

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 497 765**

(51) Int. Cl.:

C12P 21/02

(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2005 E 05810979 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014 EP 1817418**

(54) Título: **Producción de proteínas**

(30) Prioridad:

30.11.2004 IL 16548404

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

23.09.2014

(73) Titular/es:

**MERCK SERONO SA (100.0%)
CENTRE INDUSTRIEL
1267 COINSINS, VAUD, CH**

(72) Inventor/es:

**ASSARAF, YEHUDA y
ROTHEM, LILAH**

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 497 765 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Producción de proteínas

CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 5 La presente invención se refiere a un método de producción de proteínas que utiliza selección permanente en ausencia de drogas citotóxicas y, más en particular, a la producción de proteínas altamente puras adecuadas para aplicaciones terapéuticas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 10 Se necesitan grandes cantidades de proteínas puras para la terapéutica así como para el dominio de la ciencia básica. Por ejemplo, las hormonas y los factores de crecimiento (p. ej. Insulina, hormona del crecimiento) se necesitan para uso común en todo el mundo. Por otro lado, se necesitan grandes cantidades de proteínas puras para la cristalográfia de proteínas y para la determinación de la estructura tridimensional. Los avances en el campo de la biología molecular permiten la producción de grandes cantidades de proteínas mediante la sobreexpresión de polinucleótidos que codifican la proteína de interés en células huésped como son las células de bacterias, levaduras, 15 hongos, insectos, plantas y de mamífero.

Las células huésped procariotas ofrecen unos fuertes rendimientos de producción utilizando recursos de bajo coste. Sin embargo, la expresión de las proteínas eucariotas, y especialmente de proteínas humanas, en los sistemas de expresión procariota es limitada por falta de modificaciones post-traduccionales (p. ej. glicosilación, carboxilación, o hidroxilación) y/o por el plegamiento apropiado de las proteínas expresadas, dando lugar a una acumulación de 20 proteínas recombinantes en los cuerpos insolubles de inclusión.

Los sistemas de expresión en levaduras ofrecen ciertas ventajas frente a los sistemas procariotas ya que incluyen poderosas rutas secretoras y son capaces de realizar algunas modificaciones post-traduccionales limitadas. No obstante, la expresión en sistemas de levaduras conduce típicamente a un plegamiento incorrecto de las proteínas unidas por puentes disulfuro.

- 25 Los sistemas de expresión de mamíferos proporcionan un plegamiento correcto y unas modificaciones post-traduccionales apropiadas. Sin embargo, la expresión en células de mamífero a menudo conlleva unos bajos rendimientos proteicos. Para aumentar el rendimiento proteico se realiza una transfección estable del gen de interés (GOI) en presencia de un fármaco citotóxico (p. ej. metotrexato (MTX), antagonista del ácido fólico) y de un casete de expresión que incluye un gen que evade el efecto de la droga citotóxica [p. ej. la dihidrofolato reductasa (DHFR)]. No 30 obstante, debido a las grandes cantidades de drogas citotóxicas usadas durante la transfección y la expresión, las proteínas que se producen en estas condiciones a menudo están contaminadas con trazas de estas drogas y, por lo tanto, inadecuadas para uso terapéutico.

En consecuencia, existe la necesidad de desarrollar un método de producción de proteínas para aplicaciones farmacéuticas libre de las limitaciones anteriores.

- 35 El ácido fólico y los folatos reducidos son vitaminas esenciales que entran en la célula de mamífero mediante el transportador de folato reducido humano (hRFC). De la misma forma, los antagonistas del ácido fólico como el metotrexato (MTX), un potente inhibidor de DHFR, también entran en las células de mamífero mediante la proteína RFC. La exposición de las células al metotrexato produce una deficiencia de folato y al final la muerte celular. Sin embargo, estudios anteriores demostraron que la exposición al metotrexato podía conducir a una inactivación del 40 RFC lo que da lugar fenotipos de transporte deficiente por MTX. Además, las mutaciones inactivadoras en la región codificadora de hRFC, así como el silenciamiento del promotor del RFC (debido ante todo a la pérdida de expresión y/o función de varios factores de transcripción) y/o la metilación del promotor del hRFC suprimían la actividad de transporte del RFC y daba lugar a una resistencia a las drogas antifolato (Jansen et al., 1998; Drori et al., 2000a; Rothen et al., 2002; Rothen et al., 2003; Rothen et al., 2004 a, b; Worm et al., 2001). Además, otros estudios 45 demostraron que una privación de leucovorina (un folato reducido) en el medio de crecimiento libre de ácido fólico produce una notable amplificación de la expresión génica del gen de hRFC con una consecuente sobreproducción de 100 veces la actividad de transporte del MTX (Jansen et al., 1998; Dori et al., 2000a).

La D-galactosa es una hexosa esencial que se convierte en glucosa-6-fosfato en una reacción enzimática en tres etapas que involucra a la galactoquinasa (GalK1), la UDP-Glucosa- α -D-galactosa-1-fosfato uridiltransferasa y la fosfoglucomutasa. Estudios recientes demostraron que la ausencia de la enzima completamente funcional GalK1 causa galactosemia (Novelli and Reichardt, 2000; Timson and Reece, 2003). Además, se ha encontrado que las células de hámster deficientes en galactoquinasa no crecen en un medio que contiene D-galactosa como única fuente de hexosa y que requieren un medio que contenga D-glucosa para el crecimiento (Schumperli et al., 1982).

- 55 US 5.723.292 A y US 5.871.957 A se refieren a métodos para generar productos proteicos en células huésped y para seleccionar células transformadas que comprende la etapa de transformación de la célula huésped con una molécula de ADN que consta de un gen que complementa una deficiencia de la célula huésped. La célula huésped es una cepa que posee una deficiencia en una función necesaria para el crecimiento normal de la célula. El gen en

la molécula de ADN que complementa la deficiencia, por ejemplo un plásmido, sirve como un marcador de selección por el que las condiciones de crecimiento para la selección puede comprender un medio complejo convencional.

- 5 De acuerdo con la presente invención se ha encontrado que la selección permanente que usa proteínas de células viables como marcadores de selección se puede utilizar para sobreexpresar la proteína de interés en células de mamífero en un medio libre de citotóxicos y en el que las proteínas producidas por dicho método son muy adecuadas para aplicaciones farmacéuticas.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

- 10 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método de selección para células positivamente transformadas que comprende: (a) el suministro de células eucariotas que carecen de actividad de una proteína endógena de viabilidad celular; (b) la transformación de las células eucariotas con un constructo de ácido nucleico que codifica la proteína de viabilidad celular o, al menos, una porción funcional de la misma así como que además codifica la proteína de interés; y (c) el cultivo de las células eucariotas transformadas con el constructo de ácido nucleico bajo condiciones como que la viabilidad celular es dependiente de la actividad de la proteína de viabilidad celular seleccionando de este modo las células positivamente transformadas, donde la proteína de viabilidad celular es la galactoquinasa 1, donde la célula eucariota es una célula de mamífero, donde el ácido nucleico que codifica dicha proteína de viabilidad celular y el ácido nucleico que codifica dicha proteína de interés están en una configuración bi-cistrónica con la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés estando corriente abajo de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de viabilidad celular, y donde dicho cultivo se realiza en presencia de D-galactosa en una concentración de 0,25 mM a 0,5 mM.

- 15 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un cultivo de células eucariotas libre de citotóxicos que comprende las células genéticamente modificadas para expresar una proteína de viabilidad celular y una proteína de interés bajo condiciones de cultivo como que la viabilidad celular es dependiente de la actividad normal de la proteína de viabilidad celular, donde la proteína de viabilidad celular es la galactoquinasa 1, donde la célula eucariota es una célula de mamífero y donde el ácido nucleico que codifica dicha proteína de viabilidad celular y el ácido nucleico que codifica dicha proteína de interés están en una configuración bi-cistrónica con la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés estando corriente abajo de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de viabilidad celular, y donde dicho cultivo se realiza en presencia de D-galactosa en una concentración de 0,25 mM a 0,5 mM.

- 20 De acuerdo con otro aspecto aún de la presente invención, se proporciona un método de producción de una proteína de interés, que comprende: (a) la transformación de células eucariotas que carecen de actividad de una proteína endógena de viabilidad celular con un constructo ácido nucleico que codifica la proteína de interés y para la proteína de viabilidad celular o, al menos, una porción funcional de la misma; (b) el cultivo de las células eucariotas transformadas con el constructo de ácido nucleico en condiciones tales que la viabilidad celular sea dependiente de la actividad normal de la proteína de viabilidad celular seleccionando de este modo las células eucariotas positivamente transformadas; y (c) la purificación de la proteína de interés a partir de las células eucariotas positivamente transformadas o de un medio de cultivo de las mismas, donde la proteína de viabilidad celular es la galactoquinasa 1, donde la célula eucariota es una célula de mamífero y donde el ácido nucleico que codifica dicha proteína de viabilidad celular y el ácido nucleico que codifica dicha proteína de interés están en una configuración bi-cistrónica con la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés estando corriente abajo de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de viabilidad celular, y donde dicho cultivo se realiza en presencia de D-galactosa en una concentración de 0,25 mM a 0,5 mM.

- 25 De acuerdo con otras características en las realizaciones descritas preferidas, la proteína de interés se selecciona a partir de un grupo que comprende un factor de crecimiento, una hormona, una citoquina, una proteína extracelular, una proteína de adhesión celular, y una proteína de señalización celular.

- 30 De acuerdo con características adicionales en la realización descrita preferida, el factor de crecimiento se selecciona a partir del grupo que comprende factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento transformante beta, factor de crecimiento de fibroblastos ácido, factor de crecimiento de fibroblastos básico, eritropoyetina, trombopoyetina, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento I tipo insulina, factor de crecimiento II tipo insulina, interferón gamma y factor de crecimiento derivado de plaquetas.

- 35 De acuerdo con características adicionales en la realización descrita preferida, la hormona se selecciona de un grupo que consiste en prolactina, hormona paratiroidea, gastrina, leptina, hormona de crecimiento, insulina y CG-β.

- 40 De acuerdo con características adicionales en la realización descrita preferida, la citoquina se selecciona de un grupo que consiste en SDF-1α, IL-7, IL-10, IL-20 e IL-19.

- 45 De acuerdo con características adicionales en la realización descrita preferida, la proteína extracelular se selecciona de un grupo que consiste en fibrinógeno, colágeno, fibronectina, vimentina, proteína 1b asociada a microtúbulos, factor de crecimiento de las neuritas (NOF), celulosa bacteriana (BC) y laminina.

De acuerdo con características adicionales en la realización descrita preferida, la proteína de adhesión celular se selecciona de un grupo que consiste en proteínas de adhesión celular que incluyen integrina, molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), N-CAM , cadherina, tenascina, gicerina y la proteína inducida por daño nervioso 2 (nínjurin2).

- 5 De acuerdo con características adicionales en la realización descrita preferida, la proteína de señalización celular se selecciona de un grupo que consiste en proteína quinasa p38 activada por mitógenos, factor nuclear kappaB, proteína inhibidora de la Raf quinasa (RKIP), Raf-1, MEK, proteína quinasa C (PKC), fosfoinositido-3-quinasa gamma, receptor de tirosinquininas, proteínas G heterotriméricas, caveolina-3 y las proteínas 14-3-3.
- 10 De acuerdo con características adicionales en la realización descrita preferida, los constructos de ácido nucleico incluyen una secuencia de ácido nucleico como se expone en SEQ ID NO:3.
- De acuerdo con características adicionales en la realización descrita preferida, la concentración de D-galactosa es de 0,25 mM.
- 15 La presente invención aborda con éxito las deficiencias de las configuraciones actualmente conocidas proporcionando un método de producción de una proteína de interés que utiliza una selección permanente en unas condiciones de cultivo libre de citotóxicos.
- 20 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados aquí poseen el mismo significado que entiende comúnmente alguien experto en la técnica a la que esta invención pertenece. Se describen a continuación los métodos y materiales adecuados, aunque se pueden utilizar en la práctica o en el ensayo de la presente invención métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos que se describen aquí. La descripción de la patente, incluyendo las definiciones, dominará en caso de discrepancia. Además, los materiales, los métodos y los ejemplos son solamente ilustrativos y no intentan ser limitantes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 25 Se describe la invención en el presente documento, solamente a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos que acompañan. Ahora, con referencia específica a los dibujos en detalle, se hace hincapié en que los datos que se muestran son a modo de ejemplo y con fines solamente de discusión ilustrativa de la realización preferida de la presente invención, y se presentan con el fin de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente comprensible de los principios y los aspectos conceptuales de la invención. En este aspecto no se hace ningún intento de mostrar los detalles estructurales de la invención con más detalle que el necesario para una comprensión fundamental de la invención, la descripción junto con los dibujos hacen evidente para los expertos en la técnica cómo pueden realizarse en la práctica las distintas formas de la invención.

En los dibujos:

La FIG. 1 es una ilustración esquemática que representa el metabolismo de los folatos reducidos.

- 35 PRPP- 5-fosforibosil-1-pirofosfato; GAR-TFasa- Glicinamida ribonucleótido transformilasa; AICAR-TFasa- 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido transformilasa; MRP-1- Proteína resistente a múltiples drogas 1; TS- Timidilato sintasa; IMP- Inosina monofosfato; DHFR- Dihidrofolato reductasa; RFC- transportador de folato reducido.

- 40 La FIG. 2 es una ilustración esquemática que representa la inhibición por antifolato del metabolismo del folato. Los inhibidores del metabolismo del folato que entran en la célula mediante RFC están marcados en verde; los inhibidores del metabolismo del folato que entran en la célula mediante difusión a través de la membrana celular están marcados en marrón; las enzimas inhibidas están marcadas en rojo. MTX- metotrexato; MTA- antifolato multidiana; EDX- edatrexato; AMT- aminopterina; TMQ- trimetrexato; DDATHF – ácido 5,10- dideaza-5,6,7,8-tetrahidrofólico.

- 45 Las FIGs. 3a-b son ilustraciones esquemáticas que representan las fórmulas químicas del ácido fólico (Figura 3a) y del MTX (Figura 3b).
- 50 La FIG. 4 es una ilustración esquemática que representa un modelo topológico para el hRFC. El modelo topológico del hRFC ilustra 12 dominios transmembrana (TMDs), el N- y el C- terminales orientados hacia el interior y el sitio de N-glicosilación en la Asn58 orientado hacia el exterior. Se muestran también las posiciones de los 11 residuos de cisteína en la secuencia primaria del hRFC. Los 56 aminoácidos C-terminales incluyen 4 residuos de cisteína (adoptado de Cao and Matherly, 2003).

- 50 La FIG. 5 es una ilustración esquemática que representa la conversión metabólica de la galactosa a glucosa-6-fofato.

La FIG. 6 es una ilustración esquemática que representa la estrategia de selección permanente con el gen RFC. (1) Tratamiento con MTX para el aislamiento de las células RFC-; (2) Transfección con un vector de expresión que lleva el EGFP (gen marcador) ligado al gen del hRFC en una configuración bi-cistrónica; (3) Crecimiento en

concentraciones selectivas de un folato reducido (leucovorina) y de G418; (4) Mantenimiento de alto nivel de expresión en las concentraciones selectivas de leucovorina en ausencia de G418- Selección permanente no-tóxica; se utilizó GFP como el gen de interés en este estudio.

5 La FIG. 7 es una ilustración esquemática que representa la estrategia de selección permanente con el gen GalK1. (1) Transfección con el vector de expresión que lleva el EGFP (gen marcador) ligado al gen de la GalK1 humana en una configuración bi-cistrónica; (2) Crecimiento en ausencia de glucosa y en concentraciones selectivas de galactosa y de G418; (3) Mantenimiento de alto nivel de expresión en las concentraciones selectivas de galactosa en ausencia de G418; Selección permanente no-tóxica; se utilizó GFP como el gen de interés en este estudio.

10 La FIG. 8 es un análisis mediante FACS que representa el desplazamiento en la fluorescencia del F-MTX por antifolato en células CHO-S con pérdida de función del RFC. Las células CHO-S y las deficientes en RFC (CHO-SR0.15 establecidas mediante la exposición a MTX 150 nM) se tiñeron con F-MTX (un análogo fluorescente del MTX) después de lo cual se incubaron las células con varias concentraciones de MTX o TMQ (Trimetrexato, un antifolato lípido-soluble que es independiente del RFC para su entrada). El desplazamiento del F-MTX indica un RFC funcionalmente activo. La retención de la fluorescencia del F-MTX tras la competición con concentraciones de MTX de 100 nM en las CHO-SR0.15 sugiere un defecto en el transporte del MTX, p. ej. pérdida de la función del RFC.

15 20 Las FIGs. 9a-c son análisis mediante FACS que representan el desplazamiento en la fluorescencia del F-MTX por antifolato en células CHO AA8 con pérdida de función del RFC. Las células CHO AA8 silvestres y los clones C4 y C5 deficientes en RFC se tiñeron con F-MTX (análogo fluorescente del MTX) después de lo cual se sometieron a varias concentraciones de MTX o TMQ (un antifolato lípido-soluble que es independiente del RFC para su entrada). El desplazamiento del F-MTX indica un RFC funcionalmente activo. La retención de la fluorescencia del F-MTX tras la competición con altas concentraciones de MTX es indicativo de un defecto en el transporte del MTX, p. ej. pérdida de la función del RFC.

25 La FIG. 10 es un gráfico de barras que ilustra la hipersensibilidad al TQM de las células parentales o las CHO-SR0.15. Las células se incubaron durante 3 días en presencia de medio de crecimiento y varias concentraciones de TQM, y se determinaron la supervivencia de las células y las concentraciones de TMQ que inhibían el 50%. Notar la hipersensibilidad 8 veces mayor de las células CHO-SR0.15 en comparación con las células parentales CHO.

30 35 Las FIGs. 11a-b son gráficos de barras que representan la pérdida de transporte de MTX en sublíneas resistentes al antifolato. Se determinaron las velocidades de transporte de [³H]MTX en células parentales y folato-resistentes. Las células se incubaron con MTX 2 μM durante 3 minutos, seguido de lo cual se determinó el nivel de captación del MTX radiomarcado mediante recuento por centelleo. CHO-S-R0.04 y CHO-S-R0.12 son células CHO-S deficientes en RFC obtenidas mediante la exposición gradual de las células hasta 40 nM y 120 nM de MTX, respectivamente. C4 y C5 son clones CHO AA8 obtenidos mediante el tratamiento con MTX 150 nM. Observar el escaso transporte de [³H]MTX en las células CHO-S-MTXR así como en las células C4 y C5, lo que es indicativo de la pérdida de función del RFC.

40 La FIG. 12 es un análisis mediante FACS que representa la expresión de EGFP en las células CHO C5 transfectadas con RFC-HA. Análisis mediante citometría de flujo de las células CHO C5 no transfectadas y sus transfectantes doblemente seleccionados durante seis semanas en medio que contenía 600 μg/ml de G418 y leucovorina (LCV) 0,25-2 nM. Las células transfectadas parecen expresar el EGFP de modo homogéneo a todas las concentraciones de leucovorina.

45 La FIG. 13 es un análisis mediante FACS que representa la expresión de EGFP en células CHO-S transfectadas con RFC y RFC-HA. Los análisis representativos de citometría de flujo de la fluorescencia del EGFP de las células CHO-S-R0.15 no transfectadas, así como sus transfectantes RFC o RFC-HA, doblemente seleccionadas durante dos semanas en un medio que contenía 600 μg/ml de G418 y leucovorina (LCV) 2-10 nM. La población CHO-SR0.15 transfectante era homogénea y exhibía un incremento de 5 a 10 veces en la fluorescencia del EGFP con respecto a las células no transfectadas.

50 55 La FIG. 14 es un análisis mediante Western Blot que representa la expresión de RFC-HA en las células CHO C5 transfectadas. Primero se extrajeron las proteínas solubles en Tritón X-100 de las células CHO C5 (-) y de sus transfectantes RFC-HA (+) crecidas durante 4 semanas en medio de crecimiento que contenía 600 μg/ml de G418 y leucovorina 2 nM. Las proteínas se separan después mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, se transfieren a una membrana de nylon y se hacen reaccionar con un anticuerpo monoclonal frente a la cola de HA. Las membranas se revelaron mediante un procedimiento estándar de aumento de la quimioluminiscencia (ECL). Observar la expresión específica de la cola de HA en las células transfectadas con RFC-HA.

La FIG. 15 es un gráfico que representa la inhibición del crecimiento por MTX en las células RFC transfectadas. Se muestra la citotoxicidad del MTX en las células C5R0.15 (deficientes de RFC) y en sus transfectantes RFC-HA. Las células se incubaron durante 3 días a varias concentraciones de MTX, después de lo cual se midió la supervivencia celular mediante exclusión de azul tripán y se determinaron las concentraciones inhibidoras del 50% (indicadas mediante flechas). Observar el incremento de 100 veces en la sensibilidad al MTX en ambos transfectantes RFC y RFC-HA.

Las FIG. 16a-g son imágenes de fluorescencia que representan la tinción inmunofluorescente del RFC. Las células parentales C5 o las células transfectadas C5 RFC-HA se cultivaron en presencia de leucovorina 1 nM y 600 µg/ml de G418 y se sometieron a tinción inmunofluorescente. La células se fijaron con formaldehido al 4%, se trataron con tampón de lisis y se tiñeron con anticuerpos monoclonales frente a la cola de hemaglutinina (HA), seguido de anticuerpos secundarios marcados con fluoresceína. La tinción dapi del ácido nucleico revela los núcleos. Figuras 16a-c – células C5 no transfectadas RFC-, control negativo); Figuras 16d-g – células C5 RFC-HA. Observar la tinción verde de fluorescencia observada después de la inmunotinción de HA en las células transfectadas C5 RFC-HA (Figuras 16f y g) en comparación con las células C5 no transfectadas (Figura 16c). La Figura 16g muestra en aumento una célula teñida de la Figura 16f.

La FIG. 17 es un gráfico que representa el crecimiento de las células transfectadas con hRFC bajo condiciones de crecimiento selectivo. Se sembraron 2×10^5 células en placas Petri de 30 mm (5 ml de medio/placa). Las concentraciones celulares se determinan diariamente durante un total de 4 días, sin medio de refresco. Los transfectantes hRFC-HA se crecieron en medio selectivo que contenía FBS dializado, leucovorina 1 o 2 nM en presencia de 0,6 mg/ml de G418 o después de que se eliminó el G418 durante 3 semanas. Las células parentales RFC-AA8 y las C5, las cuales no pueden crecer en medio selectivo, se crecieron en medio no-selectivo (RPMI) que contiene ácido fólico 2,3 µM y suplementado con FBS al 10%. El tiempo de duplicación de los transfectantes de hRFC-HA fue de ~ 28 horas.

Las FIGs 18a-b son análisis mediante FACS que representan la estabilidad de la expresión de EGFP bajo condiciones de selección permanente con RFC. Se muestra una citometría de flujo de la expresión de la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP) en las células C5 transfectadas con hRFC-HA. Los transfectantes hRFC-HA se crecieron en medio selectivo que contenía FBS dializado, leucovorina (LCV) 1 o 2nM en presencia de 600 µg/ml de G418, o tras la eliminación del G418. Las células parentales C5-RFC (control negativo), que no crecen en medio selectivo, se crecieron en medio no-selectivo que contenía ácido fólico 2,3 µM y suplementado con FBS al 10%.

Las FIGs 19a-b son análisis mediante FACS que representan la estabilidad de la expresión de EGFP bajo condiciones de selección permanente con GalK1. Se muestra un análisis de citometría de flujo de la expresión de EGFP en células de ovario de hámster chino deficientes en galactoquinasa transfectadas con el vector bi-cistrónico hGalK1-EGFP, creciendo bajo selección a concentraciones sub-milimolares de galactosa en ausencia o en presencia de G418 durante 3 semanas (Figura 19a) o 2 meses (Figura 19b). Las células deficientes en galactoquinasa se crecieron en medio no- selectivo.

La FIG. 20 es un gráfico que representa el crecimiento de las células transfectadas GalK1 bajo condiciones de crecimiento selectivo. Se sembraron 2×10^5 células en placas Petri de 30 mm (5 ml de medio/placa). Las concentraciones celulares se determinan diariamente durante un total de 4 días, sin medio de refresco. Los transfectantes GalK1 se crecieron en medio selectivo (RPMI 1640 suplementado con FBS dializado al 10%, D-galactosa 0,25-0,5 mM) en presencia de G418 a 1mg/ml o después de quitar el G418 durante 3 semanas. Las células parentales de ovario de hámster chino deficientes en galactoquinasa se crecieron en medio no-selectivo (RPMI-1640 que contenía D-glucosa 5 mM y suplementado con suero de ternera fetal al 10%). El tiempo de duplicación de los transfectantes de GalK1 fue de ~ 28 horas.

