

PETITORIO


Industria y Comercio
 SUPERINTENDENCIA

01 81102 0

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
 Radicación : 01081102 23883339 Folios: 119
 Fecha (AMD): 2001-09-21 16:59:48
 Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
 Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE 2000-3

1 SOLICITUD DE: ☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad			
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: BAYER CORPORATION sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de Indiana, Estados Unidos de América. Dirección: 100 Bayer Road, Pittsburg, Pennsylvania 15205, Estados Unidos de América. Teléfono: 548 09 70 E-mail: clientes@camyp.com Fax: 249 40 70 Domicilio: Pittsburg, Pennsylvania, Estados Unidos de América.	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: _____	
3 REPRESENTANTE O APODERADO (74)	Nombre: Emilio FERRERO Dirección: Carrera 4ª No. 72-35 Teléfono: 347 38 11 E-mail: caveller@caveller.com Fax: 217 92 11 Domicilio: Bogotá, Colombia	IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: <u>438.019</u> TP <u>31.929</u>	
4 INVENTOR(ES) (72)	1- Nombre: Myung-Sam CHO 3259 Ramona Street, Pinole, California 94584, Estados Unidos de América. 2-Helena YEE 154 Vienna Street, San Francisco, California 94112, Estados Unidos de América.	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: _____	
5 TITULO (54) TÉCNICA DE TRANSFECCION INTENSIFICADA			
6 Clasificación Internacional (51) : C12N 015 / 0084			
7 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen US.	(32) Fecha 28 de septiembre de 2000	(31) Número de Solicitud 09/875.847
8 Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los 6 meses ☐ 12 meses ☐ 18 meses ☒ Otro ☐			
9 Comprobante de pago No. 01-55.358 por valor de \$ 357.480.00 Fecha: 3- de sepbre. 2001 Comprobante de pago No. 01-48.094 por valor de \$ 100.000.00 Fecha: 6- de agosto. 2001			

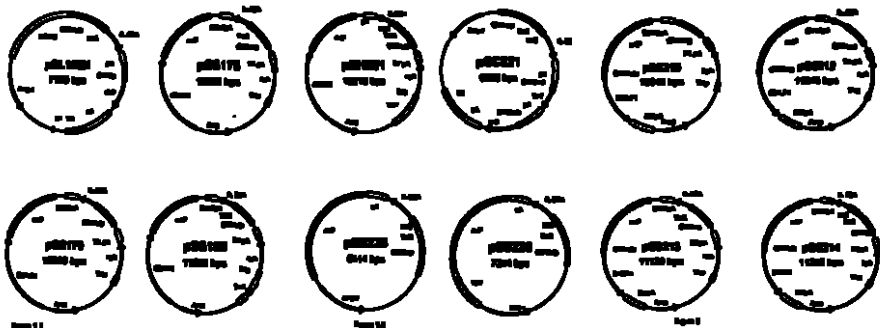
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación
- ☒ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☒ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☒ Copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad *por No. 09/675.8977 su Traducción*
- ☒ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante *+ su traducción*
- ☒ Descripción de la invención
- ☒ Una o más reivindicaciones
- ☒ Dibujos y/o planos necesarios *(7 pág.)*
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☒ Arte final 12 x 12.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA: *Emilio Ferrero*

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

TECNICA DE TRANSFECCION INTENSIFICADA

Campo: Esta invención se refiere en general a una mejora de los sistemas de expresión en células de mamíferos y se relaciona en especial con un sistema vector de expresión génica en células de mamíferos que incluye un sistema de mantenimiento episomal, un fuerte promotor / intensificador, un complejo de transactivación de proteínas y un ADN que codifica para una proteína heteróloga.

Antecedentes: Bien se sabe que diversas células huésped, tales como las células microbianas, células de levadura, células de insectos y células de mamíferos son capaces de producir pequeñas cantidades (cantidades en miligramos) de proteínas específicas en periodos de tiempo relativamente cortos. Se sabe también que las proteínas procedentes de diferentes sistemas de células huésped genéticamente modificadas generan proteínas con diferentes perfiles de glicosilación, dependiendo de la célula empleada. Para aplicaciones farmacéuticas, en algunos casos es conveniente producir proteínas que tengan perfiles de glicosilación similares a los encontrados en los humanos. Esto se logra habitualmente utilizando un sistema celular de mamífero, ya que dichos sistemas producen proteínas con glicosilaciones compatibles con aplicaciones clínicas. La desventaja de emplear células de mamíferos es que típicamente requieren un periodo de tiempo más prolongado para producir una cantidad equivalente de proteína. Por consiguiente, sería muy ventajoso contar con un sistema de expresión en células de mamífero genéticamente modificadas (para expresar proteínas heterólogas) que puedan expresar cantidades mayores de la proteína en periodos de tiempo más breves.

Se sabe que se pueden introducir diversos elementos de mantenimiento episomal en un vector de un sistema de expresión génica, a fin de garantizar la replicación. También se sabe que los sistemas genéticamente modificados pueden incluir potentes sistemas de promotores/intensificadores, y en muchos

casos se debe hacerlo. Además, se sabe que las líneas celulares genéticamente modificadas pueden incluir sistemas de transfección de proteínas para intensificar la expresión de proteínas de un ADN que codifica para una proteína heteróloga que también se incorpora al sistema. En el marco de dichos antecedentes, no tenemos conocimiento alguno de intentos o sugerencias de incorporar los cuatro elementos o sistemas antes mencionados en un sistema de expresión único en células de mamíferos de manera que estén presentes las ventajas combinadas de todos los elementos en un solo sistema efectivo que exprese proteínas heterólogas. Para sorpresa nuestra, cuando se efectuó la mencionada combinación utilizando las técnicas descritas a continuación, encontramos lo que parece ser un efecto sinérgico sobre la expresión de proteínas. A continuación se describen ejemplos representativos de dos proteínas heterólogas (a las que se designa IL-2SA e IL-4SA).

SINTESIS DE LA INVENCION

Nuestro sistema vector de expresión génica en células de mamíferos comprende:

- (a) un sistema de mantenimiento episomal;
- (b) un fuerte promotor / intensificador
- (c) un complejo de transactivación de proteínas y
- (d) ADN que codifica para la proteína heteróloga.

El sistema de mantenimiento episomal y el complejo de transactivación de proteínas pueden incluir subelementos que están situados en los mismos o diferentes plásmidos dentro del sistema de expresión en células de mamíferos. En una técnica preferida, el sistema de mantenimiento episomal está compuesto por un elemento oriP y un gen que expresa EBNA1. Un fuerte promotor/intensificador es CMV y el complejo de transactivación de proteínas preferido incluye tanto a los

elementos TAT como TAR. Una secuencia codificadora de ADN preferida para la proteína heteróloga incluye ADN que codifica para sustancias (a las que se describe más adelante en forma más detallada) conocidas como IL-2SA e IL-4SA. Una línea celular de mamífero preferida procede de un primate, si bien se pueden utilizar otras líneas celulares de mamíferos. Se ha de tener en cuenta, sin embargo, que las líneas celulares preferidas no deben ser de roedores por las razones expuestas más adelante.

Los componentes empleados para demostrar nuestros sistemas son los que se describen a continuación:

1. Se suplementó un vector de expresión basado en pBR322 con el elemento intensificador/ promotor CMV (descrito en la patente de los Estados Unidos No: 5.854.021).

2. Los elementos EBNA1 y oriP, que pueden sostener el mantenimiento del plásmido ADN como estructura episomal (Yates y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3806-3810 y la patente de los Estados Unidos No: 4.686.186) fueron agregados al vector de expresión antes mencionado.

3. Los elementos TAT (gen transactivador) y TAR (secuencia de respuesta transactivadora), que pueden sostener la función transactivadora de la proteína TAT (descrita en la patente de los Estados Unidos No: 5.801.056), designados en este documento como elementos TAT/TAR, fueron agregados al vector de expresión para dar origen a un vector de expresión oriP con los elementos TAT/TAR.

4. Se insertó en el vector BMLF1 (Lieberman y otros, J Virol 60: 140-148, 1986, Kenney y otros, J Virol 63: 3870-3877, 1989 y Ruvolo y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8852-8857) originado a partir del virus de Epstein-Barr.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Las Figuras 1-1 y 1-2 ilustran mapas físicos de los vectores de expresión de la muteína de Interleuquina-2 (designada IL-2SA) necesarios para el estudio de transfección de la optimización de los vectores de expresión, que incluyó a los elementos oriP y TAT/TAR.

La Figura 2 ilustra mapas físicos de los vectores de expresión para el estudio de transfección del efecto de transactivación de BMLF.

La Figura 3 es un gráfico que ilustra la intensificación de la secreción de IL-2SA en ensayos de transfección transitoria utilizados para identificar y comparar el efecto de oriP, el efecto de transactivación de TAT/TAR y los efectos de transactivación de TAT/TAR más oriP. Nótese que adoptamos el pSS179 linealizado como línea de base del nivel de expresión de IL-2SA puesto que se debe abolir la función de oriP tras la linealización mediante el uso de una enzima de restricción y lo mismo ocurre con el pSS185 linealizado.

La Figura 4 ilustra los efectos de la transactivación de BMLF1 sobre la secreción de IL-2SA de células CHO en un tiempo de cultivo prolongado. A 3 dpt, se trató a las células con tripsina y se las sembró con el mismo número de células en un pocillo con medio fresco suplementado con SFB al 5 %. Los niveles de secreción de IL-2SA originados en células DHO transfectadas con pSS179 se mantuvieron igualmente de 4-7 dpt con los de 3 dpt. Sin embargo, los niveles de expresión de las células CHO transfectadas con pSS212, 213 y 214 al cabo de 4 dpt no exhibieron efecto intensificado sobre la actividad de transfección de BMLF1 que se puso de manifiesto a los 3 dpt.

La Figura 5 ilustra los efectos de transactivación de BMLF1 sobre la secreción de IL-2SA de células HKB11 en un tiempo de cultivo prolongado bajo la selección de fármacos. Los efectos de transactivación de BMLF1 vistos a los 3 dpt, de células HKB11 transfectadas con pSS212, 213 y 214 fueron anulados

después de agregar HygB, si bien el efecto de TAT/TAR se mantuvo bajo la selección de fármacos como se ilustra en la Figura 6.

La Figura 6 ilustra los efectos de transactivación de TAT/TAR sobre la secreción de IL-2SA de células HKB11 bajo la selección de higromicina B. Las células transfectadas se mantuvieron de acuerdo con lo descrito en el texto.

La Figura 7 ilustra mapas físicos de los vectores de expresión utilizados para el estudio de cotransfección para la expresión de alto rendimiento.

REALIZACIONES ESPECÍFICAS

Materiales y Métodos

Células

Células de riñón embrionario humano (293) (ATCC CRL-1573)

293EBNA (células 293 que expresan EBNA 1) obtenidas de Invitrogen (Carlsbad, CA).

Células CHO (Ovario de Hamster de China) dihidrofolato reductasa (dhfr)-negativas, que fueron obtenidas de Genentech Inc.

HKB11 (ATCC, CRL-12568) es una línea celular híbrida somática humana (Solicitud de patente de los Estados Unidos No: No. 09/209.920) derivada de fusiones celulares de células de riñón embrionario humano (293S) y células de origen de linfoma de Burkitt (P3HR-1).

Construcción de Plásmidos

La IL-2SA es una mutéina de IL-2 que tiene una sola sustitución de aminoácidos (N88R), de acuerdo con lo descrito en WO 99/60128. A continuación se presenta una breve descripción de los vectores de expresión individuales de las Figuras 1-1 y 1-2.

pSL160N: se insertó una secuencia codificadora de IL-2SA en el sitio PvuII de pSM97 y se lo modificó además mediante la adición del elemento HSAG1 (fragmento EcoRI y XbaI; 1447 pb) descrito por McArthur y Stanners (J Biol Chem 266: 6000-6005, 1991) en el sitio SpeI de pSM97 y EBV-TR (Cho y otros, solicitud de patente de los Estados Unidos No: 98/209.915) en el sitio NaeI de pSM97.

pSS179: se insertó una secuencia codificadora de IL-2SA en el sitio BamHI/XhoI de pCEP4.

pSS178: el elemento TAR (82 pb) está situado en línea de entrada de pSS179 con respecto a IL-2SA.

pSS185: Se insertó un elemento funcional TAT descrito en la construcción del plásmido en el sitio NruI (sitio en línea de entrada del promotor TK) de pSS178.

pSH201: Una secuencia intrónica, MIS (~270 pb) estaba ubicada en el extremo 3' de la secuencia TAR (NotI/HindIII) de pSS185.

pSC221: Se omitió el elemento HSAG de pSL160N y el elemento TAR estaba situado en el extremo 3' de CMVe/p y en el extremo 5' de MIS.

pSS225: Se escindió EBNA1 y TAT funcional, así como los segmentos de alta expresión de hph de pSH201.

pSS226: Se insertó un elemento de expresión de TAT funcional en el extremo 5' del gen amp-r de pSS225.

La descripción del vector de expresión individual de la Figura 2 es la siguiente:

pSS210: el plásmido oriP que expresa BMLF1 y bph fue descrito en la sección de construcción de plásmidos.

pSS212: la secuencia codificadora de IL-2SA estaba situada en el extremo 3' de CMVc/p con respecto a pSS210.

pSS213: Un elemento TAR está situado en el extremo 3' de IL-2SA con respecto a pSS212.

pSS214: Se agrega además una secuencia intrónica, MIS, en el extremo 5' de IL-2SA con respecto a pSS213.

A continuación se presenta una breve descripción de la estructura de los plásmidos individuales de la Figura 7:

pSS223: Este plásmido es básicamente igual a pSS225, aunque carece de la secuencia codificadora de IL-2SA.

pSC186: Había una secuencia codificadora de TAT situada en el extremo 3' de CMVe/p con respecto a pCEP4 y se suprimió el segmento funcional de expresión de hph.

pSS240: se insertó la secuencia codificadora de IL-2SA en el sitio PvuII de pSS223.

pSS241: Se insertó la secuencia codificadora de IL-4 en el sitio PvuII de pSS223.

El vector de expresión en células de mamífero a base de pBR322 con expresión de un gen funcional dhfr (pSM97; Cho y otros, patente de los Estados Unidos No: 5.854.021). El vector pCEP4, que consistía en oriP, EBNA1 y la expresión del gen funcional hph basado en pBR322 fueron obtenidos de Invitrogen (Carlsbad, CA).

Se prepararon ochenta y dos pares de bases del elemento TAR por PCR utilizando pBennCAT (Gendelman H.E. y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 9759-9763, 1986) como patrón. Se prepararon dos cebadores agregando el sitio KpnI en el extremo 5' de TAR y el sitio HindIII en el extremo 3' de TAR. El producto de PCR así obtenido fue digerido con HindIII y KpnI e insertado en pCEP4 después de la digestión de pCEP4 con KpnI y HindIII. El segmento de expresión del gen funcional TAT fue preparado a partir de pSVTAT (Peterlin B.M y

otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 0734-9738, 1986) digiriéndolo con BamHI (modificado con el fragmento Klenow) y HpaI.

Este fragmento fue insertado en pSV₂neo después de la digestión con PvuII y HpaI. Este segmento de expresión funcional de TAT puede ser fácilmente escindido mediante la digestión con PvuII y BamHI para insertarlo en cualquier otro vector de expresión, como se ilustra en la Figura 1 (pSS185 y pSC221). La secuencia codificadora de BMLF1 y el área de señal de poliA fueron preparados a partir de B95-8 EBV que abarcaba la secuencia de ADN desde 84301 (NheI) a 82180 (HindIII) de los datos de secuencia de B95/8 EBV (P.J. Farrell, "Epstein-Barr Virus Genome" en Advanced Viral Oncology; editado por G. Klein; Ravens Press, Ltd., Nueva York 1989, pág. 103-132) e insertados en el sitio PvuII de pCEP4, un vector con CMV/e/p. Esta expresión de BMLF1 está ahora bajo el control de CMVe/p.

Se eliminó de este vector el segmento de expresión funcional de BMLF1 mediante digestión con SpeI y NheI y se construyó un nuevo vector de expresión. Este plásmido obtenido, pSS210, se encuentra en la Figura 2. Se utilizó a muteína de Interleuquina-2 (N88R) conocida como IL-2SA (solicitud de patente Acta No. WO9960128, IL-2 Selective Agonists and Antagonists) como gen reportero.

Transfección

Se ejecutaron transfecciones estacionarias utilizando las células en cultivo de modo dependiente del anclaje. Se sembraron células HKB11 en crecimiento logarítmico ($1,5 \times 10^6$ células) en 4 ml de medio fresco con SFB al 5 % o sin suero, en un pocillo de una placa de cultivo de tejidos con formato de 6 pocillos (Corning Inc., Corning, NY) y se lo dejó adherir al fondo de la placa por espacio de dos o más horas en un incubador humedecido con CO₂ a 37°C. Se preparó un cocktail (1 ml) que consistía en 5 µg de ADN y 20 µl de reactivo DMRIE-C (Life

Technologies, Rockville, MD) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se lo agregó al pocillo y se mezcló suavemente. Las placas fueron incubadas en el incubador con CO₂.

