



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 346 956**

51 Int. Cl.:
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01999652 .9**
96 Fecha de presentación : **05.12.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1339855**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.2003**

54 Título: **Mejora de la homogeneidad y secreción de proteínas recombinantes en sistemas de mamíferos.**

30 Prioridad: **05.12.2000 IL 140110**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.10.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.10.2010

73 Titular/es: **Merck Serono S.A.**
Centre Industriel
1267 Coinsins, Vaud, CH

72 Inventor/es: **Amitai, Hagit y**
Chitlaru, Edith

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 346 956 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

Mejora de la homogeneidad y secreción de proteínas recombinantes en sistemas de mamíferos.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para mejorar la homogeneidad y/o la secreción de una proteína recombinante de interés expresada en células de mamífero reemplazando la secuencia de péptido señal endógeno del ADN que codifica la proteína de interés por la de hGH humana. La invención también se refiere a vectores de expresión de ADN que contienen la secuencia que codifica dichas proteínas fusionada a la secuencia de péptido señal de la hGH y a células que contienen dichos vectores.

Antecedentes de la invención

La secreción proteica es uno de los eventos más importantes de la producción de proteínas en el campo de la biotecnología. Este proceso consta de las siguientes etapas: en primer lugar, la translocalización a lo largo de la membrana de retículo endoplasmático (RE); en segundo lugar la N-glicosilación y el plegamiento en el lumen de RE; en tercer lugar, salida del RE; en cuarto lugar, modificaciones en el aparato de Golgi; y finalmente la liberación desde los gránulos secretores hacia el espacio extracelular (Sakaguchi 1997). El hecho de que una proteína sea secretada o no desde las células depende principalmente de si puede translocalizarse a través de la membrana y de si puede plegarse correctamente en el lumen del RE. La translocalización de membrana en células de mamífero es obligatoriamente acoplada. Tras la translocalización de membrana, los péptidos nacientes son liberados al espacio luminal y se pliegan con ayuda de diversos chaperones y enzimas de plegamiento. Las proteínas plegadas incorrectamente quedan atrapadas dentro del RE y por tanto no pueden avanzar hacia los compartimentos secretores. En procesos biotecnológicos en los que se produce una expresión masiva de proteínas, la secreción puede suponer un cuello de botella y limitar la velocidad de expresión.

Los péptidos señal o secuencias líder están localizados en los extremos amino de los polipéptidos nacientes. Dirigen proteínas a la ruta secretora y son separados de la cadena naciente una vez que se han translocalizado en la membrana del retículo endoplasmático.

El péptido señal consta de tres regiones: una región polar aminoterminal (región N), en la que se observan frecuentemente residuos de aminoácido cargados positivamente; una región hidrofóbica central (región H) de más de 7-8 residuos de aminoácido hidrofóbicos; y una región carboxiterminal (región C) que incluye la posición de separación del péptido señal (Sakaguchi, 1997). Las regiones H eucarióticas están dominadas por Leu con alguna presencia de Val, Ala, Phe e Ile. La separación del péptido señal de la proteína madura se produce en una posición específica y la especificidad de separación reside en el último residuo de la secuencia señal (Nielsen y col., 1997). Cerca de la posición de separación -3 y -1 la alanina es más predominante. Dicha posición confiere especificidad de procesado. No se observan más estructuras específicas en las primeras posiciones de la proteína madura en organismos eucarióticos (Nielsen y col., 1997). Por lo tanto, un "mal" péptido señal puede promover más de una separación específica que da como resultado la expresión no homogénea de la proteína; es decir, la proteína se expresará con diferentes aminoácidos N-terminales.

Puesto que muchas proteínas están reguladas en condiciones fisiológicas, el uso de señales reguladoras naturales para la sobreexpresión en sistemas de mamíferos no es deseable. Por ejemplo, en dichos sistemas se usan promotores eficientes tales como CMV y SV40 para controlar la expresión de proteínas recombinantes de interés. De forma similar, el uso de péptidos señal efectivos tales como SV40 y hGH poli A para sobreexpresar proteínas recombinantes secretadas en lugar de sus contrapartidas endógenas sería ventajoso.