40 DESCRIPCIÓN DE LA REALIZACIONES PREFERIDAS

La presente invención es de un método de producción de proteínas en células de mamífero que usa una selección permanente en ausencia de drogas citotóxicas. Específicamente, la presente invención se puede usar para producir grandes cantidades de proteínas humanas altamente puras las cuales son apropiadas para aplicaciones farmacéuticas.

Los principios y el funcionamiento del método de producción de proteínas de acuerdo con la presente invención puede entenderse mejor con referencia a los dibujos y a las descripciones acompañantes.

Antes de explicar en detalle al menos una de las realizaciones de la invención, se ha de entender que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o exemplificada por los Ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de ser practicada o llevada a cabo de distintas maneras. También, es de entender que la fraseología y la terminología empleada aquí es con propósito de descripción y no debe considerarse como limitante.

Los factores de crecimiento humanos y las hormonas se usan ampliamente en el tratamiento de enfermedades genéticas o infecciosas. Sin embargo, la purificación de proteínas humanas a partir fuentes del cuerpo humano como la sangre es complicada, laboriosa y cara. Además, las proteínas purificadas a partir de células humanas o animales pueden estar contaminadas con varios patógenos como los virus del HIV o de la Hepatitis y son, por lo tanto, inadecuadas para uso en aplicaciones farmacéuticas.

Para superar dichas limitaciones se han desarrollado sistemas de expresión recombinante. La expresión de proteínas humanas recombinantes a partir de sistemas de expresión de mamífero permite el plegamiento correcto

de la proteína y las modificaciones post-traduccionales adecuadas. Sin embargo, la expresión de proteínas humanas que usan sistemas de expresión de mamífero comunes conlleva a menudo bajos rendimientos de proteína así como con trazas de drogas citotóxicas [p. ej. metotrexato (MTX)] el cual se usa para la selección positiva de las células transfectadas.

Se encontró que la selección permanente que usa una proteína viable para la célula como un marcador de selección se puede usar para sobreexpresar una proteína de interés en células de mamífero en ausencia de drogas citotóxicas y que las proteínas producidas mediante dicho método son altamente idóneas para aplicaciones farmacéuticas.

Como se muestra en los Ejemplos 1-3 de la sección de Ejemplos que sigue, la co-transfección de las células deficientes en el transportador de folato reducido (RFC) con un vector de expresión bi-cistrónico que incluye el gen RFC y un gen marcador (p. ej. EGFP), seguido de una disminución gradual de las concentraciones de leucovorina (un folato reducido) condujo a una sobreexpresión del gen de RFC y a una expresión significativa del gen marcador en un medio libre de cualquier droga citotóxica. Por otra parte, como se muestra en los Ejemplos 1, 2 y 4 de la sección de Ejemplos que sigue, la co-transfección de células deficientes en GalK1 con un vector de expresión bi-cistrónico que incluye el gen GalK1 y el gen marcador (p. ej. EGFP) seguido de una selección en un medio que contiene D-galactosa 5 mM como única fuente de hexosa condujo a una sobreexpresión de las proteínas GalK1 y EGFP en ausencia de cualquier droga citotóxica.

Así, se proporciona junto con esto un método de selección para células positivamente transformadas.

La expresión “células positivamente transformadas” como se usa aquí se refiere a las células que son positivas para una transformación genética, p. ej. células en las cuales una molécula de ADN exógeno (p. ej. un polinucleótido), o bien, se integra dentro del genoma de la célula, o bien está presente en el núcleo celular como una unidad de replicación extracromosómica. Se conocen en la técnica métodos de transformación celular y se describen adicionalmente más adelante.

El método se efectúa (i) proporcionando células eucariotas que carecen de actividad de una proteína de viabilidad celular endógena; (ii) transformando las células eucariotas con un constructo de ácido nucleico que codifica la proteína de viabilidad celular o al menos una porción funcional de la misma; y (iii) cultivando las células eucariotas transformadas con el constructo de ácido nucleico bajo condiciones de tal forma que la viabilidad celular depende de la actividad normal de la proteína de viabilidad celular, seleccionando de ese modo las células positivamente transformadas.

La expresión “proteína de viabilidad celular” como se usa aquí se refiere a cualquier proteína que sea esencial para el crecimiento celular, es decir, en ausencia de la cual la célula es incapaz de crecer. El crecimiento celular depende de la asimilación, captación, incorporación y biosíntesis de nutrientes como los aminoácidos, ácidos nucleicos, ácidos grasos, carbohidratos, vitaminas y similares, los cuales son esenciales para la biosíntesis de los componentes celulares (p. ej. proteína, ADN, ARN, carbohidratos y grasa) y/o compartimentos celulares (p. ej. membranas, orgánulos). En consecuencia, una proteína de viabilidad celular es cualquier proteína que es esencial para el crecimiento celular como se ha descrito anteriormente en este documento. Preferiblemente, la proteína de viabilidad celular es una proteína transportadora de folato reducido (RFC), la proteína galactoquinasa 1 (GalK1), la proteína timidina quinasa 1, la proteína adenosina quinasa, triptófano sintasa, histidinol deshidrogenasa y glutamina sintasa.

La expresión “porción funcional” como se usa aquí se refiere a una parte de la proteína de viabilidad celular (es decir, un polipéptido) la cual exhibe propiedades funcionales de la proteína como la de unión a un sustrato. Preferiblemente, la porción funcional del transportador de folato reducido es una secuencia polipeptídica que incluye los aminoácidos 23-434 (región de transporte de folato) como se expone en SEQ ID NO:1 (GenBank Accession No. AAB35058), más preferiblemente, la porción funcional del transportador de folato reducido de la presente invención es una secuencia polipeptídica que incluye los aminoácidos 1-591 como se expone en SEQ ID NO:1. Según cualquiera de las realizaciones preferidas de la presente invención, la porción funcional de la proteína galactoquinasa 1 de la presente invención es una secuencia polipeptídica que incluye los aminoácidos 1-392 como se expone en SEQ ID NO:2 (GenBank Accession No. NP_000145).

Las células eucariotas pueden ser cualquier célula que posea un núcleo altamente desarrollado y complejo el cual está rodeado por una envoltura nuclear que consiste en dos membranas. Las células eucariotas pueden ser células de levadura, células de insecto, células de planta y células de mamífero. Las células eucariotas de la presente invención son células de mamífero como las células de hámster chino (células CHO), células de pulmón de hámster chino, células de riñón de hámster recién nacido, células COS-1, células NIH/3T3, células Caco-2, células 293T, células HeLa, CCRF-CEM, L1210.

Según el método de la presente invención, las células eucariotas de la presente invención carecen de la proteína de viabilidad celular de la presente invención. Ejemplos de dichas células incluyen células CHO AA8 que carecen de actividad transportadora RFC (Assaraf and Schimke, 1987), células de pulmón de hámster chino deficientes en la enzima galactoquinasa (GalK) (ATCC; CRL-1657), células de ratón deficientes en timidina quinasa [Kaufman ER and Davidson RL, 1975, Somatic Cell Genet. 1(2): 153-63], células de riñón de hámster recién nacido deficientes en

adenosina quinasa [Mittal RA, et al., 2000; Biofactors. 11(4): 247-56], células CHO deficientes en triptófano sintasa y deficientes en histidinol deshidrogenasa (Hartman SC and Mulligan RC, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047-8051).

5 Son conocidos en la técnica los métodos de obtención de células deficientes en la proteína de viabilidad celular. Por ejemplo, las células que carecen de actividad transportadora RFC se pueden obtener sometiendo a las células a altas concentraciones de un antagonista del folato [p. ej., metotrexato (MTX)] y aislando las células supervivientes que carecen de actividad transportadora RFC, esencialmente como se describe en el Ejemplo 2 de la sección de Ejemplos que sigue. Brevemente, las células CHO AA8 (5×10^5 / placa de Petri de 10cm, en presencia de 20 ml de medio) se crecen como una monocapa en medio de crecimiento α MEM que contiene ácido fólico 2,3 μ M suplementado con suero bovino fetal al 10% (GIBCO), glutamina 2 mM y antibióticos. Para la selección por MTX, las células se expusieron a MTX (Sigma) 75 nM y 150 nM lo que corresponde a ~ 5 y 10 veces, respectivamente, el 50% de la dosis letal (LD_{50}). Alternativamente se puede llevar a cabo una selección paso a paso aumentando gradualmente las concentraciones de MTX desde 10 nM, hasta 40 nM, 120 nM y 150 nM en el medio durante un periodo de ~ cinco meses.

Las células que carecen de la proteína galactoquinasa 1 se pueden obtener exponiendo las células a un análogo tóxico de galactosa, 2-deoxi-D-galactosa (2-DOG), esencialmente como se describe en Zaret KS and Stevens KA, Mol Cell Biol. 1990; 10(9): 4582-9.

20 Las células de la presente invención (las cuales carecen de actividad de una proteína de viabilidad celular) se transforman con un constructo de ácido nucleico que codifica la proteína de viabilidad celular de la presente invención (p. ej., transportador de folato reducido, galactoquinasa 1, timidina quinasa, y/o adenosina quinasa).

25 Se ha clonado el transportador de folato reducido a partir de humanos (GenBank Accession No. AAB35058), de ratón (GenBank Accession No. AAC53287) y de rata (GenBank Accession No. AAC61788); la galactoquinasa 1 se ha clonado a partir de humanos (GenBank Accession No. NP_000145), de ratón (GenBank Accession No. NP_058601) y de rata (GenBank Accession No. XP_213528); la timidina quinasa se ha clonado de humanos (GenBank Accession No. AAN73847), de ratón (GenBank Accession No. AAD35091) y de varios virus y bacterias; la adenosina quinasa se ha clonado de humanos (GenBank Accession No. AAP35434), de ratón (GenBank Accession No. AAH09659), de rata (GenBank Accession No. AAH81712) y de muchos otros organismos. De este modo, la información de las secuencias codificantes del transportador de folato reducido, galactoquinasa 1, timidina quinasa y/o adenosina quinasa están disponibles en varias bases de datos incluyendo la base de datos del GenBank disponible en <http://www4.ncbi.nlm.nih.gov/>.

30 Para expresar una proteína de viabilidad celular exógena (p. ej., el transportador de folato reducido, galactoquinasa 1) en células de mamífero, se liga, preferiblemente, una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de viabilidad celular [p. ej., GenBank Accession No. S78996 (SEQ ID NO:4) para el transportador de folato reducido de humanos; GenBank Accession No. NM_00154 (SEQ ID NO:3) para la galactoquinasa 1 humana] a un constructo de ácido nucleico adecuado para la expresión en células de mamífero. Dicho constructo de ácido nucleico incluye una secuencia promotora para dirigir la transcripción de la secuencia de polinucleótidos en la célula de forma constitutiva o inducible.

35 Se apreciará que el constructo de ácido nucleico de la presente invención también pueda utilizar una secuencia de ácido nucleico que codifique para un homólogo de la proteína de viabilidad celular que exhiba la actividad deseada (p. ej., transporte de la actividad galactoquinasa). Dichas secuencias de ácido nucleico pueden ser, por ejemplo, al menos un 80%, al menos un 81%, al menos un 82%, al menos un 83%, al menos un 84%, al menos un 85%, al menos un 86%, al menos un 87%, al menos un 88%, al menos un 89%, al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% o al menos un 100% idéntica a la SEQ ID NO:3, como se determina utilizando el software de BestFit del paquete de análisis de secuencia de Wisconsin, que utiliza el algoritmo de Smith y Waterman, donde el peso del hueco equivale a 50, el peso de la longitud equivale a 3, el emparejamiento medio equivale a 10 y la media del no emparejamiento equivale a -9.

40 El constructo de ácido nucleico de la presente invención incluye además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de interés.

45 La expresión "proteína de interés" como se usa aquí se refiere a cualquier polipéptido que cualquier experto en la técnica produciría en las células eucariotas de la presente invención. Preferiblemente, la proteína de interés de la presente invención se puede usar para propósitos farmacéuticos y/o ciencia básica. Según las realizaciones preferidas de la presente invención la proteína de interés de la presente invención puede ser un factor de crecimiento, una citoquina y/o una hormona que se utiliza para el tratamiento de diferentes trastornos, así como una proteína de la matriz extracelular, una proteína de adhesión celular y/o una proteína de señalización celular que pueden ser utilizadas para aplicaciones de regeneración tisular.

50 Ejemplos no limitantes de factores de crecimiento incluyen el factor de crecimiento epidérmico (GenBank Accession No. NP_001954), el factor de crecimiento transformante β (GenBank Accession No. NP_000651), el factor de

crecimiento de fibroblastos ácido (GenBank Accession No. NP_000791), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (GenBank Accession No. NP_001997), la ertropoyetina (GenBank Accession No. NP_000790), la trombopoyetina (GenBank Accession No. NP_000451), el factor de crecimiento de hepatocitos (GenBank Accession No. NP_000592), el factor de crecimiento-I tipo insulina (GenBank Accession No. NP_000609), el factor de crecimiento-II tipo insulina (GenBank Accession No. NP_000603), el interferón gamma (GenBank Accession No. NP_000610) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (GenBank Accession No. NP_079484).

5 Ejemplos no limitantes de hormonas incluyen la prolactina (GenBank Accession No. AAH15850), la hormona paratiroides (GenBank Accession No. AAK34950), la gastrina (GenBank Accession No. AAA52520), la leptina (GenBank Accession No. EAL24315), la hormona de crecimiento (GenBank Accession No. AAA98618), la insulina (GenBank Accession No. AAN39451) y el CG-β (GenBank Accession No. P01233).

10 Ejemplos no limitantes de citoquinas incluyen SDF-1α (GenBank Accession No. AAA40100), la IL-7 (GenBank Accession No. NP_000871), la IL-10 (GenBank Accession No. NP_000563), la IL-20 (GenBank Accession No. NP_061194) y la IL-19 (GenBank Accession No. NP_715639).

15 Ejemplos no limitantes de proteínas extracelulares incluyen el fibrinógeno (GenBank Accession No. NP_000499), el colágeno (GenBank Accession No. NP_000079), la fibronectina (GenBank Accession No. NP_002017), la vimentina (GenBank Accession No. NP_003371), la proteína asociada a microtúbulos 1b (GenBank Accession No. NP_005900) (Theodosis DT. 2002; Front Nuroendocrinol. 23: 101-35), el factor de crecimiento de neuritas (NOF) (GenBank Accession No. P21741) (Tsukamoto Y. et al., 2001; Histol. Histopathol. 16: 563-71), la celulosa bacteriana (BC) (GenBank Accession No. NP_625477) y la laminina (GenBank Accession No. NP_000218).

20 Ejemplos no limitantes de proteínas de adhesión celular incluyen la integrina (GenBank Accession No. NP_002202) (Stefanidakis M. Et al., 2003; J. Biol. Chem. 278:34674-84), la molécula de adhesión intercelular (ICAM) 1 (GenBank Accession No. NP_000192) (van de Stolpe A and van der Saag PT. 1996; J. Biol.Med. 74: 13-33), N-CAM (GenBank Accession No. NP_000606), la cadherina (GenBank Accession No. NP_004351), la tenascina (GenBank Accession No. NP_061978) (Joshi P et al., 1993; J. Cell Sci. 106: 389-400), la gicerina (GenBank Accession No. NP_006491) y la proteína inducida por daño nervioso 2 (ninjurin2) (GenBank Accession No. NP_067606) (Araki T and Milbrandt J. 2000; J. Neurosci. 20: 187-95).

25 Ejemplos no limitantes de proteínas de señalización celular incluyen la proteína quinasa activada por el mitógeno p38 (GenBank Accession No. NP_002736), el factor nuclear kappaB (GenBank Accession No. NP_003989), la proteína inhibidora de la Raf quinasa (RKIP) (GenBank Accession No. XP_497846), Raf-1 (GenBank Accession No. NP_002871), MEK (GenBank Accession No. NP_002746), la Proteína quinasa C (PKC) (GenBank Accession No. NP_002728), la fosfoinositido-3-quinasa gamma (GenBank Accession No. NP_002640), el receptor de tirosina quinasa [p. ej. el receptor de insulina (GenBank Accession No. NP_000199)], las proteínas G heterotriméricas [p. ej. la G-alfa(i) (GenBank Accession No. NP_002060), G-alfa(s) (GenBank Accession No. NP_000507) y G-alfa(q) (GenBank Accession No. NP_002063)], la caveolina-3 (GenBank Accession No. NP_001225), y las proteínas 14-3-3 (GenBank Accession No. NP_003397).

30 Los promotores constitutivos adecuados para utilizar en la presente invención son secuencias promotoras que son activas bajo la mayoría de las condiciones ambientales y la mayoría de tipos de células como el citomegalovirus (CMV) y el virus del sarcoma de Rous (RSV). Los promotores inducibles adecuados para su uso con la presente invención incluyen por ejemplo los promotores inducibles de los genes de metalotioneína (MT I y MT II) (Majumdar S et al., (2003) J. Biol. Chem. 278: 26216-26226) y el promotor inducible por tetraciclina [Zabala M et al., Cancer Res. 2004, 64(8): 2799-2804].

35 El constructo de ácido nucleico (también denominado en este documento como un “vector de expresión”) de la presente invención incluye secuencias adicionales que hacen a este vector adecuado para la replicación y la integración en procariotas, eucariotas, o preferiblemente ambas (p. ej. vectores lanzadera). Además, un vector de clonación típico también puede contener una secuencia de iniciación de la transcripción y de la traducción, un terminador de la transcripción y de la traducción y una señal de poliadenilación.

40 Los promotores de eucariotas contienen típicamente dos tipos de secuencias de reconocimiento, la caja TATA y elementos promotores corriente arriba. La caja TATA, localizada 25-30 pares de bases corriente arriba del sitio de iniciación de la transcripción, se cree que participa en la dirección de la ARN polimerasa para iniciar la síntesis de ARN. Los otros elementos promotores corriente arriba determinan la velocidad a la que se inicia la transcripción.

45 Los elementos amplificadores pueden estimular hasta 1.000 veces la transcripción de los promotores homólogos y heterólogos ligados. Los amplificadores son activos cuando están localizados corriente arriba o corriente abajo del de iniciación de la transcripción. Muchos elementos amplificadores derivados de virus poseen una amplia gama de huéspedes y son activos en una variedad de tejidos. Por ejemplo, el amplificador del gen temprano de SV40 es adecuado en muchos tipos celulares. Otras combinaciones de amplificador/promotor que son adecuadas para la presente invención incluyen aquellos derivados de poliomavirus, citomegalovirus humano o de ratón (CMV), repetición terminal larga de varios retrovirus como el virus de la leucemia murina, virus de ratón o sarcoma de Rous y el VIH. Ver, Enhancers and Eucaryotic Expression, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1983.

En la construcción del vector de expresión, el promotor se posiciona preferiblemente a la misma distancia aproximadamente del sitio de comienzo de la transcripción heteróloga como ocurre desde el sitio de inicio de la transcripción en su entorno natural. Sin embargo, como se conoce en la técnica, puede haber sitio para alguna variación en la distancia sin pérdida de la función promotora.

Se pueden añadir secuencias de poliadenilación al vector de expresión con el fin de incrementar la eficiencia de la traducción de la proteína de viabilidad celular y/o de la proteína de interés. Se requieren dos elementos de secuencia distintos para una adenilación precisa y eficiente: secuencias ricas en GU o U localizadas corriente abajo del sitio de poliadenilación y una secuencia altamente conservada de seis nucleótidos, AAUAAA, localizada a 11-30 nucleótidos corriente arriba. Las señales de terminación y de poliadenilación que son adecuadas para la presente invención incluyen aquellas derivadas del SV40.

Además de los elementos ya descritos, el vector de expresión de la presente invención puede típicamente contener otros elementos especializados destinados a incrementar el nivel de expresión de los ácidos nucleicos clonados o a facilitar la identificación de las células que llevan el ADN recombinante. Por ejemplo, un número de virus animales 15 contienen secuencias de ADN que promueven la replicación extra cromosómica del genoma viral en tipos celulares permisivos. Los plásmidos que soportan estos replicones vírales se replican episomialmente siempre que se proporcionen los factores apropiados mediante los genes, ya sean los que lleva el plásmido o, los del genoma de la célula huésped.

El vector puede o no incluir un replicón eucariótico. Si está presente el replicón eucariótico, entonces el vector se amplifica en las células eucariotas mediante el marcador de selección adecuado. Si el vector no consta de un replicón eucariótico, no es posible la amplificación. En su caso, el ADN recombinante se integra en el genoma de la célula manipulada, donde el promotor dirige la expresión del ácido nucleico deseado.

El vector de expresión de la presente invención puede incluir además secuencias de polinucleótidos adicionales que permitan, por ejemplo, la traducción de varias proteínas a partir de un único mARN como el sitio interno de entrada 25 al ribosoma (IRES) y secuencias para la integración genómica del polipéptido promotor quimérico.

Según la presente invención, durante la elaboración del constructo de ácido nucleico de la presente invención, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés se liga corriente abajo de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de viabilidad celular. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés se liga corriente abajo de la proteína de viabilidad celular mediante p. ej. un vector de expresión 30 que contiene IRES, de tal forma que la expresión de la proteína de interés está bajo la influencia del mismo promotor que regula la expresión de la proteína de viabilidad celular.

Por ejemplo, como se muestra en el Ejemplo 2 de la Sección de Ejemplos que sigue, el cDNA de hRFC (es decir, la proteína de viabilidad celular) se clonó corriente arriba del elemento IRES en el vector pIRES-2-EGFP (Clontech), es decir, corriente arriba de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés (EGFP).

35 Ejemplos de vectores de expresión de mamífero incluyen, pero no se limitan a, pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2 (+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, los cuales están disponibles en Invitrogen, pCI el cual está disponible en Promega, pMbac, pPbac, pBK-RSV y pBK-CMV que están disponibles en Stratagene, pTRES que está disponible en Clontech, y sus derivados.

40 Se pueden usar también los vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus de eucariotas como los retrovirus. Los vectores SV40 incluyen pSVT7 y pMT2. Los vectores derivados del virus del papiloma bovino incluyen pBV-1MTHA, y los vectores derivados del virus de Epstein Bar, pHEBO y p2O5. Otros vectores modelo incluyen pMSG, pAV009/A⁺, pMTO10/A⁺, pMAMneo-5, baculovirus pDSVE, y cualquier otro vector que 45 permite la expresión de proteínas bajo el control del promotor temprano del SV40, el promotor tardío del SV40, el promotor de la metalotioneína, el promotor del virus de tumor mamario de ratón, el promotor del virus del sarcoma de Rous, el promotor polihedrina, u otros promotores que se han mostrado eficaces en la expresión en células eucariotas.

Como se describe más arriba, los virus son agentes infecciosos muy especializados que han evolucionado, en 50 muchos casos, para evadirse de los mecanismos de defensa del huésped. Típicamente, los virus infectan y se propagan en los tipos celulares específicos. La especificidad de selección de los vectores virales utiliza su especificidad natural para dirigirse específicamente a tipos de células predeterminadas y de ese modo introducir un gen recombinante dentro de la célula infectada. En consecuencia, el tipo de vector usado en la presente invención dependerá del tipo de célula transformada. La capacidad de seleccionar vectores adecuados según el tipo de célula transformada está dentro de las capacidades del experto en la técnica ordinaria y como tal no se facilita aquí una descripción general de consideración de la selección. Por ejemplo, células de la médula ósea pueden ser diana utilizando el virus tipo I de la leucemia de células T humana (HTLV-I), y células de riñón podrían ser diana utilizando el promotor heterólogo presente en el baculovirus Autographa californica nucleopolihedrovirus (AcMNPV) como se describe en Liang CY et al., 2004 (Arch. Virol. 149: 51-60).