Se llevaron a cabo transfecciones con agitación utilizando las células adaptadas a las condiciones de suspensión sin suero. Se mezclaron células HKB11 en crecimiento logarítmico (5×10^6 células) en 4 ml de medio fresco con un ml del complejo ADN/DMRIE-C al igual que en la transfección estacionaria anterior. Estos 5 ml de células transfectadas en un formato de 6 pocillos fueron incubados en un agitador (90-100 rpm) en un incubador con CO₂ humedecido. Las células transfectadas fueron subcultivadas a 3 y 7 días después de la transfección (dpt) dividiéndolas 1:4 o bien 1:5. El volumen de cultivo total fue incrementado desde el volumen de transfección inicial a 20 veces a los 10 dpt. Se analizó el sobrenadante del cultivo tisular mediante un ELISA para determinar los niveles de secreción de proteínas.

ELISA

Para la detección de IL-2SA, se revistieron placas de fondo redondo Dynatech Immulo-2 con 1 µg/ml de IL-2 antihumana purificada (PharMingen, San Diego, CA) de rata utilizando buffer de NaHCO₃ 0,1 M (pH 8,2), incubado a 37°C por espacio de 3 horas en una cámara humedecida, se las lavó con PBS/Tween 20 al 0,05 % (Sigma P-1379, St. Louis, MO) y se las bloqueó con PBS/BSA al 1 % durante una hora a temperatura ambiente. Los sobrenadantes del cultivo, que contenían IL-2SA y un patrón de IL-2SA purificada (como curva standard) fueron diluidos en serie con PBS/ BSA al 1 % (50 µl/pocillo) e incubados a temperatura ambiente por espacio de dos horas. Se detectó la IL-2SA capturado utilizando IL-2 biotinilada de ratón (62,5 ng/ml; PharMingen, San Diego, CA) seguida por incubación con HRP-estreptavidina (125 ng/ml; Zymed Laboratories Inc. #43-

4323, San Francisco Sur, CA). Entre todas las incubaciones (una incubación de una hora cada una a temperatura ambiente), las placas fueron lavadas con PBS/Tween 20. Las placas fueron reveladas utilizando soluciones sustrato de tetrametilbencidina (TMB; Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. Producto # 50-65-00 y 50-76-01, Gaithersburg, MD) y la reacción fue detenida con HCl 1 N. Se midió la densidad óptica (DO) a 450 nm/570 nm utilizando un lector cinético de microplacas Vmax de Molecular Devices (S/N 04514, Sunnyvale, CA) y el programa Softmax provisto por Molecular Devices. La concentración de IL-2SA en el sobrenadante de cultivo tisular se determinó comparando con la DO de una curva standard de IL-2SA purificada.

Para medir la secreción de interleuquina-4 humana (IL-4), el ensayo fue similar, excepto que se utilizó el anticuerpo de IL-4 antihumana de ratón (PharMingen, Cat. #18651D, San Diego, CA) para revestir la placa, y se utilizó el anticuerpo de IL-4 biotinilada antirrata (PharMingen, Cat #18502D, San Diego, CA) como anticuerpo de detección. Se utilizó la molécula de IL-4 purificada como patrón.

EJEMPLO 1

Expresión de proteínas en ensayos de transfección transitoria utilizando los vectores de expresión TAT/TAR-oriP

Los vectores de expresión en células de mamíferos equipados con CMV3/p en el plásmido pBR322 exhibieron un nivel de expresión relativamente elevado y secreción de entre 1 – 20 µg/ml de proteína heteróloga. Sin embargo, algunas proteínas habían sido muy difíciles de expresar, por ejemplo IL-2SA. Por lo tanto, construimos diversos vectores de expresión equipados con diferentes elementos intensificadores, fundamentalmente proteínas transactivadoras y el elemento oriP para mantener el plásmido transferido como episoma. Cualquiera de estos

elementos por sí solo exhibió un pequeño nivel de aumento (3-5 veces) en ensayos de transfección transitoria. Construimos dos vectores de expresión, uno con IL-2SA en el vector pCEP4 (pSS179) y otro con la adición de elementos transactivadores TAT/TAR a pSS179 (pSS185). Ambos plásmidos ADN que expresan IL-2SA (pSS179 y pSS185) fueron digeridos con enzimas de restricción y se transfectó la misma cantidad de ADN (5 µg de cada uno) de ambos plásmidos sin cortar. Se utilizó una pequeña cantidad de ambos ADN digeridos con enzimas de restricción para confirmar la cantidad de ADN precipitado para garantizar las mismas cantidades y calidad (para ver el 100 % de conversión a la forma lineal) en cada transfección. Las transfecciones fueron ejecutadas utilizando el método de transfección estacionario con medio suplementado con SFB al 5 %. Se analizaron los niveles de expresión de cada plásmido bajo la presunción de que la forma lineal del plásmido anula la función de oriP, puesto que el ADN lineal no puede ser replicado en estas condiciones. Si bien oriP y TAT/TAR tienen un efecto intensificador, cuando se los evalúa individualmente bajo la regulación de un promotor CMV, el aumento es considerablemente bajo (3-5 veces) en los ensayos de transfección transitoria.

Como se ilustra en la figura 3, los efectos del elemento oriP (pSS179 sin cortar) y la transactivación con TAT/TAR (pSS185 cortado) sobre la secreción de IL-2SA fueron 2,7 y 6 veces más altos, respectivamente, que el de la forma lineal de pSS179 a los 3 dpt. Los aumentos multiplicadores a los 5 dpt fueron de 5,6 y 10, respectivamente. Sin embargo, el pSS185 sin cortar (transactivación con TAT/TAR intacto y función de oriP) exhibió niveles asombrosamente más elevados (26 veces a los 3 dpt y 34 veces a los 5 dpt) de secreción de IL-2SA que los de pSS179 sin cortar.

Analizamos también otras construcciones de vectores que consistían en el mismo elemento funcional. Se utilizaron vectores que expresan IL-2SA pSC221

(TAT/TAR-dhfr), pSH201 (TAT/TAR-oriP con EBNA1) y pSS226(TAT/TAR-oriP sin EBNA1) para transfectar células HKB11 y 293EBNA a fin de comparar las dos células huésped y comparar los vectores episomales de TAT/TAR y TAT/TAR-oriP. Referirse a la Figura 1 para ver mapas físicos de los vectores de expresión. Como se ilustra en la Tabla 1, el efecto de TAT/TAR-oriP (pSH201) sobre TAT/TAR (pSC221) fue ~ 9 veces mayor en las células HKB11 y ~ 4 veces más elevado en las células 293EBNA a los 3 dpt. Estos efectos fueron similares a los observados (4,4 veces) utilizando pSS185 episomal y lineal (Figura 3). Las células 293EBNA exhibieron niveles de secreción de IL-2SA ligeramente inferiores a los de las células HKB11; sin embargo, resultó evidente que se puede utilizar el vector TAT/TAR-oriP en otras células aparte de las HKB11, en este caso células 293EBNA, para la producción máxima de proteínas. Observamos que el vector TAT/TAR-oriP equipado con el gen EBNA1 era ligeramente mejor que sin el gen EBNA1. Parece que las células HKB11 y 293EBNA pueden no tener suficientes proteínas EBNA1 para mantener el vector episomal.

También analizamos otras construcciones vector que consisten en el mismo elemento funcional. Se utilizaron los vectores de expresión de IL-2SA pSC221 (TAT/TAR.dhfr), pSH201 (TAT/TAR-oriP con EBNA1) y pSS226 (TAT/TAR-oriP sin EBNA1) para transfectar células HKB11 y 293EBNA a fin de comparar dos células huésped y comparar los vectores episomales de TAT/TAR y TAT/TAR-oriP. Referirse a la Figura 1 para ver mapas físicos de los vectores de expresión. Como se ilustra en la Tabla 1, el efecto de TAT/TAR-oriP (pSH201) sobre TAT/TAR (pSC221) fue ~9 veces más elevado en las células HKB11 y ~ 4 veces mayor en las células 293EBNA. Estos efectos fueron similares (~ 5 veces) al que observamos utilizando pSS185 episomal y lineal (Figura 2). Las células 293EBNA exhibieron niveles de secreción de IL-2SA ligeramente inferiores a los de las células HKB11, sin embargo, fue evidente que también se observaba el

efecto sinérgico de TAT/TAR-oriP en las células 293EBNA aparte de las células HKB11, para la producción máxima de la proteína. Observamos que el vector TAT/TAR-oriP equipado con el gen EBNA1 era algo mejor que sin el gen EBNA1. Parece que las células HKB11 y 293EBNA pueden no tener suficiente proteína EBNA1 para mantener el vector episomal.

Tabla 1. Comparación de las células HKB11 y 293EBNA transfectadas con los vectores TAT/TAR y TAT/TAR-oriP para la secreción de IL-2SA en medio sin suero a los 3 dpt.

Vector de Expresión	HKB11		293EBNA	
pSC221	0,5	1	0,62	1
pSH201	4,45	8,9	2,55	4,11
pSS226	2,98	5,9	2,27	3,6

Nota: Se calculó el aumento de IL-SA por medio de TAT/TAR y TAT/TAR-oriP presumiendo una producción de IL-2SA a partir de pSC221 de 1.

EJEMPLO 2

Expresión de Proteína en Ensayos de transfección transitoria utilizando los vectores de expresión BMLF1-oriP

En un principio se conoció a BMLF1 como un transactivador promiscuo (Lieberman y otros, J Virol 60: 140-148, 1986). Desde entonces, se ha encontrado que esta proteína era un transactivador posterior a la transcripción (Kenney y otros, J. Virol, 63: 3870-3877, 1989) y muy recientemente se lo describió como transactivador para la expresión génica sin intrones y como inhibidor de la expresión génica vinculada con los intrones (Ruvolo y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8852-8857). Analizamos la proteína BMLF1 en cuanto a la función de

transactivación de la expresión génica en mamíferos (IL-2SA). La secuencia codificadora de IL-2SA sin 5'-IS insertado en línea de salida de CMVe/p con respecto a pSS210 es pSS212. La secuencia codificadora de IL-2SA fue modificada agregando la secuencia TAR en el extremo 5' de IL-2SA (pSS213) y fue modificada también agregando una secuencia intrónica (MIS) en el extremo 5 de IL-2SA con respecto a pSS13, dando origen al vector pSS214. Ver la Figura 2 para encontrar mapas físicos del vector de expresión individual. Los ensayos de transfección transitoria estacionaria indicaron que la proteína bMLF1 intensificaba la expresión de IL-2SA independientemente de los intrones en 3-4 veces en las células HKB11 (Tabla 2) y en 10-20 veces en las células CHO (Tabla 3) utilizando medio con contenido de suero.

Tabla 2. Comparación de la producción de IL-2SA (3 dpt) a partir de células HKB11 transfectadas con diversos vectores de expresión de IL-2SA en medio con contenido de suero.

Vectores de expresión	Títulos de IL-2SA (µg/ml)			Veces de aumento (promedio)
	Exp. 1	Exp. II	Exp. III	
pSS179	0,84	1,24	0,27	1
pSS212	3	4,4	1,23	4
pSS213	2,76	4,16	0,81	3,2
pSS214	2,48	3,1	1,1	3,2

Nota: Se calculó la multiplicación de la producción de IL-2SA por BMLF1 a partir del promedio de tres experimentos tomando la producción de IL-2SA a partir de pSS179 como 1.

De acuerdo con lo descrito en la Figura 3, pSS212, pSS213 y pSS214 tienen segmentos de expresión de IL-2SA incorporados en el extremo 5' de la molécula sin intrones, sin intrones con TAR y TAR-MIS, respectivamente.

Tabla 3. Comparación de la producción de IL-2SA (3 dpt) a partir de células CHO transfectadas con diversos vectores de expresión de IL-2SA en medio con contenido de suero.

Vectores de expresión	Títulos de IL-2SA (µg/ml)			Veces de aumento (promedio)
	Exp. I	Exp. II	Exp. III	
pSS179	0,062	0,058	0,042	1
pSS212	0,275	0,77	0,7	11,2
pSS213	0,23	0,88	1,33	16,6
pSS214	0,225	1,46	1,52	21,5

Nota: El aumento multiplicador y los vectores de expresión han sido descriptos para la Tabla 2.

EJEMPLO 3

Producción de la proteína en ensayos prolongados de transfección transitoria

Para preparar grandes cantidades de proteínas, analizamos estas proteínas transactivadoras en el plásmido oriP en un tiempo de cultivo prolongado posterior a la transfección hasta 10 días. En este experimento, utilizamos un vector de expresión básico de IL-2SA (pSL160N) un vector de expresión de IL-2SA suplementado con elementos transactivadores TAT/TAR (pSC221), un vector de expresión de IL-2SA con el elemento oriP solo (pSS225) y el elemento de expresión de IL-2SA tanto con los elementos transactivadores TAT/TAR como oriP (pSS185). Referirse a la Figura 1 para ver mapas físicos de la estructura de

los plásmidos. Se adaptaron células HKB11 adaptadas a la condición de suspensión sin suero según el método de transfección con agitación de acuerdo con lo descrito anteriormente. Las células transfectadas fueron subcultivadas utilizando medio libre de suero dividiendo 4-5 veces dos veces a los 3 dpt y 7 dpt durante un periodo de 10 días después de la transfección. El volumen total del cultivo transfectado fue incrementado en 20-25 veces.

Observamos que el efecto de oriP y los efectos de transactivación de TAT/TAR (Tabla 4) fueron ligeramente diferentes de los datos expuestos en la Figura 3, lo que se podría explicar por los diferentes estados plasmídicos de la forma lineal del ADN plásmido oriP (por ejemplo, pSS170 y pSS185 linealizados) y la estructura plasmídica sin el elemento oriP (por ejemplo, pSL160N y pSS221). Por ejemplo, se presumió que un vector de expresión de pSS179 lineal basal exhibía el mismo resultado con pSL160N y se presumió que pSS185 lineal era igual a pSC221 a causa de la función interrumpida de oriP al linealizar la estructura plasmídica. Sin embargo, el efecto combinado de TAT/TAR y la función oriP fue similar. Durante este tiempo de cultivo prolongado, como se ilustra en la Tabla 4, el aumento visto en la expresión de la proteína (títulos de IL-2SA) se mantuvo sin disminuir drásticamente los niveles de expresión. El rendimiento total de producción de IL-2SA a partir de pSS185 (vector de expresión de IL-2SA con los elementos TAT/TAR y oriP) en el tiempo de transfección transitoria prolongada (10 días) exhibió un rendimiento sumamente elevado de la proteína (460,8 µg) a partir de 5 µg de ADN transfectado con un número de células iniciales de 5×10^6 , en tanto que el vector de expresión no optimizado (pSL160N) en un cultivo de 3 días utilizando las mismas cantidades de ADN y células puede dar origen a sólo 28,8 µg de la proteína a los 10 dpt y 1,4 µg de la proteína a los 3 dpt utilizando un vector de expresión standard.

Se demostró que este sistema se podría aumentar fácilmente a escala para utilizar en la producción eficiente de proteínas, por ejemplo cuando se transfectaron 50×10^6 células HKB11 (50 ml de cultivo) con 50 μg de pSS185, pudimos obtener aproximadamente 5 mg de proteína a los 10 días después de la transfección con un volumen final de cultivo de 1 litro. Según nuestra experiencia, encontramos que este efecto es proporcional y que la producción de proteína a partir de 500 μg de ADN utilizando un frasco agitador fue aproximadamente 100 veces mayor que la encontrada en una transfección standard utilizando 5 μg de ADN en formato de 6 pocillos. Este resultado de la transfección a escala más grande indica que podemos ahorrar en el costo de la preparación del ADN y los reactivos de transfección utilizando esta técnica de transfección aumentada en escala en comparación con la técnica de transfección standard que utiliza 20-25 veces más materiales de partida (ADN, reactivo de transfección y células).

Como se ilustra en la Figura 4 y 5, no se pudo utilizar el transactivador BMLF1 en una técnica de transfección prolongada, puesto que los títulos de IL-2SA y el número de células se redujeron drásticamente al cabo de 3 dpt. La proteína BMLF1 podría ser tóxica, en última instancia, para las células que expresan BMLF1 en el modo de transfección transitoria prolongada.

Tabla 4. Comparación de la producción de IL-2SA en una técnica de transfección transitoria aumentada a escala utilizando diversos vectores de expresión en condiciones sin suero.

Vectores de expresión	Título (µg/ml)			Rendimientos totales (µg)		
	3 dpt	7 dpt	10 dpt	3 dpt	7 dpt	10 dpt
pSL160N	0,28	0,36	0,36	1,4	7,2	28,8
pSS221	0,64	0,68	0,74	3,2	13,6	58,2
pSS225	1,22	1,42	1,31	6,1	28,4	104,8
pSS185	5,08	7,29	5,76	25	145,8	460,8

Nota: Los rendimientos totales indican una multiplicación de los títulos de IL-2SA (µg/ml) en volumen (ml).

- pSL160N: Secuencia codificadora de IL-2SA en un vector dhfr
- pSS221: Secuencia codificadora de IL-2SA en un vector TAT/TAR
- pSS225: Secuencia codificadora de IL-2SA en un vector oriP
- pSS185: Secuencia codificadora de IL-2SA en un vector TAT/TAR-oriP.

Las células fueron divididas 1:4 a los 3 dpt y 1:5 a 7 dpt.