Se ha descrito que el péptido señal de la hormona de crecimiento humana (hGH) es eficaz para la secreción de proteínas intracelulares, ligadas a membrana y de proteínas secretadas a través de mecanismos diferentes a los gobernados por péptidos señal.

Por ejemplo, el documento WO26562 describe la secreción de la proteína intracelular icIL-1ra-II mediante fusión del péptido señal de hGH con la secuencia de la icIL-1ra-II. La invención se refiere a un proceso para la expresión recombinante de una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de la icIL-1ra-II natural en un sistema de expresión celular recombinante a través del uso de un vector que es una fusión del péptido señal de una proteína secretora humana, preferiblemente el péptido señal de 26 aminoácidos de la hGH, fusionado en un marco de lectura apropiado con el ADN que codifica icIL-1ra-II. El proceso comprende la producción de un vector de expresión que contienen ADN que codifica icIL-1ra-II, bien en forma de ADNc o de ADN genómico, fusionado en un marco de lectura apropiado con el ADN que codifica el péptido señal seleccionado, preferiblemente el péptido señal de hGH de 26 aminoácidos (Figura 1, SEC ID N°: 2). A continuación, el vector de expresión es insertado en un hospedante de expresión apropiado, tal como células CHO. Las células de hospedante transformadas son cultivadas a continuación de tal modo que se provoca que el vector de expresión exprese su proteína codificada, y entonces la proteína icIL-1ra-II expresada y secretada es recolectada del medio de cultivo y purificada.

Morris y col. (1999) describen el uso de péptido señal de hGH para la secreción de la proteína CDL40L, que existe en la naturaleza predominantemente como molécula anclada a membrana. Varios informes han demostrado que

ES 2 346 956 T3

la forma soluble de la CD40L es biológicamente activa (Fanslow y col., 1994, Hollenbaugh y col., 1992 y Mazzei y col., 1995). Para usar CD40L como agente terapéutico potencial se ha desarrollado la optimización de formas solubles de esta molécula. En este trabajo, se ha comparado la actividad de las formas solubles de CD40L con la actividad de la región homóloga de TNF de CD40L multimerizada soluble. Las formas solubles de CD40L han sido preparadas mediante fusión del dominio extracelular completo de CD40L humano o de la región de CD40L homóloga a la secuencia de TNF a la secuencia de péptido señal de hGH. La forma multimerizada de CD40L se ha preparado mediante fusión a un compresor de isoleucina (IZ, del inglés "isoleucine zipper"). Los resultados demostraron que la multimerización aumenta la actividad de CD40L soluble.

Pecceu y col. (1991) describen el uso del péptido señal de hGH para expresar y secretar la forma madura de IL-1 β . En el organismo, tras su síntesis, la proIL-1 β permanece principalmente citosólica hasta que es liberada y transportada fuera de las células. Un examen de la secuencia revela la ausencia de un péptido señal hidrofóbico N-terminal o interno clásico. La liberación de IL-1 β madura parece estar relacionada con el procesamiento en la ruptura de péptido de ácido aspártico-alanina por la enzima convertidora (ICE) (Dinarelli, 1996). Aunque la ICE se expresa constitutivamente en la mayoría de las células, no todas las células procesan proIL-1 β y secretan IL-1 β madura. Por lo tanto, la secreción de IL-1 β madura es dependiente del tipo de célula. Pecceu describe el uso de un vector recombinante que contiene únicamente el ADN que codifica la forma madura de la IL-1 β , sin ningún péptido señal y un vector que contiene el ADN que codifica la forma madura de la IL-1 β , unido al péptido señal de hGH. Los resultados demuestran que sólo el 52% de la proteína es secretada usando la primera construcción, mientras que usando la construcción con el péptido señal de hGH se obtiene una secreción del 97%.