- Los vectores virales recombinantes son útiles para la expresión *in vivo* de la proteína de viabilidad celular y/o de la proteína de interés de la presente invención ya que ofrecen ventajas como la infección lateral y la especificidad de diana. La infección lateral es inherente en el ciclo de vida, por ejemplo, de los retrovirus y es el proceso mediante el cual una única célula infectada produce muchos viriones progenie que brotan fuera e infectan a las células vecinas.
- 5 El resultado es que una gran área termina rápidamente infectada, la mayor parte de la cual no estaba infectada inicialmente por partículas virales originales. Esto está en contraste con la infección de tipo vertical en la cual el agente infeccioso se propaga solamente a través de la progenie hija. También se pueden producir vectores virales que no sean capaces de propagarse lateralmente. Esta característica puede ser útil si el propósito deseado es el de introducir un gen específico sólo en un número localizado de células diana.
- 10 Se pueden utilizar varios métodos para introducir el vector de expresión de la presente invención dentro de células madre. Dichos métodos se describen en general en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) y Gilboa et al., [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986] e incluyen, por ejemplo, la transfección estable o transitoria, la lipofección, la electroporación y la infección con vectores virales recombinantes. Además, ver U.S. Pat. Nos. 5.464.764 y 5.487.992 para los métodos de selección positiva-negativa.
- 15 La introducción de ácidos nucleicos mediante infección viral ofrece ventajas sobre otros métodos como la lipofección y la electroporación, ya que se puede obtener una alta eficiencia de transfección debido a la naturaleza infecciosa de los virus.
- 20 Según la presente invención, el cultivo se efectúa bajo condiciones de tal forma que la viabilidad celular es dependiente de la actividad normal de la proteína de viabilidad celular. Se valorará que dichas condiciones dependan del tipo de proteína de viabilidad celular que se use.
- 25 Por ejemplo, si las células son aquellas que carecen de actividad de un transportador de folato reducido (p. ej. células CHO AA8), entonces después de la transfección con el constructo de ácido nucleico que codifica el transportador de folato reducido (p. ej. SEQ ID NO:4) se cultivan las células en un medio que contiene un folato reducido [p. ej. 5-formil-tetrahidrofolato (leucovorina) o 5-metil-tetrahidrofolato] como única fuente de ácido fólico.
- 30 Preferiblemente, dichas condiciones de cultivo incluyen leucovorina en un rango de concentración de 0,01 - 5 nM, más preferiblemente, en un rango de concentración de 0,02 – 2 nM, lo más preferiblemente en un rango de concentración de 0,25 – 2 nM.
- 35 Como se muestra en el ejemplo 2 de la sección de Ejemplos que sigue, la selección de las células que expresan el transportador de folato reducido se llevó a cabo en presencia de un medio de cultivo (medio RPMI-1640 carente de ácido fólico) suplementado con suero de ternera fetal dializado al 10% y contenido leucovorina 2 nM como única fuente de folato. Tras 5 semanas en cultivo, las células se seleccionaron de forma permanente en presencia de 1, 0,5, o 0,25 nM de leucovorina.
- 40 Alternativamente, si las células son aquellas que carecen de actividad de la proteína Galactoquinasa 1 [p. ej. células GalK1-deficientes; Zaret, 1990 (Supra)], a continuación, después de la transfección con el constructo de ácido nucleico que codifica la Galactoquinasa 1 (p. ej. SEQ ID NO:3) se cultivan las células en un medio que contiene D-galactosa como única fuente de hexosa.
- 45 Preferiblemente, dichas condiciones de cultivo incluyen D-galactosa en un rango de concentración de 0,01 - 10 mM, más preferiblemente, en un rango de concentración de 0,05 – 8 mM, más preferiblemente, en un rango de concentración de 0,1 – 5 mM, lo más preferiblemente en un rango de concentración de 0,25 – 0,5 mM.
- Como se muestra en el ejemplo 2 de la sección de Ejemplos que sigue, la selección de las células que expresan D-galactoquinasa se llevó a cabo en presencia de un medio de cultivo (medio RPMI-1640 carente de glucosa) suplementado con suero de ternera fetal dializado al 10% y contenido, cualquiera de las dos, 5 mM o 2mM de D-galactosa como única fuente de hexosa. Transcurridos 3 días, las células se transfirieron a un medio de cultivo que contenía D-galactosa 1 o 0,5 mM y se cultivaron bajo dichas condiciones durante 40 días, seguido de lo cual se seleccionaron de forma permanente en presencia de D-galactosa 0,25 o 0,1 mM como única fuente de hexosa.
- 50 Para facilitar el proceso de selección de las células positivamente transformadas de la presente invención y para prevenir el crecimiento de las células no transfectadas, la transfección se lleva preferiblemente a cabo en presencia de un agente de selección negativa como un antibiótico. Así, después de la transfección, las células transfectadas que poseen el gen de resistencia a antibiótico en el vector de expresión (p. ej. el gen de la neomicina fosfotransferasa se puede cultivar en presencia de concentraciones relativamente altas de antibiótico (p.ej. 300-600 µg de G418), mientras que las células no transfectadas son incapaces de crecer). Sin embargo, se valorará que una vez que las células transfectadas de la presente invención expresen niveles suficientes de la proteína de viabilidad celular, dicho agente de selección negativa (p. ej. G418) es innecesario y preferiblemente eliminado.

Como se muestra en el Ejemplo 2 de la sección de Ejemplos que sigue, el G418 se usa a una concentración de 300-600 µg/ml durante las primeras semanas de selección, después de lo cual se elimina el G418 y se cultivan los transformantes estables bajo condiciones de cultivo libres de citotóxicos en presencia de folatos reducidos (p. ej. leucovorina) o D-galactosa, dependiendo de los tipos de células usados.

Además lo que se proporciona adjunto es un cultivo de células eucariotas libre de citotóxicos.

La expresión "libres de citotóxicos" como se usa aquí se refiere al estado de estar libre de cualquier agente que sea tóxico para la célula y que pueda interferir con el funcionamiento celular. El normal funcionamiento se puede interrumpir por agentes que induzcan, por ejemplo, la proliferación celular anormal (p. ej. agentes cancerosos), aminoglicósidos y otros agentes antibióticos que interfieren con la traducción de proteínas, agentes de unión a ADN que inhiben la expresión génica y similares.

El cultivo celular de la presente invención, como se define en las Reivindicaciones, incluye células que se modifican genéticamente como se describe anteriormente para expresar la proteína de viabilidad celular y la proteína de interés de la presente invención bajo las condiciones de cultivo selectivas de la presente invención.

15 Se valorará que cuando las secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína de viabilidad celular y la proteína de interés se colocan bajo la misma regulación transcripcional en el constructo de ácido nucleico de la presente invención (p. ej. usando un vector bi-cistrónico), se esperan niveles similares de expresión de la dos secuencias de ácido nucleico en las células transfectadas. Así, las células que expresan niveles altos de la proteína de viabilidad celular son propensas a expresar niveles similares de la proteína de interés.

20 En efecto, como se muestra en las Figuras 12 y 13 y el Ejemplo 3 de la sección de Ejemplos que sigue, los análisis de citometría de flujo revelan un incremento de 100 veces o de 10 veces en la expresión de EGFP en las células transfectadas con los vectores de expresión RFC y cultivadas en presencia de leucovorina 0,25 – 2 nM o 2 -10 nM, respectivamente. Así, el método de la presente invención se puede usar para producir altos niveles de la proteína de interés bajo condiciones de cultivo libres de citotóxicos.

25 Según otro aspecto aún, se proporciona un método para producir una proteína de interés.

Según este aspecto, el método se efectúa mediante la transformación de las células eucariotas de la presente invención (esto es, células que carecen de actividad de una proteína endógena de viabilidad celular) con un constructo de ácido nucleico que codifica la proteína de interés y para la proteína de viabilidad celular o para al menos una porción funcional de la misma; cultivando las células como se describe anteriormente y purificando la proteína de interés a partir de las células transformadas.

30 La expresión "purificando" como se usa aquí se refiere al aislamiento de la proteína de interés de la presente invención a partir de las células o del cultivo celular de la presente invención. La proteína de interés de la presente invención se puede aislar como una secuencia polipeptídica sola, como parte de un complejo de proteína-lípido (p. ej. en proteínas de membrana), como parte de un complejo de proteína-ácido nucleico (p. ej. en las proteínas histonas), con varias modificaciones como los carbohidratos (p. ej. glicoproteínas) y similares. Además, la proteína purificada de la presente invención puede presentarse en cualquier forma, es decir, solubilizada, liofilizada, cristalizada y similares.

35 Los métodos de purificación de proteínas de células eucariotas son conocidos en la técnica. Por ejemplo, las proteínas recombinantes secretadas se pueden purificar a partir del medio de cultivo usando por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico o de fase reversa como se describe en WO Pat. Appl. No. 86/07594 a Por-Hsiung, L. and Strickland, T.; Schneider P. Methods Enzymol. 2000; 322: 325-45. Las proteínas recombinantes unidas a membrana se pueden purificar usando detergentes iónicos como el dodecilsulfato sódico (SDS), soluciones a base de urea con detergentes no iónicos como el Triton X-100 y el CHAPS y agentes caotrópicos, detergentes y solventes orgánicos (Molloy, 2000; Santoni et al., 2000; Taylor et al., 2002; Ferro et al., 2002; Ferro et al., 2000) y las proteínas unidas a ADN se pueden purificar como se describe en Pedersen LB et al., Mol. Microbiol. 1996; 20(2): 295-311.

40 Ya que las células que producen la proteína de interés de la presente invención se cultivan bajo condiciones de cultivo libre de citotóxicos (es decir, bajo selección permanente seguido de supresión de antibióticos), la proteína producida por dichas células está altamente pura y libre de contaminantes citotóxicos. Será de valorar que dicha proteína pueda ser usada en varias aplicaciones que incluyen aplicaciones terapéuticas en las cuales se administra una proteína de interés altamente pura a un individuo con necesidad del mismo.

45 La proteína de interés de la presente invención se puede administrar a un individuo per se, o en una composición farmacéutica donde se mezcla con soportes o excipientes adecuados.

50 La expresión "composición farmacéutica" como se usa aquí se refiere a la preparación de uno o más de los ingredientes activos descritos aquí con otros componentes químicos como soportes y excipientes físicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es la de facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

Aquí, el término “ingrediente activo” se refiere a la proteína de interés que da cuenta del efecto biológico.

En lo sucesivo, la expresión “soporte fisiológicamente aceptable” y “soporte farmacéuticamente aceptable” las cuales se pueden usar indistintamente, se refieren a un soporte o a un diluyente que no causa irritación significante a un organismo o no abole la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Se incluye un adyuvante en estos términos.

Aquí el término “excipiente” se refiere a una sustancia inerte añadida a la composición farmacéutica para facilitar aún más la administración del ingrediente activo. Ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato cálcico, fosfato cálcico, varios azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilén glicoles.

Las técnicas para la formulación y administración de los fármacos se puede encontrar en “Remington's Pharmaceutical Sciences”, Marck Publishing Co., Easton, PA, última edición.

Las rutas adecuadas de administración podrían, por ejemplo, incluir oral, rectal, transmucosal, especialmente transnasal, suministro intestinal o parenteral, que incluye inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares así como intratecales, inyecciones intraventriculares, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares directas.

Alternativamente, se puede administrar la composición farmacéutica de manera local más que sistémica, por ejemplo, mediante inyección de la composición farmacéutica directamente dentro de una zona de tejido del paciente.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser fabricadas mediante procesos bien conocidos en la técnica, es decir, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, grageas, levigación, emulsión, encapsulación, procesos de atrapamiento o de liofilización.

Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención por lo tanto se pueden formular de manera convencional usando uno o más soportes fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos dentro de las preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación correcta es dependiente de la ruta de administración elegida.

Para la inyección, los ingredientes activos de la composición farmacéutica se pueden formular en solución acuosa, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles como la solución de Hank, la solución de Ringer, o tampón salino fisiológico. Para la administración transmucosal, se usan penetrantes apropiados de la barrera a permear. Dichos penetrantes se conocen en general en la técnica.

Para la administración oral, la composición farmacéutica se puede formular fácilmente mediante la combinación de los compuestos activos con soportes farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos soportes permiten que la composición farmacéutica se formule como tabletas, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones, y similares, para la ingestión oral por un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral se pueden hacer utilizando un excipiente sólido, opcionalmente triturando la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados si se desea para obtener núcleos de tabletas o grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, diluyentes como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa como por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa, carboximetilcelulosa sódica; y/o polímeros fisiológicamente aceptables como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes desintegradores como polivinilpirrolidona entrecruzada, agar, o ácido algínico o una sal del mismo como el alginato sódico.

Se proporcionan núcleos de grageas con recubrimientos adecuados. Para este propósito, se pueden usar soluciones concentradas de azúcar las cuales pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y solventes orgánicos adecuados o mezclas de solventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los recubrimientos de las tabletas o grageas para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

Las composiciones farmacéutica que se pueden usar oralmente incluyen cápsulas duras hechas de gelatina además de blandas, cápsulas selladas hechas de gelatina y plastificante como el glicerol o el sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos en una mezcla con un diluyente como la lactosa, aglutinantes como los almidones, lubricantes como el talco o el estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los ingredientes activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados como los aceites grasos, parafina líquida o polietilénicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizadores. Todas las formulaciones para la administración oral deben estar en dosis adecuadas para la ruta de administración elegida.

Para la administración bucal, la composiciones pueden tomar la forma de tabletas o pastillas formuladas de manera convencional.

- Para la administración por inhalación nasal, los ingredientes activos para el uso de acuerdo con la presente invención se distribuyen convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol en un envase presurizado o un nebulizador que use un propelente adecuado, p. ej. díclorodifluorometano, triclorofluorometano, díclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para dispensar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de p. ej. gelatina para su uso en un dispensador se pueden formular que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada como la lactosa y el almidón.
- La composición farmacéutica descrita aquí se puede formular para la administración parenteral, p. ej. por inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para la inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, p. ej. en ampollas o en envases multidosis opcionalmente con un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.
- Las composiciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los ingredientes activos se pueden preparar como suspensiones de inyección oleosa o a base de agua apropiadas. Los solventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen los aceites grasos como el aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos como el etil oleato, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que incrementen la viscosidad de la suspensión como la carboximetil celulosa sódica, el sorbitol o el dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede también contener estabilizantes adecuados o agentes que incrementen la solubilidad de los ingredientes activos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.
- Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para la reconstitución con un vehículo adecuado, p. ej. solución a base de agua estéril, libre de pirógenos, antes de su uso.
- La composición farmacéutica también puede ser formulada en composiciones rectales como supositorios o enemas de retención, que usan, p. ej. bases convencionales de suppositorio como manteca de cacao u otros glicéridos.
- Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones donde los ingredientes activos están contenidos en una cantidad efectiva para lograr la finalidad prevista. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente activa quiere decir una cantidad de ingredientes activos (constructo de ácido nucleico) efectiva para prevenir, mitigar o mejorar los síntomas de un trastorno (p. ej. isquemia) o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando.
- La determinación de la cantidad terapéuticamente activa está también dentro de la capacidad de aquellos expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en el presente documento.
- Para cualquier preparación, la cantidad o la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de los ensayos *in vitro* y de cultivos celulares. Por ejemplo, una dosis se puede formular en modelos animales para lograr una concentración o título deseados. Dicha información se puede utilizar para determinar con más precisión las dosis útiles en humanos.
- La toxicidad y la eficacia terapéuticas de los ingredientes activos descritas aquí se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar *in vitro*, en cultivos celulares o en animales de experimentación. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos *in vitro* y de cultivos celulares y de estudios animales se pueden usar para formular un intervalo de dosificación para su uso en humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la ruta de administración utilizada. La formulación exacta, ruta de administración y la dosificación pueden ser elegidas por el médico individual en vista de la condición del paciente. (Ver p. ej. Fingl et al., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p. 1).
- La cantidad y el intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente para proporcionar los niveles suficientes del ingrediente activo para lograr el efecto biológico (concentración mínima efectiva, CME). La CME variará en cada preparación, pero se puede estimar a partir de los datos *in vitro*. Las dosificaciones necesarias para conseguir la CME dependerán de las características individuales y de la ruta de administración. Se pueden usar ensayos de detección para determinar las concentraciones en plasma.
- Dependiendo de la severidad y de la sensibilidad de la condición a tratar, la dosificación puede ser de una administración única o de una pluralidad de administraciones con el curso del tratamiento que dura de varios días a varias semanas o hasta que se efectúa la curación o se logra una disminución del estado de la enfermedad.
- La cantidad de la composición a administrar será, por supuesto, dependiente del sujeto a tratar, de la gravedad de la afección, de la forma de administración, del juicio del médico que prescribe, etc.
- Las composiciones se pueden presentar, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador, como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación que contiene el ingrediente activo. Por ejemplo, el envase puede comprender lámina metalizada o de plástico como un blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de las instrucciones para su administración. El envase o dispositivo dispensador también

puede ir acompañado por una notificación asociada con el envase en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, notificación que es un reflejo de la aprobación por la agencia, de la forma de las composiciones o de la administración humana o veterinaria. Dicha notificación, por ejemplo, puede ser de una etiqueta de aprobación por la Administración de Alimentos y Medicamentos, EE.UU. de los medicamentos con receta, o de un prospecto aprobado. También se pueden preparar las composiciones que comprenden una preparación formulada en un soporte farmacéuticamente compatible, colocadas en un recipiente adecuado, y etiquetadas para el tratamiento de la condición indicada, como se detalla más arriba.

10 El término "alrededor" como se usa aquí se refiere a $\pm 10\%$.

Se harán evidentes los objetivos adicionales, las ventajas y las características novedosas para un experto habitual en la técnica tras el examen de los siguientes ejemplos, que no están destinados a ser limitados. Adicionalmente, cada una de las distintas realizaciones y aspectos de la presente invención tal como se expone más arriba y como se reivindica en la sección de reivindicaciones más abajo, encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Se hace referencia ahora a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de una manera no limitante.

20 Generalmente, la nomenclatura utilizada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican a fondo en la literatura. Ver, por ejemplo, "Molecular cloning: A Laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., Ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (Eds.) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1988); metodologías como se establece en U.S. Nos. 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J.E., Ed. (1994); "Culture of Animal Cells- A Manual of Basis Technique" por Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; "Current Protocols in Immunology" Volumen I-III Coligan J.E., Ed. (1994); Stites et al. (Eds.), "Basic and Clinical Immunology" (octava edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (Eds.), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); inmunoensayos disponibles se describen extensamente en la patente y la literatura científica, ver, por ejemplo, U.S. Pat. Nos. 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., Ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., Eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., Ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods and Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); 40 Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization- A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Se proporcionan otras referencias generales a lo largo de este documento. En él se cree que los procedimientos son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.

EJEMPLO 1

45 DISEÑO DE LA SELECCIÓN PERMANENTE NO-TÓXICA EN CÉLULAS CHO

Antecedentes generales en los genes utilizados para la selección permanente

El transportador de folato reducido (RFC). El ácido fólico y los folatos reducidos son vitaminas hidrofílicas, esenciales para la biosíntesis de purinas, timidilato y ciertos aminoácidos en células de mamífero (Figura 1 y Stockstad, 1990). Para apoyar la síntesis de ADN, las células de mamífero, a diferencia de las procariotas y las de plantas, deben depender de la absorción de folato a partir de fuentes exógenas ya que son incapaces de sintetizar sus propias vitaminas folato (Matherly and Goldman, 2003). La leucovorina (5-formil-tetrahidrofolato) y los folatos reducidos relacionados incluyendo el 5-metil-tetrahidrofolato, son precursores de los donantes de un carbono en la biosíntesis *de novo* de las purinas y las pirimidinas. El sistema de transporte celular primario para la absorción de los folatos reducidos y antagonistas del ácido fólico (es decir, antifolatos; ver Figura 2) como el metotrexato (MTX) es el transportador de folato reducido humano (hRFC; Figura 1, Zhao and Goldman, 2003). Las Figuras 3a-b representan la estructura química del ácido fólico y del MTX.

El hRFC es una proteína integral de membrana que contiene 591 aminoácidos (peso molecular previsto de ~ 65 kDa), con 12 dominios transmembrana (TMDs), un N-terminal corto y un C-terminal largo ambos de los cuales se encuentran en el citoplasma (Ferguson and Flintoff, 1999) (Figura 4). Contiene un único sitio de glicosilación ligado a N- en el primer bucle extracelular (L1) y sufre fuerte glicosilación lo que la hace ser una proteína ampliamente migratoria con una masa molecular de ~ 85 kDa (Matherly et al., 1992; Freisheim et al., 1992). El RFC es un transportador clásico que funciona como un intercambiador aniónico bidireccional (Goldman, 1971; Henderson and Zevely, 1981), tomando cofactores folato y exportando varios aniones orgánicos (Henderson and Zevely, 1981) incluyendo el fosfato de tiamina (Zhao et al., 2001a). El RFC es un miembro de la superfamilia principal de facilitadores (MFS), un gran grupo de transportadores que transportan diversos compuestos orgánicos e inorgánicos en ambos, procariotas y eucariotas (Pao et al., 1998). El papel central fisiológico del RFC de mamíferos ha sido confirmado recientemente en estudios dirigidos de interrupción del locus del RFC murino. Zhao et al., (Zhao et al., 2001b) manifestó recientemente que la interrupción homocigótica del gen RFC murino es letal en la etapa embrionaria y que la suplementación materna de ácido fólico puede rescatar la letalidad del embrión y dar lugar a un fallo neonatal prematuro de los órganos hematopoyéticos.

Los antifolatos ejercen su actividad citotóxica mediante la inhibición de enzimas específicas en la ruta metabólica del ácido fólico (Figura 2). Por ejemplo, el MTX, el cual entra en la célula a través del RFC, es un potente inhibidor de la dihidrofolato reductasa (DHFR), la primera enzima y clave en el metabolismo del folato (Figura 1). La exposición de las células al MTX da lugar a una deficiencia de folato y a un fallo de síntesis de purinas y deoxitimidilato. Como resultado, la síntesis de ADN está inhibida y las células sufren apoptosis y muerte celular. Estudios anteriores realizados por los presentes inventores demostraron que la exposición al MTX puede conducir a la inactivación del RFC lo que da lugar a fenotipos estables deficientes en el transporte de MTX. Las mutaciones inactivadoras en la región codificante del hRFC ablen la actividad de transporte del RFC y da lugar a una resistencia a las drogas antifolato (Jansen et al., 1998; Dori et al., 2000a; Rothen et al., 2002). Además, el silenciamiento del promotor del RFC (initialmente debido a una pérdida de expresión y/o función de varios factores de transcripción) causa la pérdida de expresión del gen de RFC y da como resultado un deterioro en el transporte de MTX (Rothen et al., 2003; Rothen et al., 2004 a, b). A ello se suma, aunque raramente, que se ha documentado la metilación del promotor del hRFC como un mecanismo de silenciamiento del gen del hRFC (Worm et al., 2001).

El gen galactoquinasa (GalK1). La D-galactosa es una hexosa derivada de la hidrólisis del disacárido de lactosa (un componente muy abundante en la leche). La D-galactosa se convierte en glucosa-6-fosfato en una conversión con tres pasos enzimáticos (Figura 5 y Novelli and Reichardt, 2000). En el primer paso, la galactoquinasa (GalK1; EC 2.7.1.6) en presencia de ATP convierte la D-galactosa en D-galactosa-1-fosfato; en el segundo paso, la D-galactosa-1-fosfato sufre una epimerización por la UDP-Glucosa- α -D-galactosa-1-fosfato uridiltransferasa en presencia de UDP-glucosa hacia D-glucosa-1-fosfato; en el último paso, la D-glucosa-1-fosfato se convierte por la fosfoglucomutasa en D-glucosa-6-fosfato, que puede ser usado después en la glicolisis. Estudios recientes demostraron que la ausencia de GalK1 plenamente funcional es una causa de enfermedad de galactosemia hereditaria, de la cual la principal manifestación clínica es la aparición temprana de cataratas (Novelli and Reichardt, 2000; Timson and Reece, 2003).

Las células de hámster deficientes en galactoquinasa (Schumperli et al., 1982) no crecen en medio que contiene D-galactosa como única fuente de hexosa y requieren un medio rico que contenga D-galactosa para su crecimiento.

Diseño experimental de la selección permanente que utiliza el gen RFC. El primer paso de la selección permanente del TFR requiere el establecimiento de las células CHO deficientes. Una vez que se ha comprobado que las células carecen de la capacidad de transportar folatos, se transfecan con un vector de expresión que lleva un gen marcador (p.ej. EGFP) ligado al gen del RFC humano en una configuración bi-cistrónica (ver diagrama de flujo en la Figura 6). Las células transfectadas se crecen con G418 bajo concentraciones de folato selectivas (leucovorina reducida como la única fuente de folato) para seleccionar las células que expresan RFC. El nivel de expresión del hRFC debe ser alto para permitir que las células internalicen cantidades suficientes de folato reducido y que sobrevivan bajo condiciones de privación de folato. Una vez que se ha establecido un grupo de células transfectadas estables, se van reduciendo gradualmente las concentraciones de leucovorina y se sigue la expresión de GFP después de la retirada de G418 para evaluar la estabilidad de la expresión en ausencia de la selección tóxica. Se espera que, bajo estas condiciones, la expresión del gen marcador de GFP debe mantenerse de forma estable a lo largo del tiempo.