EJEMPLO 4

Expresión de proteínas bajo la selección de fármacos

Se analizó la expresión de IL-2SA de los vectores oriP, pSS178 y pSS179 (referirse a Figura 1 para ver los mapas de los plásmidos), y se la comparó con la expresión de IL-2SA de un vector TAT/TAR-oriP, pSS185, bajo la selección de fármacos para obtener células resistentes a los fármacos para la producción de proteínas a mayor escala durante períodos de tiempo aun más prolongados. Se transfectaron células HKB11 que se desarrollaban en un frasco agitador en condición sin suero con los tres vectores de expresión empleando un formato de 6 pocillos. Tres días después de la transfección, las células transfectadas fueron inoculadas en un frasco agitador, a razón de 2 x 10⁶ células en 20 ml de medio suplementado con suero (5 %) con 100 µg/ml de higromicina B (HygB). Las

células fueron subcultivadas dos veces por semana empleando estos mismos medios de selección. Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en el mismo volumen de medio fresco en las primeras tres pasadas. Después de esta fase de selección inicial, el cultivo celular fue subcultivado manteniendo una densidad celular de 5×10^5 células/ml. Se midieron los títulos de producción de IL-2SA de cada pasada por medio de un ELISA. Cuatro semanas después de la producción, la productividad de IL-2SA de pSS185 se mantenía con un título superior a los de pSS178 y pSS179 en más de 10 veces (Figura 6). Estos resultados indican que los elementos de transactivación TAT/TAR con los elementos oriP, juntos (pSS185), bajo el modo de selección de fármacos exhiben una productividad mucho mayor en comparación con la productividad de IL-2SA de los vectores oriP, pSS178 y pSS179.

EJEMPLO 5

Sistema TAT/TAR para la transfección de alto rendimiento

Si bien el vector de expresión TAT/TAR-oriP exhibió una expresión asombrosamente elevada de la proteína, el tamaño del vector es excesivo para utilizar en clonación de alto rendimiento. Por lo tanto, separamos el vector de expresión par formar dos grupos funcionales. El principal vector de clonación (4,0 kb) consiste en CMVe/p, TAR, MIS, el sitio de clonación (PvuII) y la señal de poliA en un vector oriP, pSS223. El vector oriP de expresión de TAT (8,7 kb), el plásmido pSC186, fue un plásmido cotransfectado. En ensayos de transfección transitoria para el screening de alto rendimiento, podemos transfectar 5 μ g de pSS223 con el gen de interés y 1 μ g del plásmido oriP pSS186 para expresión de TAT. Como se ilustra en la Figura 8, insertamos las secuencias codificadoras de IL-2SA e IL-4 en el sitio de clonación PvuII de pSS223. Los plásmidos resultantes son pSS240 y pSS241, respectivamente. Se cotransfectaron células HKB11 con 5

µg de pSS240 y pSS241 y 1 µg de pSC186 en un modo de transfección con agitación en condiciones libres de suero. Observamos un resultado similar de un aumento de 3-5 veces en los ensayos de cotransfección (Tabla 5) como en el vector TAT/TAR-oriP (pSS185) con respecto al vector oriP (pSS225 (Tabla 4). Este resultado indica que el método de cotransfección de los dos plásmidos funcionalmente separados es equivalente a la transfección de un solo vector de expresión que consiste en los elementos TAT/TAR y oriP.

Tabla 5. Comparación de la producción de proteína (µg/ml) del vector TAR-oriP con la de la cotransfección con el vector TAT-oriP

	Transfección simple	Cotransfección con pSC186	Veces de aumento
IL-2SA (3 dpt)	4,28	14,2	3,3
IL-2SA (6 dpt)	3,07	15,9	5,1
IL-4 (3 dpt)	13,4	41,6	3,1
IL-4 (6 dpt)	11,6	37,2	3,2

Nota: Se calculó el aumento multiplicador a partir de los valores de cotransfección sobre los valores de la transfección simple.

COMENTARIOS

Las proteínas heterólogas expresadas por células de mamíferos tienen habitualmente cualidades mejores o más convenientes para caracterizar las proteínas que las proteínas expresadas a partir de células no de mamíferos y, por consiguiente, son preferibles las células de mamíferos. Sin embargo, la cantidad de proteína preparada por células de mamíferos es habitualmente menor que en otros sistemas. Para compensar los mencionados problemas, optimizamos un

método de transfección transitoria para dar lugar a la producción de proteínas "en vía rápida". Nuestros resultados se basan en numerosos factores, a saber:

1. Una célula huésped HKB11 optimizada que ha sido adaptada a una condición de suspensión sin suero.

2. Métodos de transfección con agitación utilizando medio libre de suero. En este método pudimos utilizar una densidad celular inicial mayor en condiciones de cultivo óptimas, que posteriormente puede producir más proteína. En las transfecciones estacionarias, no se pudo utilizar más de $1,5 \times 10^6$ células por pocillo a causa de la condición de cultivo no óptima de las células que se desarrollaron en forma de monocapa. Utilizando células en monocapa (por ejemplo, células CHO) para la transfección, las condiciones de agitación del cultivo transfectado dieron lugar a una mayor secreción de proteína (2-3 veces) con respecto a las condiciones sin agitación, por razones que permanecen sin dilucidar.

3. Vectores de expresión optimizados mediante el uso del elemento oriP, que puede mantener a los plásmidos transferidos como episomas, así como elementos de transactivación, que pueden intensificar la expresión de proteínas, respectivamente.

4. La parte más crítica y el resultado inesperado de esta técnica de transfección mejorada fueron la combinación del elemento oriP y los elementos de transactivación TAT/TAR para la expresión proteica y dicha combinación en un solo sistema vector o de transfección no había sido propuesto en la técnica anterior.

No se llevó a cabo intensamente el experimento utilizando células CHO después de obtener datos ineficaces en el sistema de transactivación TAT/TAR-oriP y se basó en la siguiente información publicada. Un plásmido oriP no se replica con eficiencia (Yates y otros, Nature 313: 812-815, 1985 y Mizuguchi y

otros, FEBS lett 472: 173-178, 2000) en células de roedor y las células CHO carecen de factores celulares para el sistema de transactivación TAT/TAR (Alonso y otros, J Virol 66: 4617-4621, 1992 y Wimmer y otros, Virology 255: 182-189, 1999).

Dada la descripción que antecede, los expertos en la técnica podrán idear variaciones de lo expuesto. En consecuencia, se pretende que los ejemplos consignados sean considerados ilustrativos y el alcance de las invenciones descritas en este documento sólo debe estar limitado por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema vector de expresión génica en células de mamíferos que incluye una pluralidad de plásmidos y comprende:
 - (a) un sistema de mantenimiento episomal;
 - (b) un fuerte promotor/intensificador
 - (c) un complejo de transactivación de proteínas y
 - (d) ADN que codifica para la proteína heteróloga.
2. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el sistema de mantenimiento episomal comprende un elemento oriP y un gen que expresa EBNA1.
3. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el elemento oriP y el gen que expresa EBNA1 están en el mismo plásmido.
4. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual el elemento oriP y el gen que expresa EBNA1 están en plásmidos separados.
5. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual el elemento oriP está en un plásmido y la proteína EBNA1 en las células huésped.
6. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual el fuerte promotor/intensificador es CMV.
7. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual el complejo de transactivación de proteínas incluye tanto al elemento TAT como TAR.
8. El sistema de acuerdo con la reivindicación 7 en el cual los elementos TAT y TAR se encuentran en el mismo plásmido.
9. El sistema de acuerdo con la reivindicación 7 en el cual los elementos TAT y TAR se encuentran en plásmidos separados.
10. El sistema de acuerdo con la reivindicación 7 en el cual el elemento TAR está en un plásmido y el elemento TAT se encuentra en las células de expresión.

11. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual el complejo de transactivación de proteínas incluye a la proteína BMLF1.

12. El sistema de acuerdo con la reivindicación 11, en el cual el gen BMLF1 está en el mismo plásmido.

13. El sistema de acuerdo con la reivindicación 11, en el cual el gen BMLF1 está en un plásmido aparte.

14. El sistema de acuerdo con la reivindicación 11, en el cual la proteína BMLF1 es expresada en las células.

15. El sistema vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la proteína heteróloga es seleccionada entre el grupo que consiste en IL-2SA e IL-4R.

16. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la línea celular de mamífero es de un primate.

17. Una línea celular de mamífero que comprende el sistema vector de expresión génica en mamíferos de acuerdo con la reivindicación 1.

18. La línea celular de mamífero de acuerdo con la reivindicación 17 en la cual la línea celular es HKB11.

19. La línea celular de mamífero de acuerdo con la reivindicación 17 en la cual la línea celular es 293EBNA.

20. La línea celular de mamífero de acuerdo con la reivindicación 17 en la cual la línea celular es una línea celular 293.

21. Un método para expresar una proteína heteróloga empleando una línea celular de acuerdo con la reivindicación 1.

RESUMEN

Un sistema vector de expresión génica en células de mamíferos que incluye una pluralidad de plásmidos y comprende: (a) un sistema de mantenimiento episomal; (b) un fuerte promotor/intensificador; (c) un complejo de transactivación de proteínas y (d) ADN que codifica para la proteína heteróloga. Los complejos de mantenimiento episomal y de transactivación de proteínas pueden incluir subelementos situados en el mismo o en diferentes plásmidos dentro del sistema de expresión celular.