El primer codón ATG para el inicio de la traducción debe ser identificado por la maquinaria transcripcional. Un codón ATG en un contexto muy débil probablemente no sea la posición de inicio de la traducción. El contexto óptimo para el inicio de la traducción en ARNm vertebral es un residuo G que sigue al codón ATG (posición +4 en la región de codificación) y una purina, preferiblemente A, tres nucleótidos por encima (-3 en la región no codificadora), esta secuencia de consenso se ha designado secuencia Kozak (Kozak, 1996, 1999). El ARN mensajero en el que el primer codón ATG carece de los nucleótidos preferidos en estas dos posiciones de flanco claves (una secuencia "mala" o no óptima Kozak) tiene la propiedad especial de iniciar la traducción en el primer y segundo codones, produciendo con ello dos proteína a partir de un ARN. El ATG en la posición de inicio del péptido señal de hGH va seguido de G (en posición +3) requerido para obtener una secuencia de Kozak óptima (Figuras 1 y 2, SEC ID N°: 3), que asegura el inicio de la traducción en la primera posición ATG únicamente y la homogeneidad del producto.

Se purificó por afinidad proteína de unión a IL-18 (IL18-BP) a partir de orina humana usando IL-18, se secuenció y se clonó. Se descubrió que la IL-18BP erradica *in vitro* la actividad de la citoquina IL-18 pro-inflamatoria (Novick y col., 1999). El ADN codifica un péptido señal en su porción N-terminal. Parte de la secuencia Kozak codificada dentro del péptido señal no posee el contexto apropiado.

IL-18BP líder	ATG	A
	+1	+4
Consenso Kozak	ATG	G
	+1	+4
Hormona de crecimiento humana líder	ATG	G
	+1	+4

Por tanto, existe la necesidad de proporcionar un método o sistema que permita la secreción de una proteína de interés en general y que permita la secreción de IL-18BP en particular en forma de proteínas homogéneas y/o en grandes cantidades en células de mamífero.

Sumario de la invención

La invención proporciona un método mejorado para producir una IL-18BP recombinante homogénea expresada en diferentes sistemas de mamífero y/o una secreción eficaz de la misma, que comprende reemplazar la secuencia de péptido señal endógena del ADN que codifica IL-18BP por la de hGH.

La invención también proporciona un vector de expresión para mejorar la homogeneidad y/o la secreción de una IL-18BP recombinante expresada en un sistema de mamífero que comprende la secuencia de péptido señal de la hGH unida al ADN que codifica IL-18BP.

ES 2 346 956 T3

En un aspecto, la presente invención proporciona dicho vector, que codifica la secuencia de Kozak óptima que asegura la traducción desde un único codón de inicio. Parte de dicha secuencia se incluye en la codificación para el péptido señal de hGH, que asegura una separación precisa del péptido señal de la proteína madura.

5 En una realización de la presente invención, el vector incluye el gen que codifica IL-18BP. Dicho vector permite la producción de IL-18BP homogénea (comenzando con Thr-Pro-Val).

10 En otro aspecto, la invención proporciona células capaces de crecer en medio libre de suero y capaces de producir al menos 4 picogramos de IL-18BP/célula/24 horas, preferiblemente al menos 11,8 picogramos/célula/24 horas y más preferiblemente aproximadamente 12 picogramos/célula/24 horas.

Breve descripción de las figuras

15 Figura 1: muestra la secuencia genómica que codifica el péptido señal de hGH y la secuencia de aminoácidos traducida.

Figura 2: muestra la secuencia Kozak presente en el consenso y en el péptido señal de hGH.

20 Figura 3: describe los cebadores usados para la fusión de la secuencia de péptido señal de hGH (sin su intrón) y la secuencia de IL-18BP.

