggtttc tctgtggctt tggaggctgt 900
cctggaacta gctctttag accaggctgg tctcgaactc agagatccac ctgcctctgc 960
ctcctgagtg ctgggattaa aggcattcgc caccaacgct tggctctacc taattttaaa 1020
agagattgtg tgtcacaagg gtgtcatgtc gccctgcaac ccccccccc ccaaaaaaaaa 1080
aaaaaaaaaa acttcaactga agctgaagca cgatgatttg gttactctgg ctggccaatg 1140
agctctaggg agtctcctgt caaacagaat ctcaacaggc gcagcagtct tttttaaagt 1200
ggggttacaa cacaggtttt tgcatatcag gcattttatc taagctattt cccagccaaa 1260
aatgtgtatt ttggaggcag cagagctaat agattaaaat gaggggaagag cccacacagg 1320
ttattaggaa gataagcatc ttctttatat aaaacaaaac caaaccaaac tggaggaggt 1380
ctacctttag ggatggaaga aaagacattt agaggggtgca atagaaaggg cactgagttt 1440
gtgaggtgga ggactgggag agggcgcaac cgctttaact gtcctgtttt gcctattttt 1500
tggggacagc acatgttcct atttttccca ggatgggcaa tctccacgtc caaacttgcg 1560
gtcgaggact acagtcattt tgcaggtttc cttactgtat ggctttttaa acgtgcaaag 1620
gtgaccatta accgtttcac gctgggaggg cacgtgcggc tcagatgctt cctctgactg 1680

```

```

agggccagga gggggctaca cggaagaggc cacacccgca cttgggaaga ctcgatttgg 1740
gcttcagctg gctgagacgc cccagcaggc tcctcggcta caccttcagc cccgaatgcc 1800
ttccggccca taacccttcc cttctaggca ttccggcgga ggacccaccc tcgcgcaaaa 1860
catteggccc catcccccg gtcctcacctg aatctctaac tctgactcca gagtttagag 1920
actataacca gatagcccgg atgtgtggaa ctgcatcttg ggacgagtag ttttagcaaa 1980
aagaaagcga cgaaaaacta caattcccag acagacttgt gttacctctc ttctcatgct 2040
aaacaagccc cttttaaagg aaagcccctc ttagtcgcat cgactgtgta agaaaggcgt 2100
ttgaaacatt ttaatgttgg gcacaccggt tcgaggaccg aatgagaaa gagcataggg 2160
aaacggagcg cccgagctag tctggcactg cgttagacag ccgcggtcgt tgcagcgggc 2220
aggcacttgc gtggacgcct aaggggaggg tctttcggcc gggaaagccc gttggtccgc 2280
gcggtcttcc ctttccgatc cgccatccgt ggtgagtgtg tgctgcgggc tgccgctccg 2340
gcttggggct tcccgcgtcg ctctcacctt ggtcggcggc tctaatacctg ctcttttcga 2400
atgtag                                     2406

```

Patentansprüche

1. Expressionsvektor umfassend ein Gen, das für ein Protein von Interesse kodiert, in funktioneller Verknüpfung mit einem Hamster-Ubiquitin/S27a-Promotor und einem Gen, das für ein fluoreszierendes Protein kodiert.

2. Expressionsvektor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass er ein amplifizierbares Selektionsmarkergen enthält.

3. Expressionsvektor nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass er einen oder mehrere Enhancer in funktioneller Verknüpfung mit dem oder den Promotoren umfasst.

4. Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass er zusätzlich eine interne Ribosomenbindungsstelle (IRES) enthält, welche die bicistronische Expression des Gens, das für ein fluoreszierendes Protein kodiert, und des Gens, das für ein Protein/Produkt von Interesse kodiert, ermöglicht.

5. Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass sich das Gen, das für ein fluoreszierendes Protein kodiert, und das amplifizierbare Selektionsmarkergen in einer oder in zwei separaten Transkriptionseinheiten befinden.

6. Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die funktionelle Verknüpfung nicht über Intronsequenzen erfolgt.

7. Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das amplifizierbare Selektionsmarkergen für Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) oder ein Fusionsprotein aus dem fluoreszierenden Protein und DHFR kodiert.

8. Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 3 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Enhancer ein CMV- oder SV40-Enhancer ist.

9. Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass er zusätzlich zumindest ein Polyadenylierungssignal aufweist.

10. Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass er anstelle des Gens, das für ein Protein/Produkt von Interesse kodiert, eine multiple Klonierungsstelle zum Einbau eines Gens, das für ein Protein von Interesse kodiert, umfasst.

11. Eukaryontische Wirtszelle, die mit einem Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 1 bis 10 transfiziert worden ist.

12. Wirtszelle nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine Säugerzelle, vorzugsweise eine CHO-Zelle, handelt.

13. Wirtszelle nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich mit einem oder mehreren Vektoren mit Genen, die für ein oder mehrere andere Proteine/Produkte von Interesse sowie zumindest einen weiteren Selektionsmarker kodieren, transfiziert worden ist.