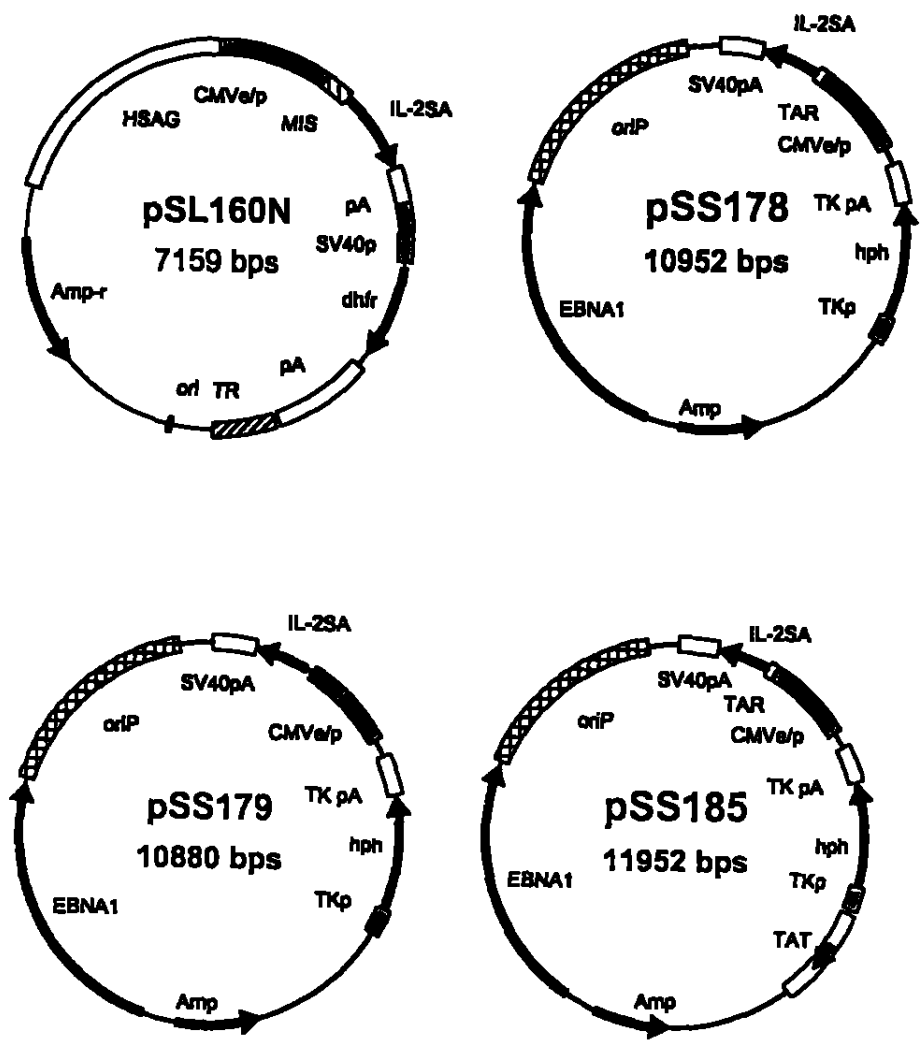


Figure 1-1



Figure1-2



Figure 2

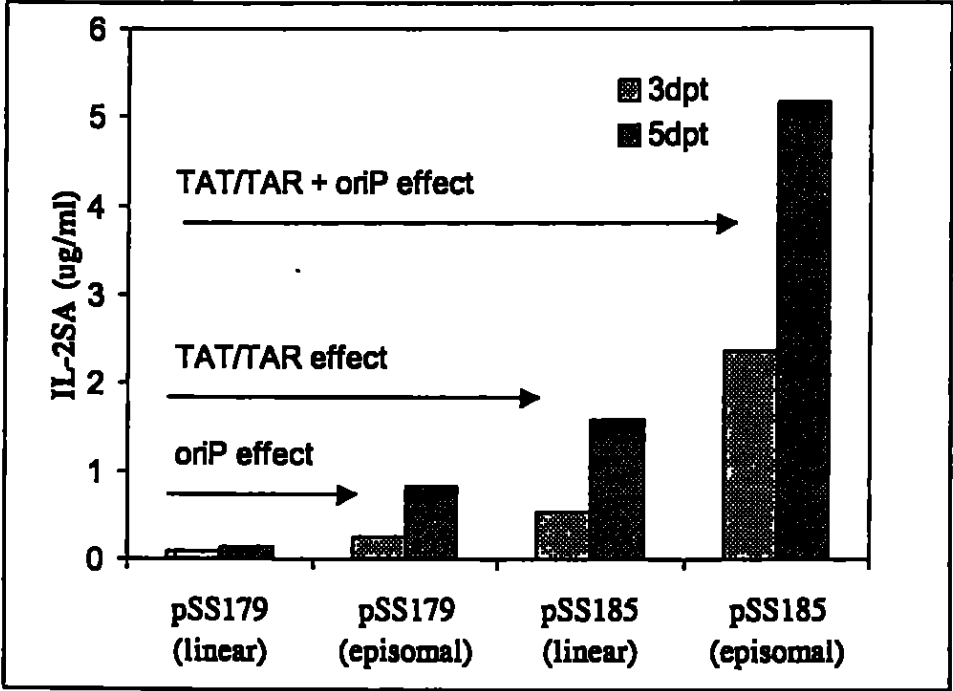


Figure 3

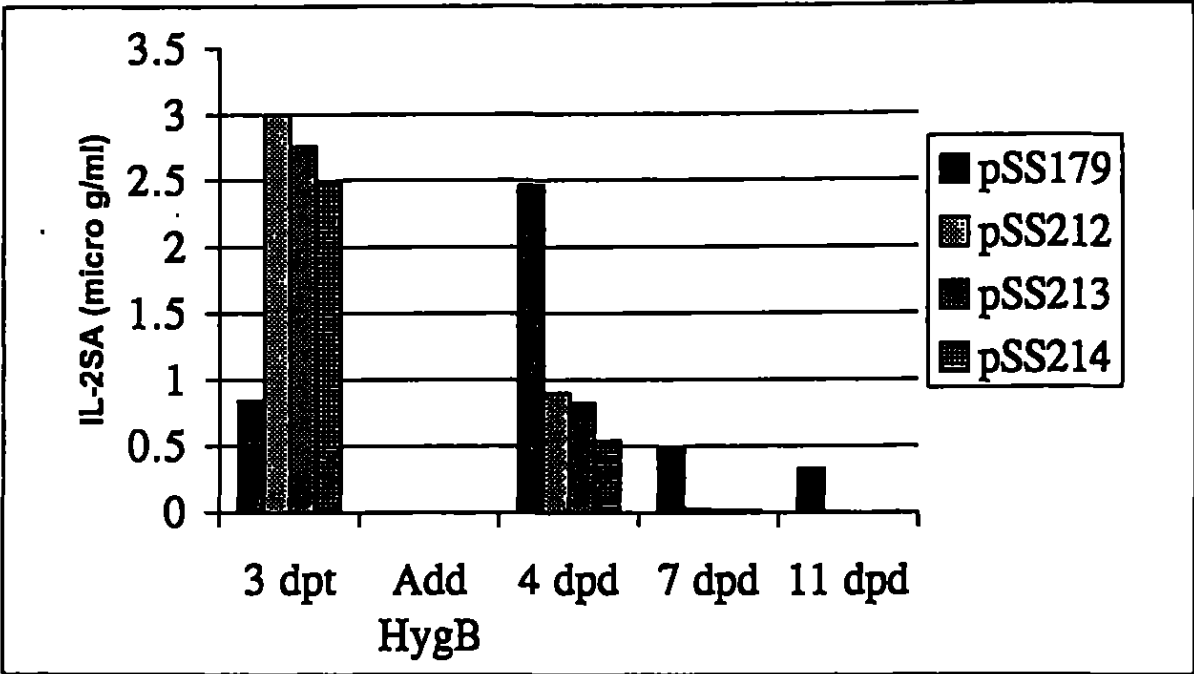


Figure 4

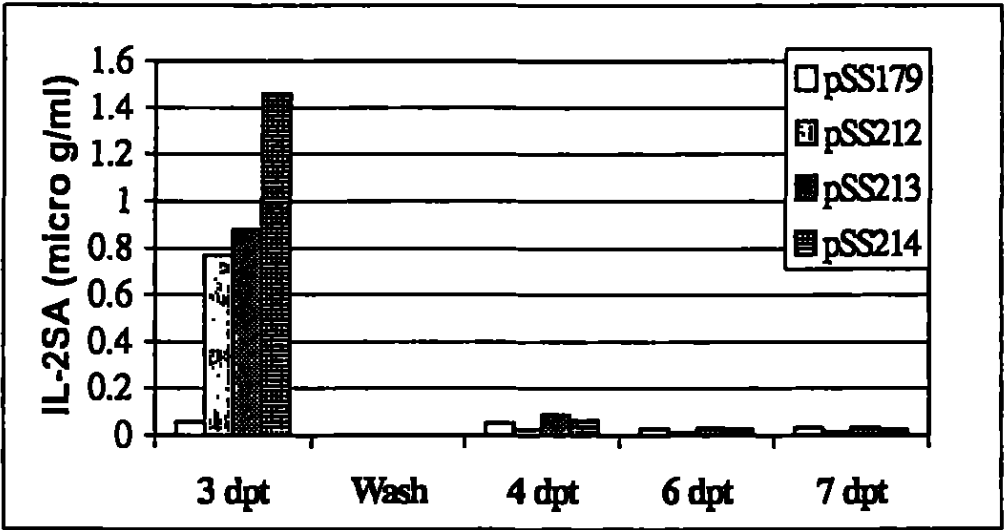


Figure 5

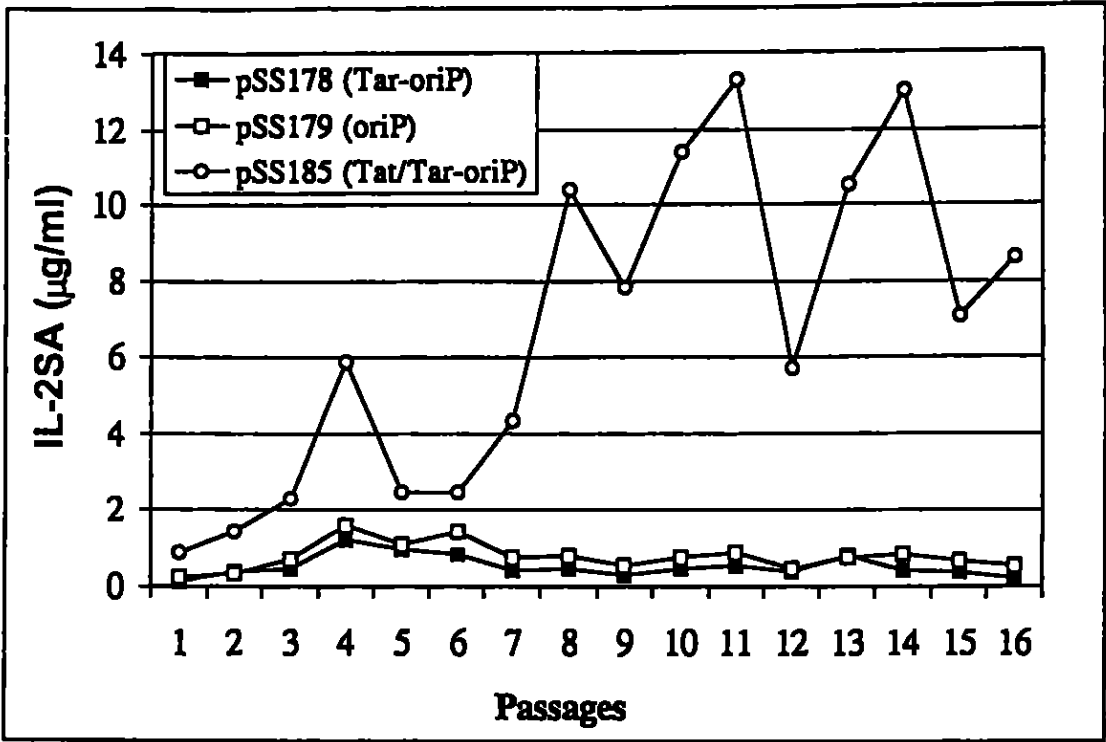


Figure 6

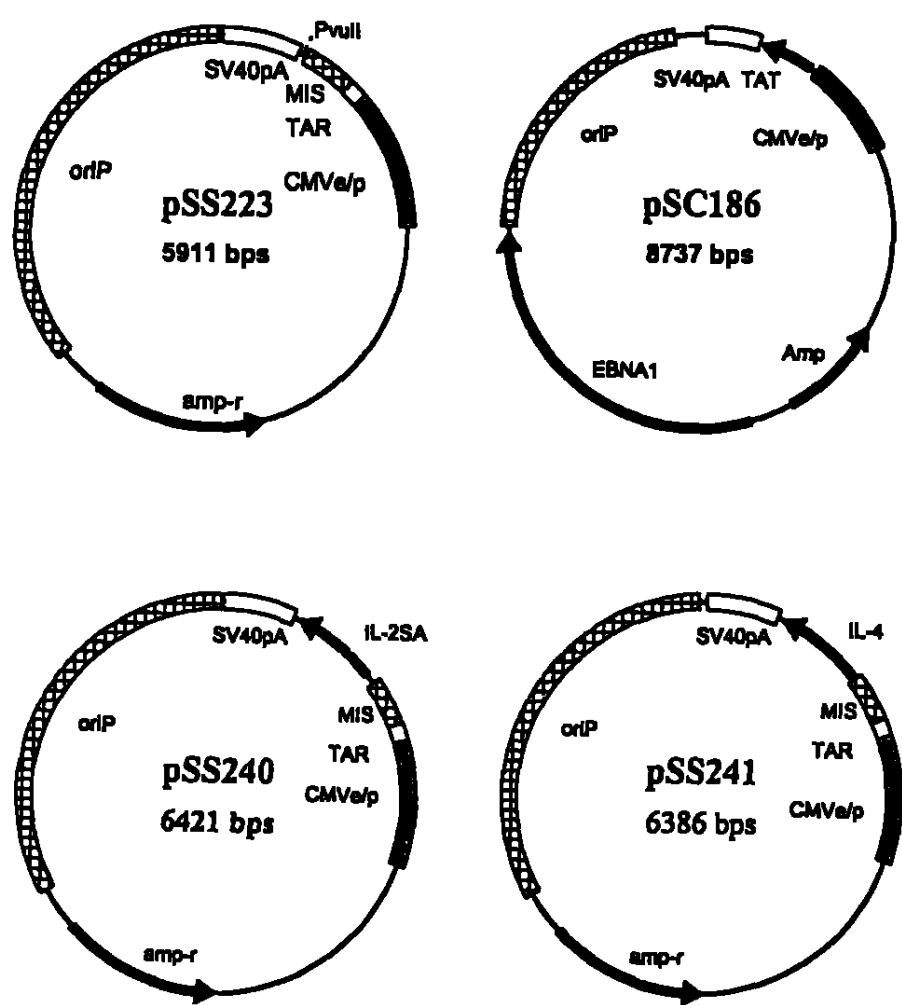


Figure 7



CONSULADO DE COLOMBIA
WASHINGTON, D.C.

9597
5786

No. 1040

EL CONSULADO DE COLOMBIA

CERTIFICA:

Que es auténtica la firma de PATRICK O. HATCHETT.

quien el día 19 DE ABRIL DEL 2000

desempeñaba las funciones de OFICIAL DE AUTENTICACIONES DEPARTAMENTO DE ESTADO

la cual aparece al pie de los documentos anexos relacionados con REPRESENTACION Y PODER

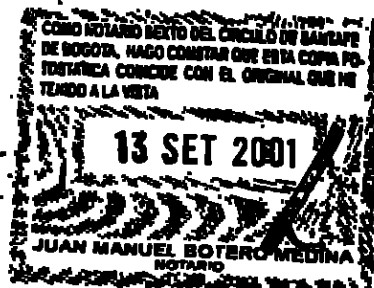
Dado en Washington, D.C. a los VEINTICINCO (25) días del mes de ABRIL del año dos mil (2000)

Pagado Impuesto de Timbre

Pagado Derecho Consular**Total**

**(El Consulado no asume ninguna
responsabilidad por el contenido de los
documentos anexos)**

JACQUELINE ESPITIA ARIAS
Vicecónsul



MINISTERIO DE LA ECONOMIA
EXTERIORES

27163521

JARUWNECAPITA
COMUNIDAD APARCESE EN
MURQUINAPU SESEMPENA
EASTEN, 2001 23 INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2001 JUN - 7 A 43

JEFE DE RELACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

[Handwritten signature]



00034295-4
United States of America

9597
5786
3



DEPARTMENT OF STATE

To all to whom these presents shall come, Greetings:



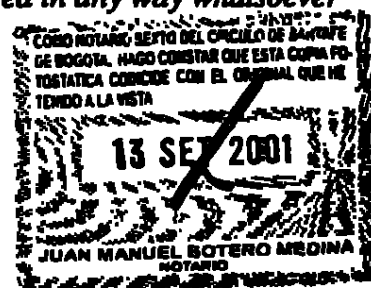
I Certify That the document hereunto annexed is under the Seal of the State(s) of Connecticut, and that such Seal(s) is/are entitled to full faith and credit.*

In testimony whereof, I, Strobe Talbott, Acting Secretary of State, have hereunto caused the seal of the Department of State to be affixed and my name subscribed by the Assistant Authentication Officer, of the said Department, at the city of Washington, in the District of Columbia, this nineteenth day of April, 2000.

Strobe Talbott
Acting Secretary of State
By Patricia A. Harris
Assistant Authentication Officer,
Department of State

Issued pursuant to CHXIV, State of
Sept. 13, 1789, 1 Stat. 68-69; 22
USC 2657; 22 USC 2651a; 5 USC
301; 28 USE 1733 et. seq.; 8 USC
1443(f); RULE 44 Federal Rules of
Civil Procedure.

*For the contents of the annexed document, the Department assumes no responsibility
This certificate is not valid if it is removed or altered in any way whatsoever





**STATE OF CONNECTICUT
OFFICE OF THE SECRETARY OF THE STATE**

I, **SUSAN BYSIEWICZ**, Secretary of the State of Connecticut and keeper of the seal thereof,

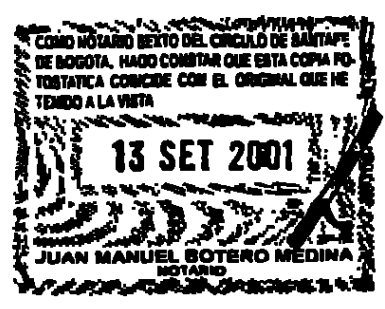
DO HEREBY CERTIFY, that DEBORAH COLLINS, was duly elected or appointed to the office of ASSISTANT CITY AND TOWN CLERK, for the town of WEST HAVEN in the County of NEW HAVEN in said state, for the term of DECEMBER 5, 1999 to DECEMBER 2, 2001;

and that to his/her acts and attestations as such, full faith and credit are and ought to be given in and out of Court.

In Testimony Whereof, I have hereunto set my hand and affixed the Great Seal of the State of Connecticut, at Hartford, on April 14, 2000.



Susan Bysiewicz
Secretary of the State



STATE OF CONNECTICUT
COUNTY OF New Haven

West Haven

I, Deborah Collins Asst. Clerk of the Town of West Haven

in said County, do hereby certify that Elaine Porter
by and before whom the foregoing (or annexed) acknowledgment was taken, was at the time of taking the same
a notary public (or other officer) residing (or authorized to act) in said County, and was authorized by the laws
of said State to take and certify acknowledgments in said State, and, further, that I believe that the signature to
the certificate of acknowledgment is genuine.

IN TESTIMONY WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed the seal of the State and Town this

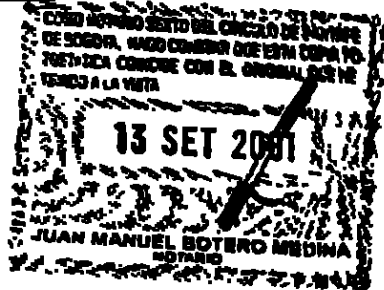
13th day of April 190 2000

Deborah Collins
Asst. Town Clerk

ADKINS FORM 220

Subscribed and sworn to before me this 10th day of April, 2000.

Elaine Porter
ELAINE PORTER
NOTARY PUBLIC
MY COMMISSION EXPIRES JUNE 30, 2001





CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA D. COLOMBIA

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans.

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned/Yo (nosotros), abajo firmado (s)

BAYER CORPORATION

of/domiciliado (s) en 100 BAYER ROAD, PITTSBURGH, PENNSYLVANIA 15205,
UNITED STATES OF AMERICA

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31828; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4° N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1° del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, reuniéndolos por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistír, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiales.

In due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31828; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4° N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn cases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact of its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Given and signed this/Dado y firmado hoy 11th day of

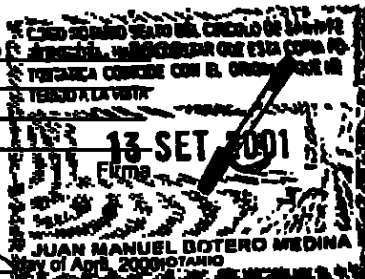
In/en West Haven, Connecticut, United States of America

Signature

Name: Jaime M. Eisenman
Title: Vice President, Patents and Licensing

Subscribed and sworn to before me this 11th

© CAVELIER ABOGADOS
(Minuta N° 12.1.1.2.6.USA)



ELIANA P. P. P.
NOTARY PUBLIC
MY COMMISSION EXPIRES JUNE 30, 2001

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los _____ días del mes de _____ de 19__

ante mí, Notario Público de _____

compareció(eron) personalmente _____

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es) tiene(n) capacidad legal para otorgarlo.

Notario Público _____

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen.

CERTIFICADO (PARA SOCIEDAD)

De conformidad con las leyes de Estados Unidos de America, yo soy el funcionario que tiene la facultad legal de certificar acerca de la existencia y representación de la Sociedad/Compañia.

denominada BAYER CORPORATION

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:

Ver ABAJO

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que BAYER CORPORATION

es una Sociedad/Compañia legalmente constituida y existente

de acuerdo con las leyes de Estado de Indiana,

Estados Unidos de América

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañia es

100 Bayer Road, Pittsburgh, Pennsylvania

15205, Estados Unidos de América

2.3. Que el objeto y objeto para los cuales se otorga el presente poder están comprendidos dentro del objeto social de la mencionada Sociedad/Compañia.

2.4. Que el (los) Sr. (Sres.) Jeffrey M. Greenman

está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad West Haven

Estado Connecticut

Hoy 12 Abril de 2000

Signature: _____

Nombre del funcionario:

Cargo:

Firma: _____

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen.

1. Artículo de Constitución fechado 6 MARZO, 1996 en Indianapolis, Indiana - E.U.

2. Artículo de fusión de Bayer U.S.A. y Bayer Corporation y Miles Financial Services a Miles Inc. y

CAMBIO de nombre a Bayer Corporation, certificado por el Secretario de Estado de Indiana en Indianapolis

© CAVELIER ABOGADOS (Minuta N° 12.1.1.2.BUSA) el 10 Abril 1995.

3. Estatutos de Bayer Corporation de 10 Abril 1995

4. Resolución de la Junta Directiva de Miles Inc. a

Ahora Bayer Corporation de una reunión de la Junta

fecha 22 nov. 1991 autorizando funcionarios para

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this _____ day of _____, 19__

before me, a Notary Public of _____

personally appeared _____

to me known, and known to me to be the person(s) who executed that foregoing document, and who has(have) legal capacity to execute it.

Notary Public _____

* Documents must be identified with date and origin.

CERTIFICATE (FOR CORPORATION)

According to the laws of the United States of America, I am the official who has the legal function to certify about the existence and representation of Corporation/Company

named BAYER CORPORATION

I Certify:

1. That I have seen the following documents:

- See below -

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That BAYER CORPORATION

is a Corporation/Company legally constituted and in existence

in accordance with the laws of the State of Indiana,

United States of America

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is

100 Bayer Road, Pittsburgh, Pennsylvania 15205,

United States of America

2.3. That the purpose of purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set forth in the charter of the mentioned Corporation/Company.

2.4. That Mr.(Messrs.) Jeffrey M. Greenman

is(are) authorized to grant the present Power of Attorney.

City West Haven

State Connecticut

This 12th day of April, 2000.

Signature: _____

Name of Attesting Officer: George J. Lykos

Position held: Vice President, Assistant General Counsel, and Assistant Secretary

Signature: _____

* Documents must be identified with date and origin.

1. Articles of Incorporation of Miles Inc., filed and approved 6 March 1996, Indianapolis, Indiana, U.S.A.

2. Articles of Merger of Bayer U.S.A. Inc., and Bayer Corporation, and Miles Financial Services Inc., into Miles Inc., and change

of name of the survivor to Bayer Corporation; certified by the Secretary of State of the State of Indiana, at Indianapolis, Indiana,

10 April 1995.

3. Bylaws of Bayer Corporation effective as of April 1, 1995.

4. Resolution of the Board of Directors of Miles Inc., now Bayer Corporation,

at a meeting of the Board held 22 November 1991, authorizing corporate

officers to execute legal instruments on behalf of the corporation.