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención se refiere a la producción y a la secreción de una IL-18BP recombinante usando la secuencia de péptido señal de la hGH en lugar de la secuencia de péptido señal natural. La invención también proporciona un vector de expresión que contiene el ADN que codifica IL-18BP en forma de ADNc o de ADN genómico, fusionado en un marco de lectura apropiado con el ADN que codifica el péptido señal de hGH. El vector de expresión es insertado entonces en un hospedante de expresión apropiado, es decir, en células de mamífero. A continuación las células hospedantes transformados son cultivadas de un modo que provoque que el vector de expresión exprese su IL-18BP codificada, y entonces la IL-18BP expresada y secretada es aislada y purificada. La expresión de IL-18BP puede ser estable o transitoria.

30 Aunque las células CHO son las células hospedantes preferidas, también pueden usarse otras células de mamífero tales como células COS, células HEK293, etc. Los especialistas en la técnica son conscientes de las técnicas para crear vectores de expresión, insertarlos en sistemas de expresión y seleccionar clones, que expresen la proteína deseada, incluyendo las técnicas de amplificación.

35 Como apreciarán los especialistas en la técnica, los tipos de promotores usados para controlar la transcripción de las proteínas recombinantes pueden ser cualesquiera de los que son funcionales en las células hospedantes. Los ejemplos de promotores funcionales en células de mamífero incluyen el promotor temprano de SV40, el promotor tardío principal de adenovirus, el promotor de timidina quinasa de herpes simple (HSV), el promotor LTR de sarcoma de rous (RSV), el promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV), el promotor LTR de virus de tumor mamario de ratón (MMTV), el promotor de interferón- β , el promotor de proteína 70 de choque térmico (hsp 70), así como muchos otros bien conocidos en la técnica. Dichos promotores pueden ser constitutivos o regulables. 45 Los promotores constitutivos son los preferidos debido a que no se requiere una etapa extra de tratamiento, tal como el cambio de temperatura, la adición de agentes químicos o inductores, etc., para la expresión a partir de promotores constitutivos. Se ha demostrado en una realización que se puede obtener una mayor productividad controlando la expresión de IL-18BP con el promotor CMV en comparación con el promotor SV40.

50 En células de mamífero, tres elementos definen la señal de poliadenilación del núcleo, es decir el hexanucleótido altamente conservado AAUAAA que se encuentra de 10 a 30 nucleótidos por encima de la posición de ruptura, un elemento rico en U o rico en GU menos altamente conservado localizado por debajo de la posición de ruptura, y la propia posición de ruptura, que se convierte en el punto de poli(A) adición y que por tanto se denomina generalmente posición poli(A) (Zhao y col., 1999). Otras secuencias adicionales fuera de dicho núcleo reclutan factores reguladores o mantienen la señal del núcleo en una estructura abierta y accesible. Se han diseñado diferentes vectores de expresión para la expresión heteróloga para contener señales de poliadenilación eficientes tales como las señales de poliadenilación de SV40 y de hGH. En una realización preferida se produce IL-18BP usando la señal de poliadenilación de hormona de crecimiento humana.

60 En particular, la presente invención se refiere a un vector de expresión que contiene el ADN de IL-18BP fusionado al ADN que codifica el péptido señal de hGH, y a células hospedantes transfectadas con dicho vector de expresión.

65 La secuencia de ADN del péptido señal de hGH usado puede ser la secuencia genómica que incluye el intrón (Figura 1, SEC ID N°: 1) o la secuencia de ADNc del péptido señal que excluye el intrón.

De acuerdo con la presente invención es posible expresar IL-18BP homogénea y efectivamente en un sistema de expresión de mamífero usando el péptido señal de hGH.

ES 2 346 956 T3

Adicionalmente, la invención se refiere a células de mamífero que expresan y secretan eficientemente IL-18BP recombinante homogénea usando el péptido señal de hGH.