14. Verfahren zur Herstellung eines heterologen Genprodukts, bei dem eine Wirtszelle nach einem der Ansprüche 11 bis 13 unter Bedingungen, die eine Expression des Genprodukts ermöglichen, kultiviert und das Genprodukt aus der Kultur oder dem Kulturmedium isoliert wird.

15. Verfahren zur Herstellung eines heteromeren Proteins/Produkts, bei dem eine Wirtszelle nach Anspruch 13, die mit Expressionsvektoren, welche für unterschiedliche Untereinheiten des heteromeren Proteins/Produkts kodieren, co-transfiziert worden ist, unter Bedingungen, die eine Expression des heteromeren Proteins/Produkts ermöglichen, kultiviert und das heteromere Protein/Produkt aus der Kultur oder dem Kulturmedium isoliert wird.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das heteromere Protein ein Antikörper ist.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirtszelle einem oder mehreren Genamplifikationsschritten unterzogen wird.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass der amplifizierbare Selektionsmarker DHFR und das Amplifikationsmittel Methotrexat ist.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirtszelle lediglich einem Genamplifikationsschritt mit Methotrexat unterzogen wird.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass es in einem serumfreien Kulturmedium durchgeführt wird.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirtszelle in Suspensionskultur kultiviert wird.

22. Verfahren zur Selektion einer Wirtszelle, die ein Protein/Produkt von Interesse exprimiert, bei dem eine Population von Wirtszellen nach einem der Ansprüche 11 bis 13 unter Bedingungen kultiviert wird, die eine Expression des Proteins/Produkts von Interesse und des fluoreszierenden Proteins ermöglichen, und die Zelle(n) identifiziert und/oder selektiert werden, welche den höchsten Expressionslevel an fluoreszierendem Protein zeigen.

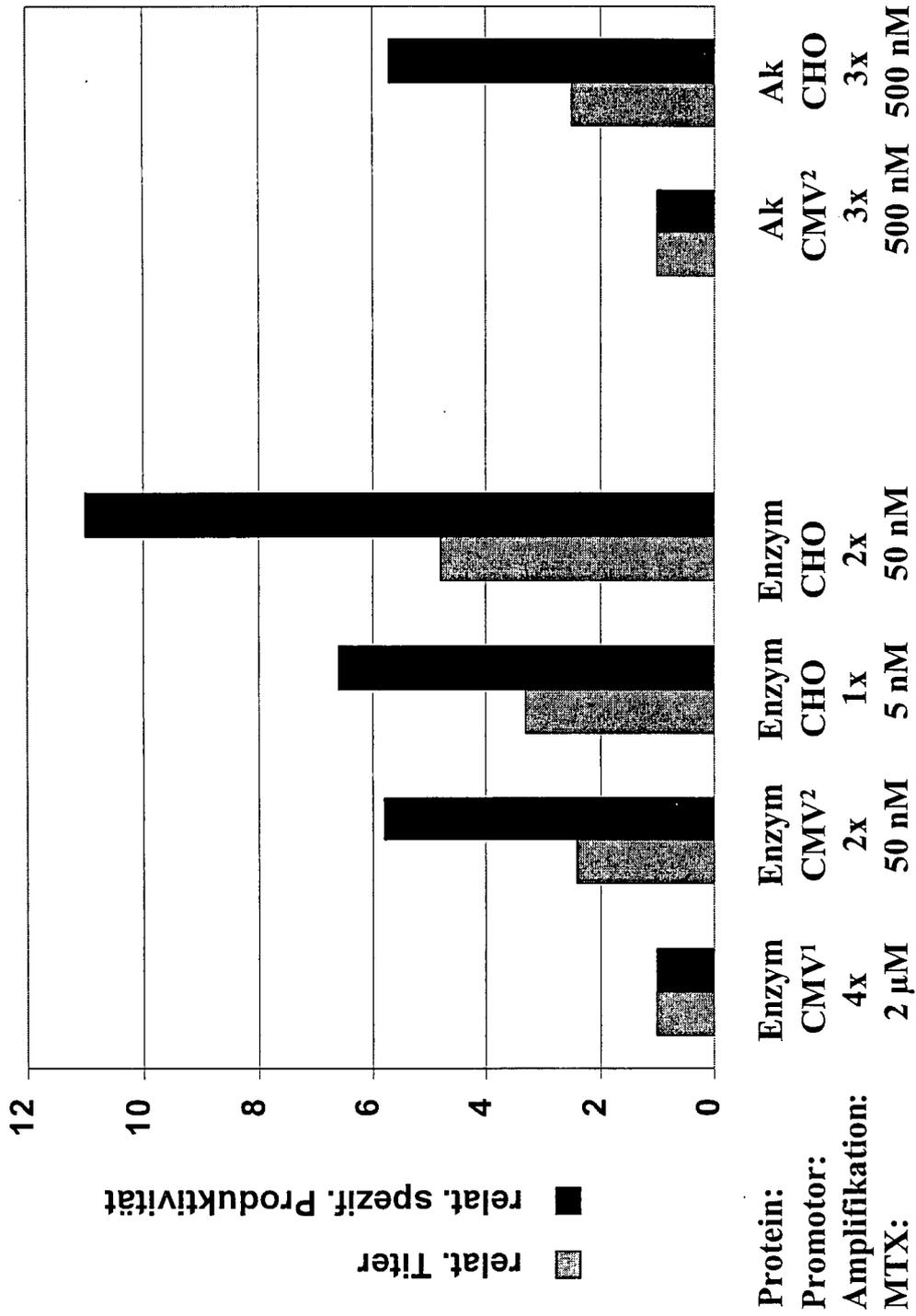
23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Selektion mit Hilfe eines Fluoreszenz-aktivierten Zellsortiergeräts (FACS) erfolgt.