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 0806001 del inglés al español de los sellos y autenticaciones que aparecen en el documento de poder otorgado por BAYER CORPORATION, preparada por Jaime Armando Garavito Burgos, Traductor Oficial debidamente reconocido por el Ministerio de Relaciones Exteriores y aprobado por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia mediante Resolución N° 034 de enero 11 de 1983

Documento escrito en inglés y español por medio del cual BAYER CORPORATION, otorga poder. a favor de EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ y GERMÁN CAVELIER. Dado y firmado el 11 de abril del 2000 en West Haven, Connecticut, Estados Unidos de América (firmado) Jeffrey M. Greeman

Nombre: Jeffrey M. Greenman

Cargo: Vicepresidente, Patentes y Licenciamiento

Suscrito y juramentado en mi presencia hoy 11 de abril del 2000. (firmado) ELAINE PORTER, Notario Público

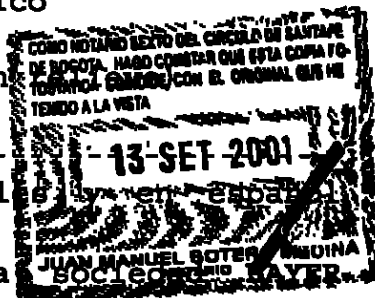
(Sello notarial en tinta y sello notarial en relieve)

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD) en inglés y en español

referente a la existencia legal de la BAYER CORPORATION y su representante autorizado Jeffrey M. Greenman, expedida el 12 de abril del 2000 en West Haven, Connecticut, Estados Unidos de América

Suscrito y juramentado en mi presencia hoy 10 de abril del 2000. (firmado) ELAINE PORTER, Notario Público

(Sello notarial en tinta y sello notarial en relieve)



40

(Aparece escudo impreso)

ESTADO DE CONNECTICUT

}

declaración juramentada

West Haven

CONDADO DE New Haven

Yo, Deborah Collins, Subsecretario de la ciudad de West Haven en dicho condado, por medio del presente certifico que Elaine Porter por quien ante quien se hizo el reconocimiento anterior (anexo), era en el momento de hacerlo un notario público (u otro funcionario) residente (o autorizado para actuar) en dicho Condado y estaba autorizado por las leyes de dicho Estado para hacer y certificar reconocimientos en dicho Estado. Certifico además que creo que la firma en dicho certificado de reconocimiento es auténtica.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, he estampado mi firma y el sello del estado y ciudad hoy 13 de abril del 2000.

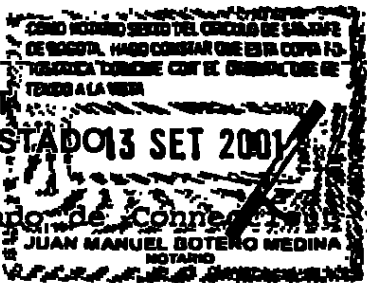
(firmado) Deborah Collins, Subsecretaria del Poblado

(Aparece sello en relieve)

ADINKS FORMATO 223

ESTADO DE CONNECTICUT
OFICINA DEL SECRETARIO DE ESTADO 13 SET 2001

Yo, SUSAN BYSIEWICZ, Secretario del Estado de Connecticut y guardián de su sello,



POR MEDIO DEL PRESENTE CERTIFICO que DEBORAH COLLINS, fue debidamente electa o nombrada al cargo de SUBSECRETARIA DE CIUDAD Y DE PUEBLO, para la población de WEST HAVEN en el Condado de NEW HAVEN en dicho estado, por el período comprendido entre DICIEMBRE 5, 1999 y DICIEMBRE 2, 2001;

(Aparece adherido sello dorado)

y que se da y deberá darse plena fe y crédito a sus actos y testimonios como tales, tanto procesal como extraprocesalmente.

En testimonio de lo cual, he estampado mi firma y el Gran Sello del Estado de Connecticut en Hartford el 14 de abril del 2000.

(firmado) Susan Bysiewicz, Secretaria del Estado

N° 00034295-4

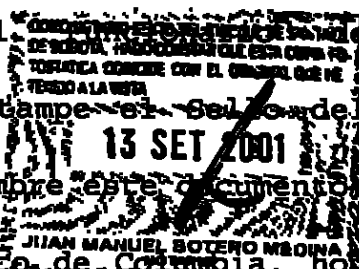
Estados Unidos de America

(Aparece escudo)

DEPARTAMENTO DE ESTADO

A todos aquellos a quienes los presentes llegaren, Saludos:

Certifico que el documento adjunto al presente se encuentra bajo el(los) Sello(s) del Secretario de Estado del Estado de Connecticut y que debe darse plena fe y crédito a dicho(s) Sello(s).*

En testimonio de lo cual, yo, Strobe Talbott, Secretario de Estado Encargado, he hecho que el  Autenticaciones de dicho Departamento estampe el Sello del Departamento de Estado y suscriba en mi nombre este documento en la ciudad de Washington, en el Distrito de Columbia, hoy diecinueve de abril del 2000.

(firmado) Strobe Talbott, Secretario de Estado

(Firmado) Patrick O. Hatchett, Funcionario Asistente de Autenticaciones Departamento de Estado.

*El Departamento no asume ninguna responsabilidad por el contenido del documento anexo.

42

Este certificado no es válido si se le remueve o altera en cualquier forma.

(Sello en relieve del Departamento de Estado de los Estados Unidos de América)

(El formulario detalla las disposiciones legales bajo las cuales fue emitido e impreso)

N° 1040. EL CONSULADO DE COLOMBIA en Washington, D.C., Estados Unidos de América, certifica las funciones y firma de PATRICK O. HATCHETT, el 25 de abril del 2000. Pagado impuesto de timbre y derechos consulares. (firmado) JAQUELINE ESPITIA ARIAS, Vicecónsul

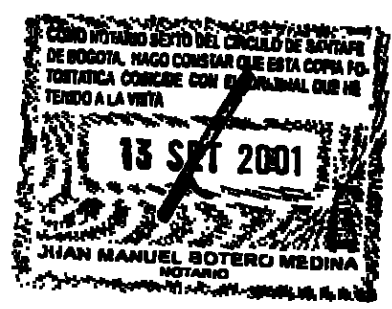
EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES en Santa Fe de Bogotá, D.C. certifica la firma y las funciones de JAQUELINE ESPITIA, el 07 de junio del 2000. N° 276352. (firmado) Jefe de Legalizaciones.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para su confrontación y a la cual me remito.

Santa Fe de Bogotá, D.C., junio 08 del 2000

COLO: 9597-801-014-8
WPCL9597 - ID # 156

Jaime A. Garavito B.
JAIME A. GARAVITO B.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
Reg. 034 de Enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

278511

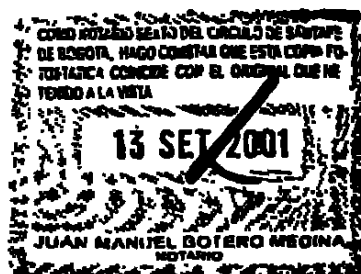
JAIME GARAVITO
CUYA FIRMA APARECE EN LA
AUTENTICACION DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2000 JUN -9 10 56

OFICINA DE RELACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIR-
MA(S) PUESTA(S) POR
Jaime Garavito
IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s)
AUTENTICACION
SANTAFE DE BOGOTA 09 JUN 2000



43-

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

9

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by L. Edelen

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

6. the twenty-ninth of August, 2001

7. by Assistant Authentication Officer, United States Department of State

8. No. 01025980-3

9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Patrick O. Hatchett

A 450610



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office

August 24, 2001

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
September 28, 2000.



By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

L. Edelen

L. EDELEN
Certifying Officer

ASSIGNMENT

WHEREAS, WE, MYUNG-SAM CHO and HELENA YEE, have invented certain new and useful improvements in ENHANCED TRANSFECTION SYSTEM for which Application for United States Letters Patent was executed by US on SEPTEMBER 28, 2000.

WHEREAS, Bayer Corporation, a corporation organized and existing under the laws of the State of Indiana, having a principal place of business at 800 Dwight Way, Berkeley, California 94710, is desirous of acquiring said invention and application and any and all Letters Patent that may be obtained therefor or thereupon;

NOW, THEREFORE, TO ALL WHOM IT MAY CONCERN, be it known that, for and in consideration of the sum of One Hundred Dollars (\$100.00) and other good and valuable consideration, to US in hand paid by Bayer Corporation, the receipt of which is hereby acknowledged, WE have sold, assigned, transferred and set over and by these presents do sell, assign, transfer and set over unto Bayer Corporation, its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest in and to said invention and application and any and all divisions and continuations thereof, and in and to any and all United States Letters Patent and any and all reissues and extensions thereof that may be issued for or upon said invention and applications, to have and to hold for its own use and behoof and the use and behoof of its successors and assigns as fully and entirely as the same might be enjoyed by US if this sale and assignment had not been made;

AND WE HEREBY AUTHORIZE and request the Commissioner of Patents and Trademarks to issue said Letters Patent and any reissues and extensions thereof to Bayer Corporation, as assignee of the entire right, title and interest in and to said invention and application and any and all Letters Patent issued therefor or thereupon;

AND WE HEREBY AGREE to execute all instruments and documents within OUR power which may be necessary for the carrying out of this assignment in full; and to execute any divisional or continuation application which may be necessary or proper to obtain full protection on the invention hereby assigned; and to execute any and all supplemental oaths, preliminary statements and other papers should the same be proper and necessary in the prosecution of said application and any divisions and continuations thereof;

AND WE HEREBY FURTHER ASSIGN unto Bayer Corporation, its successors and assigns, the whole right, title and interest in and to the invention disclosed in said application throughout all countries foreign to the United States and do hereby ratify any acts of Bayer

47

Patent
MSB-7270

Corporation, its successors and assigns, in applying for patents therefor in its own name in countries where such application is proper and do agree to execute applications for said invention in the several countries where it is necessary that the same be executed by the inventor, and to execute assignments of such applications and the patents to be obtained thereupon to Bayer Corporation, its successors and assigns;

AND WE HEREBY AUTHORIZE Bayer Corporation, and its successors and assigns, to claim the priority of the aforesaid United States Patent Application in accordance with the provisions of each and every international convention or treaty in connection with each and every corresponding application which it may file or cause to be filed in each and every country which is a party to any such convention or treaty.

IN WITNESS WHEREOF, WE have hereunto set OUR hands this 28 day of September, 2000.

STATE OF CALIFORNIA)
) ss:
COUNTY OF ALAMEDA ;

Myung Sam Cho
Helena Yee

On this 28 day of September, 2000, before me personally appeared MYUNG-SAM CHO and HELENA YEE to me known to be the persons described in and who executed the foregoing instrument and acknowledge that THEY executed the same as THEIR free act and deed in their authorized capacity.

LIJUANNA LE GRANDE
Commission # 1245542
Notary Public - California
Alameda County
My Comm. Expires Dec 12, 2003

Lijuanne LeGrande
Notary Public

RECORDED: 09/28/2000

PATENT
REEL: 011165 FRAME: 0160

28

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 170901 al español de un documento escrito en inglés, preparada por Jaime Armando Garavito Burgos, Traductor Oficial debidamente reconocido por el Ministerio de Relaciones Exteriores y aprobado por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia mediante Resolución N° 034 de enero 11 de 1983

Formato de la Oficina de
Patentes y Marcas - 1585
(Rev. 8-83) F
OMB N° 0851-0011
(vencimiento 4/84)
Ajustes de tabulación

10-23-2000
(código de barras)
101494757

HOJA R

DEPARTAMENTO DE
COMERCIO DE LOS EE.UU.
Oficina de Patentes y Marcas

Al Honorable Comisionado de Patentes y Marcas. Por favor registrar los documentos originales anexos o copia de los mismos.

1. Nombre(s) de la(s) parte(s) que efectúa(n) el traspaso:

MYUNG-
MYUNG-SAM CHO
HELENA YEE

Nombre(s) adicional(es) de la(s) parte(s) anexo(s)?

☐ Sí

☒ No

2. Nombre y dirección de la(s) parte(s) que recibe(n)?

Nombre: Bayer Corporation

Dirección interna: (en blanco) (Aparece sello)

Dirección: P.O. Box 1986
800 Dwight Way

Ciudad: Berkeley Estado: CA Código Zip: 94701

Nombre(s) adicional(es) & dirección(es) anexo(s)

☐ Sí

☒ No

3. Naturaleza del Traspaso: MRD 9.28.00

Fecha de firma: (en blanco)

. 09/675847

B. Patente(s) N° (en blanco)

Ciudad: Berkeley **Estado:** CA **Código Zip:** 94701

Se autoriza cambiar a cuenta de depósito

NO ESCRIBA EN ESTE ESPACIO

9. Declaración y firma.

Según mi leal saber y entender, la anterior información es verdadera y correcta y cualquier copia anexa es una copia auténtica del documento original.

James A. Giblin

Nombre de la persona que firma

(firmado) James A. Giblin

Fecha Septiembre 28, 2000

El número total de páginas incluye la página de cubierta,
anexos y el documento: 3

OMB N° 0651-0011 (exp.{sic} 4/94)

Enviar por correo los documentos que deban registrarse con la
información de la cubierta a:

Comisionado de Patentes y Marcas de los EE.UU.
Casilla de Traspasos
Washington, D.C. 20231

PATENTE

CARRETE: 011165 MARCO:0158

Patente
MSB-7270

TRASPASO

CONSIDERANDO QUE NOSOTROS, MYUNG-SAM CHO y HELENA YEE
hemos inventado ciertas mejoras nuevas y útiles en el SISTEMA
MEJORADO DE TRANSFECCIÓN para las cuales firmamos una Solicitud
de Título de Patente de los Estados Unidos el 28 de septiembre
del 2000.

CONSIDERANDO QUE, Bayer Corporation, una sociedad
organizada y existente bajo las leyes del Estado de Indiana,
con lugar principal de negocios en 800 Dwight Way, Berkeley,

California 94710, desea adquirir dicho invento y solicitud al igual que todos y cada uno de los Títulos de Patente que puedan obtenerse para el mismo;

EN CONSECUENCIA, A TODOS AQUELLOS A QUIENES PUEDA INTERESAR, sépase que por la suma de Cien Dólares (US\$ 100.00) y por otra contraprestación efectiva y valiosa pagada en efectivo a NOSOTROS por Bayer Corporation, cuyo recibo se reconoce por medio del presente, NOSOTROS hemos vendido, cedido, transferido y traspasado y por medio del presente vendemos, cedemos, transferimos y traspasamos a Bayer Corporation, sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés completos y exclusivos a dicho invento y solicitud, así como a todas y cada una de sus divisiones y continuaciones, al igual que a todos y cada uno de los Títulos de Patente de los Estados Unidos y a todas y cada una de las re-expediciones y prórrogas que puedan expedirse con respecto a dicho invento y solicitudes, para que los posea y tenga en su poder para su propio uso y provecho, al igual que para el uso y provecho de sus sucesores y cesionarios tan completamente y enteramente como si el mismo derecho fuese disfrutado por NOSOTROS si esta venta y cesión no hubiera sido hecha;

Y POR MEDIO DEL PRESENTE AUTORIZAMOS y solicitamos al Comisionado de Patentes y Marcas para que expida dichos Títulos de Patente y cualesquier re-expediciones y prórrogas de los mismos a Bayer Corporation, como cesionario de la totalidad del entero título e interés en dicho invento y solicitud y en todos y cada uno de los Títulos de Patente expedidos para ellos;

Y POR MEDIO DEL PRESENTE ACORDAMOS firmar todos los instrumentos y documentos en NUESTRO poder que puedan ser necesarios para llevar a cabo en su totalidad esta cesión y para suscribir cualquier solicitud suplementaria o de continuación que pueda ser necesaria o apropiada para obtener la protección completa sobre el invento cedido por medio del presente; y suscribir todas y cada una de las declaraciones juramentadas suplementarias, declaraciones preliminares y otros papeles que fuesen apropiados y necesarios dentro del trámite de dicha solicitud y cualesquier divisiones y continuaciones de la misma;

Y POR MEDIO DEL PRESENTE CEDEMOS ADEMÁS a Bayer Corporation, sus sucesores y cesionarios, la totalidad del derecho, título e interés en el invento publicado en dicha solicitud en todos los países fuera de los Estados Unidos y por medio del presente ratificamos cualesquier

PATENTE
CARRETE: 011165 MARCO: 0159

Patente
MSB-7270

actos de Bayer Corporation, sus sucesores y cesionarios, al solicitar patentes para ellos en su propio nombre en países en los que dicha solicitud es apropiada y acordamos firmar las solicitudes para dicho invento en los diversos países donde sea necesario que estas sean firmadas por el inventor y a suscribir las cesiones de dichas solicitudes y las patentes que se obtengan a Bayer Corporation, sus sucesores y cesionarios;

Y POR MEDIO DEL PRESENTE AUTORIZAMOS A Bayer Corporation, sus sucesores y cesionarios, para que reclamen la prioridad de la anteriormente mencionada Solicitud de Patente de los Estados Unidos de acuerdo con las disposiciones de todos y cada uno de los convenios o tratados internacionales relacionados con todas y cada una de las solicitudes correspondientes que pueda presentar o hacer que se presenten en todos y cada uno de los países que sean parte de cualquiera de dichos convenios o tratados.

EN FE DE LO CUAL, NOSOTROS hemos FIRMADO hoy 28 de septiembre del 2000.