En otro aspecto, la invención se refiere a células que secretan eficientemente IL-18BP recombinante homóloga, de acuerdo con la invención, que es capaz de ser cultivada y producida en medio libre de suero (SFM, del inglés "serum free medium"). Más específicamente, en una realización preferida, se demostró que, de acuerdo con la invención, las células producían entre 4 y 11,8, y también aproximadamente 12, picogramos de IL-18BP/célula/24 horas, tanto con suero como en condiciones libres de suero.

A continuación se ilustrará la invención mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Establecimiento del clon S10-21 productor de IL-18BP

El ADN del péptido señal natural de la proteína IL-18BP codifica para una secuencia Kozak no óptima debido a que el + 4 es A y no G, por tanto se reemplazó por el péptido señal de hGH que exhibe una secuencia Kozak óptima (Figura 2, SEC ID N°: 3). El fragmento de ADN que codifica el péptido señal de hGH fusionado con la proteína IL-18BP fue introducido en un vector de expresión de mamífero bajo el control del promotor SV-40 y de la señal de poliadenilación.

Para la preparación del vector de expresión, se fusionó el péptido señal de hGH (sin su intrón, véase la Figura 1) directamente con el ADNc que codifica para la proteína hIL-18BP madura (variante A, número de acceso AF110799 en las bases de datos públicas NCBI) mediante PCR (la Figura 3 describe los cebadores usados).

El péptido señal de hGH (sin su intrón) fue amplificado mediante PCR usando pXGH5 (Selden y col., 1986) como plantilla y dos cebadores, a) un cebador que contenía las secuencias entre el inicio del hGHsp (cebador de fusión fuera 5' hGH-IL-18BP, SEC ID N°: 4) y b) un cebador que codifica secuencias del extremo del hGHsp y secuencias que codifican los primeros 19 nucleótidos del ADNc de IL-18BP madura (cebador de fusión dentro 3' hGH-IL-18BP, SEC ID N°: 5).

El ADNc que codifica para la IL-18BP madura fue amplificado mediante PCR usando un plásmido que codifica el ADNc de IL-18BP como plantilla y dos cebadores, a) un cebador que codifica secuencias que solapan con el extremo del péptido señal de hGH y con el inicio del ADNc de la proteína IL-18BP madura (el cebador de fusión dentro 5' hGH-IL-18BP, SEC ID N°: 6) y b) un cebador que contiene el extremo de la secuencia de ADNc de la IL-18BP (el cebador de fusión fuera 3' hGH-IL-18BP, SEC ID N°: 7).

Los fragmentos resultantes de la anterior amplificación de PCR fueron fusionados en una tercera PCR, mediante un recocido de las secuencias que solapan presentes en ambos fragmentos y usando dos cebadores, a) el cebador 5' hGH-IL-18BP de fusión fuera, y b) el cebador 3' hGH-IL-18BP de fusión fuera.

El fragmento de ADN de PCR resultante fue clonado en el vector de expresión de mamífero pSVE3 (Hartman y col., 1982) que codifica las señales reguladoras usadas habitualmente, el promotor SV40 y la señal SV40 poliA (los cebadores de fusión fuera 5' y 3' también contenían las secuencias de posición de restricción específica necesarias para la clonación).

El plásmido construido (PSIL18BP) fue usado para transfectar células CHO (DHFR-) junto con un plásmido que contenía el gen DHFR de ratón como marcador selectivo.

Se aislaron elementos individuales en medio selectivo y se evaluó la producción de IL-18BP mediante un ensayo ELISA.

Se llevaron a cabo varios ciclos de amplificación génica con concentraciones crecientes de MTX. Tras la amplificación los clones fueron aislados mediante dilución limitada. Tras subclonar el clon seleccionado S10-21 mostró una productividad específica y estable de 1 picogramo/célula/24 horas.