24. Verfahren nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, dass die entsprechend selektierten Wirtszellen einem oder mehreren zusätzlichen Genamplifikationsschritten unterzogen werden.

25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass der amplifizierbare Selektionsmarker DHFR und das Amplifikationsmittel Methotrexat ist.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



Figur 1

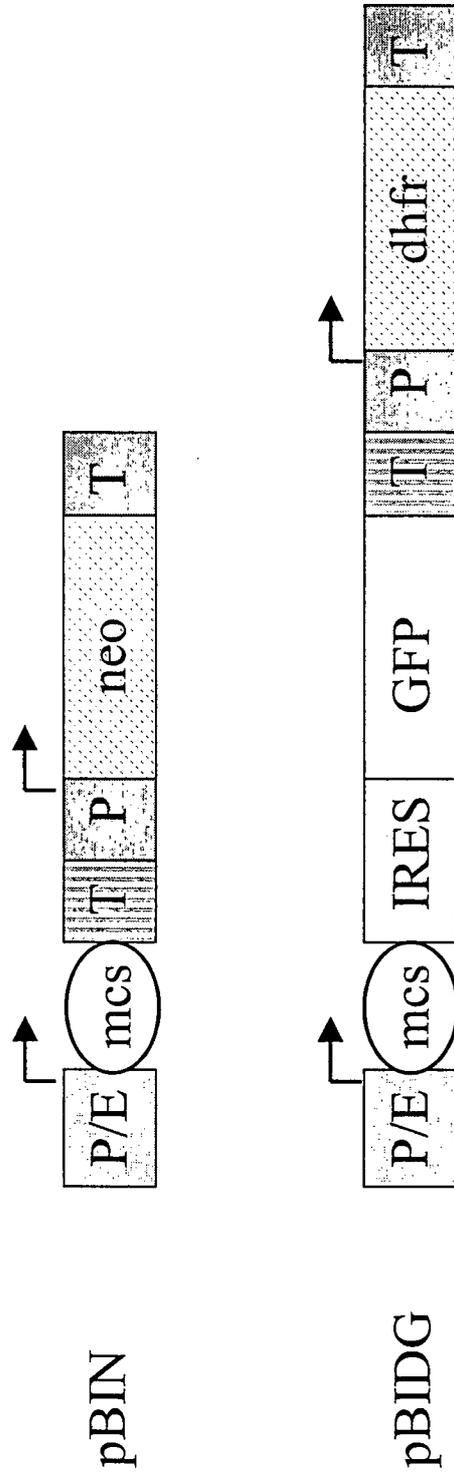


Figure 2

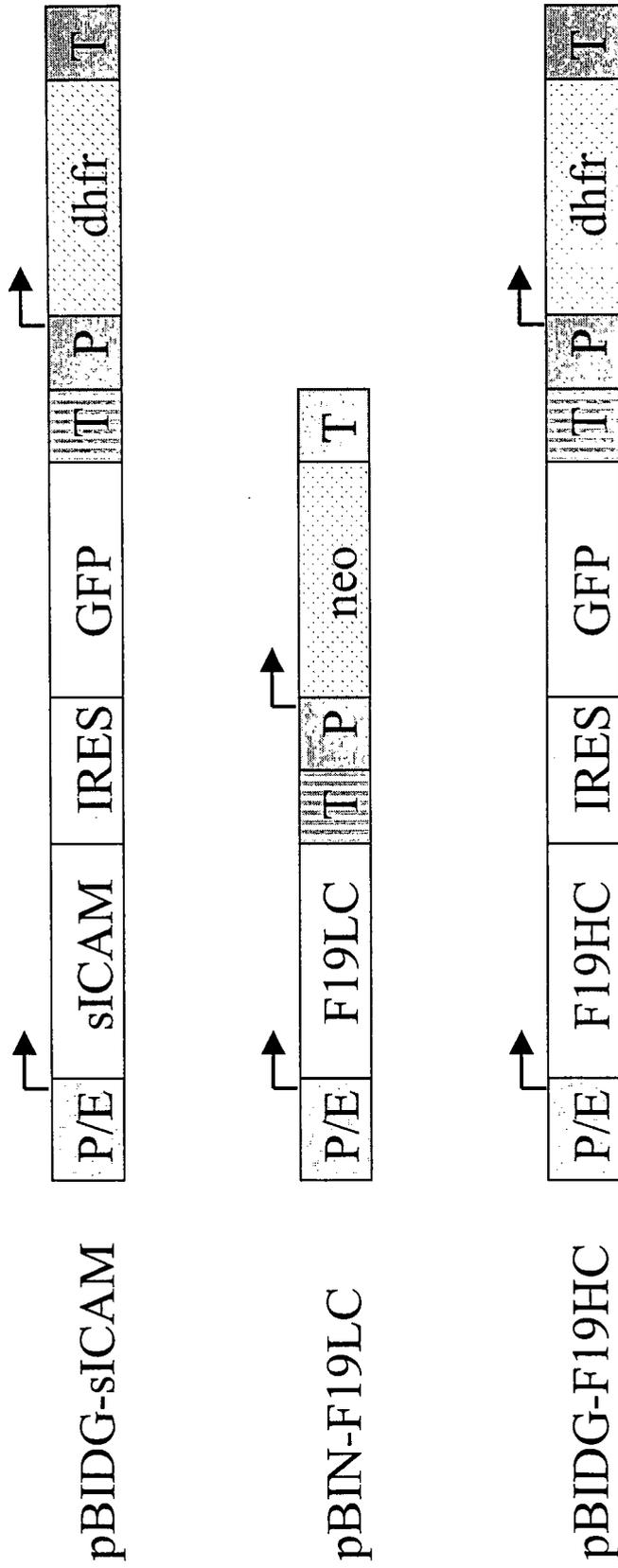
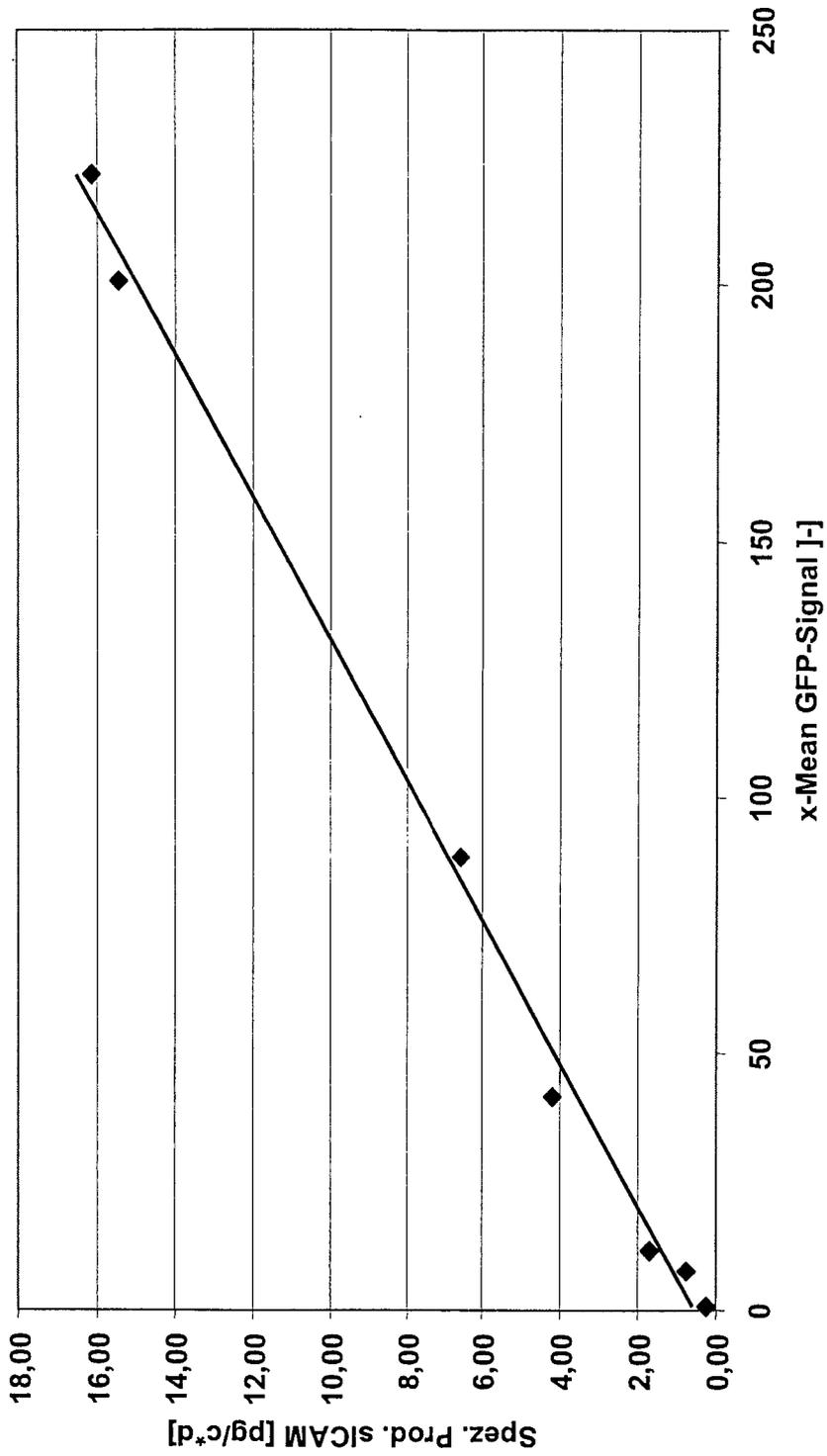