ESTADO DE CALIFORNIA)
) declaración juramentada
CONDADO DE ALAMEDA)

(firmado) MYUNG-SAM CHO

(firmado) HELENA YEE

Hoy 28 de septiembre del 2000, ante mí, comparecieron personalmente MYUNG-SAM CHO y HELENA YEE, a quienes conozco como las personas descritas en el anterior instrumento y como quienes lo suscribieron y reconozco que ELLOS lo firmaron como SU acto libre en su calidad autorizada.

(firmado) LUAJUANA LE GRANDE, Notario Público

(Sello en tinta que dice: "LUAJUANA LE GRANDE; Comisión # 1245542; Notario Público - California; Condado de Alameda; mi comisión vence el 12 de diciembre del 2003")

REGISTRADO: 09/28/2000

PATENTE
CARRETE: 011165 MARCO:0160

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

A TODOS AQUELLOS A QUIENES LOS PRESENTES LLEGAREN:

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

Agosto 24, 2001

EL PRESENTE CON EL FIN DE CERTIFICAR QUE ANEXA SE ENCUENTRA UNA COPIA AUTÉNTICA DE LOS REGISTROS QUE REPOSAN EN ESTA OFICINA DE UN DOCUMENTO REGISTRADO EL 28 de septiembre del 2000.

(Aparece adherido sello dorado de oblea con cinta azul de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos de América)

Por autoridad del COMISIONADO DE PATENTES Y MARCAS

(firmado) L. EDELEN, Funcionario que certifica

APOSTILLA

(Aparece leyenda en Francés)

1. País: *Estados Unidos de América*

Este documento público

2. ha sido firmado por L. Edelen

3. quien actúa en calidad de Funcionario que Certifica

4. lleva el sello de la Oficina de Patentes y Marcas

Certificado

5. en Washington, D.C.

6. el veintinueve de agosto del 2001

7. por el *Funcionario Asistente de Autenticaciones,*
Departamento de Estado de los Estados Unidos

8. N° 01025980-3

5J

- 9. Sello: (Aparece sello en relieve)
- 10. Firma: (firmado) Patrick O. Hatchett

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en los
archivos de esta oficina para su confrontación y a la cual me
remito.

Bogotá, septiembre 14 del 2001

COLO: 09547-801-020-5
WPCL9547 - ID: 15

Jaime A. Garavito B.
JAIME A. GARAVITO B
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
Dec 034 de Enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIORE(S) FIRMA(S) PUESTA(S) POR

[Signature]

IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s)

ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA, 18 SET. 2001

[Signature]



56 58

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by E. Bornett

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

6. the twenty-second of August, 2001

7. by Assistant Authentication Officer, United States Department of State

8. No. 01025507-3

9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Patrick O. Hatchett

52
PA 454625

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

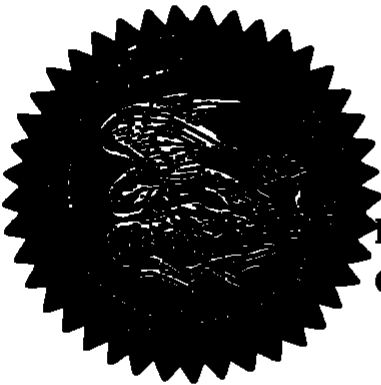
United States Patent and Trademark Office

August 17, 2001

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER: 09/675,847

FILING DATE: September 28, 2000



By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

E. Bornett
E. BORNETT
Certifying Officer

JCS15 U.S. PTO
09/28/00

10-2-00

A 58

PATENT
MSB-7270

JCS15 U.S. PTO
09/28/00
09/28/00

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants:
MYUNG-SAM CHO
HELENA YEE

Serial No.: Unassigned

Filed: Unassigned

Title: ENHANCED TRANSFECTION SYSTEM

TRANSMITTAL LETTER

EXAMINER: Unassigned

ART UNIT: Unassigned

Box: PATENT APPLICATION
Commissioner of Patents and Trademarks
Washington, D.C. 20231

Sir:

Transmitted herewith for filing are the following:

1. Application for United States Patent, including a Title page, 20 pages of Specification and Claims, an Abstract (1 page) and 7 sheets of drawings of Applicants: MYUNG-SAM CHO and HELENA YEE for: Enhanced Transfection System.
2. An Assignment document is enclosed, together with a Request for Recordation.
3. Fee calculation:

Basic Fee				\$790.00
Total Claims	21	1	22	22.00
Independent Claims	4	1	82	82.00
Multiple Dependent Claims				0
TOTAL				\$ 894.00

09675847-092800

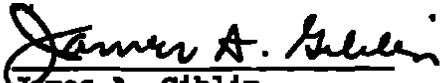
4. Enclosed with this Transmittal Letter is a Deposit Account Order Form authorizing payment of the filing fee from Deposit Account No. 03-4000.
5. An executed Declaration for Patent Application is enclosed.
6. Address all future communications to:

James A. Giblin
Patent Department
Bayer Corporation
800 Dwight Way
P.O. Box 1986
Berkeley, CA 94701

Respectfully submitted,

Dated:

Sept. 28, 2000


James A. Giblin
Attorney for Applicants
Reg. No. 25,772
Bayer Corporation
800 Dwight Way
P.O. Box 1986
Berkeley, CA 94701
(510) 705-7910

0082 0-4854960

UNITED STATES PATENT APPLICATION

09675847.092800

Title: Enhanced Transfection System

Inventors: Myung-Sam Cho and Helena Yee

Field: This invention generally relates to an improvement in mammalian cell expression systems and specifically relates to a mammalian cell gene expression vector system which includes an episomal maintenance system, a strong promoter/enhancer, a protein transactivation system and DNA coding for a heterologous protein.

Background: It is well known that various cell hosts such as microbial cells, yeast cells, insects cells and mammalian cells are capable of producing small amounts (milligram quantities) of specific proteins in relatively short periods of time. Also, it is known that proteins from different genetically engineered host cell systems generate proteins having different glycosylation profiles, depending on the cell used. For pharmaceutical applications in some cases it is desirable to product proteins that have glycosylation profiles that are similar to those found in humans. This is usually accomplished using a mammalian cell system since such systems produce proteins with glycosylations that are compatible with clinical applications. The disadvantage of using mammalian cells is that they typically require a longer period of time to produce an equivalent quantity of protein. Thus, it would be very desirable to have a genetically engineered mammalian cell expression system (for expressing heterologous proteins) that can express larger amounts of the protein in shorter periods of time.

It is known that various episomal maintenance elements can be introduced into a vector in a gene expression system to ensure replication. It is also well known that genetically engineered systems can and in many cases should include strong promoter/enhancer systems. In addition, it is well known that genetically engineered cell lines can include protein transactivation systems to enhance protein expression from DNA coding for a heterologous protein that is also incorporated into the system. Against that background, we are unaware of any attempts or suggestions to incorporate all four of the above elements or systems into a single mammalian cell expression system so that the combined advantages of all of the elements are present in a single and functioning system that expresses heterologous proteins. To our surprise, when the above combination was made using the techniques described below we found what appears to be a synergistic

effect on protein expression. Representative examples for two heterologous proteins (designated IL-2SA and IL-4SA) are described below.

SUMMARY OF THE INVENTION

Our mammalian cell gene expression vector system comprises:

- (a) an episomal maintenance system,
- (b) a strong promoter/enhancer,
- (c) a protein transactivation system, and
- (d) DNA coding for heterologous protein.

The episomal maintenance system and the protein transactivation system can include sub-elements that are located on same or different plasmids within the mammalian cell expression system. In a preferred system, the episomal maintenance system comprises of an oriP element and an EBNA1 expressing gene. A preferred strong promoter/enhancer is CMV and the preferred protein transactivation system includes both TAT and TAR elements. A preferred DNA coding sequence for the heterologous protein includes DNA that codes for substances (described in more detail below) known as IL-2SA and IL-4SA. A preferred mammalian cell line comes from a primate although other mammalian cell lines can be used. It should be noted, however, that the preferred cell lines should be non-rodent for reasons given below.

The components used to demonstrate our systems are described below.

1. A pBR322-based expression vector was supplemented with human CMV enhancer/promoter element and 5'-IS for mammalian cell expression, this plasmid is pSM97 (described in United State Patent No 5,854,021).

2. EBNA1 and oriP elements, which can support maintenance of plasmid DNA as an episomal structure (Yates et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:3806-3810 and United State Patent No 4,686,186), were added to the above expression vector.

3. TAT (transactivator gene) and TAR (trans-activating responsive sequence) elements, which can support the transactivating function of TAT protein (described in United States patent No 5,801,056), designated them here as TAT/TAR elements, were added to the expression vector to result in an oriP expression vector combined with the TAT/TAR elements.

4. BMLF1 transactivator (Lieberman et al., J Virol 60:140-148, 1986, Kenney et al., J Virol, 63: 3870-3877, 1989, and Ruvolo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8852-8857) originated from Epstein-Barr virus was inserted into vector.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1-1 and 1-2 show physical maps of Interleukin-2 mutein (designated IL-2SA) expression vectors used for the transfection study of the optimization of expression vectors, which included combined oriP and TAT/TAR elements.

Figure 2. shows physical maps of expression vectors used for the transfection study of BMLF transactivation effect.

Figure 3 is a chart which shows enhancement of IL-2SA secretion in transient transfection assays used to identify and compare oriP effect, TAT/TAR transactivation effect, and TAT/TAR transactivation plus oriP effects. Note that we assumed the linearized pSS179 as base line of IL-2SA expression level because oriP function should be abolished after linearization by using a restriction enzyme and similarly with linearized pSS185.

Figure 4 shows BMLF1 transactivation effects on IL-2SA secretion from CHO cells in a prolonged culture time. At 3 dpt, cells were treated with trypsin and seeded with the same numbers of cells on a well with a fresh medium supplemented with 5 % FBS. The secretion levels of IL-2SA from pSS179 transfected CHO cells maintained similarly throughout 4-7 dpt with that from 3 dpt. However, IL-2SA expression levels from

pSS212, 213, and 214 transfected CHO cells after 4 dpt didn't show any enhanced effect of BMLF1 transfection activity that was shown at 3dpt.

Figure 5 shows BMLF1 transactivation effects on IL-2SA secretion from HKB11 cells in a prolonged culture time under the drug selection. BMLF1 transactivation effects seen at 3 dpt, from HKB11 cells transfected with pSS212, 213, and 214, was abolished after adding HygB, although TAT/TAR effect was maintained under the drug selection as shown in Figure 6.

Figure 6 shows TAT/TAR transactivation effects on IL-2SA secretion from HKB11 cells under the hygromycin B selection. The transfected cells were maintained as described in the text.

Figure 7 shows physical maps of expression vectors used for cotransfection study for highthroughput expression.

SPECIFIC EMBODIMENTS

Materials and Methods

Cells

Human embryonic kidney cells (293) (ATCC CRL-1573)

293EBNA (EBNA1 expressing 293 cells) obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA)

Dihydrofolate reductase (dhfr)-negative CHO (Chinese Hamster Ovary) cells were obtained from Genentech Inc.

HKB11 (ATCC, CRL-12568) is a human somatic hybrid cell line (United States Patent Application No. 09/209,920) derived from the cell fusion of human embryonic kidney (293S) cells and Burkitt's lymphoma origin (P3HR-1) cells.

6J

Plasmids construction

The IL-2 SA is an IL-2 mutein having a single amino acid substitution (N88R), as described in WO 99/60128. A brief description of the individual expression vectors of Figures 1-1 and 1-2 is as follows.

pSL160N: IL-2SA coding sequence was inserted into PvuII site of pSM97 and further modified by adding HSAG1 element (EcoRI and XbaI fragment; 1447 bp) described in McArthur and Stanners (J Biol Chem 266:6000-6005, 1991) into SpeI site of pSM97 and EBV-TR (Cho et al., US patent application # 09/209,915) into NaeI site of pSM97.

pSS179: IL-2SA coding sequence was inserted into BamHI/XhoI site of pCEP4.

pSS178: TAR element (82 bp) is located upstream of IL-2SA of pSS179.

pSS185: A functional TAT element described in the plasmid construction was inserted into NruI site (upstream site of TK promoter) of pSS178.

pSH201: An intronic sequence, MIS (~270 bp) was located at the 3'-end of TAR sequence (NotI/HindIII) of pSS185.

pSC221: HSAG element of pSL160N was omitted and TAR element was located at 3'-end of CMVe/p and 5'- end of MIS.

pSS225: EBNA1 and functional TAT and hph expressing segments were excised from pSH201.

pSS226: A functional TAT expressing element was inserted at 5'-end of amp-r gene of pSS225.

A description of individual expression vector of Figure 2 is as follows.

pSS210: BMLF1 and hph expressing oriP plasmid was described in a section of plasmid construction.

pSS212: IL-2SA coding sequence was located 3'-end of CMVe/p of pSS210.

pSS213: A TAR element is located at the 5'-end of IL-2SA of pSS212.

pSS214: An intronic sequence, MIS, is further added at the 5'-end of IL-2SA of pSS213.

09675847-092800

A brief description of individual plasmid structure of Figure 7 is as follows.

pSS223: This plasmid is basically same as pSS225 but missing IL-2SA coding sequence.

pSC186: A TAT coding sequence was located at the 3'-end of CMVe/p of pCEP4 and the functional hph expressing segment was deleted.

pSS240: IL-2SA coding sequence was inserted into PvuII site of pSS223.

pSS241: IL-4 coding sequence was inserted into PvuII site of pSS223.

The pBR322-based mammalian cell expression vector with a functional dhfr gene expression (pSM97; Cho et al., United State Patent Number 5,854,021). pCEP4 vector consisting of oriP, EBNA1, and functional hph gene expression based on pBR322 was obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA).

Eighty-two base pairs of TAR element was prepared by PCR using pBamCAT (Gendelman H.E. et al., Proc.Natl.Acad. Sci.USA 83:9759-9763, 1986) as a template. Two primers were made by adding KpnI site at 5'-end of TAR and HindIII site at 3' end of TAR. The resulting PCR product was digested with HindIII and KpnI and inserted into pCEP4 after digesting pCEP4 with KpnI and HindIII. The functional TAT gene expressing segment was prepared from pSVTAT (Peterlin B.M. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83: 9734-9738, 1986) by digesting it with BamHI (modified with Klenow fragment) and HpaI.

This fragment was inserted to pSV_{neo} after digesting with PvuII and HpaI. This functional TAT expressing segment can be easily excised by digesting with PvuII and BamHI to insert into any other expression vectors as shown in Figure 1 (pSS185 and pSC221). BMLF1 coding sequence and polyA signal area was prepared from B95-8 EBV encompassing DNA sequence from 84301 (NheI) to 82180 (HindIII) of B95/8 EBV sequence data (P.J. Farrell, "Epstein-Barr Virus Genome" in Advanced Viral Oncology; edited by G. Klein; Ravens Press, Ltd.: New York 1989, pp103-132) and inserted to PvuII site of pCEP4, a vector with CMVe/p. This BMLF1 expression is now under the control of CMVe/p.

The functional BMLF1 expression segment was removed by digestion with SpeI and NheI from this vector and a new expression vector was constructed. This resulting plasmid pSS210 found in Figure 2. The Interleukin-2 mutein (N88R) known as IL-2SA (Patent application file No. WO9960128, IL-2 Selective Agonists and Antagonists) was used as a reporter gene.

Transfection

Stationary transfections were performed using the cells growing in anchorage dependent mode. Logarithmically growing HKB11 cells (1.5×10^6 cells) in 4 ml of fresh medium with either 5 % FBS or without serum were seeded in one well of a 6-well format tissue culture dish (Corning Inc., Corning, NY) and allowed to attach on the bottom of the plate for two or more hours in a humidified CO₂ incubator at 37°C. A cocktail (1 ml) consisting of 5 µg of DNA and 20 µl of DMRIE-C reagent (Life Technologies, Rockville, MD) was prepared according to the manufacturer's protocol and added to the well and mixed gently. Plates were incubated in the CO₂ incubator.

Shaking transfections were performed using cells adapted to serum-free suspension conditions. Logarithmically growing HKB11 cells (5×10^6 cells) in 4 ml of fresh medium were mixed with one ml of the DNA/DMRIE-C complex as in the above stationary transfection. This 5 ml of transfected cells in a 6-well format was incubated on a shaker (90-100 rpm) in a humidified CO₂-incubator. Transfected cells were sub-cultured at 3 and 7 days post transfection (dpt) by splitting either 1:4 or 1:5. The total culture volume was increased from the initial transfection volume to 20 fold at 10 dpt. Tissue culture supernatant was analyzed by an ELISA to determine secretion levels of proteins.

ELISA

For detection of IL-2SA, Dynatech Immulo-2 round bottom plates were coated with 1 µg/ml purified anti-human IL-2 (PharMingen, San Diego, CA) from rat using 0.1 M NaHCO₃ (pH8.2) buffer, incubated at 37°C for 3 hours in a humidified chamber, washed with PBS/0.05% Tween 20 (Sigma P-1379, St Louis, MO) and blocked with PBS/1% BSA for one hour at room temperature. Culture supernatants containing IL-2SA

and a standard of purified IL-2SA (as a standard curve) were serially diluted with PBS/1 % BSA (50 μ l/well) and incubated at room temperature for two hours. Captured IL-2SA was detected using biotinylated mouse anti-human IL-2 (62.5 ng/ml; PharMingen, San Diego, CA) followed by incubation with HRP-streptavidin (125 ng/ml; Zymed Laboratories Inc. #43-4323, South San Francisco, CA). Between all incubations (a one hour incubation each at room temperature), plates were washed with PBS/Tween 20. Plates were developed using substrate solution tetramethylbenzidine (TMB; Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. Product# 50-65-00 and 50-76-01, Gaithersburg, MD) and the reaction was stopped with 1 N HCl. The optical density (OD) was measured at 450 nm/570 nm using Molecular Device's Vmax kinetic microplate reader (S/N 04514, Sunnyvale, CA) and the Softmax program provided by Molecular Devices. The IL-2SA concentration in the tissue culture supernatant was determined by comparing to the OD of a standard curve of purified IL-2SA.