Ejemplo 2

Establecimiento del clon 22C2-11 productor de IL-18BP

El ADN del péptido señal natural de la proteína IL-18BP codifica para una secuencia Kozak no óptima debido a que el + 4 es A y no G, por tanto se reemplazó por el péptido señal de hGH que exhibe una secuencia Kozak óptima (Figura 2, SEC ID N°: 3). El fragmento de ADN que codifica el péptido señal de hGH fusionado con la proteína IL-18BP fue introducido en un vector de expresión de mamífero bajo el control del promotor CMV y de la señal de poliadenilación de hormona de crecimiento humana.

ES 2 346 956 T3

Para la preparación del vector de expresión, el ADN que codifica el péptido señal de hGH (sin su intrón, véase la Figura 1) fue fusionado directamente con el ADNc que codifica para la proteína hIL-18BP madura (variante A, número de acceso AF110799) mediante PCR usando el vector de expresión generado en el Ejemplo 1 (PSIL18BP) como plantilla y dos cebadores, a) el cebador directo ACGCGTTCGACGCCACCATGGCTCCCGGACG (SEC ID N°: 8) que comprende una posición de restricción Sall, y las primeras 21 bases que codifican el ADNc de péptido señal de hGH, y b) el cebador inverso CGGGATCCTCATTAACCTGCTGCTGTGG (SEC ID N°: 9) que comprende las últimas 18 bases de la IL-18BP, dos codones de parada y una posición de restricción Bam HI.

El fragmento de ADN de PCR resultante fue insertado en un vector de expresión de mamífero, usando manipulaciones genéticas moleculares conocidas, en donde el vector de mamífero comprende las señales reguladoras usadas habitualmente para expresar IL-18BP: el promotor de CMV y la señal poliA de hGH (Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publications y Wiley Interscience, Nueva York, NY, 1987-1995; Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

El plásmido construido (pCMV-IL18bp2) fue usado para transfectar células CHO (DHFR-) junto con un plásmido que contenía el gen DHFR de ratón como marcador selectivo.

Los elementos aislados individuales fueron aislados en medio selectivo y se evaluó la producción de IL-18BP mediante un ensayo ELISA.

Se llevaron a cabo varios ciclos de amplificación génica con concentraciones crecientes de MTX (hasta 1000 nM) sobre elementos aislados de alta producción. Después de la amplificación se eliminó el MTX y se aislaron clones de alta producción mediante dilución limitada y escrutando la actividad. Tras clonar, el clon seleccionado 22C2-11 mostró una elevada productividad específica de 4 picogramos/célula/24 horas y estabilidad en suero a 37°C. Se descubrió que el clon 22C2-11 se cultiva y produce IL-18BP también en condiciones libres de suero. La productividad del clon 22C2-11 fue evaluada a temperaturas más bajas. A 32-33°C, tanto en suero como en condiciones libres de suero, se observó que la productividad aumentaba hasta 11,8 picogramos de IL-18BP/célula/24 horas.

Estos resultados indican que usar una construcción que controle la expresión a partir del promotor de CMV y de la señal poliA de hGH permitió aumentar la expresión de IL-18BP en comparación con los niveles de expresión controlados a partir del promotor de SV40 y de la señal poliA de SV40 (Ejemplo 1).

Ejemplo 3

Purificación y análisis N-terminal de la IL-18BP producida

Se purificó la IL-18BP del sobrenadante de todas las células productoras (S10-21 y 22C2-11, Ejemplos 1 y 2 respectivamente) mediante cromatografía de inmunoafinidad. El análisis N-terminal de la IL-18BP expresada con el péptido señal de hGH únicamente reveló las especies correctas de IL-18BP con la siguiente secuencia N-terminal de aminoácidos T P V S Q T T T A A T A S V R (SEC ID N°: 10). Estos resultados demuestran que la IL-18BP es producida de forma homogénea, a partir de diferentes vectores de expresión, usando el péptido señal de hGH en el que, al contrario que con el péptido señal natural de la IL-18BP, la señal Kozak tiene un contexto óptimo.