Diseño experimental de la selección permanente que utiliza el gen GalK1. Las células deficientes en galactoquinasa (ATCC, CRL-1657) se transfecan con un vector de expresión que lleva un gen marcador (p. ej. EGFP) ligado al gen GalK1 humano (Stambolian et al., 1995) en una configuración bi-cistrónica (ver diagrama de flujo en la Figura 7). Las células transfectadas se crecen en G418 bajo concentraciones selectivas de galactosa (D-galactosa 5mM como única fuente de hexosa) para seleccionar las células que expresan GalK1. Una vez que se ha establecido un grupo estable de células transfectadas, se van reduciendo gradualmente las concentraciones de D-galactosa y la expresión de GFP se sigue después de la retirada del G418 para evaluar la estabilidad de la expresión en ausencia de la selección tóxica. Se espera que, bajo estas condiciones, la expresión del gen marcador de GFP debe mantenerse de forma estable a lo largo del tiempo.

EJEMPLO 2***ESTABLECIMIENTO DE LAS CÉLULAS QUE EXPRESAN RFC SELECCIONADAS PERMANENTEMENTE***

Establecimiento de las células deficientes en el transporte de MTX. Se ha descrito previamente el aislamiento de mutantes de células AA8 de ovario de hámster chino (CHO) que carecen de actividad del transportador RFC (Assaraf and Schimke, 1987). Se obtuvieron células CHO AA8 de tipo silvestre del Dr. Cyntia Hoy originalmente del laboratorio del Dr. Larry H. Thompson: Lawrence Livermore National Laboratory, CA. Brevemente, se crecieron en monocapa células CHO AA8 (5×10^5 cels./placa de Petri de 10 cm., en presencia de 20 ml de medio) en medio de cultivo (α MEM, que contenía ácido fólico 2,3 μ M) suplementado con suero bovino fetal al 10%, glutamina 2mM y antibióticos. Las células se expusieron a MTX (Sigma) 75 nM o 150 nM, lo que corresponde a 5 y 10 veces, respectivamente, el 50% la dosis letal (LD50). La selección por MTX se llevó a cabo en medio de crecimiento suplementado con suero de ternera fetal dializado al 10% (dFCS, GIBCO).

Las células CHO-S deficientes en RFC (Invitrogen, creciendo en suspensión en medio químicamente definido, CD-CHO, Invitrogen) se aislaron mediante selección por pasos en concentraciones gradualmente crecientes de MTX. Las células se sometieron a una concentración inicial de MTX 10 nM y se aislaron las células CHO-S deficientes en RFC con MTX 150 nM mediante el incremento gradual de la concentración de MTX en el medio desde 10 nM hasta 40 nM, 120 nM y 150 nM durante un periodo de tiempo de ~ 5 meses.

Construcción de los vectores hRFC-EGFP. Se clonó previamente el cDNA de hRFC en pcDNA3.1 (phRFC1), se secuenció y se confirmó la actividad de capacidad de transporte (Drori et al., 2000b). El cDNA de hRFC se cortó del vector de pcDNA3.1 con la enzima de restricción *Xba*I-*Bam*HI del vector de expresión de mamífero phRFC1 y se clonó direccionalmente corriente arriba del elemento IRES en el vector pIRES-2-EGFP (Clontech) en los sitios *Bgl* II-*Sal* I.

El constructo hRFC-HA que contiene el epítopo etiqueta (YPYDVPDYA) de la hemaglutinina del virus de la gripe humana (HA) en el extremo C-terminal del hRFC se construyó como se describió anteriormente (Liu and Metherly, 2002; Ferguson and Flintoff, 1999). La pequeña etiqueta del epítopo de la HA en el extremo C-terminal del hRFC permite la detección del gen de hRFC sobre-expresado mediante anticuerpos monoclonales comerciales. Digno de atención es, que dichos anticuerpos no detectan al gen endógeno inactivado del hRFC que, tal vez, puede someterse a alguna reversión excepcional y re-expresión. El constructo hRFC-HA se clonó direccionalmente corriente arriba del elemento IRES en el vector pIRES-2-EGFP (Clontech) en los sitios *Bgl* II-*Sal* I.

Construcción del vector hGalK1-EGFP. El gen GALK1 humano se clonó mediante PCR a partir de un vector de expresión bacteriana (pET21d, Novagen) obtenido del Dr. Richard J. Reece, School of Biological Sciences, University of Manchester, UK (Timson and Reece, EJB, 2003); el Dr. Reece obtuvo este cDNA GalK1 del consorcio IMAGE (clon ID: 3501788).

Para amplificar la región de codificación completa del gen de GalK1 se realizó una RT-PCR usando los siguientes cebadores: Directo; 5'-GAT CCG CTC GAG CCG CCA TGG CTG CTT TGA GAC AGC C-3' (SEQ ID NO:1) y el reverso; 5'-CCG GAA TTC ACA AGC ACA GCA CCT TGG C-3' (SEQ ID NO:2). Las secuencias de hexanucleótidos subrayadas codifican un sitio *Xba*I y un sitio *Eco*RI, respectivamente. Este producto de PCR GalK1 (SEQ ID NO:6) se resolvió mediante electroforesis en agarosa, se purificó utilizando un kit de extracción del gel (Quiagen), se digirió con *Xba*I y *Eco*RI y se clonó direccionalmente en el vector pIRES-2-EGFP (Clontech). El vector hGalK1-EGFP se usó para transformar bacterias Top1 competentes (obtenidas del Prof. Dan Cassel, Depeartamento de Biología, Technion, Haifa 32000, Israel). De las ~ 40 colonias que se picaron, el 95% contenían un inserto GalK1 como se evidencia mediante las dos, PCR específica para GalK1 así como por excisión por *Xba*-*Eco*RI del inserto de GalK1. La secuenciación de los transformantes positivos confirmó la presencia del gen GalK1.

Establecimiento de los transfectantes estables

hRFC-EGFP. Se separó la monocapa de células CR50.15 en crecimiento exponencial mediante un protocolo estándar de tripsinización (2×10^7 células) mientras que las células CHO-S que crecían en suspensión se recogían mediante centrifugación. Las células se transfecaron por electroporación (1.000 microfaradios, 234 V, Rothen et al., 2003) utilizando 10 μ g de los vectores de expresión bi-cistrónicos basados en EGFP que codificaban los genes de hRFC o hRFC-HA. Tras la transfección, las células se transfirieron a un medio RPMI-1640 libre de ácido fólico suplementado con FCS dializado al 10%, que contenía leucovorina 2 nM como única fuente de folato, y se crecieron a 37°C durante 48 horas. Las células se transfirieron entonces a un medio RPMI-1640 que carecía de ácido fólico y suplementado con suero de ternera fetal dializado al 10% y conteniendo ya sea 400 μ g/ml o 600 μ g/ml de G-418 (Calbiochem-Novabiochem, San Diego, CA) y leucovorina 2 nM como única fuente de folato. Transcurridas 5 semanas en presencia de G-418 a 600 μ g/ml + LCV 2 nM, las células se sometieron a una selección más rigurosa y se transfirieron en paralelo a leucovorina 1, 0,5 y 0,25 nM en presencia de una concentración constante de 600 μ g/ml de G-418. Se crecieron las células bajo estas condiciones selectivas durante al menos un mes momento en el cual las células se cultivaron adicionalmente en ausencia y en presencia de G-418.

hGALK1-EGFP. Se separó la monocapa de células deficientes en GalK1 en crecimiento exponencial mediante un protocolo estándar de tripsinización (2×10^7). Las células se transfecaron entonces por electroporación (1.000 microfaradios, 234 V) (Rotem et al., 2003) utilizando 10 µg del vector bi-cistrónico de expresión basado en EGFP que codifica el gen GalK1. Después de la transfección, las células se transfirieron a un medio RPMI-1640 carente de glucosa, suplementado con suero de ternera fetal dializado al 10% y que contenía D-galactosa ya sea 5 mM o 2 mM, y se crecieron a 37°C durante 24 horas. Las células se transfirieron entonces a un medio RPMI-1640 que carecía de glucosa y suplementado con suero de ternera fetal dializado al 10% y contenido G-418 ya sea 300, 450 o 600 µg/ml (6 tandas independientes). Transcurridos 3 días, los cultivos que crecían en 600 µg/ml de G-418 + D-galactosa 5 mM se dividieron y se transfirieron a una selección más rigurosa de D-galactosa y/o G-418 como sigue: D-galactosa 1 mM + G-418 a 600 µg/ml; D-galactosa 0,5 mM + G-418 a 300 µg/ml ; D-galactosa 0,5 mM a lo largo + G-418 a 750 µg/ml . Transcurridos 40 días en condiciones rigurosas, los cultivos que crecían en D-galactosa 0,5 mM y G-418 a 750 µg/ml se colocaron adicionalmente en medio que contenía D-galactosa 0,25 mM o 0,1 mM en presencia o ausencia de G-418 1 mg/ml. Estos cultivos crecieron durante al menos 5 semanas antes de su análisis.

Ensayos de crecimiento celular. Con el fin de determinar el tiempo de duplicación de las células huésped y sus derivadas transfecadas, se sembraron 2×10^5 células en palcas Petri de 30 mm con el medio de crecimiento apropiado (5 ml de medio de crecimiento/placa): RPMI 1640 + FCS 10% para las células huésped, y RPMI 1640 sin suplemento de ácido fólico con FCS dializado al 10%, cada una en sus respectivos medios de selección, para los transfectantes. Las células se incubaron en medio de crecimiento durante 4 días a 37°C, durante los cuales se determinaron diariamente el número de células viables mediante la exclusión del azul tripán. El tiempo de duplicación se calculó a partir de las curvas de crecimiento (número de células frente a tiempo de incubación).

Inhibición del crecimiento celular por antifolatos. Para la inhibición del crecimiento celular por antifolato se sembraron las células (10^4 /pocillo) en placas de 24 pocillos en el medio de crecimiento respectivo (AA8 y derivadas en RPMI + FCS 10%, y las células CHO-S en CD-CHO) que contenía varias concentraciones de MTX o de antifolatos lipofílicos, trimeterxato (Dr. David Fry, Warner-Lambert, Parke-Davis, Detroit, Michigan) y se incubaron durante 3 días a 37 °C. Después de eso, las células se despegaron mediante tripsinización y se determinó el número de células viables mediante la exclusión del azul tripán. La concentración inhibidora del 50% (IC_{50}) se define como la concentración de fármaco a la cual se inhibe un 50% el crecimiento celular con respecto a los controles no tratados.

Tinción con F-MTX y competición con antifolatos hidrofílicos y lipofílicos. Se sembraron las células en placas de Petri de 60 mm. Y se incubaron durante 8 horas a 37°C en medio de crecimiento que contenía MTX-fluoresceina (F-MTX) 2 µM. Se lavaron entonces las células con PBS y se sometieron a competición con MTX y su análogo lipofílico TMQ. Después de 3 horas de incubación, se despegaron mediante tripsinización, se resuspendieron en PBS que contenía suero de ternera fetal al 1% y se determinó la fluorescencia verde residual por célula utilizando un citómetro de flujo (FACScalibur, Becton-Dickinson) a una excitación de 488 nm y a una emisión de 525 nm. Se registró rutinariamente la autofluorescencia de las células no teñidas.

Transporte de [³H]-MTX. Se midieron las tasas de entrada de [³H]-MTX con el fin de determinar la capacidad de los clones resistentes a antifolato a captar antifolatos y se compararon con las de las células de control CHO AA8. Las células en la fase semi-logarítmica de crecimiento (2×10^7) se lavaron tres veces con el tampón de transporte que consistía en solución salina tamponada con HEPES (HBSS, Rothem et al., 2002) y se incubaron durante 3 minutos a 37°C en presencia de HBSS (suspensiones de 1 ml) que contenía [³H]-MTX 2 µM. Los controles de transporte contenían un exceso de 500 veces (1 mM) de MTX no marcado. El transporte de [³H]-MTX se paró mediante la adición de 10 ml de HBSS helado. Se centrifugó entonces la suspensión celular durante 5 minutos a 4°C utilizando una velocidad de centrifugación de 500 x g seguido de lo cual se lavó el sedimento celular dos veces con 10 ml de tampón de transporte helado. El sedimento celular final se resuspendió en agua y se procesó para el recuento de centelleo.

Aislamiento de las células CHO AA8 deficientes en el transporte de MTX. Se aislaron mutantes de células AA8 de ovario de hámster chino (CHO) que carecen de actividad del transportador RFC mediante la exposición de las células AA8 silvestres a concentraciones de MTX de 75 nM o 150 nM, que correspondían a ~ 5 y ~ 10 veces (respectivamente) el 50% de la dosis letal (LD_{50}) (Figuras 11a-b). La selección por MTX se llevó a cabo en medio de crecimiento suplementado con suero de ternera fetal dializado al 10% (dFCS, GIBCO). Tras 18 días de exposición a MTX, se picaron 7 clones independientes (tamaño de la colonia ~ 80-300 células) utilizando anillos de clonaje estériles. De las 7 colonias independientes CHO AA8 que fueron inicialmente picadas (derivando de células resistentes a MTX 75 y 150 nM) únicamente 2 clones (C4 R0.15 y C5 R0.15), ambos obtenidos a partir de la selección en presencia de MTX 150 nM, mostraron un crecimiento estable en el medio selectivo de MTX. Los 5 clones restantes mostraron ya sea crecimiento inestable en medio selectivo y/o exhibieron fenotipos diploides y por lo tanto fueron descartados.

Aislamiento de las células CHO-S deficientes en RFC. Se aislaron células CHO-S creciendo en suspensión en medio químicamente definido mediante una selección paso a paso con concentraciones gradualmente crecientes de MTX de hasta 150 nM (10, 40, 120 y 150 nM) durante un periodo de ~ 5 meses. Las células que fueron resistentes a 150 nM de MTX se designaron CHO-SR0.15.

Actividad de transporte de RFC de líneas celulares MTX-resistentes. Para confirmar que las líneas celulares MTX-resistentes (CHO-S y CHO AA8) se deterioran en su actividad de transporte de MTX, se empleó un ensayo de citometría de flujo de tinción con F-MTX seguido por una competición con antifolatos hidrofílicos (MTX) y lipofílicos (TMQ). Como se muestra en la Figura 8, las células CHO-S R0.15 presentaron una tinción brillante de F-MTX que era ~ 2 veces mayor que aquella de las células CHO-S, sugiriendo una expresión incrementada de DHFR en las células CHO-S R0.15. Sin embargo, como se esperaba, tras la incubación de las células en presencia de MTX 100 nM, las células CHO-S perdían completamente su tinción de F-MTX (Figura 8). Por el contrario, la incubación de las células CHO-S R0.15 con MTX 100 nM no dio como resultado ninguna pérdida de tinción celular por F-MTX. Es más, en las células CHO-S R0.15 se requería MTX 1.000 nM para un desplazamiento completo del F-MTX. Por otro lado, la incubación de cualquiera de los tipos de células con solamente 10 nM de antifolato lípido-soluble TMQ que entra en la célula por difusión, conllevó una pérdida completa de la fluorescencia de F-MTX (Figura 8). De forma similar, la incubación de las células CHO AA8 con MTX 30 nM dio lugar a una pérdida completa de la fluorescencia de F-MTX (Figura 9). Por otro lado, se requería MTX 3 μ M para desplazar completamente la fluorescencia de F-MTX de las células CHO AA8 C4R0.15 y de las CHO AA8 C5R0.15 (Figuras 9b y c, respectivamente).

Ensayo de transporte de [3 H]-MTX. Para proporcionar evidencia directa de que las líneas celulares resistentes a MTX de la presente invención son de hecho defectuosas en el transporte de MTX se empleó un ensayo de transporte de [3 H]-MTX. Las tasas iniciales de absorción de MTX se determinaron utilizando [3 H]-MTX 2 μ M a lo largo de 3 minutos de transporte. Las líneas celulares CHO-S, las cuales se aislaron en pasos tempranos de la selección paso a paso por MTX en presencia de MTX 40 y 120 nM perdieron respectivamente el 92,5% y el 96,4% de la actividad de transporte del control de CHO-S (Figura 11a). De la misma forma, las líneas celulares CHO AA8 C4R0.15 y C5R0.15 presentaron una pérdida del 90-91% en la captación de MTX, en comparación con el control de células AA8 (Figura 11b). Por lo tanto, el transporte muy pobre de MTX en estas líneas celulares resistentes a MTX proporciona evidencia directa de que la actividad de transporte se ha perdido en gran medida en estas células.

Las células que resultaron ser deficientes en RFC utilizando ambos ensayos, el ensayo de transporte de [3 H]-MTX y el ensayo de tinción con Fluoresceína-MTX , se usaron como huéspedes para la transfección del hRFC.

En conjunto, estos resultados demuestran que se requieren cantidades significativamente altas de MTX para desplazar al F-MTX intracelular (el cual está presente en un complejo de alta afinidad con el DHFR intracelular) dentro de las células deficientes en RFC (es decir, las células CHO-S R150, CHO AA8 C4R0.15 y C5R0.15). Por lo tanto, estos resultados sugieren que las células CHO-S R150, CHO AA8 C4R0.15 y C5R0.15 son deficientes en la capatación de MTX.

Hipersensibilidad a TMQ de las líneas celulares MTX-resistentes. Las células que son defectuosas en la actividad de transporte de MTX, presentan típicamente un fenotipo de hipersensibilidad a antifolatos lípido-solubles , trimetrexato (TMQ) y piritrexima (PTX) ya que tienen una marcada merma en sus fuentes intracelulares de folato (Rothen et al., 2002). Para caracterizar mejor la susceptibilidad de las células deficientes en RFC a los antifolatos, las células CHO-S R150, C4R0.15 y C5R0.15 se sometieron a un experimento de citotoxicidad a TMQ. Como se muestra en la Figura 10, mientras en las células CHO-S se alcanzaba un 50% de inhibición del crecimiento celular (es decir, IC₅₀) en presencia de aproximadamente de TMQ 40 nM, en las células CHO-S R0.15 el IC₅₀ era de 10 nM de TMQ (Figura 10). Estos resultados indican que la pérdida de actividad de transporte por RFC se asocia con una disminución de la fuente intracelular de folato.

Por otra parte, las células resistentes a MTX CHO AA8 C4R0.15 y C5R0.15 eran >3 veces y >5 veces hipersensibles a PTX y TMQ, respectivamente, cuando se compararon con su homóloga CHO AA8 (valores de IC₅₀ ~ 8 nM y 6 nM respectivamente, datos no mostrados).

Estos resultados proporcionan una prueba más de la pérdida de actividad de transporte por RFC resultando así en una marcada disminución de las fuentes de folato intracelular y la consecuente marcada hipersensibilidad a los antifolatos lipídicos.

EJEMPLO 3

LAS CÉLULAS QUE EXPRESAN RFC SELECCIONADAS PERMANENTEMENTE MANTIENEN UNOS ALTOS NIVELES DE EXPRESIÓN EN AUSENCIA DE DROGAS CITOTÓXICAS (G418)

Extracción de las proteínas de membrana a partir de células cultivadas. Se despegaron las células que crecían exponencialmente mediante trypsinización, se lavaron tres veces con PBS y se recogieron por centrifugación. Las células (1×10^6 - 3×10^6) se incubaron entonces en tampón de lisis que contenía Tris-HCl 50 mM a pH 7,5, 2-mercaptoetanol 50 mM, Triton X-100 0,5% y una mini mezcla de inhibidores de proteasas complete™ (Roche) que contenía fenilmetil sulfonil fluoruro 10 μ g/ml, aprotinina 60 μ g/ml, leupeptina 5 μ g/ml, pepstatina 10 μ g/ml, EGTA (pH 8) 1 mM, y EDTA (pH 8) 1 mM (Assaraf and Borgnia, 1994). Tras 1 hora de incubación en hielo se centrifugó el extracto de proteína y se guardaron aliquotas del sobrenadante a -80°C hasta su análisis. El contenido de proteína se determinó mediante el ensayo de proteína de Bio-Rad según Bradford.

Análisis mediante Western Blot. La expresión de RFC-HA se estudió mediante análisis de Western blot utilizando anticuerpos anti-HA. Brevemente, las proteínas microsómicas se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS y se transfirieron por electroblot a una membrana de níquel de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell). Los blots se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con tampón TBS (NaCl 150 mM, Tween 20 0,5% y Tris/HCl 10 mM a pH8) que contenía leche descremada 1%, tras lo cual se incubaron con anticuerpo monoclonal H12 a una dilución 1:1.000 (Covance Inc., Princeton, NJ) específico para el epítopo HA. Los blots se lavaron entonces con el mismo tampón durante 10 minutos a temperatura ambiente y se incubaron adicionalmente durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (IgG; dilución 1:40.000, Jackson Immunoresearch Labs, West Grove, PA). Tras tres lavados de 10 minutos en tampón TBS a temperatura ambiente, se realizó la detección por quimioluminiscencia según las instrucciones del fabricante (Biological Industries, Beth Haemek, Israel). El contenido de proteína se determinó mediante el ensayo de proteína de Bradford (Bio-Rad).

Tinción de inmunofluorescencia. Las células (10^4) se sembraron en placas de 24 pocillos (1 ml de medio/pocillo) sobre cubreobjetos de vidrio estéril y se incubaron durante 3 días a 37°C. Para la inmunotinción, se eliminó el medio de crecimiento y las monocapas de células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron durante 10 minutos con formaldehido al 4% en PBS. Tras la fijación, los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS, se incubaron durante 20 minutos con una solución de metanol al 80% en agua doblemente destilada, se lavaron dos veces con PBS, se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente con PBS que contenía leche descremada al 1% y se hicieron reaccionar con un anticuerpo monoclonal anti-HA H12 (Covance Inc., Princeton, NJ; dilución 1:100). Tras la incubación con anti-HA los cubreobjetos se lavaron XXX veces (XXX minutos cada uno) en presencia de XXX(PBS?), y se incubaron adicionalmente con un anticuerpo secundario IgG de conejo anti-ratón conjugado con FITC (Sigma 1:100). Tras la incubación con el anticuerpo secundario se lavaron los cubreobjetos dos veces con PBS y se tiñeron los núcleos celulares durante 60 minutos a temperatura ambiente con DAPI (Sigma; catálogo # D-9564) a una concentración final de 0,5 µg/ml. Después de cuatro lavados con PBS (con 2 ml cada uno), se montaron en portaobjetos de vidrio utilizando fluoromount-GTM (Southern Biotech; Birmingham, Alabama Catalog # 0100-01). Los portaobjetos se examinaron entonces con un microscopio confocal MRC1024 de BioRad.

Análisis de la expresión de EGFP mediante citometría de flujo. Las células cultivadas en frascos de cultivo de tejido de 25 mm se lavaron con PBS, se despegaron por tripsinización y se resuspendieron en PBS + FCS 1% a 10^6 células/ml. Las células se analizaron entonces para fluorescencia verde por célula mediante un citómetro de flujo (FACScalibur, Becton Dickinson) a una excitación de 488 nm y a una emisión de 525 nm. Se registró la autofluorescencia de las células no teñidas de modo rutinario.

Ensayos de crecimiento celular y de inhibición por antifolatos. Como se describe anteriormente en el Ejemplo 2.

Efecto de la selección por leucovorina sobre la expresión del gen marcador. El efecto de la disminución de las concentraciones de leucovorina sobre la expresión del gen marcador EGFP. Los análisis de citometría de flujo de los transfectantes C5 R0.15 RFC-HA crecidos con G-418 (600 µg/ml) en presencia de concentraciones decrecientes de leucovorina (0,25 – 2 nM) revelaron un incremento de 100 veces en la fluorescencia de EGFP en comparación con las células no transfectadas control (Figura 12). De igual forma, las hRFC CHO-S R0.15 que se crecieron en presencia de G-418 a 600 µg/ml y leucovorina 2 nM o 10 nM mostraron un aumento de ~ 10 veces en la fluorescencia de EGFP tras la transfección con el vector bi-cistrónico que codifica RFC o RFC-HA como marcadores seleccionables y EGFH como segundo cistrón (Figura 13). Estos resultados indican la efectividad de la selección por leucovorina y sugieren que los genes corriente arriba RFC y RFC-HA se expresan en altos niveles en estas células transfectadas.

Confirmación de la expresión de hRFC mediante Western Blot. La expresión de RFC-HA en las células transfectadas RFC-HA se confirmó además mediante análisis por Western blot utilizando anticuerpos monocionales frente al epítopo HA. Como se muestra en la Figura 14, las células transfectadas CHO AA8 C5 R0.15 que crecían en medio selectivo que contenía leucovorina 2 nM y G-418 a 600 µg/ml expresaban fuertemente la proteína hRFC-HA.