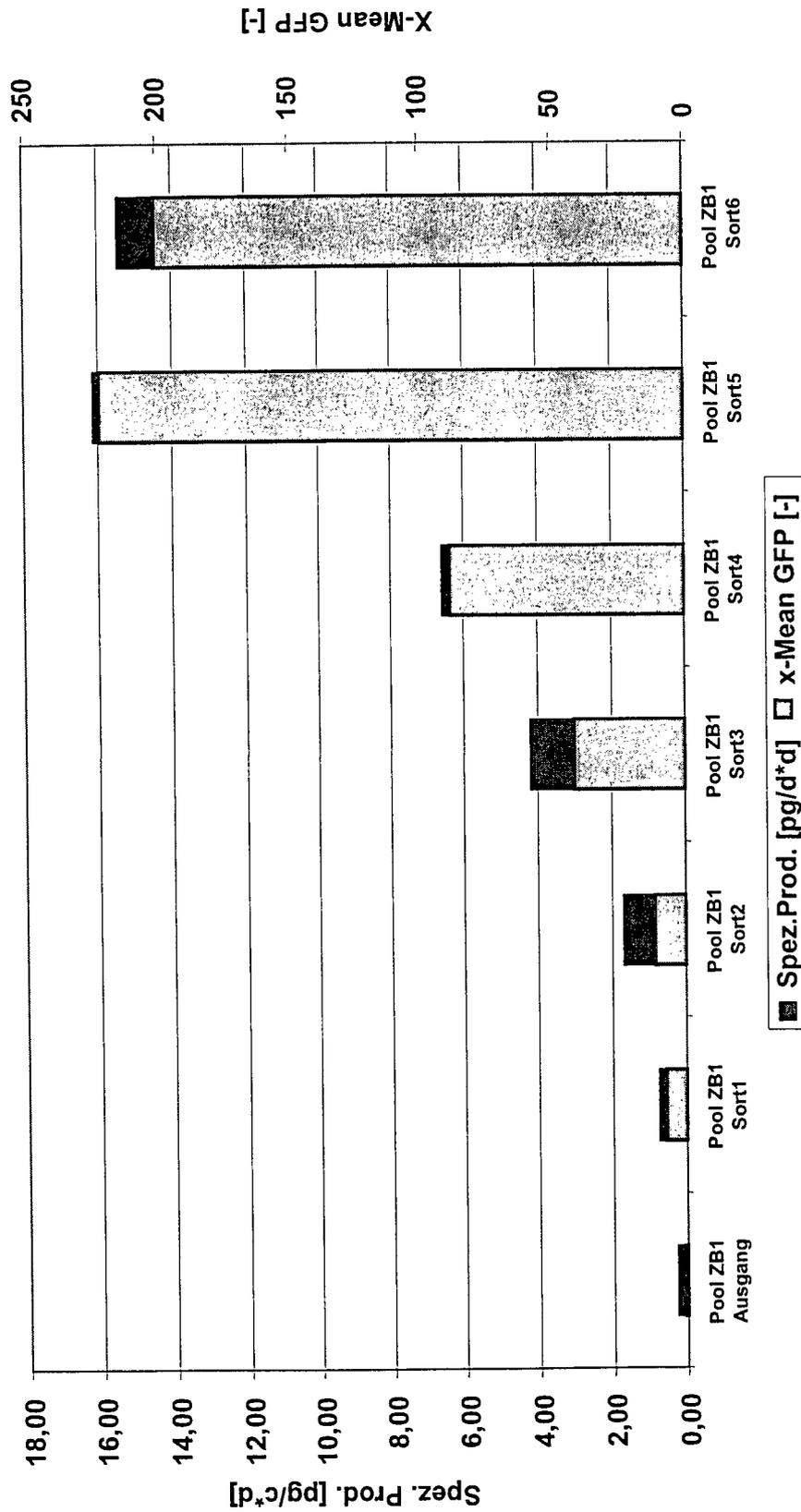


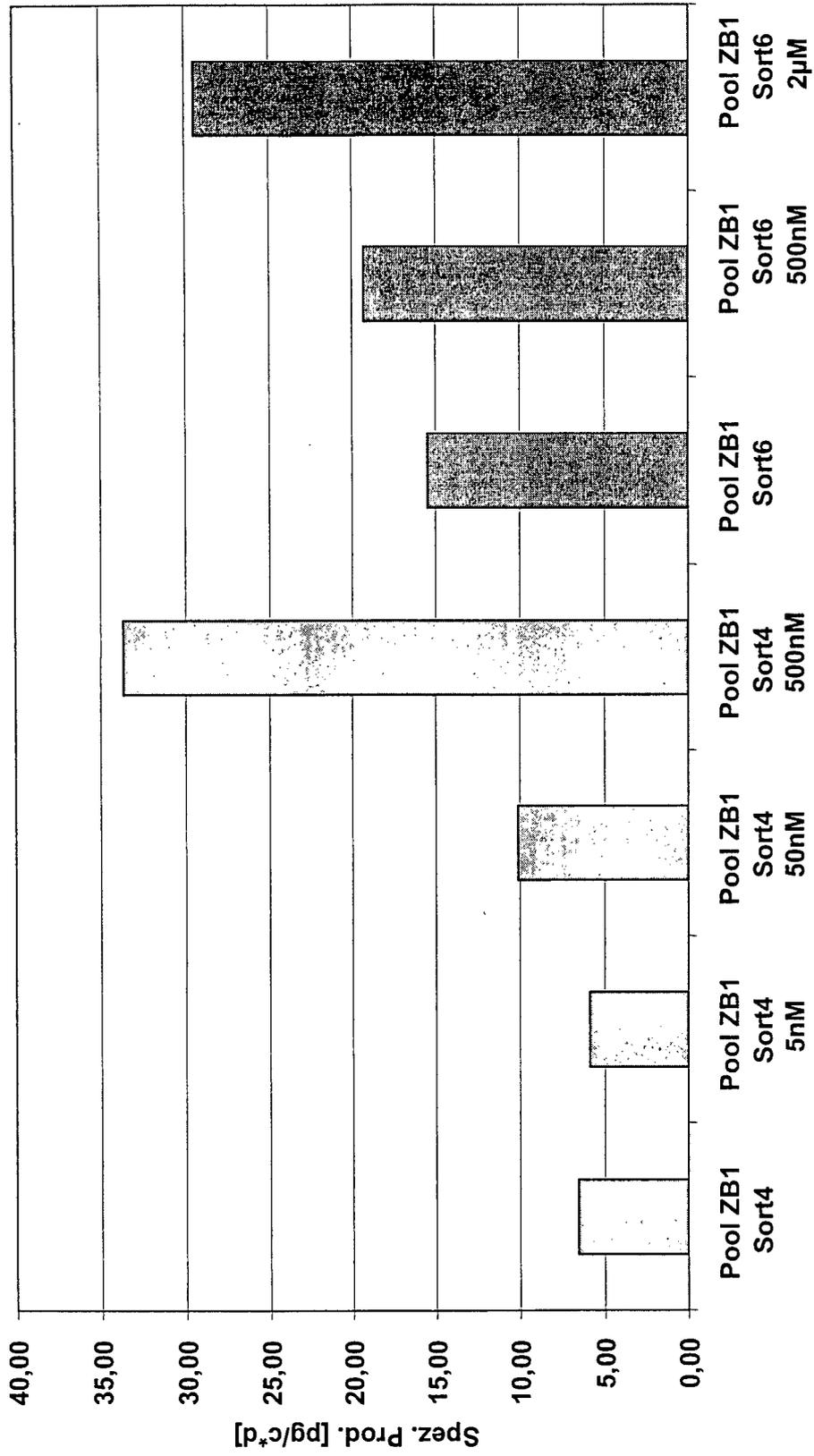
Figure 3



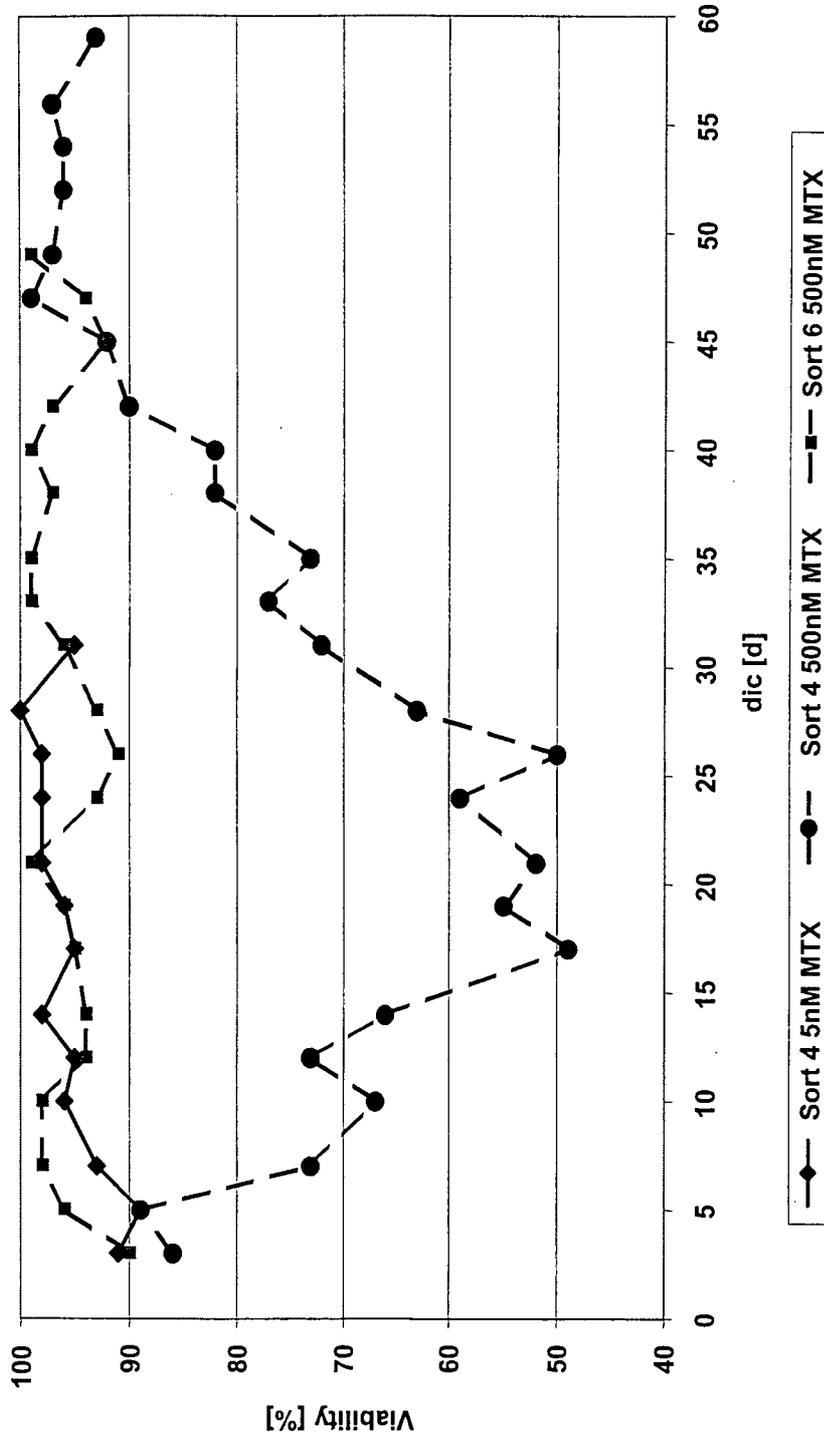
Figur 4