Referencias

- Dinareello, C.A.** (1996) "Biologic Basis for Interleukin-1 in Disease". *Blood*, 87, 2095-147.
- Fanslow, W.C., Srinivasan, S., Paxton, R., Gibson, M.G., Spriggs, M.K., Armitage, R.J.** (1994) "Structural characteristics of CD40 ligand that determine biological function". *Semin Immunology*, 5, 267-78.
- Hartman, J.R., Nayak, D.P. y Fareed, G.C.** (1982) "Human Influenza virus hemagglutinin is expressed in monkey cells using simian virus 40 vectors". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 233-7.
- Hollenbaugh, D., Grosmaire, L.S., Kullas, C.D., Chalupny, N.J., Braesch-Andersen, S., Noelle, R.J., Stamenkovic, I., Ledbetter, J.A. y Aruffo, A.** (1992) "The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity". *EMBO J.* 11, 4313-21.
- Kozak, M.** (1996) "Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation". *Mammalian Genome*, 7, 563-74.
- Kozak, M.** (1999) "Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes". *Gene*, 234, 187-208.
- Mazzei, G.J., Edgerton, M.D., Losberger, C., Lecoanet-Henchoz, S., Graber, P., Durandy, A., Gauchat, J.F., Bernard, A., Allet, B. y Bonnefoy, J.Y.** (1995) "Recombinant Soluble Trimeric CD40 Ligand Is Biologically Active". *J. Biol. Chem.* 270, 7025-8.

ES 2 346 956 T3

Morris, A., Remmele, Jr., Klinke, R., Macduff, B.M., Fanslow, W.C. y Armitage, R.J. (1999) "Incorporation of an Isoleucine Zipper Motif Enhances the Biological Activity of Soluble CD40L (CD154)". *The journal of Biological Chemistry*, 474, 418-23.

5 **Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. y von Heijne, G. (1997)** "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites". *Protein Engineering*, 10, 1-6.

Novick, D., Kim, S.H., Fantuzzi, G., Reznikov, L.L., Dinarello, C.A. y Rubinstein, M. (1999) "Interleukin-18 Binding Protein: A Novel Modulator of the Th1 Cytokine Response". *Immunity* 10, 127-136.

10 **Pecceu, F., Dousset, P., Shire, D., Cavois, E., Marchese, E., Ferrara, P., Kaghad, M., Dumont, X. y Lupker, J. (1991)** "Human interleukin 1b fused to the human growth hormone signal peptide is N-glycosylated and secreted by Chinese hamster ovary cells". *Gene*, 97, 253-8.

15 **Sakaguchi, M. (1997)** "Eukaryotic protein secretion". *Current Opinion in Biotechnology*, 8, 595-601.

Selden, R.F., Howie, K.B., Rowe, M.E., Goodman, H.M. y Moore, D.D. (1986) "Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression". *Mol Cell Biol* 6, 3173-9.