Efecto de la expresión de hRFC sobre la inhibición del crecimiento. Con el fin de confirmar que las células transfectadas hRFC-HA presentaban un transportador de folato funcional, se llevó a cabo un ensayo de inhibición del crecimiento por MTX. Las células deficientes en RFC que sobreexpresan un receptor hRFC funcional se espera que sean hipersensibles al MTX comparado con sus huéspedes parentales. En estos experimentos se encontró que las células parentales CHO AA8 C5 tenían un valor de IC₅₀ para el MTX de ~ 3 µM, mientras que los transfectantes CHO AA8 C5R0.15 de hRFC y de hRFC-HA presentaban un valor de IC₅₀ para el MTX de ~ 27-29 nM, dos órdenes de magnitud menor comparado con las células parentales (Figura 15). Por lo tanto, las células transfectadas hRFC y hRFC-HA expresaron transportadores hRFC y hRFC-HA 100 veces más funcionales en comparación con las células parentales C5R0.15.

Detección de RFC mediante inmunofluorescencia. Con el fin de determinar que el hRFC estaba correctamente anclado en la membrana plasmática, se sometieron las células transfectadas a tinción por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-HA seguido de análisis por microscopía confocal. Como se muestra en las Figuras 16a-g, la fluorescencia verde que correspondía a la sobreexpresión estaba confinada a la membrana plasmática de los transfectantes CHO AA8 C5R0.15, mientras no se observó tinción en las células no transfectadas (comparar la

Figura 16f con la Figura 16c). La contratinación con el colorante DAPI localizó con precisión los bordes de los núcleos (Figuras 16b y d).

Crecimiento de las líneas celulares transfectadas con RFC. Se examinaron las características de crecimiento de las células huésped deficientes en RFC y de sus transfectantes. Las células CHO AA8 C5 R0.15 que crecían en un medio de crecimiento que contenía ácido fólico 2,3 μ M exhibían un tiempo de duplicación de ~ 24 horas (Figura 17). También se determinaron los tiempos de duplicación para los transfectantes hRFC-HA que crecieron en medio libre de ácido fólico que contenía leucovorina 1-2 nM en presencia de G-418 a 600 μ g/ml o 3 semanas después de la eliminación de G-418. Bajo estas distintas condiciones selectivas de crecimiento los tiempos de duplicación fueron de ~ 28 horas , similar al tiempo de duplicación de la línea celular huésped CHO AA8 C5 R0.15. En comparación, la línea celular parental AA8 exhibió un tiempo de duplicación de ~ 15 horas (Figura 17). El tiempo de duplicación más largo de las células deficientes en RFC es un fenómeno bien establecido que es debido a la marcada merma en la fuente de folato intracelular (Rothen et al., 2002).

Estos resultados indican que los transfectantes hRFC-HA conservan tiempos de duplicación relativamente largos incluso en presencia de severas condiciones selectivas de crecimiento.

Estabilidad de la expresión bajo condiciones de selección permanente con RFC. Se llevaron a cabo análisis de citometría de flujo de EGFP con el fin de estudiar la estabilidad del gen marcador sobreexpresado utilizando distintos transfectantes que crecían en presencia continua de leucovorina 1-2 nM en presencia o ausencia de G-418. Como se muestra en las Figuras 18a-b, la expresión de EGFP se mantenía estable a concentraciones estables nanomolares de leucovorina durante 2 meses en ausencia de G-418. Además, los transfectantes hRFC-HA que crecían durante 2 meses bajo condiciones de selección permanente en medio que contenía solamente leucovorina 1 nM en ausencia de G-418 parecían tener mayor fluorescencia EGFP que los transfectantes que crecían durante sólo 3 semanas en medio libre de G-418. Estos resultados demuestran claramente que se conserva un alto nivel de expresión de EGFP en los transfectante hRFC-HA bajo condiciones de selección permanente.

25

EJEMPLO 4

LAS CÉLULAS QUE EXPRESAN GALK SELECCIONADAS PERMANENTEMENTE MANTIENEN UNOS ALTOS NIVELES DE EXPRESIÓN EN PRESENCIA DE CONCENTRACIONES BAJAS DE D-GALACTOSA

Materiales y Métodos Experimentales - como anteriormente en los Ejemplos 2 y 3.

30 **Transfección de las células de hámster deficientes en galactoquinasa.** Las células de pulmón de Hámster Chino deficientes en galactoquinasa (GalK) se adquirieron de la ATCC (CRL-1657). Mientras estas células mostraron un crecimiento normal en medio RPMI-1640 con D-glucosa, no pudieron crecer en medio RPMI-1640 (Biological Industries, Beth Haemek, Israel) que contenía tanto como D-galactosa 10 mM como única fuente de hexosa (datos no mostrados).

35 **Estabilidad de la expresión bajo privación de galactosa.** Se determinaron los niveles de expresión del gen marcador EGFP en presencia y en ausencia de G-418 con el fin de evaluar la estabilidad de la expresión del gen marcador bajo condiciones permanentes de selección con el gen GalK1 y el efecto de la carencia gradual de D-galactosa. Los ensayos de citometría de flujo de los transfectantes GalK1 crecidos durante 3 semanas con G-418 a 1 mg/ml y D-galactosa 0,25-0,5 mM como única fuente de hexosa revelaron dos subpoblaciones igualmente 40 distribuidas que presentaron una sobreexpresión de EGFP de ~ 5 veces y 100 veces en relación con las células no transfectadas deficientes de GalK (Figura 19a). Después de dos meses de crecimiento en medio que contenía D-galactosa 0,25-0,5 mM como única fuente de hexosa, los transfectantes GalK1 se hicieron más homogéneos con una población dominante que expresaba de forma estable 100 veces más EGFP a pesar de la presencia de G-418 (1 mg/ml) en el medio que contenía D-galactosa (Figura 19b). Estos resultados sugieren que la principal fuerza 45 motriz de la expresión de EGFP en estos transfectantes GalK1 es la privación gradual de D-galactosa. De ahí que el gen marcador de este estudio (EGFP) se demostró que se expresa de forma estable durante al menos dos meses en ausencia de selección tóxica, bajo condiciones de selección permanente con el gen GalK1. Ya que se deben expresar altos niveles de GalK1 con el fin de permitir el crecimiento celular a concentraciones sub-milimolares de D-galactosa, es muy probable que el gen corriente arriba GalK1 se sobreexpresa a niveles que son comparables o 50 mayores que aquellos de EGFP.

Crecimiento de las líneas celulares transfectadas con hGalK1. Se determinaron los tiempos de duplicación de las células huésped deficientes en galactoquinasa así como de sus diversos transfectantes GalK1 (Figura 20). Las células parentales deficientes en galactoquinasa mostraron un tiempo de duplicación de ~ 24 horas. Se encontró que los transfectantes GalK1 que crecían en medio que contenía a la vez D-galactosa 0,25 mM y G-418 a 1 mg/ml o solo D-galactosa tenían tiempos de duplicación de 24-28 horas. No obstante, como con los transfectantes hRFC-HA, hubo un aumento significativo en el lapso de tiempo en varios de los transfectantes. Estos resultados demuestran que los distintos transfectantes de GalK1 conservan un tiempo de duplicación relativamente bueno incluso en presencia de condiciones selectivas severas de tanto como 1 mg/ml de G-418 o de tan poco como D-galactosa 0,25 mM.

Para probar la viabilidad de que se empleen genes seleccionables como agentes de selección permanente y no citotóxica para la expresión de un gen de interés en un bio-reactor se emplearon dos nuevos genes seleccionables: los genes del transportador de folato reducido (RFC) y de la galactoquinasa. Se construyeron vectores de expresión que contenían los genes RFC o GalK1 junto con el gen marcador (EGFP) y se transfecaron las células deficientes en RFC o GalK1 de forma estable con los vectores de expresión respectivos.

La viabilidad del estudio confirmó que los dos genes ensayados (el transportador de folato reducido y la galactoquinasa) se pueden usar con el propósito de selección permanente y que el crecimiento de las células en sus respectivos medios de selección (en ausencia de folatos o en presencia de galactosa como única fuente de hexosa) permite mantener la expresión estable del gen marcador (EGFP) en ausencia de la selección tóxica durante al menos dos meses.

Se aprecia que ciertas características de la invención, que son, para mayor claridad, descritas en el contexto de las realizaciones separadas, se pueden proporcionar también en combinación en una única realización. A la inversa, varias características de la invención, que son, por razones de brevedad, descritas en el contexto de una única realización, se pueden proporcionar también de modo separado o en cualquier subcombinación adecuada.

REFERENCIAS

(Se citan referencias adicionales en el texto)

- 5 1. Assaraf, Y.G. and Schimke, R.T. (1987) Identification of methotrexate transport deficiency in mammalian cells using fluoresceinated methotrexate and flow cytometry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7154-7158.
- 10 2. Assaraf, Y.G. and Borgnia, M.J. (1994) Probing the interaction of the multidrug resistance phenotype with the polypeptide ionophore gramicidin D via functional channel formation. Eur. J. Biochem. 212, 813-824.
- 15 3. Cao, W. And Matherly L.H. (2003) Characterization of a cysteine-less human reduced folate carrier: localization of a substrate-binding domain by cysteine-scanning mutagenesis and cysteine accessibility methods. Biochem. J.; 374 (Pt 1), 27-36.
- 20 4. Drori, S., Jansen, G., Mauritz, R., Peters, G., and Assaraf, Y.G. (2000a) Clustering of mutations in the first transmembrane domain of the human reduced folate carrier in GW1843U89-resistant leukemia cells with impaired antifolate transport and augmented folate uptake. J. Biol. Chem. 275, 30855-30863.
- 25 5. Drori, S., Sprecher, H., Shemer, G., Jansen, G., Goldman, I.D., and Assaraf, Y.G. (2000b) Characterization of a human alternatively spliced truncated reduced folate carrier (RFC) increasing folate accumulation in parental leukemia cells. Eur. J. Biochem. 267, 1-14.
- 30 6. Ferguson, P.L., and Flintoff, W.F., (1999) Topological and functional analysis of the human reduced folate carrier by hemagglutinin epitope insertion. J. Biol. Chem. 274, 16269-16278.
- 35 7. Freisheim, J., Ratnam, M., McAlinden, T.P., Prasad, K.M.R., Williams, F.E., Westerhof, G.R., Schornagel, J.H., and Jansen, G. (1992) Molecular events in membrane transport of methotrexate in human CCRF-CEM leukemia cells. Adv. Enzyme Regul. 32, 17-31.
- 40 8. Goldman, I.D., (1971) The characteristics of the membrane transport amethopterin and the naturally occurring folates. Ann. NY Acad. Sci. 186, 400-422.
- 45 9. Henderson, G.B., and Zevely, E.M., (1981) Anion Exchange mechanism for transport of methotrexate in L1210 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 99, 163-169.
- 50 10. Jansen, G., Mauritz, R., Drori, S., Sprecher, H., Kathmann, I., Bunni, M., Priest, D.G., Noordhuis, P., Schornagel, J.H., Pinedo, H.M., Peters, G.J. and Assaraf, Y.G. (1998) A structurally altered human reduced folate carrier with increased folic acid transport mediates a novel mechanism of antifolate resistance. J. Biol. Chem. 273, 30189-30198.
- 55 11. Liu, X.Y., and Matherly, L.H. (2002) Analysis of membrane topology of the human reduced folate carrier protein by HA epitope insertion and scanning glycosylation insertion mutagenesis. Bichim. Biophys. Acta 1564, 332-342.
- 60 12. Matherly, L.H., Angeles, S.M., and Czajkowski, C.A. (1992) Characterization of transport-mediated methotrexate resistance in human tumor cells with antibodies to membrane carrier for methotrexate and tetrahydrofolate cofactors. J. Biol. Chem. 267, 23253-23260.
- 65 13. Matherly, L.H., and Goldman, I.D. (2003) Membrane transport of folates. Vitam. Horm. 66, 403-456.
- 70 14. Novelli, G., Reichardt, J.K. (2000) Molecular basis of human galactose metabolism: past, present and future. Mol. Genet. Metab. 71, 62-65.
- 75 15. Pao, S.S., Paulsen, I.T., and Saier, M.H., Jr. (1998) Major facilitator superfamily. Microbiol. Mol. Rev. 62, 1-34.
- 80 16. Rothen, L., Ifergan, I., Kaufman, Y., Priest, D.G., Jansen, G., and Assaraf, Y.G. (2002) Resistance to multiple novel antifolates is mediated via defective drug transport resulting from clustered mutations in the reduced folate carrier gene in human leukaemia cell lines. Biochem. J. 367, 741-750.
- 85 17. Rothen, L., Aronheim, A., and Assaraf, Y.G. (2003) Alterations in the expression of transcription factors and the reduced folate carrier as a novel mechanism of antifolate resistance in human leukemia cells. J. Biol. Chem. 278, 8935-8941.

18. Rothen, L., Stark, M., Kaufman, Y., Mayo, L., and Assaraf, Y.G. (2004a) Reduced folate carrier gene silencing in multiple antifolate-resistant tumor cell lines is due to a simultaneous loss of function of multiple transcription factors but not promoter methylation. *J. Biol. Chem.* 279, 374-384.
- 5 19. Rothen, L., Stark, M., Assaraf, Y.G. (2004b) Impaired CREB-1 phosphorylation in antifolate-resistant cell lines with down-regulation of the reduced folate carrier gene. *Mol. Pharmacol.*, in press.
20. Schumperli, D., Howard, B.H., and Rosenberg, M. (1982) Efficient expression of *Escherichia coli* galactokinase gene in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 257-261.
- 10 21. Stambolian, D., Ai, Y., Sidjanin, D., Nesburn, K., Sathe, G., Rosenberg, M., and Bergsma, D.J. (1995) Cloning of the galactokinase cDNA and identification of mutations in two families with cataracts. *Nat. Genetics* 10: 307-312.
22. Stockstad, E.L.R., Historical perspective on key advances in the biochemistry and physiology of folates. In: (Piccianno, M.F., Stockstad, E.L.R., Gregory, J.F. eds.) *Folic Acid Metabolism in Health and Disease*. Wiley-Liss, New York, 1990, pp. 1-21.
- 15 23. Timson, D.J., and Reece, R.J. (2003) Functional analysis of diseases-causing mutations in human galactokinase. *Eur. J. Biochem.* 270, 1764-1774.
24. Worm, J., Kirkin, A.F., Dzhandzhugazyan, K.N., Guldberg, P. (2001) Methylation-dependent silencing of the reduced folate carrier gene in inherently methotrexate-resistant human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 26, 39990-40000.
- 20 25. Zhao, R., Gao, F., Wang, Y., Diaz, G.A., Gelb, B.D., and Goldman, I.D. (2001a) Impact of the reduced folate carrier on the accumulation of active thiamin metabolites in murine leukemia cells. *J. Biol. Chem.* 276, 1114-1118.
26. Zhao, R., Russell, R.G., Wang, Y., Liu, L., Gao, F., Kneitz, B., Edelmann, W., and Goldman, I.D. (2001b) Rescue of embryonic lethality in reduced folate carrier-deficient mice by maternal folic acid supplementation reveals early neonatal failure of hematopoietic organs. *J. Biol. Chem.* 276, 10224-10228.
- 25 27. Zhao, R., and Goldman, I.D. (2003) Resistance to antifolates. *Oncogene* 22, 7431-7457.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Applied Research systems ARS Holding N.V ASSARAF, Yehuda ROTEM, Lilah

<120> Producción de proteínas

<130> 1024W0

10 <150> 165484

<151> 30-11-2004

<160> 4

15 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 591

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Val Pro Ser Ser Pro Ala Val Glu Lys Gln Val Pro Val Glu Pro
1 5 10 15

Gly Pro Asp Pro Glu Leu Arg Ser Trp Arg Arg Leu Val Cys Tyr Leu
20 25 30

Cys Phe Tyr Gly Phe Met Ala Gln Ile Arg Pro Gly Glu Ser Phe Ile
35 40 45

Thr Pro Tyr Leu Leu Gly Pro Asp Lys Asn Phe Thr Arg Asp Glu Val
50 55 60

Thr Asn Glu Ile Thr Pro Val Leu Ser Tyr Ser Tyr Leu Ala Val Leu
65 70 75 80

Val Pro Val Phe Leu Leu Thr Asp Tyr Leu Arg Tyr Thr Pro Val Leu
85 90 95

1024.ST25.txt

Leu Leu Gln Gly Leu Ser Phe Val Ser Val Trp Leu Leu Leu Leu
 100 105 110

Gly His Ser Val Ala His Met Gln Leu Met Glu Leu Phe Tyr Ser Val
 115 120 125

Thr Met Ala Ala Arg Ile Ala Tyr Ser Ser Tyr Ile Phe Ser Leu Val
 130 135 140

Arg Pro Ala Arg Tyr Gln Arg Val Ala Gly Tyr Ser Arg Ala Ala Val
 145 150 155 160

Leu Leu Gly Val Phe Thr Ser Ser Val Leu Gly Gln Leu Leu Val Thr
 165 170 175

Val Gly Arg Val Ser Phe Ser Thr Leu Asn Tyr Ile Ser Leu Ala Phe
 180 185 190

Leu Thr Phe Ser Val Val Leu Ala Leu Phe Leu Lys Arg Pro Lys Arg
 195 200 205

Ser Leu Phe Phe Asn Arg Asp Asp Arg Gly Arg Cys Glu Thr Ser Ala
 210 215 220

Ser Glu Leu Glu Arg Met Asn Pro Gly Pro Gly Gly Lys Leu Gly His
 225 230 235 240

Ala Leu Arg Val Ala Cys Gly Asp Ser Val Leu Ala Arg Met Leu Arg
 245 250 255

Glu Leu Gly Asp Ser Leu Arg Arg Pro Gln Leu Arg Leu Trp Ser Leu
 260 265 270

Trp Trp Val Phe Asn Ser Ala Gly Tyr Tyr Leu Val Val Tyr Tyr Val
 275 280 285

His Ile Leu Trp Asn Glu Val Asp Pro Thr Thr Asn Ser Ala Arg Val
 290 295 300

Tyr Asn Gly Ala Ala Asp Ala Ala Ser Thr Leu Leu Gly Ala Ile Thr
 305 310 315 320

Ser Phe Ala Ala Gly Phe Val Lys Ile Arg Trp Ala Arg Trp Ser Lys
 325 330 335

Leu Leu Ile Ala Gly Val Thr Ala Thr Gln Ala Gly Leu Val Phe Leu
 340 345 350

Leu Ala His Thr Arg His Pro Ser Ser Ile Trp Leu Cys Tyr Ala Ala
 355 360 365

1024.ST25.txt

Phe Val Leu Phe Arg Gly Ser Tyr Gln Phe Leu Val Pro Ile Ala Thr
 370 375 380

Phe Gln Ile Ala Ser Ser Leu Ser Lys Glu Leu Cys Ala Leu Val Phe
 385 390 395 400

Gly Val Asn Thr Phe Phe Ala Thr Ile Val Lys Thr Ile Ile Thr Phe
 405 410 415

Ile Val Ser Asp Val Arg Gly Leu Gly Leu Pro Val Arg Lys Gln Phe
 420 425 430

Gln Leu Tyr Ser Val Tyr Phe Leu Ile Leu Ser Ile Ile Tyr Phe Leu
 435 440 445

Gly Ala Met Leu Asp Gly Leu Arg Asp Cys Gln Arg Gly His His Pro
 450 455 460

Arg Gln Pro Pro Ala Gln Gly Leu Arg Ser Ala Ala Glu Glu Lys Ala
 465 470 475 480

Ala Gln Arg Leu Ser Val Gln Asp Lys Gly Leu Gly Gly Leu Gln Pro
 485 490 495

Ala Gln Ser Pro Pro Leu Ser Pro Glu Asp Ser Leu Gly Ala Val Gly
 500 505 510

Pro Ala Ser Leu Glu Gln Arg Gln Ser Asp Pro Tyr Leu Ala Gln Ala
 515 520 525

Pro Ala Pro Gln Ala Ala Glu Phe Leu Ser Pro Val Thr Thr Pro Ser
 530 535 540

Pro Cys Thr Leu Ser Ser Ala Gln Ala Ser Gly Pro Glu Ala Ala Asp
 545 550 555 560

Glu Thr Cys Pro Gln Leu Ala Val His Pro Pro Gly Val Ser Lys Leu
 565 570 575

Gly Leu Gln Cys Leu Pro Ser Asp Gly Val Gln Asn Val Asn Gln
 580 585 590

<210> 2

<211> 392

<212> PRT

<213> Homo sapiens

1024.ST25.txt

<400> 2

Met Ala Ala Leu Arg Gln Pro Gln Val Ala Glu Leu Leu Ala Glu Ala
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Phe Arg Glu Glu Phe Gly Ala Glu Pro Glu Leu Ala Val
 20 25 30

Ser Ala Pro Gly Arg Val Asn Leu Ile Gly Glu His Thr Asp Tyr Asn
 35 40 45

Gln Gly Leu Val Leu Pro Met Ala Leu Glu Leu Met Thr Val Leu Val
 50 55 60

Gly Ser Pro Arg Lys Asp Gly Leu Val Ser Leu Leu Thr Thr Ser Glu
 65 70 75 80

Gly Ala Asp Glu Pro Gln Arg Leu Gln Phe Pro Leu Pro Thr Ala Gln
 85 90 95

Arg Ser Leu Glu Pro Gly Thr Pro Arg Trp Ala Asn Tyr Val Lys Gly
 100 105 110

Val Ile Gln Tyr Tyr Pro Ala Ala Pro Leu Pro Gly Phe Ser Ala Val
 115 120 125

Val Val Ser Ser Val Pro Leu Gly Gly Leu Ser Ser Ser Ala Ser
 130 135 140

Leu Glu Val Ala Thr Tyr Thr Phe Leu Gln Gln Leu Cys Pro Asp Ser
 145 150 155 160

Gly Thr Ile Ala Ala Arg Ala Gln Val Cys Gln Gln Ala Glu His Ser
 165 170 175

Phe Ala Gly Met Pro Cys Gly Ile Met Asp Gln Phe Ile Ser Leu Met
 180 185 190

Gly Gln Lys Gly His Ala Leu Leu Ile Asp Cys Arg Ser Leu Glu Thr
 195 200 205

Ser Leu Val Pro Leu Ser Asp Pro Lys Leu Ala Val Leu Ile Thr Asn
 210 215 220

Ser Asn Val Arg His Ser Leu Ala Ser Ser Glu Tyr Pro Val Arg Arg
 225 230 235 240

Arg Gln Cys Glu Glu Val Ala Arg Ala Leu Gly Lys Glu Ser Leu Arg
 245 250 255

Glu Val Gln Leu Glu Glu Leu Glu Ala Ala Arg Asp Leu Val Ser Lys
 260 265 270

1024.ST25.txt

Glu Gly Phe Arg Arg Ala Arg His Val Val Gly Glu Ile Arg Arg Thr
275 280 285

Ala Gln Ala Ala Ala Leu Arg Arg Gly Asp Tyr Arg Ala Phe Gly
290 295 300

Arg Leu Met Val Glu Ser His Arg Ser Leu Arg Asp Asp Tyr Glu val
305 310 315 320

Ser Cys Pro Glu Leu Asp Gln Leu Val Glu Ala Ala Leu Ala Val Pro
325 330 335

Gly Val Tyr Gly Ser Arg Met Thr Gly Gly Gly Phe Gly Gly Cys Thr
340 345 350

Val Thr Leu Leu Glu Ala Ser Ala Ala Pro His Ala Met Arg His Ile
355 360 365

Gln Glu His Tyr Gly Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Leu Ser Gln Ala Ala
370 375 380

Asp Gly Ala Lys Val Leu Cys Leu
385 390

<210> 3

<211> 1361

<212> DNA

<213> Homo sapiens

```

<400> 3
cccgagcatc cccgcggc ac gggctgtgc cggaggc agt gtgcagagct gcaggcgcgc 60
gtcatggctg ctttgagaca gccccaggc gcggagctgc tggccgaggc ccggcgagcc 120
ttccgggagg agttcggggc cgagccc gag ctggccgtgt cagcgccggg ccgcgtcaac 180
ctcatcgaaa aacacacgga ctacaaccag ggcctggtgc tgcctatggc tctggagctc 240
atgacggtgc tggtgtggcag cccccgcaag gatgggctgg tgtctctcct caccacctct 300
gagggtgccg atgagccccca gcggctgcag tttccactgc ccacagccca gcgcgcgtg 360
gaggcctggga ctccctggc ggccaactat gtcaaggag tgattcaga ctacccagct 420
gccccccctcc ctggcttcag tgcagtggtg gtcagctcag tgccccctggg gggtgtggcctg 480
tccagctcag catccttggc agtggccacg tacaccttcc tccagcagct ctgtccagac 540
tcgggcacaa tagctgccccg cgccccaggc tgtcagcagg ccgagcacag cttcgcagg 600
atgcccctgtg gcatcatggc ccagttcatc tcacttatgg gacagaaaagg ccacgcgcgtg 660
ctcatttgcact gcagggtcctt ggagaccacg ctggtgccac tctcggaccc caagctggcc 720