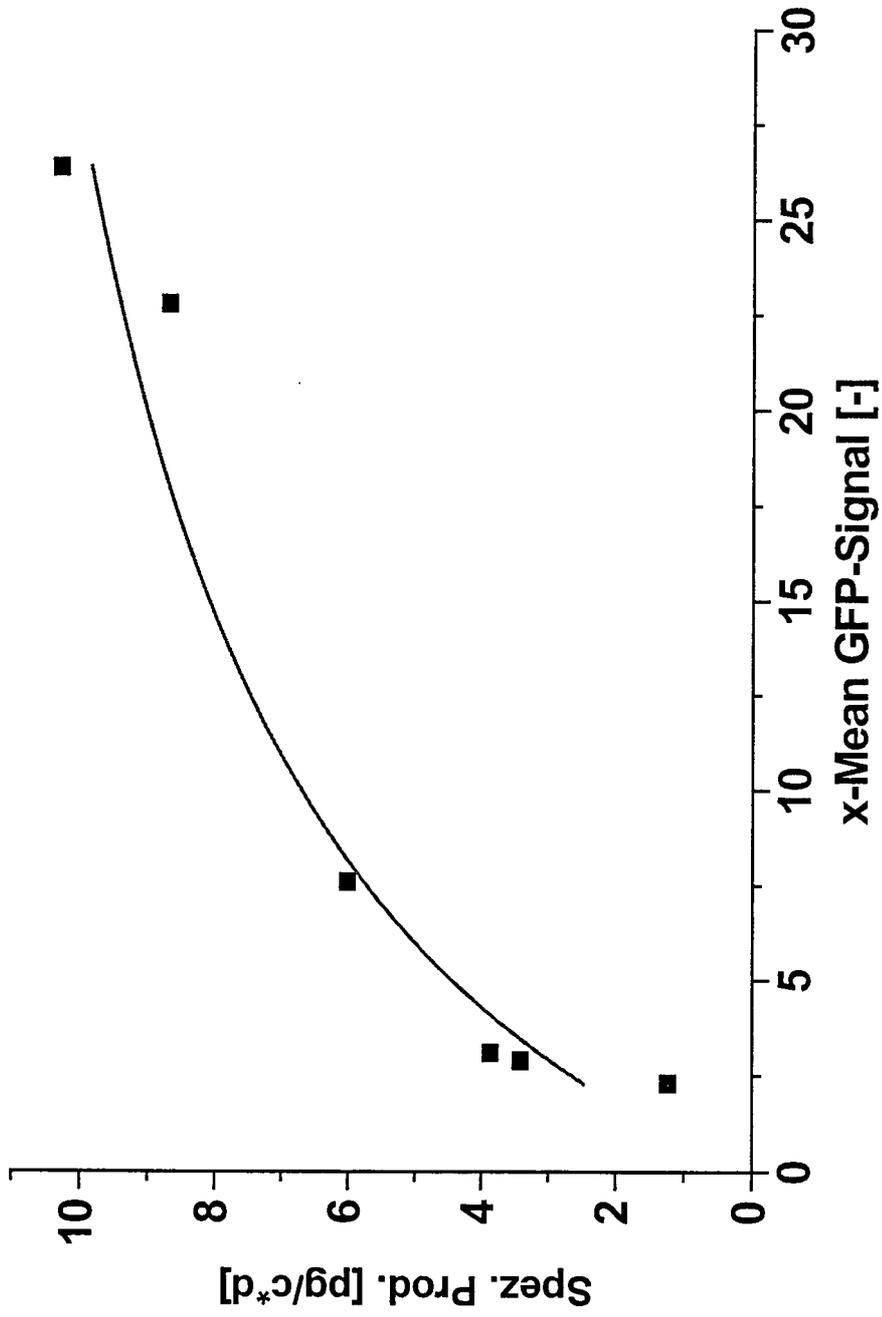
Figur 5



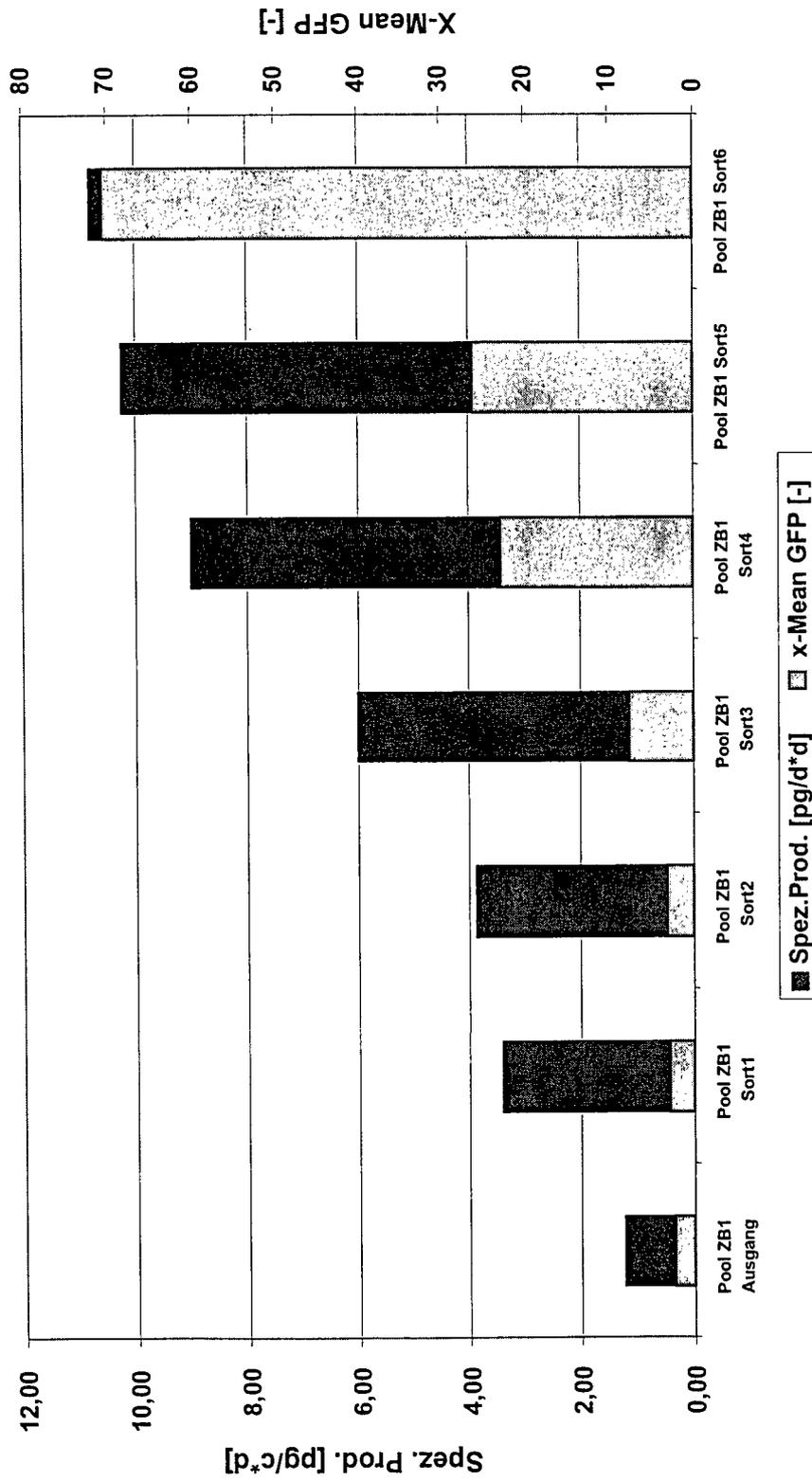
Figur 6



Figur 7



Figur 8



Figur 9