20 **Zhao, J., Hyman, L. y Moore, C. (1999)** "Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation and interrelationships with other steps in mRNA synthesis". *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63, 405-445.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método *in vitro* para producir una proteína IL-18BP recombinante en un sistema de mamífero que se **carac-**
teriza porque
- (i) dicha proteína IL-18BP recombinante exhibe homogeneidad de aminoácidos N-terminal; y
- (ii) dicho método comprende la etapa de reemplazar la secuencia endógena de péptido señal del ADN que codifica
10 dicha proteína IL-18BP por la del péptido señal de hormona de crecimiento humana (hGH).
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sistema de mamífero comprende células CHO.
- 15 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que las células CHO son cultivadas en medio suplementado
con suero.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que las células CHO son cultivadas en condiciones libres
de suero.
- 20 5. El uso de un vector de expresión para producir *in vitro* una proteína IL-18BP recombinante en un sistema de
mamífero, que se **caracteriza** porque
- (i) dicha proteína IL-18BP recombinante exhibe homogeneidad de aminoácidos N-terminales; y
- (ii) dicho vector comprende el ADN que codifica dicha proteína IL-18BP fusionada en un marco de lectura apro-
25 piado con el ADN que codifica la secuencia de péptido señal de hGH.
6. El uso de un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5, que permite la expresión constitutiva de la
30 proteína IL-18BP.
7. El uso de un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la expresión del gen que codifica
la proteína IL-18BP está regulada por el promotor de CMV.
- 35 8. El uso de un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la expresión del gen que codifica
la proteína IL-18BP está regulada por la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento humana.
9. Una célula que produce al menos 4 picogramos de IL-18BP/célula/24 horas, en la que dicha célula aloja un
40 vector de expresión que comprende el ADN que codifica dicha proteína IL-18BP fusionada en un marco de lectura
apropiado con el ADN que codifica la secuencia de péptido señal de hGH.
10. Una célula de acuerdo con la reivindicación 9, que produce aproximadamente 12 picogramos de IL-18BP/célula/
45 la/24 horas.
11. Una célula de acuerdo con la reivindicación 9, que produce al menos 11,8 picogramos de IL-18BP/célula/24
horas.
12. Una célula de acuerdo con la reivindicación 9, capaz de crecer en medio libre de suero.
- 50 13. Una célula de acuerdo con la reivindicación 12, que produce aproximadamente 12 picogramos de IL-18BP/célula/
la/24 horas.
14. Una célula de acuerdo con la reivindicación 12, que produce 11,8 picogramos de IL-18BP/célula/24 horas.
- 55 15. Una célula de acuerdo con la reivindicación 12, que produce al menos 11,8 picogramos de IL-18BP/célula/24
horas.

60

65

Figura 1

Exón 1

ATG GCT ACA G
Met Ala Thr G

Intrón 1

GTAAGCGCCC	CTAAAATCCC	TTTGGGCACA	ATGTGTCCTG	AGGGGAGAGG	CAGCGACCTG
TAGATGGGAC	GGGGGCACTA	ACCCTCAGGT	TTGGGGCTTC	TGAATGTGAG	TATCGCCATG
TAAGCCCAGT	ATTTGGCCAA	TCTCAGAAAG	CTCCTGGTCC	CTGGAGGGAT	GGAGAGAGAA
AAACAAACAG	CTCCTGGAGC	AGGGAGAGTG	CTGGCCTCTT	GCTCTCCGGC	TCCCTCTGTT
GCCCTCTGGT	TTCTCCCCAG				

Exón 2

GC TCC CGG ACG TCC CTG CTC CTG GCT TTT GGC CTG CTC TGC
ly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu Cys

Posición de separación del péptido señal

CTG CCC TGG CTT CAA GAG GGC AGT GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA TCC AGG
Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg

Figura 2

Consenso Kozak	ATG	G
	+1	+4
Líder de hormona de crecimiento humana	ATG	G
	+1	+4

ES 2 346 956 T3

	<400> 3	
	atgg	4
5	<210> 4	
	<211> 34	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 4	
15	tataagctta ccatggctac aggctcccgg acgt	34
	<210> 5	
	<211> 34	
20	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 5	
25	tggtctgcga gacagggtg gcactgccct cttg	34
	<210> 6	
30	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 6	
	caagagggca gtccacacc tgtctgcag acca	34
40	<210> 7	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 7	
	acgcgttcga cgccaccatg gctcccggac c	31
50	<210> 8	
	<211> 31	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 8	
60	acgcgttcga cgccaccatg gctcccggac g	31
	<210> 9	
	<211> 29	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 346 956 T3

<400> 9

cgggacctc attaacctg ctgctgtgg

29

5

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

15 Thr Pro Val Ser Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg
1 5 10 15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65