```

1024.ST25.txt

gtgctcatca ccaactctaa tgtccgccac tccctggcct ccagcgagta ccctgtgcgg	780
cggcgccaat gtgaagaagt ggcccggcg ctgggcaagg aaagcctccg ggaggtacaa	840
cttggaaagagc tagaggctgc cagggacctg gtgagcaaag agggcttccg gcgggccccgg	900
cacgtggtgg gggagattcg gcgcacggcc caggcagcgg ccgcccgttag acgtggcgac	960
tacagagcct ttggccgcct catggtgag agccaccgct cactcagaga cgactatgag	1020
gtgagctgcc cagagctgga ccagctgggag gaggctgcgc ttgctgtgcc tggggtttat	1080
ggcagccgca tgacggcg ggcttcgggt ggctgcacgg tgacactgct ggaggcctcc	1140
gctgctcccc acgccccatgcg gcacatccag gagcactacg gcgggactgc caccttctac	1200
ctctctcaag cagccgatgg agccaagggtg ctgtgcttgt gaggcaccccc caggacagca	1260
cacggtgagg gtgcggggcc tgcaggccag tcccacggct ctgtgcccgg tgccatcttc	1320
catatccggg tgctcaataa acttgtgcct ccaatgtggta a	1361

<210> 4

<211> 1776

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4 atgggtgcctt ccagccccagc ggtggagaag caggtgcccgg tggAACCTGG gcctgacccc	60
gagctccgggt cctggcgccg cctcgtgtgc tacctttgtct tctacggctt catggcgccag	120
atacggccag gggagagctt catcaccccc taccccttgg ggccccacaa gaacttcacg	180
cgggacgagg tcacgaacga gatcacggccg gtgctgtcgt actcctacactt ggccgtgctg	240
gtgcccgtgt tcctgctcac cgactacactg cgctacacgc cggtgctgct gctgcagggg	300
ctcagcttcg tgcgggtgtg gctgctgctg ctgctggcc actcgggtggc gcacatgcag	360
ctcatggagc tcttctacag cgtcaccatg gcccgcgcac tcgcctattt ctccctacatc	420
ttctctctcg tgcggcccgc gcgttaccatg cgtgtggccg gctactcgac cgctgcgggtg	480
ctgctggccg tggccaccatg ctccgtgctg ggccagctgc tggtcactgt gggccgagtc	540
tccttctcca cgctcaacta catctcgctg gccttcctca ctttcagcgt ggtcctcgcc	600
ctcttcctga agcgcaccaa gcgcagccctc ttcttcaacc gcgcacgaccg ggggcgggtgc	660
gaaaccttcgg ctgcggagct ggagcgcatg aatccctggcc caggcgggaa gctgggacac	720
gccttcgggg tggccctgtgg ggactcagtg ctggcgccga tgctgcggga gctggggac	780
agccttcggc gcgcgcagct gcgcctgtgg tccctctgggt ggtcttcaa ctgcggccggc	840
tactacctgg tggtctacta cgtgcacatc ctgtggaaacg aggtggaccc caccaccaac	900
agtgcgcggg tctacaacgg cgccgcagat gctgcctcca cgctgcgtgg cgccatcacg	960
tccttcggccg cgggcttcgt gaagatccgc tgggcgcgcgt ggtccaagct gctcatcgcg	1020

1024.ST25.txt

ggcgtcacgg ccacgcaggc	ggggctggtc ttccctctgg	cgcacacgcg ccacccgagc	1080
agcatctggc ttgtctatgc	ggccttcgtg ctgttcccg	gctcctacca gttcctcgtg	1140
cccatcgcca ccttcagat	tgcacatcttct ctgtctaaag	agctctgtgc cctggtcttc	1200
ggggtcaaca cgttctttgc	caccatcgac aagaccatca	tcactttcat tgtctcggac	1260
gtgcggggcc tgggcctccc	ggtccgcaag cagttccagt	tatactccgt gtacttcctg	1320
atcctgtcca tcacatctactt	cttgggggcc atgctggatg	gcctgcgcga ctgcccagcgg	1380
ggccaccacc cgcggcagcc	cccggcccaag ggcctgagga	gtgccgcgga ggagaaggca	1440
gcacagcgac tgagcgtgca	ggacaagggc ctcggaggcc	tgcagccagc ccagagcccg	1500
ccgctttccc cagaagacag	cctgggggct gtggggccag	cctccctgga gcagagacag	1560
agcgaccat acctggccca	ggccccggcc ccgcaggcag	ctgaattcct gagcccagtg	1620
acaacccctt cccccctgcac	tctgtcgtcc gcccaagcct	caggccctga ggctgcagat	1680
gagacttgtc cccagctggc	tgtccatcct cctgggtgtca	gcaagctggg tttgcagtgt	1740
cttccaaagcg acgggtttca	aatgtgaac cagtga		1776

REIVINDICACIONES

1. Un método de selección de células transformadas positivamente que comprende:
 - a) suministrar células eucariotas que carecen de actividad de una proteína endógena de viabilidad celular;
 - b) transformar dichas células eucariotas con un constructo de ácido nucleico que codifica dicha proteína de viabilidad celular o al menos una porción funcional de la misma, y que codifica también una proteína de interés; y
 - c) cultivar dichas células eucariotas transformadas con dicho constructo de ácido nucleico bajo condiciones tales que la viabilidad celular es dependiente de la actividad normal de dicha proteína de viabilidad celular seleccionando de este modo las células positivamente transformadas,

donde la proteína de viabilidad celular es la galactoquinasa 1, donde la célula eucariota es una célula de mamífero, donde un ácido nucleico que codifica dicha proteína de viabilidad celular y un ácido nucleico que codifica dicha proteína de interés están en una configuración bi-cistrónica con la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés estando corriente abajo de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de viabilidad celular, y donde dicho cultivo se efectúa en presencia de D-galactosa a una concentración de 0,25 mM a 0,5 mM.
2. El método de la reivindicación 1, donde dicha proteína de interés se selecciona del grupo que consiste en un factor de crecimiento, una hormona, una citoquina, una proteína extracelular, una proteína de adhesión celular, y una proteína de señalización celular.
3. El método de la reivindicación 2, donde dicho factor de crecimiento se selecciona a partir del grupo que consiste en factor de crecimiento epidérmico, factor beta de crecimiento transformante, factor ácido de crecimiento de fibroblastos, factor básico de crecimiento de fibroblastos, eritropoyetina, trombopoyetina, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento I tipo insulina, factor de crecimiento II tipo insulina, interferón gamma y factor de crecimiento derivado de plaquetas.
4. El método de la reivindicación 2, donde dicha hormona se selecciona a partir del grupo que consiste en prolactina, hormona paratiroidea, gastrina, leptina, hormona del crecimiento, insulina y CG-β.
5. El método de la reivindicación 2, donde dicha citoquina se selecciona a partir del grupo que consiste en SDF-1 α , IL-7, IL-10, IL-20 e IL-19.
6. El método de la reivindicación 2, donde dicha proteína extracelular se selecciona a partir del grupo que consiste en fibrinógeno, colágeno, fibronectina, vimentina, proteína 1b asociada a microtúbulos, factor de crecimiento de las neuritas (NOF), celulosa bacteriana (BC) y laminina.
7. El método de la reivindicación 2, donde dicha proteína de adhesión se selecciona a partir del grupo que consiste en proteínas de adhesión celular que incluyen integrina, molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), N-CAM, cadherina, tenascina, glicerina y la proteína inducida por daño nervioso 2 (nirjurin2).
8. El método de la reivindicación 2, donde dicha proteína de señalización celular se selecciona a partir del grupo que consiste en proteína quinasa p38 activada por mitógenos, factor nuclear kappaB, proteína inhibidora de la Raf quinasa (RKIP), Raf-1, MEK, proteína quinasa C (PKC), fosfoinositido-3-quinasa gamma, receptor de tirosinquininas, proteínas G heterotriméricas, caveolina-3 y las proteínas 14-3-3.
9. El método de la reivindicación 1, donde dicho constructo de ácido nucleico incluye una secuencia de ácido nucleico como se expone en SEQ ID NO:3.
10. El método de la reivindicación 1, donde una concentración de dicha D-galactosa es 0,25 mM.
11. Un cultivo celular de células eucariotas libre de citotóxicos que comprende las células genéticamente modificadas para expresar una proteína de viabilidad celular y una proteína de interés bajo condiciones de cultivo tales que la viabilidad celular depende de la actividad normal de dicha proteína de viabilidad celular, donde la proteína de viabilidad celular es la galactoquinasa 1, donde la célula eucariota es una célula de mamífero y donde el ácido nucleico que codifica dicha proteína de viabilidad celular y un ácido nucleico que codifica dicha proteína de interés están en una configuración bi-cistrónica con la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés estando corriente abajo la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de viabilidad celular, y donde dicho cultivo se efectúa en presencia de D-galactosa a una concentración de 0,25 mM a 0,5 mM.

- 12.** El cultivo celular de la reivindicación 11, donde dicha proteína de interés se selecciona a partir del grupo que consiste en un factor de crecimiento, una hormona, una citoquina, una proteína extracelular, una proteína de adhesión celular, y una proteína de señalización celular.
- 5 **13.** El cultivo celular de la reivindicación 12, donde dicho factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste en factor de crecimiento epidérmico, factor beta de crecimiento transformante, factor ácido de crecimiento de fibroblastos, factor básico de crecimiento de fibroblastos, eritropoyetina, trombopoyetina, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento I tipo insulina, factor de crecimiento II tipo insulina, interferón gamma y factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- 10 **14.** El cultivo celular de la reivindicación 12, donde dicha hormona se selecciona a partir del grupo que consiste en prolactina, hormona paratiroidea, gastrina, leptina, hormona del crecimiento, insulina y CG-β.
- 15 **15.** El cultivo celular de la reivindicación 12, donde dicha citoquina se selecciona a partir del grupo que consiste en SDF- α , IL-7, IL-10, IL-20 e IL-19.
- 15 **16.** El cultivo celular de la reivindicación 12, donde dicha proteína extracelular se selecciona a partir del grupo que consiste en fibrinógeno, colágeno, fibronectina, vimentina, proteína 1b asociada a microtúbulos, factor de crecimiento de las neuritas (NOF), celulosa bacteriana (BC) y laminina.
- 20 **17.** El cultivo celular de la reivindicación 12, donde dicha proteína de adhesión se selecciona a partir del grupo que consiste en proteínas de adhesión celular que incluyen integrina, molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), N-CAM, cadherina, tenascina, gicerina y la proteína inducida por daño nervioso 2 (nijjurin2).
- 20 **18.** El cultivo celular de la reivindicación 12, donde dicha proteína de señalización celular se selecciona a partir del grupo que consiste en proteína quinasa p38 activada por mitógenos, factor nuclear kappaB, proteína inhibidora de la Raf quinasa (RKIP), Raf-1, MEK, proteína quinasa C (PKC), fosfoinosítido-3-quinasa gamma, receptor de tirosinquinasas, proteínas G heterotriméricas, caveolina-3 y las proteínas 14-3-3.
- 25 **19.** El cultivo celular de la reivindicación 13, donde una concentración de dicha D-galactosa es 0,25 mM.
- 25 **20.** Un método de producción de la proteína de interés que comprende:
- 30 a) transformar las células eucariotas que carecen de actividad de una proteína de viabilidad celular endógena con un constructo de ácido nucleico que codifica la proteína de interés y dicha proteína de viabilidad celular o al menos una porción funcional de la misma;
- 30 b) cultivar dichas células eucariotas transformadas con el constructo de ácido nucleico bajo condiciones tales que la viabilidad celular es dependiente de la actividad normal de dicha proteína de viabilidad celular seleccionando de este modo las células positivamente transformadas; y
- 30 c) purificar la proteína de interés a partir de dichas células positivamente transformadas o de un medio de cultivo de las mismas,
- 35 donde la proteína de viabilidad celular es la galactoquinasa 1, donde la célula eucariota es una célula de mamífero, donde un ácido nucleico que codifica dicha proteína de viabilidad celular y un ácido nucleico que codifica dicha proteína de interés están en una configuración bi-cistrónica con la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés estando corriente abajo de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de viabilidad celular, y donde dicho cultivo se efectúa en presencia de D-galactosa a una concentración de 0,25 mM a 0,5 mM.
- 40 **21.** El método de la reivindicación 20, donde dicha proteína de interés se selecciona a partir del grupo que consiste en un factor de crecimiento, una hormona, una citoquina, una proteína extracelular, una proteína de adhesión celular, y una proteína de señalización celular.
- 45 **22.** El método de la reivindicación 21, donde dicho factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste en factor de crecimiento epidérmico, factor beta de crecimiento transformante, factor ácido de crecimiento de fibroblastos, factor básico de crecimiento de fibroblastos, eritropoyetina, trombopoyetina, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento I tipo insulina, factor de crecimiento II tipo insulina, interferón gamma y factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- 45 **23.** El método de la reivindicación 22, donde dicha hormona se selecciona a partir del grupo que consiste en prolactina, hormona paratiroidea, gastrina, leptina, hormona del crecimiento, insulina y CG-β.
- 50 **24.** El método de la reivindicación 22, donde dicha citoquina se selecciona a partir del grupo que consiste en SDF- α , IL-7, IL-10, IL-20 e IL-19.

25. El método de la reivindicación 22, donde dicha proteína extracelular se selecciona a partir del grupo que consiste en fibrinógeno, colágeno, fibronectina, vimentina, proteína 1b asociada a microtúbulos, factor de crecimiento de las neuritas (NOF), celulosa bacteriana (BC) y laminina.

5 **26.** El método de la reivindicación 22, donde dicha proteína de adhesión se selecciona a partir del grupo que consiste en proteínas de adhesión celular que incluyen integrina, molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), N-CAM, cadherina, tenascina, glicerina y la proteína inducida por daño nervioso 2 (ninizurin2).

10 **27.** El método de la reivindicación 21, donde dicha proteína de señalización celular se selecciona a partir del grupo que consiste en proteína quinasa p38 activada por mitógenos, factor nuclear kappaB, proteína inhibidora de la Raf quinasa (RKIP), Raf-1, MEK, proteína quinasa C (PKC), fosfoinositido-3-quinasa gamma, receptor de tirosinquininas, proteínas G heterotriméricas, caveolina-3 y las proteínas 14-3-3.

28. El método de la reivindicación 22, donde dicho constructo de ácido nucleico incluye una secuencia de ácido nucleico como se expone en SEQ ID NO:3.