To measure human interleukin-4 (IL-4) secretion, assay was similar except mouse anti human IL-4 antibody (PharMingen, Cat. #18651D, San Diego, CA) was used to coat the plate, and biotinylated anti rat IL-4 antibody (PharMingen, Cat. #18502D, San Diego, CA) was used as a detection antibody. Purified IL-4 molecule was used as a standard.

EXAMPLE 1

Protein expression in transient transfection assays using TAT/TAR-oriP expression vectors

Mammalian cell expression vectors equipped with CMVe/p in pBR322 plasmid showed relatively high level expression and secretion of between 1 - 20 μ g/ml of heterologous protein. However, some proteins had been very difficult to express, e.g. IL-2SA. Therefore, we constructed various expression vectors equipped with different enhancing elements, mainly transactivating proteins and the oriP element to maintain the transferred plasmid as an episome. Either element alone showed a small level of increases (3-5 fold) in transient transfection assays. We constructed two expression vectors, one with IL-2SA in pCEP4 vector (pSS179) and other with the addition of

TAT/TAR transactivating elements to the pSS179 (pSS185). Both IL-2SA expressing plasmid DNAs (pSS179 and pSS185) were digested with restriction enzymes and the same amount of DNAs (5 µg each) of both and uncut plasmids were transfected. A small amount of both restriction enzyme digested DNAs was used to confirm the amount of precipitated DNA to assure that same amounts and quality (to see 100 % conversion to linear form) were used in each transfection. Transfections were performed using stationary transfection method with medium supplemented with 5 % FBS. Expression levels of each plasmid were analyzed the under assumption that the linear form of plasmid abolishes oriP function, because linear DNA can not be replicated at this condition. Although oriP and TAT/TAR have an enhancing effect, when evaluated individually under the regulation of a CMV promoter, the increase is considerably low (3-5 fold) in transient transfection assays.

As shown in Figure 3, the effects of oriP element (uncut pSS179) and TAT/TAR transactivation (cut pSS185) on IL-2SA secretion were 2.7 and 6 fold, respectively, higher than that from linear form of pSS179 at 3 dpt. The fold increases at 5 dpt was 5.6 and 10, respectively. However, the uncut pSS185 (intact TAT/TAR transactivation and oriP function) showed unexpectedly higher levels (26 fold at 3 dpt and 34 fold at 5 dpt) of IL-2SA secretion than that from cut pSS179.

We tested also other vector constructions consisting of same functional element. IL-2SA expressing vectors pSC221 (TAT/TAR-dhfr), pSH201(TAT/TAR-oriP with EBNA1), and pSS226(TAT/TAR-oriP w/o EBNA1) were used to transfect HKB11 and 293EBNA cells to compare two host cells and to compare episomal vectors of TAT/TAR and TAT/TAR-oriP. See Figure 1 for the physical maps of the expression vectors. As shown in Table 1, the TAT/TAR-oriP effect (pSH201) over TAT/TAR (pSC221) was ~9-fold higher in HKB11 cells and ~4-fold higher in 293EBNA cells at 3 dpt. This effects was similar as that (4.4-fold) we observed using episomal and linear pSS185 (Figure 3). 293EBNA cells showed slightly lower secretion levels of IL-2SA than HKB11 cells, however, it was clear that TAT/TAR-oriP vector can be used in other than HKB11 cells,

70

here 293EBNA cells, for maximal protein production. We observed that TAT/TAR-oriP vector equipped with EBNA1 gene was slightly better than withoutEBNA1 gene. It seems that HKB11 and 293EBNA cells may not have enough EBNA1 protein to maintain episomal vector.

We also tested other vector constructions consisting of the same functional element. IL-2SA expressing vectors pSC221 (TAT/TAR-dhfr), pSH201(TAT/TAR-oriP with EBNA1), and pSS226(TAT/TAR-oriP w/o EBNA1) were used to transfect HKB11 and 293EBNA cells to compare two host cells and to compare episomal vectors of TAT/TAR and TAT/TAR-oriP. See Figure 1 for the physical maps of the expression vectors. As shown in Table 1, the TAT/TAR-oriP effect (pSH201) over TAT/TAR (pSC221) was ~9-fold higher in HKB11 cells and ~4-fold higher in 293EBNA cells. This effects were similar (~5-fold) to what we observed using episomal and linear pSS185 (Figure 2). 293EBNA cells showed slightly lower secretion levels of IL-2SA than HKB11 cells, however, it was clear that TAT/TAR-oriP synergistic effect was also observed in 293EBNA cells aside from HKB11 cells, for maximal protein production. We observed that TAT/TAR-oriP vector equipped with EBNA1 gene was slightly better than withoutEBNA1 gene. It seems that HKB11 and 293EBNA cells may not have enough EBNA1 protein to maintain episomal vector.

Table 1. Comparison of HKB11 and 293EBNA cells transfected with TAT/TAR and TAT/TAR-oriP vectors for IL-2SA secretion in serum-free medium at 3dpt.

Expression vector	HKB11		293EBNA	
	Titer (µg/ml)	Fold Increase	Titer (µg/ml)	Fold Increase
pSC221	0.5	1	0.52	1
pSH201	4.45	8.9	2.55	4.11
pSS226	2.98	5.9	2.27	3.8

Note: Fold increase of IL-2SA by TAT/TAR and TAT/TAR-oriP was calculated from by assuming IL-2SA production from pSC221 as 1

09675847-092800

EXAMPLE 2

Protein expression in transient transfection assays using BMLF1-oriP expression vectors

BMLF1 was originally known as a promiscuous transactivator (Lieberman et al., J Virol 60:140-148, 1986). Since then, this protein has been found to be post-transcriptional transactivator (Kenney et al., J. Virol, 63:3870-3877, 1989), and most recently described as a transactivator for intronless gene expression and as an inhibitor for intron linked gene expression (Ruvolo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8852-8857). We tested the BMLF1 protein for transactivating function of mammalian gene expression (IL-2SA). The IL-2SA coding sequence without 5'-IS inserted in downstream of CMVe/p of pSS210 is pSS212. IL-2SA expressing coding sequence was modified by adding TAR sequence at the 5'end of IL-2SA (pSS213) and further modified by adding an intronic sequence (MIS) at 5-end of IL-2SA of pSS213, resulting in vector pSS214. See Figure 2 for physical maps of individual expression vector. Stationary transient transfection assays indicated that BMLF1 protein enhanced IL-2SA expression regardless of intron by 3-4 fold in HKB11 (Table 2) and by 10-20 fold in CHO cells (Table 3) using serum-containing medium.

Table 2. Comparison of IL-2SA production (3 dpt) from HKB11 cells transfected with various IL-2SA expressing vectors in serum-containing medium.

Expression Vectors	IL-2SA titers (μg/ml)			Fold Increase (Average)
	Exp. I	Exp. II	Exp. III	
pSS179	0.84	1.24	0.27	1
pSS212	3	4.4	1.23	4
pSS213	2.78	4.16	0.81	3.2
pSS214	2.48	3.1	1.1	3.2

Note: Fold increase of IL-2SA production by BMLF1 was calculated from the average of three experiments by assuming IL-2SA production from pSS179 as 1.

As described in Figure 3, pSS212, pSS213, and pSS214 have IL-2SA expressing segments equipped at 5' end of the molecule with intron-less, intron-less with TAR, and TAR-MIS, respectively.

09675347.092800

Table 3. Comparison of IL-2SA production (3 dpt) from CHO cells transfected with various IL-2SA expressing vectors in serum-containing medium.

Expression	IL-2SA titers ($\mu\text{g/ml}$)			Fold increase
Vectors	Exp. I	Exp. II	Exp. III	(average)
pSS179	0.082	0.058	0.042	1
pSS212	0.275	0.77	0.7	11.2
pSS213	0.23	0.88	1.33	16.6
pSS214	0.225	1.46	1.52	21.5

Note: Fold increase and expression vectors are described in Table 2.

008260-4854960

EXAMPLE 3**Protein production in prolonged transient transfection assays**

To make larger amount of proteins, we tested these transactivating proteins in oriP plasmid in prolonged culture time post transfection up to 10 days. In this experiment, we used a basic expression vector of IL-2SA (pSL160N), an IL-2SA expression vector supplemented with TAT/TAR transactivating elements (pSC221), an IL-2SA expression vector with oriP element alone (pSS225), and IL-2SA expression element with both TAT/TAR transactivating elements and oriP element (pSS185). See Figure 1 for the physical maps of the plasmid structure. HKB11 cells adapted to serum-free suspension condition were transfected under shaking transfection method as described earlier. The transfected cells were sub-cultured using serum-free medium by splitting 4-5 fold twice at 3 dpt and 7 dpt through 10 days period post transfection. The total transfected culture volume was increased by 20- 25 fold.

We observed that the oriP effect and TAT/TAR transactivation effects (Table 4) were slightly different than the data shown in Figure 3, which might be explained by the different plasmid states of linear form of oriP-plasmid DNA (e.g. linearized pSS179 and pSS185) and plasmid structure without oriP element (e.g. pSL160N and pSC221). For example, a baseline expression vector of linear pSS179 was assumed to show the same result with pSL160N and linear pSS185 was assumed to be the same as pSC221 because of interrupted oriP function by linearizing the plasmid structure. However, the combined effect of TAT/TAR and oriP function was similar. During this prolonged culture time, as shown in Table 4, the increase seen in protein expression (IL-2SA titers) was maintained without drastically decreased expression-levels. The total yield of IL-2SA production from pSS185 (IL-2SA expressing vector with TAT/TAR and oriP elements) in the prolonged transient transfection time (10 days) showed extremely high yield of the protein (460.8 µg) from 5 µg of transfected DNA with 5×10^4 starting cell number, while the non-optimized expression vector (pSL160N) in 3 day-culture using the same amounts of

74

DNA and cells can harvest only 28.8 μ g of the protein at 10 dpt and 1.4 μ g of protein at 3 dpt using a standard expression vector.

This system was shown to be easily scaled up for the use of efficient production of proteins, e.g. when 50×10^6 HKB11 cells (50 ml culture) were transfected with 50 μ g of pSS185, we could obtain approximately 5 mg of protein at 10 days post transfection with a final culture volume of one liter. In our experience, we found that this effect is proportional and that production of protein from 500 μ g of DNA using shake flask was approximately 100 fold more than what was found in a standard transfection using 5 μ g DNA in 6-well format. This result of larger scale transfection indicates that we can save in the cost of DNA preparation and transfection reagents using this prolonged scale up transfection system when compared to standard transfection system which use 20-25 fold more initial materials (DNA, transfection reagent, and cells).

As shown in Figure 4 and 5, BMLF1 transactivator could not be utilized in a prolonged transfection system, because the titers of IL-2SA and cell number decreased drastically after 3 dpt and. The BMLF1 protein might be toxic, ultimately, to the BMLF1 expressing cells in the prolonged transient transfection mode.

Table 4. Comparison of IL-2SA production in a prolonged and scaled-up transient transfection system using various expression vectors under serum-free condition.

Expression vectors	Titer (μ g/ml)			Total yields (μ g)		
	3 dpt	7 dpt	10 dpt	3 dpt	7 dpt	10 dpt
pSL160N	0.28	0.36	0.36	1.4	7.2	28.8
pSS221	0.64	0.68	0.74	3.2	13.6	58.2
pSS225	1.22	1.42	1.31	6.1	28.4	104.8
pSS185	5.08	7.29	5.76	25	145.8	460.8

Note: Total yields indicate a multiplication of IL-2SA titers (μ g/ml) by volume (ml).

pSL160N: IL-2SA coding sequence in a dhfr vector

pSS221: IL-2SA coding sequence in a TAT/TAR vector

pSS225: IL-2SA coding sequence in an oriP vector

pSS185: IL-2SA coding sequence in a TAT/TAR-oriP vector.

Cells were split 1:4 at 3dpt and 1:5 at 7 dpt.

09675847.092800

25

EXAMPLE 4

Protein expression under the drug selection

IL-2SA expression from oriP vectors, pSS178 and pSS179 (see Figure 1 for physical maps of the plasmids), were tested and compared to IL-2SA expression from a TAT/TAR-oriP vector, pSS185, under the drug selection to obtain drug resistant cells for larger scale protein production for even longer periods of time. HKB11 cells growing in a shake flask under serum-free condition were transfected with the three expression vectors using 6-well format. Three days post transfection, transfected cells were inoculated into a shake flask, 2×10^6 cells in 20 ml of serum (5 %) containing medium supplemented with 100 $\mu\text{g/ml}$ of hygromycin B (HygB). Cells were sub-cultured twice per week using this same selection media. Cells were centrifuged and resuspended in the same volume of fresh medium in the first three passages. After this initial selection phase, cell culture were sub-cultured by maintaining cell density of 5×10^5 cells /ml. Titers of IL-2SA production from each passage were measured by an ELISA. Four weeks post production the IL-2SA productivity from pSS185 was maintained at higher titer than those from pSS178 and pSS179 by over 10 fold (Figure 6). These results indicate that TAT/TAR transactivating elements with oriP elements together (pSS185) under drug selection system show much higher productivity when compared to IL-2SA productivity from oriP vectors, pSS178 and pSS179.

EXAMPLE 5

TAT/TAR-oriP system for highthroughput transfection

Although the TAT/TAR-oriP expression vector showed unexpectedly high expression of protein, the size of the vector is too large to use in high throughput cloning. Therefore, we separated the expression vector into two functional groups. The main cloning vector (5.9 kb) consists of CMVe/p, TAR, MIS, cloning site (PvuII) and polyA signal in an oriP vector, pSS223. The TAT expressing oriP vector (8.7 kb) pSC186 plasmid was co-

09675847.092800

transfected plasmid. In transient transfection assays for high throughput screening, we can transfect 5 µg of pSS223 with the gene of interest and 1 µg of TAT expressing oriP plasmid pSS186. As shown in Figure 7, we inserted the IL-2SA and IL-4 coding sequences into PvuII cloning site of pSS223. The resulting plasmids are pSS240 and pSS241, respectively. HKB11 cells were co-transfected with 5 µg of pSS240 or pSS241 and 1 µg of pSC186 in a shaking transfection mode under serum-free condition. We observed a similar result of 3-5 fold increase in cotransfection assays (Table 5) as in TAT/TAR-oriP vector (pSS185) over oriP vector (pSS225) (Table 4). This result indicates that the cotransfection method of the two functionally separated plasmids is equivalent to the transfection of the single expression vector consisting of both TAT/TAR and oriP elements.

Table 5. Comparison of protein production (µg/ml) from TAR-oriP vector to those from the cotransfection with TAT-oriP vector

	Single transfection	Cotransfection with pSC186	Fold increase
IL-2SA (3dpt)	4.28	14.2	3.3
IL-2SA (6dpt)	3.07	15.9	5.1
IL-4 (3dpt)	13.4	41.6	3.1
IL-4 (6dpt)	11.6	37.2	3.2

Note: Fold increase was calculated from the cotransfection values over the values of single transfection.

DISCUSSION

Heterologous proteins expressed by mammalian cells usually have a better or more desirable qualities for characterizing the proteins than proteins expressed from non-mammalian cells and, thus, mammalian cells are preferred. However, the quantity of the protein made by mammalian cell is usually smaller than other systems. To compensate the above problems, we optimized a transient transfection system to produce "fast track" protein production. Our results are based on many factors as follows:

1. Optimized HKB11 cell host that was adapted to a serum-free suspension condition.
2. Shaking transfection methods using serum-free medium. In this method, we could use a larger initial cell density under optimal growth conditions, which can subsequently produce more protein. In stationary transfections, more than 1.5×10^6 cells per well could not be used for transfection, because of the non-optimal growth condition of cells growing as a monolayer. Using monolayer cells (e.g. CHO cells) for transfection, shaking conditions of transfected culture provided more protein secretion (2-3 fold) over non-shaking conditions, for reasons not entirely clear.
3. Optimized expression vectors using the oriP element, which can maintain transferred plasmid as episomes, and transactivation elements, which can enhance protein expression, simultaneously.
4. The most critical part and unexpected result of this improved transfection system were the combination of oriP element and TAT/TAR transactivation elements for protein expression and such combination in a single vector or transfection system has not been suggested in the prior art.

The experiment using CHO cells was not pursued intensively after obtaining the ineffective data in TAT/TAR-oriP transactivation system and based on the following published information. An oriP plasmid is not replicating efficiently (Yates et al., Nature 313:812-815, 1985 and Mizuguchi et al., FEBS lett 472:173-178, 2000) in rodent cells and CHO cell lacks cellular factors for TAT/TAR transactivation system (Alonso et al., J Virol 66:4617-4621, 1992 and Wimmer et al., Virology 255:182-189, 1999).