29. El método de la reivindicación 21, donde una concentración de dicha D-galactosa es 0,25 mM.

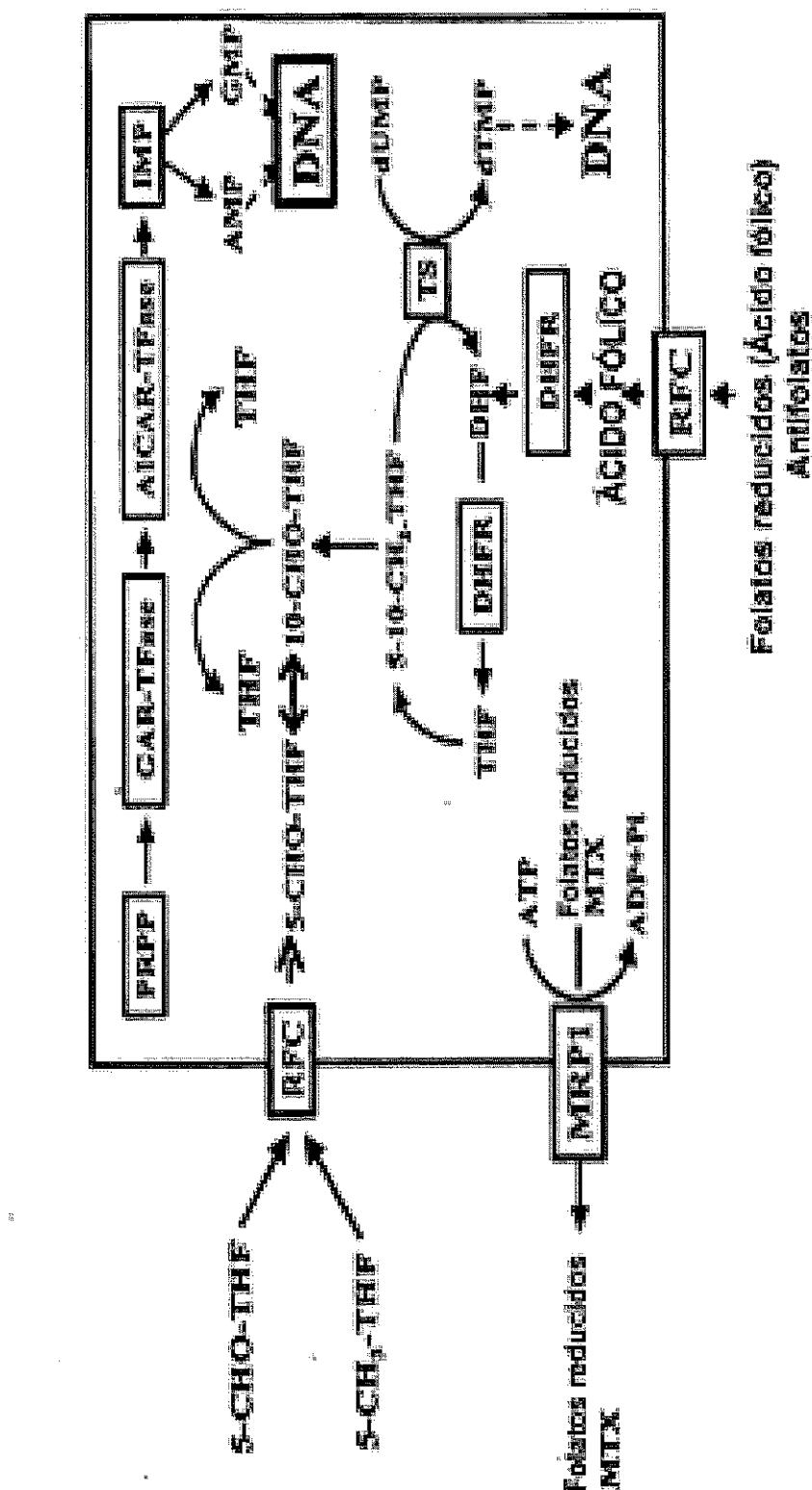


Figura 1

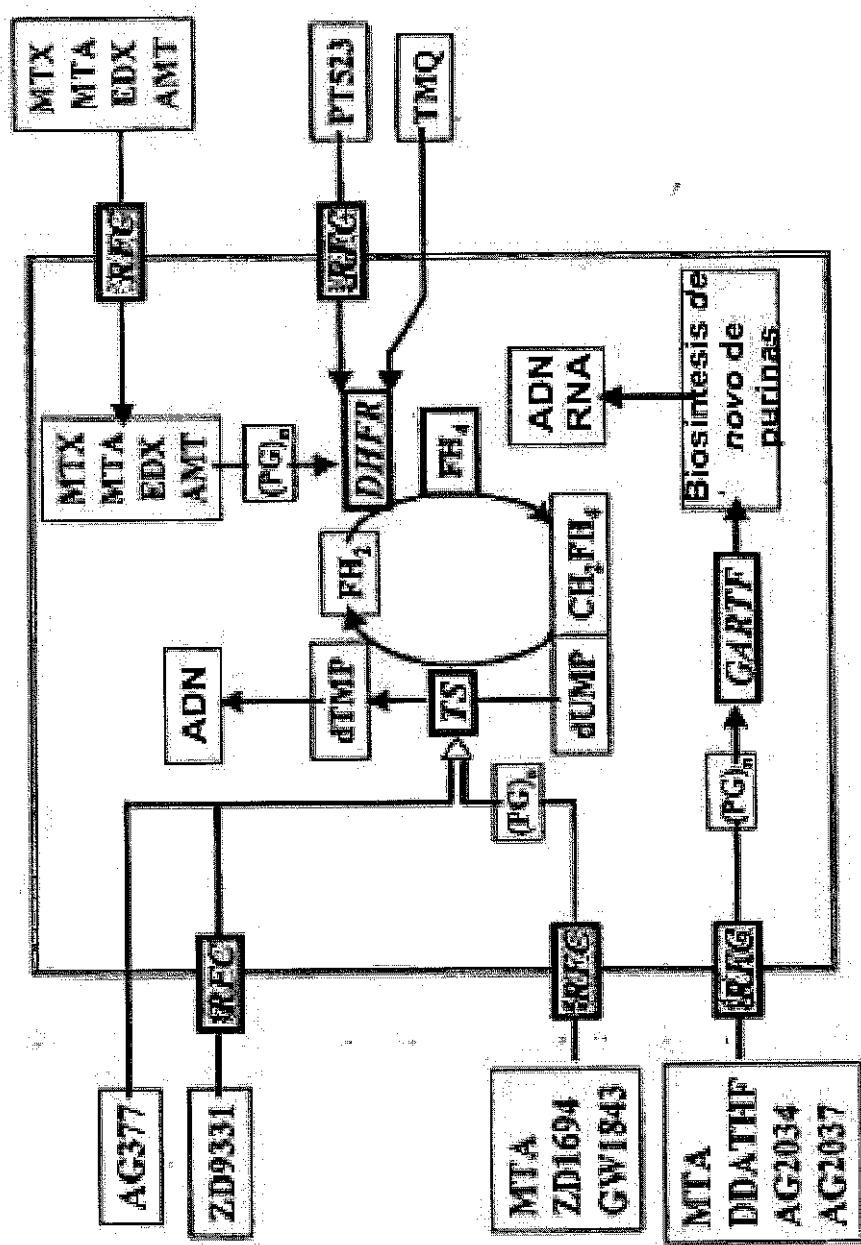


Figura 2

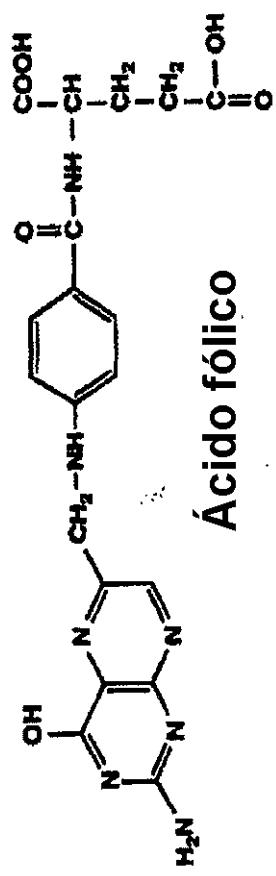


Figura 3a

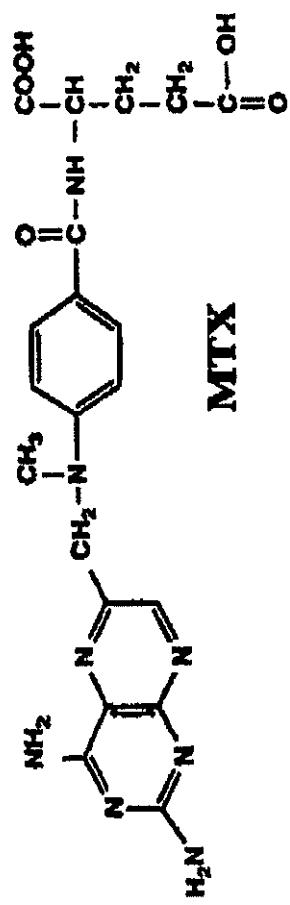


Figura 3b

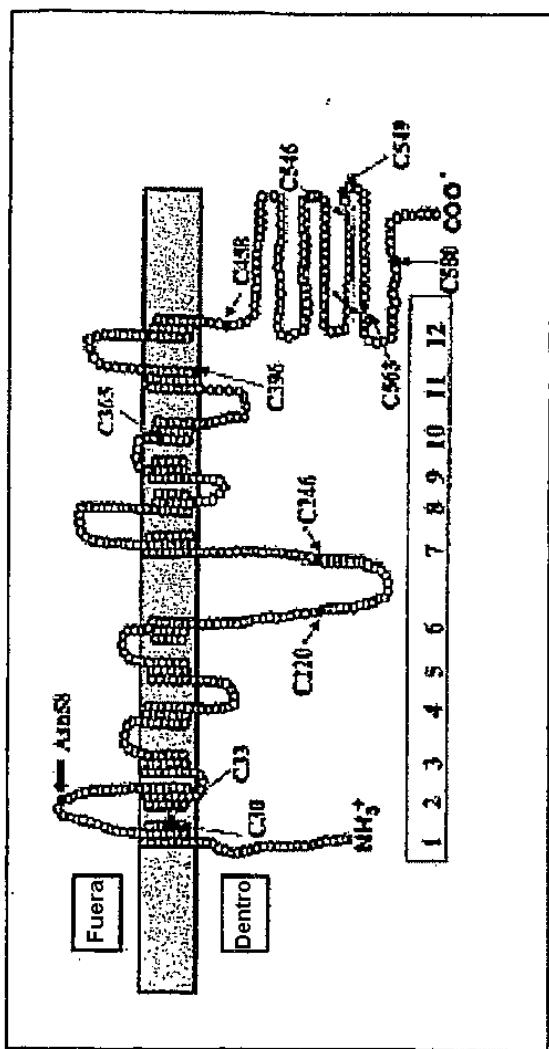
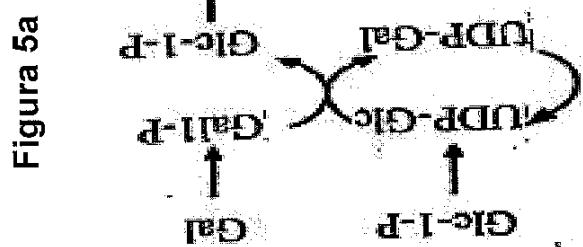
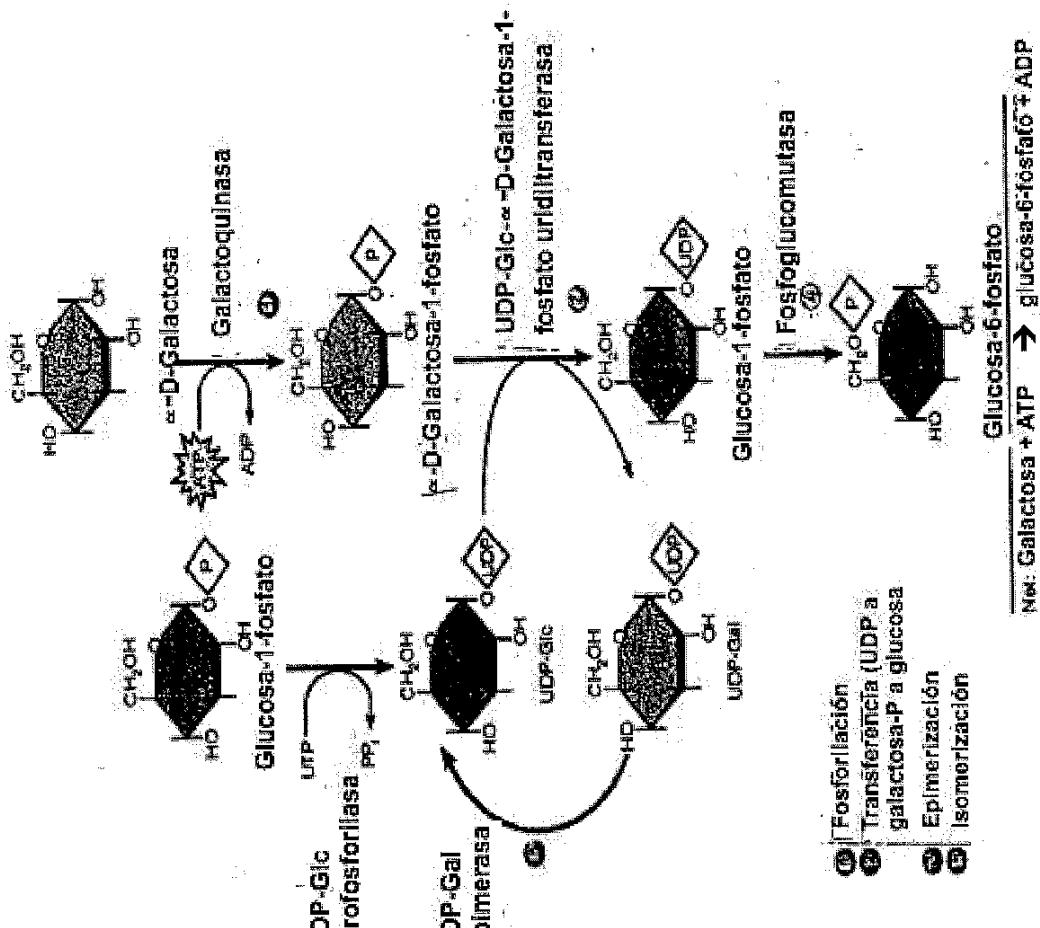


Figura 4



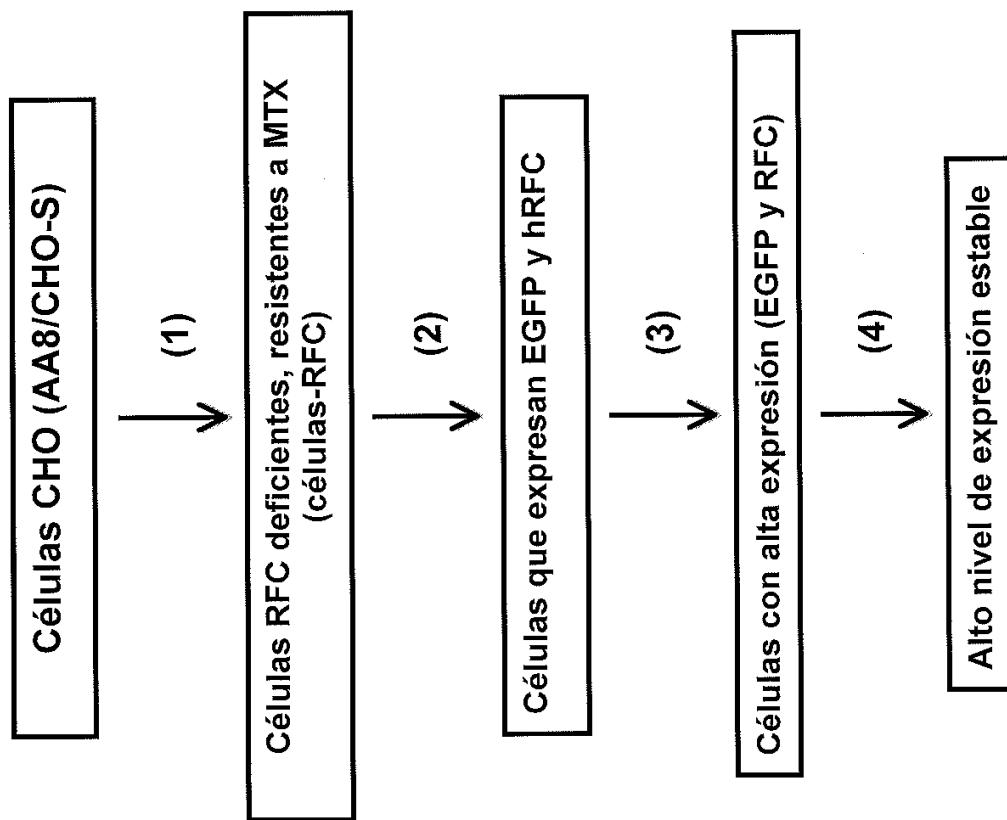


Figura 6

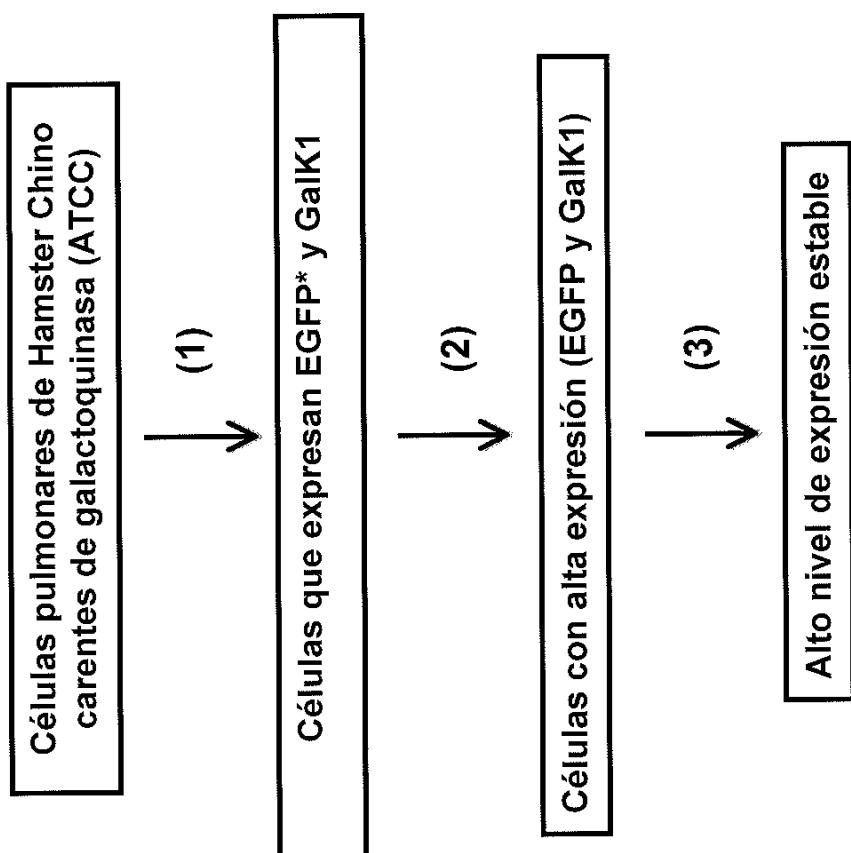


Figura 7

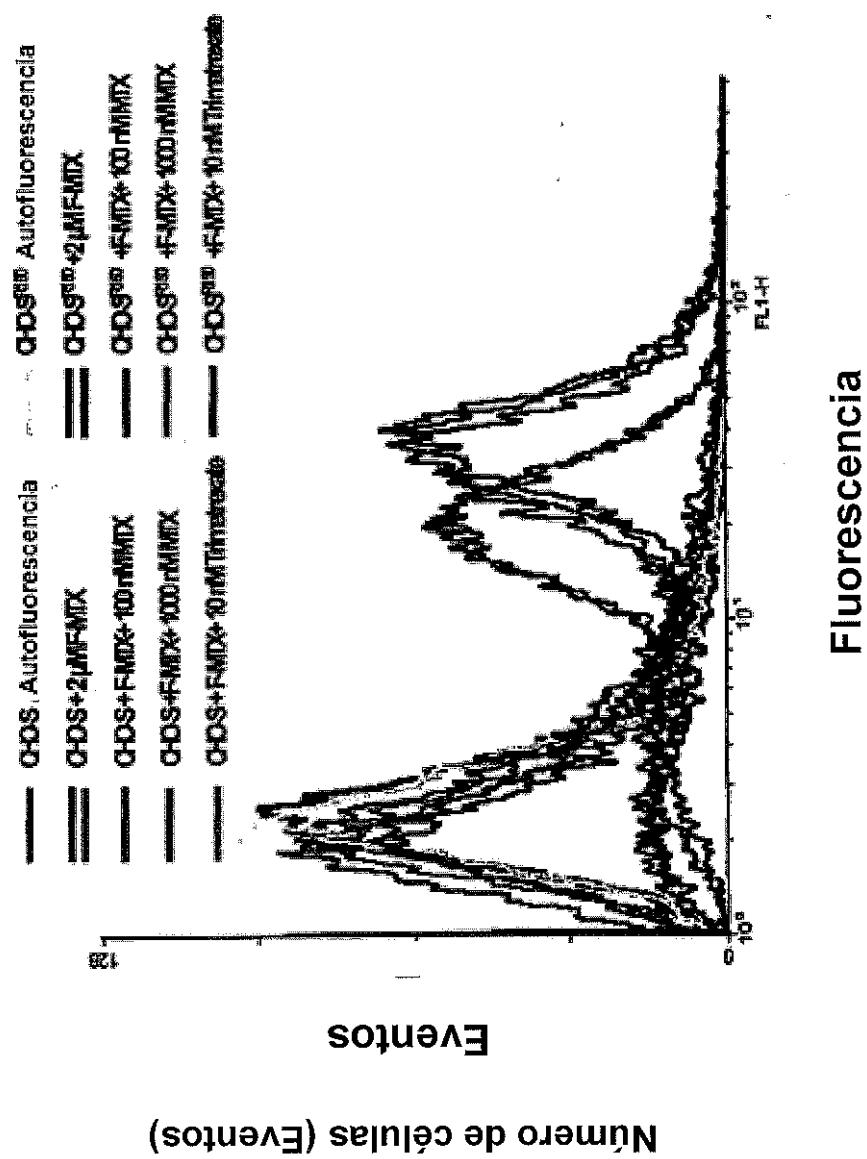


Figura 8

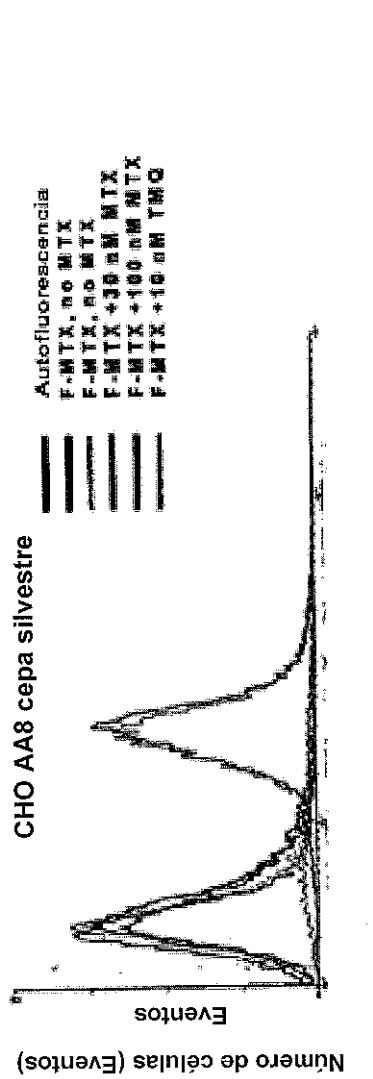


Figura 9a

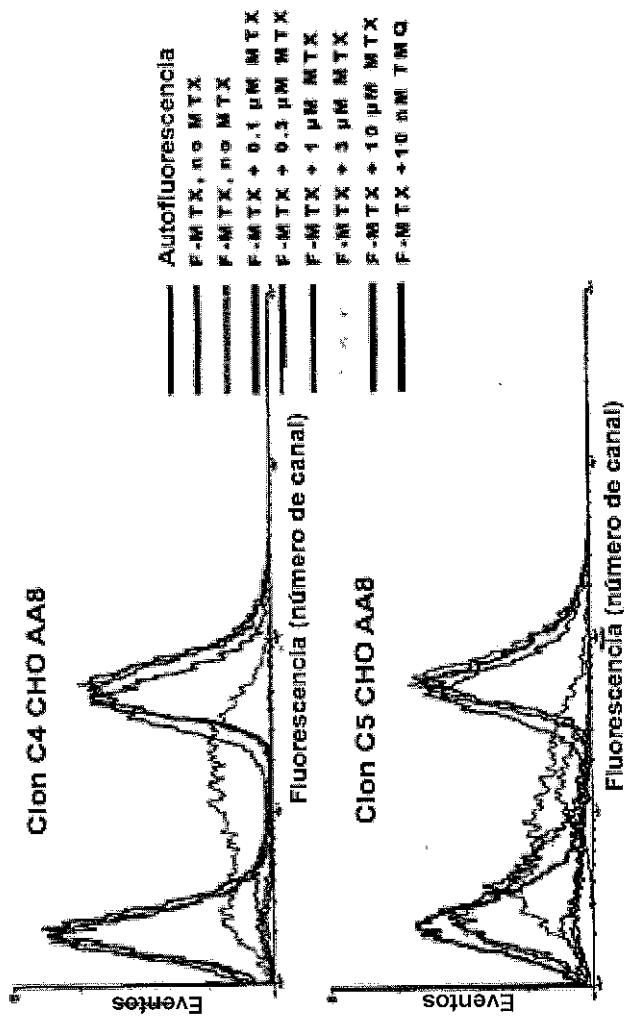


Figura 9b

Figura 9c

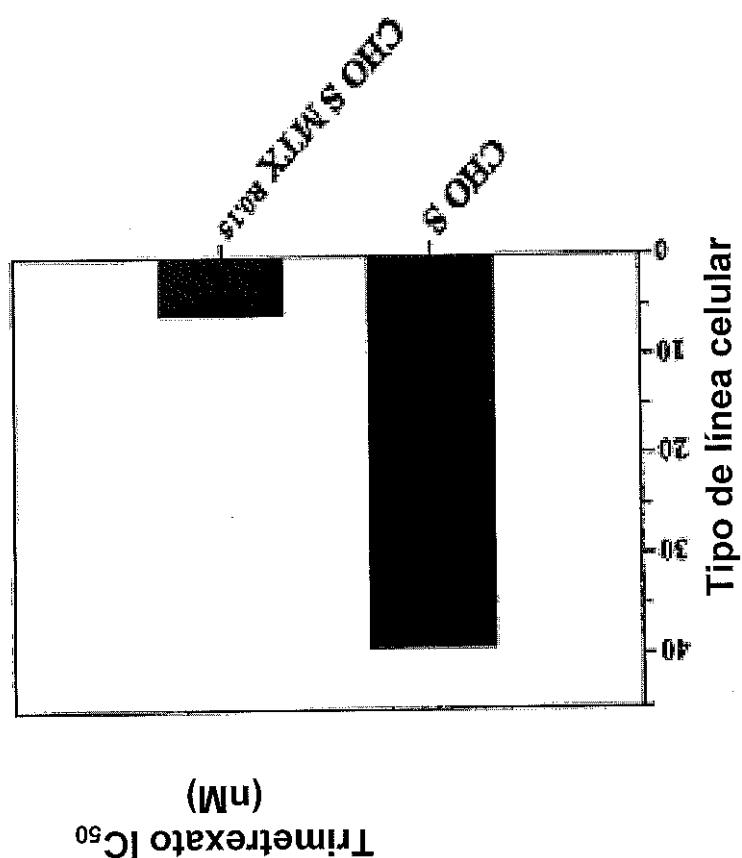


Figura 10

[^3H] MTX Transport
(pmol/min $\times 10^7$ celulas)

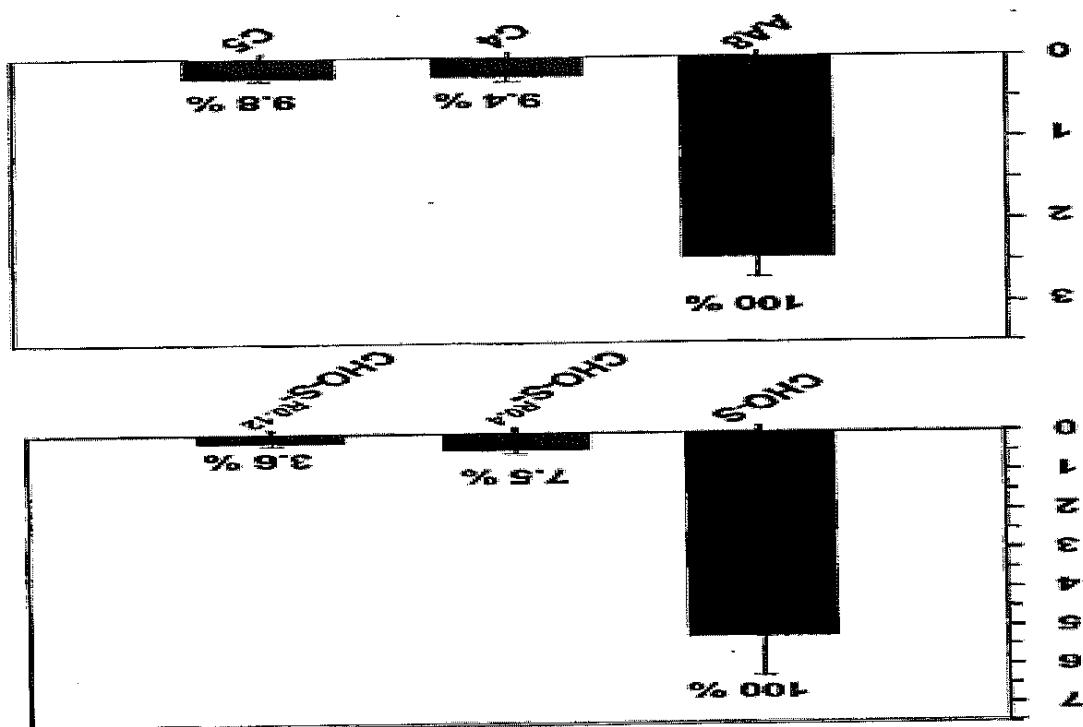


Figura 11a

Figura 11b

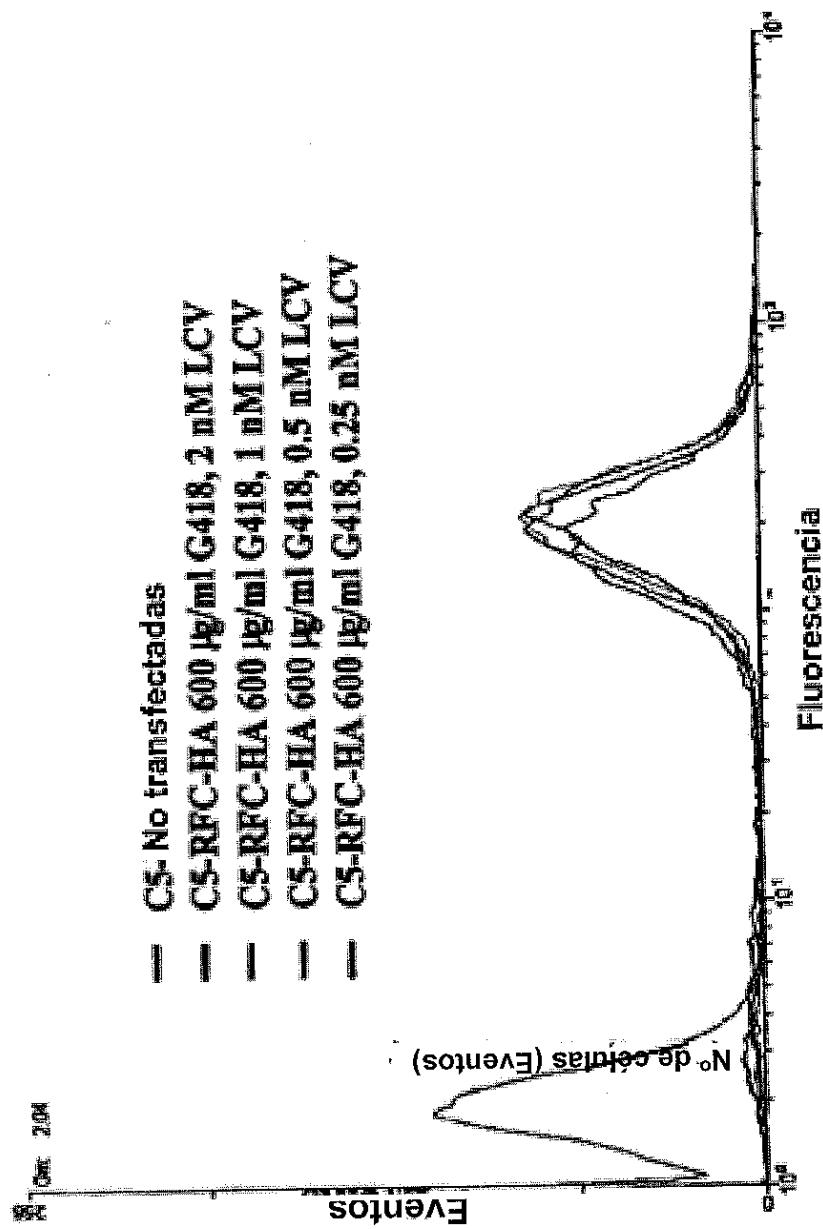


Figura 12

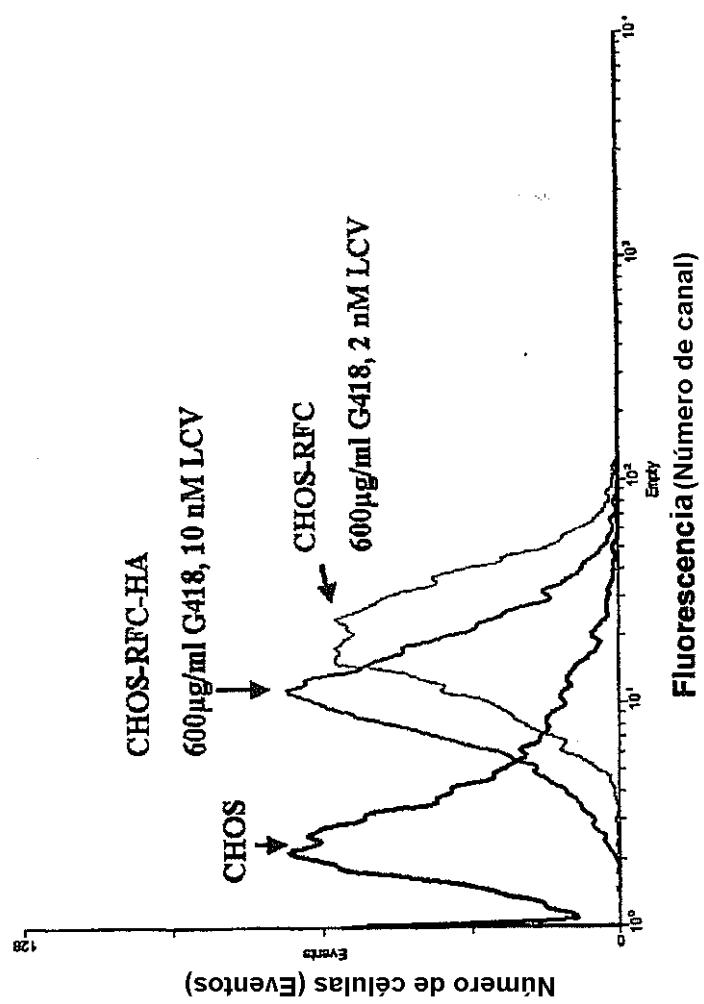


Figura 13

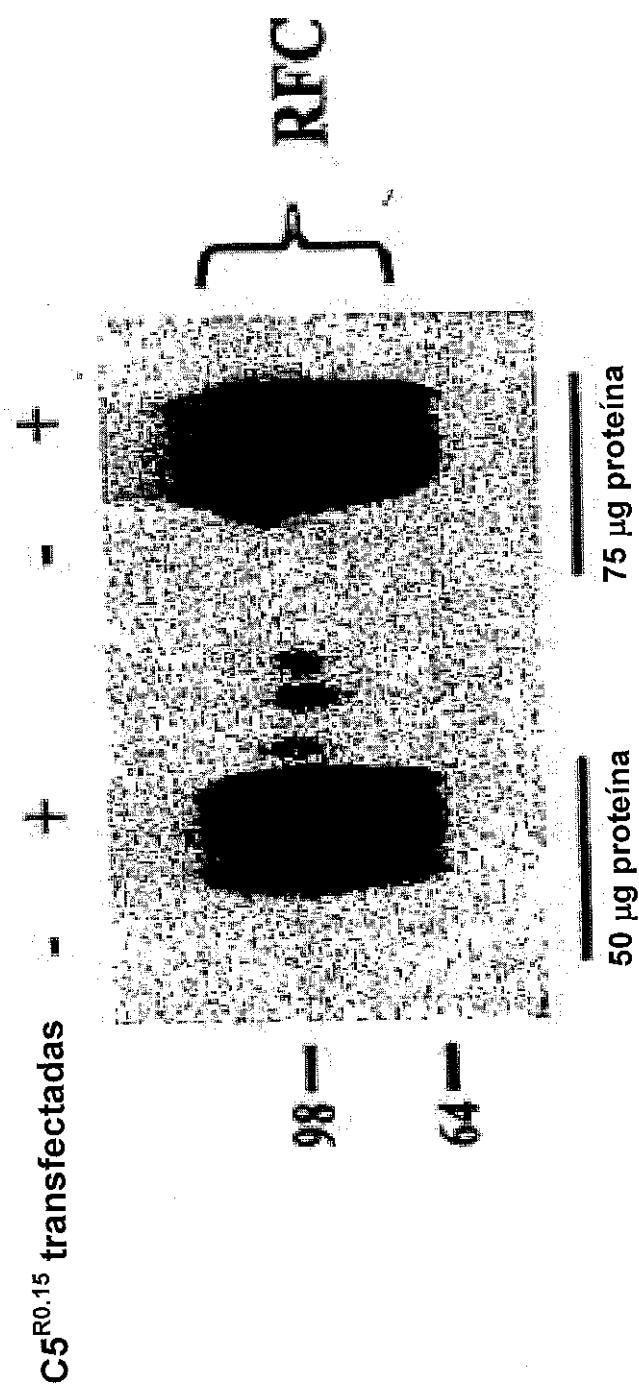


Figura 14

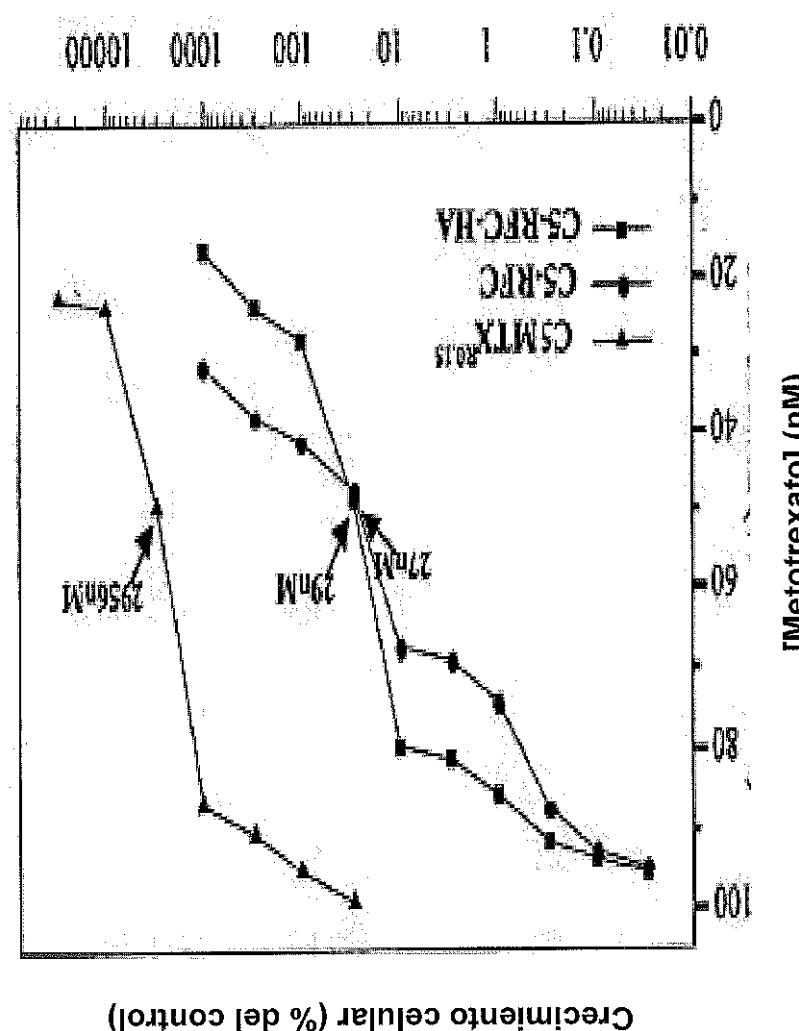


Figura 15

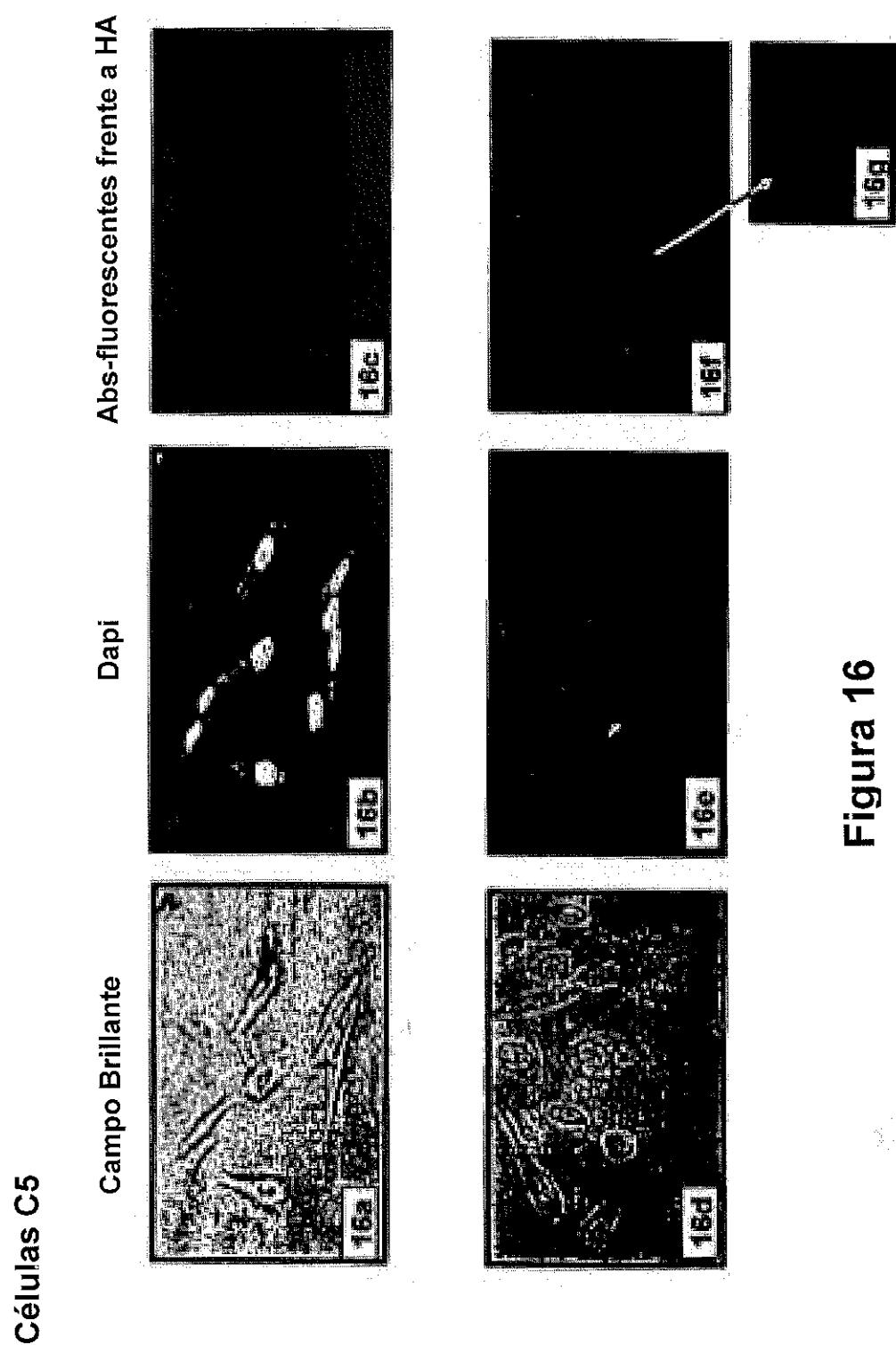


Figura 16

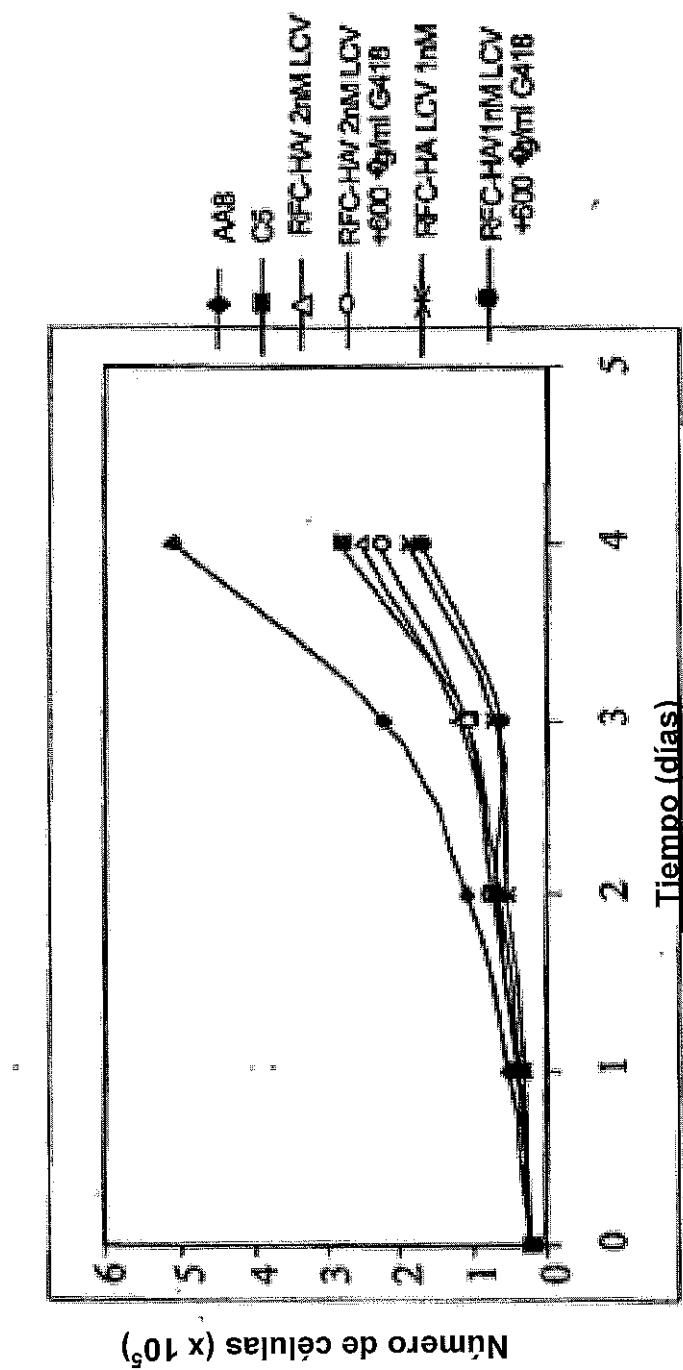


Figura 17

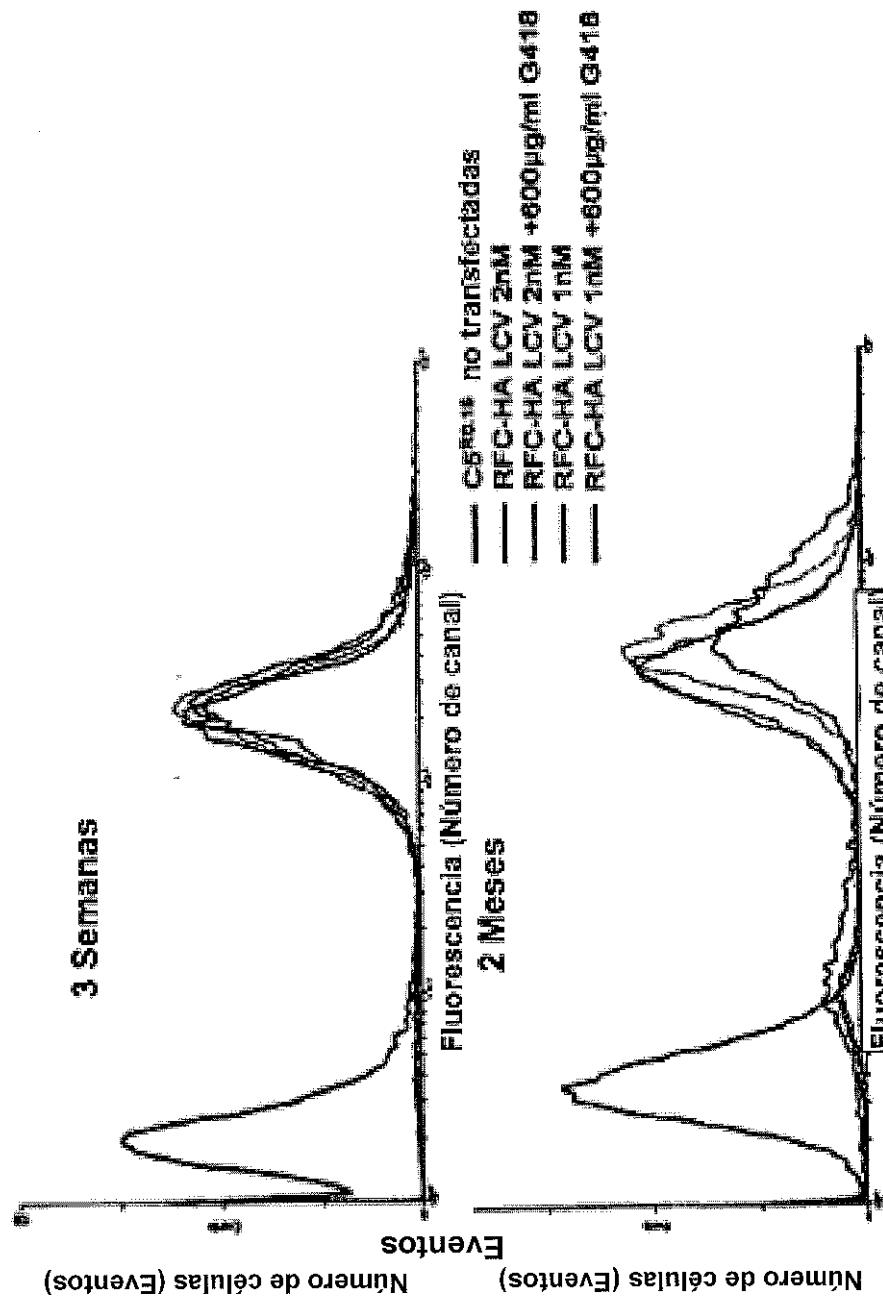


Figura 18a

Figura 18b

3 Semanas

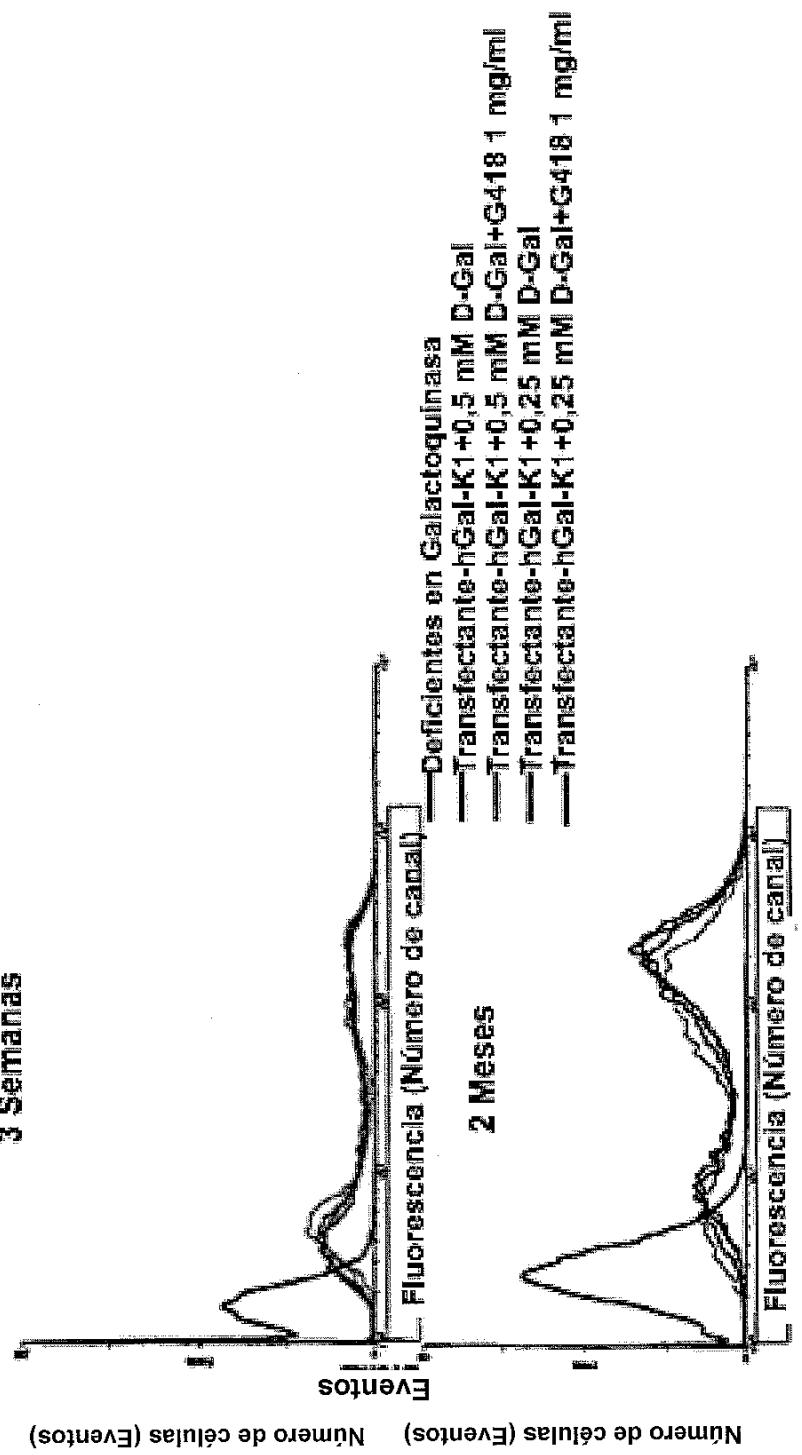


Figura 19a

Figura 19b

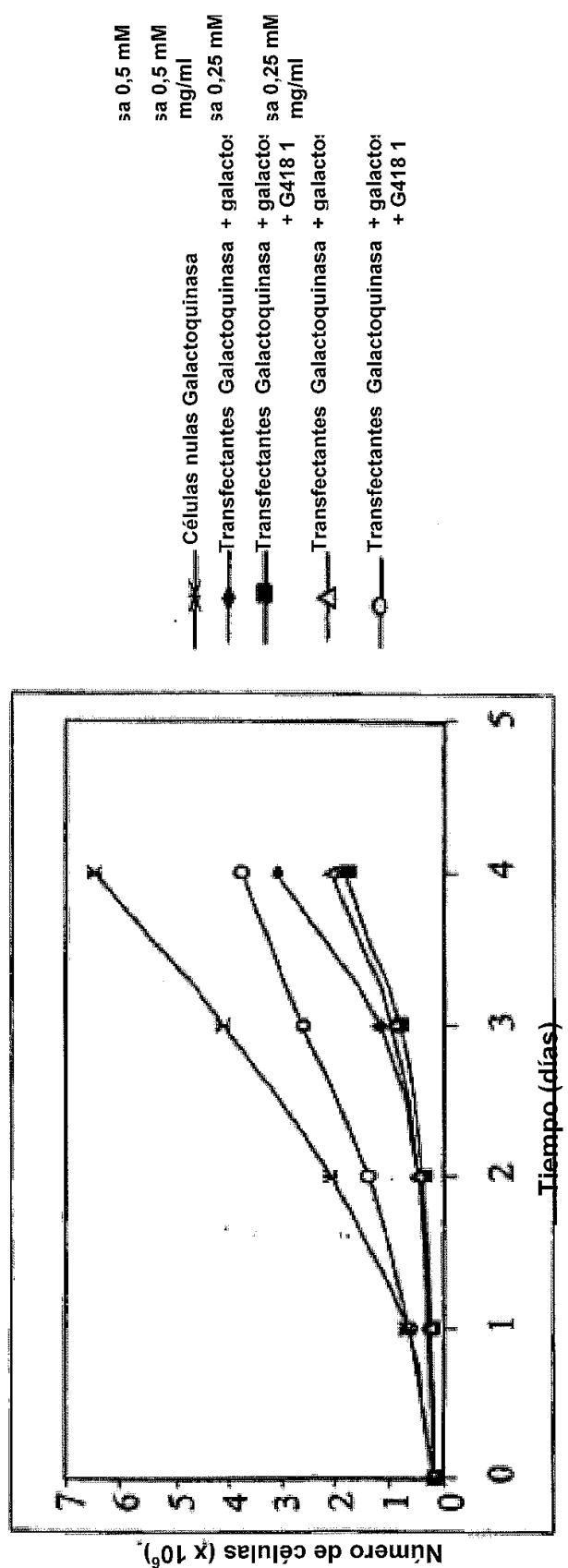


Figura 20