Given the above disclosure, it is though variations will now occur to those skilled in the art. Accordingly, it is intended that the above examples should be construed as illustrative and that the scope of the inventions disclosed herein should be limited only by the following claims.

09675847.092800

CLAIMS

1. A mammalian cell gene expression vector system including a plurality of plasmids and comprising:
- a. an episomal maintenance system,
 - b. A strong promoter/enhancer,
 - c. A protein transactivation system, and
 - d. DNA coding for a heterologous protein.
2. The system of claim 1 wherein the episomal maintenance system comprises an element oriP element and EBNA1 expressing gene.
3. The system of claim 1 wherein the oriP element and EBNA1 expressing gene are on the same plasmid.
4. The system of claim 1 wherein the oriP element and EBNA1 expressing gene are on separate plasmids.
5. The system of claim 1 wherein the oriP element on a plasmid and the EBNA1 protein in the host cells.
6. The system of claim 1 wherein the strong promoter/enhancer is CMV.
7. The system of claim 1 wherein the protein transactivation system includes both TAT and TAR elements.
8. The system of claim 7 wherein the TAT and TAR elements are on the same plasmid.
9. The system of claim 7 where the TAT and TAR elements are on separate plasmids.

10. The system of claim 7 wherein TAR element is on a plasmid and TAT element is in the expressing cells.
11. The system of claim 1 wherein the protein transactivation system includes BMLF1 protein.
12. The system of claim 11 wherein the BMLF1 gene is on the same plasmid.
13. The system of claim 11 wherein the BMLF1 gene is on a separate plasmid.
14. The system of claim 11 wherein the BMLF1 protein is expressed in the cells.
15. The expression vector system of claim 1 wherein the heterologous protein is selected from the group consisting of IL-2SA and IL-4R.
16. The system of claim 1 wherein the mammalian cell line is from a primate.
17. A mammalian cell line comprising the mammalian gene expression vector system of claim 1.
18. The mammalian cell line of claim 17 wherein the cell line is HKB11.
19. The mammalian cell line of claim 17 wherein the cell line is 293EBNA.
20. The mammalian cell line of claim 17 wherein the cell line is a 293 cell line.
21. A method of expressing a heterologous protein using a cell line of claim 1.

ABSTRACT

A mammalian cell gene expression vector system comprising (a) an episomal maintenance system (b), a strong promoter/enhancer, (c) a protein transactivation system and (d) DNA coding for a heterologous protein. The episomal maintenance and protein transactivation systems can include sub-elements located on the same or different plasmids within the cell expression system.

09675847.092800

DECLARATION FOR PATENT APPLICATION

Docket Number (Optional)
MSB-7270

As a below named inventor, I hereby declare that:

My residence, post office address and citizenship are as stated below next to my name.

I believe I am the original, first and sole inventor (if only one name is listed below) or an original, first and joint inventor (if plural names are listed below) of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought on the invention entitled ENHANCED TRANSFECTION SYSTEM, the specification of which

is attached hereto unless the following box is checked:

☐ was filed on _____ as United States Application Number or PCT International Application Number _____ and was amended on _____ (if applicable).

I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above identified specification, including the claims, as amended by any amendment referred to above.

I acknowledge the duty to disclose information which is material to patentability as defined in Title 37, Code of Federal Regulations, § 1.56.

I hereby claim foreign priority benefits under Title 35, United States Code, § 119 of any foreign application(s) for patent or inventor's certificate listed below and have also identified below any foreign application for patent or inventor's certificate having a filing date before that of the application on which priority is claimed.

Prior Foreign Application(s)

(Number)	(Country)	(Day/Month/Year Filed)
<u>NONE</u>		
<u>01</u>		
<u>02</u>		
<u>03</u>		

Priority Claimed

☐ Yes ☐ No☐ Yes ☐ No☐ Yes ☐ No

I hereby claim the benefit under Title 35, United States Code, § 120 of any United States application(s) listed below and, insofar as the subject matter of each of the claims of this application is not disclosed in the prior United States application in the manner provided by the first paragraph of Title 35, United States Code, § 112, I acknowledge the duty to disclose information which is material to patentability as defined in Title 37, Code of Federal Regulations, § 1.56 which became available between the filing date of the prior application and the national or PCT International filing date of this application.

(Application Number)	(Filing Date)	(Status - patented, pending, abandoned)
<u>NONE</u>		
<u>01</u>		
<u>02</u>		

I hereby appoint the following attorney(s) and/or agent(s) to prosecute this application and to transact all business in the Patent and Trademark Office connected therewith: James A. Giblin, Reg. No. 25, 772
Melissa A. Shaw, Reg. No. 38,301Address all telephone calls to James A. Giblin at telephone number (510) 705-7910Address all correspondence to James A. Giblin
Bayer Corporation
800 Dwight Way
Berkeley, CA 94701

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Full name of sole or first inventor (given name, family name) Myung-Sam ChoInventor's signature Myung-Sam Cho Date 9/28/00Residence Pleola, California Citizenship U.S.A.Post Office Address 3256 Ramona StreetPleola, California 94584Full name of second joint inventor, if any (given name, family name) Helena YeeSecond inventor's signature Helena Yee Date 9/28/00Residence San Francisco, California Citizenship U.S.A.Post Office Address 154 Vienna StreetSan Francisco, California 94112☐ Additional inventors are being named on separately numbered sheets attached hereto.

00675847.092800

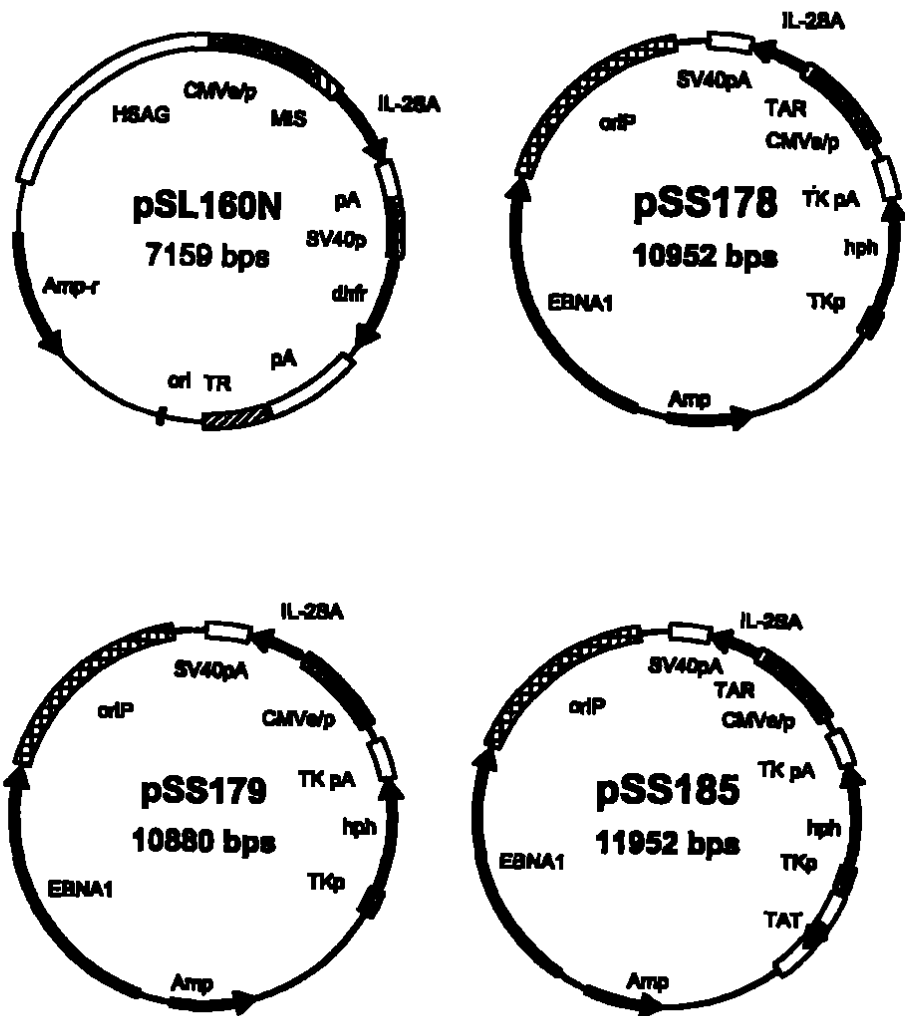


Figure 1-1

008260-4854960



Figure1-2

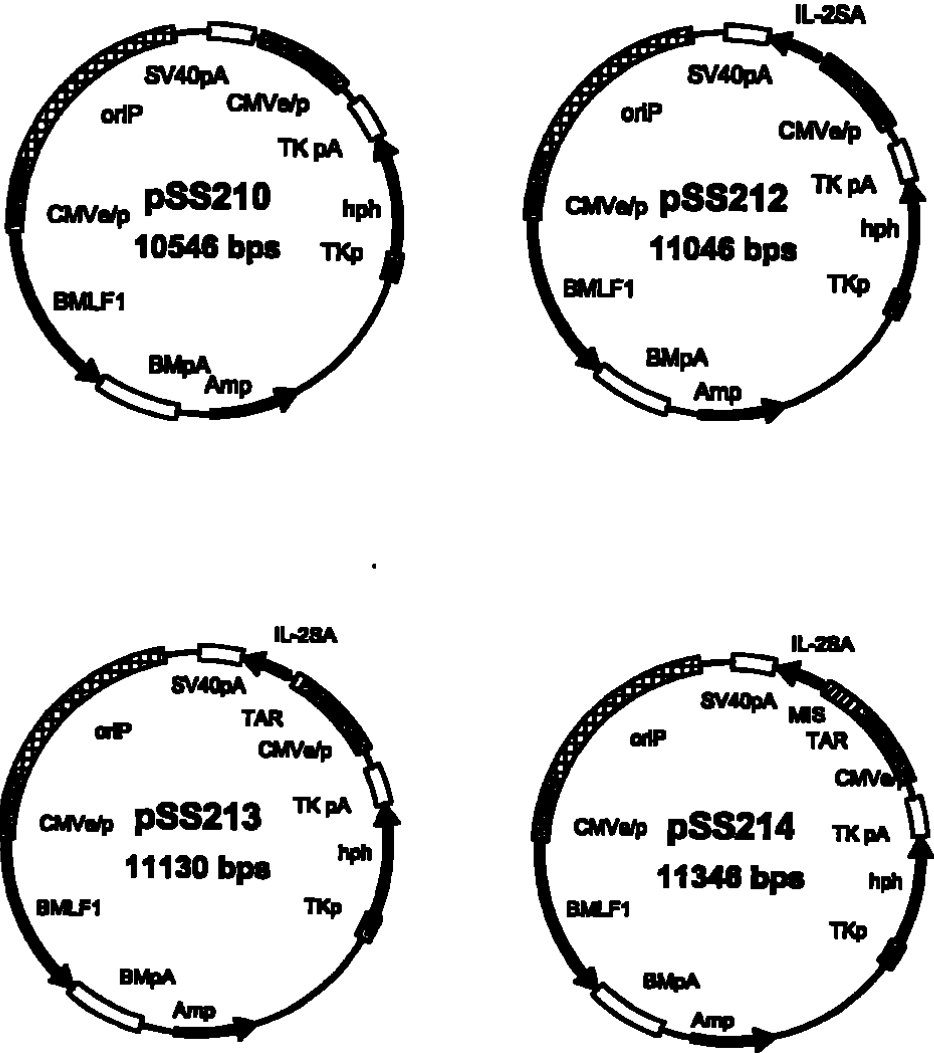


Figure 2

008260.4357960



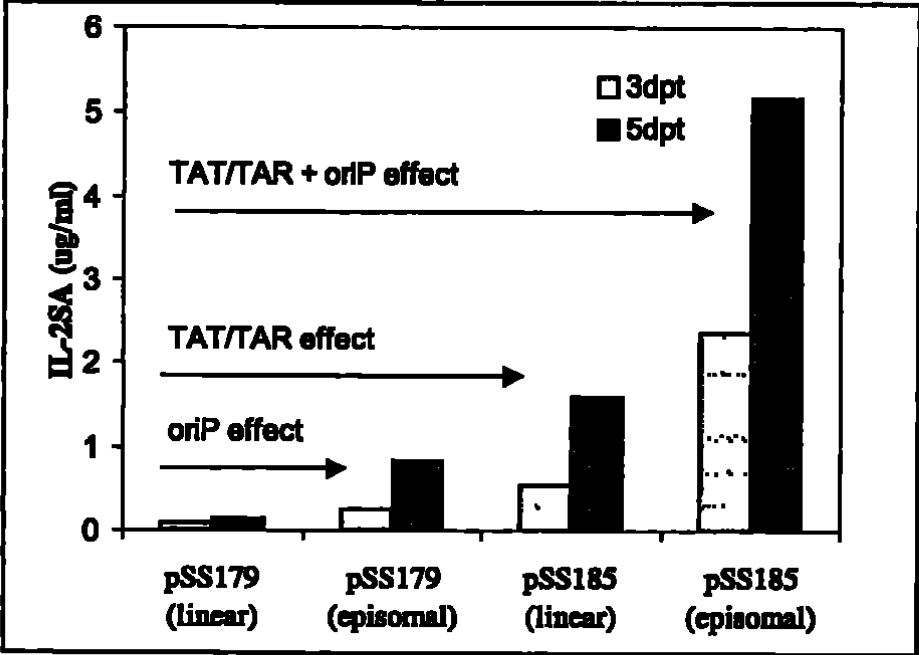


Figure 3

008260-24852960

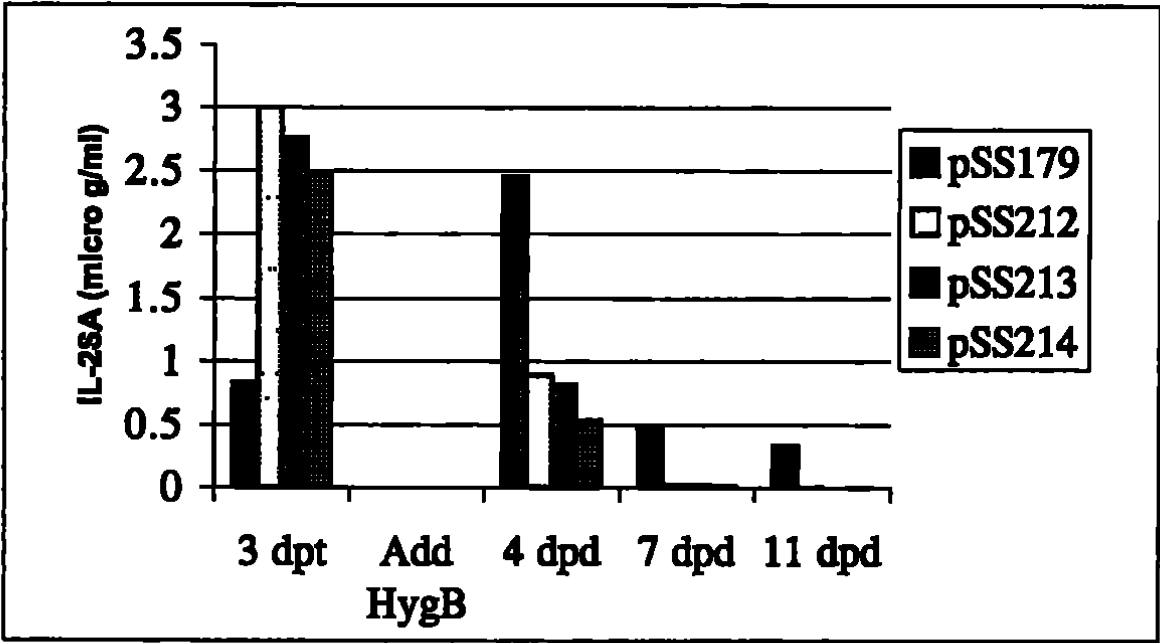


Figure 4

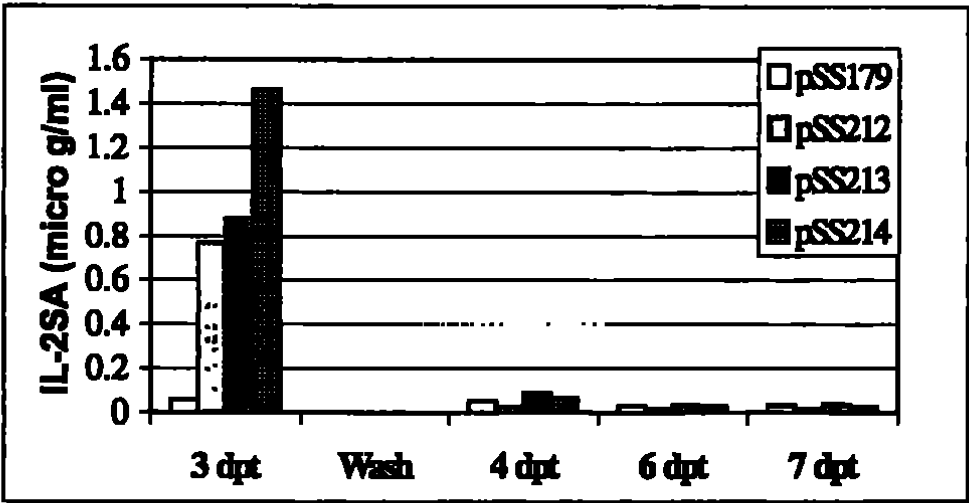


Figure 5

008260-4852960

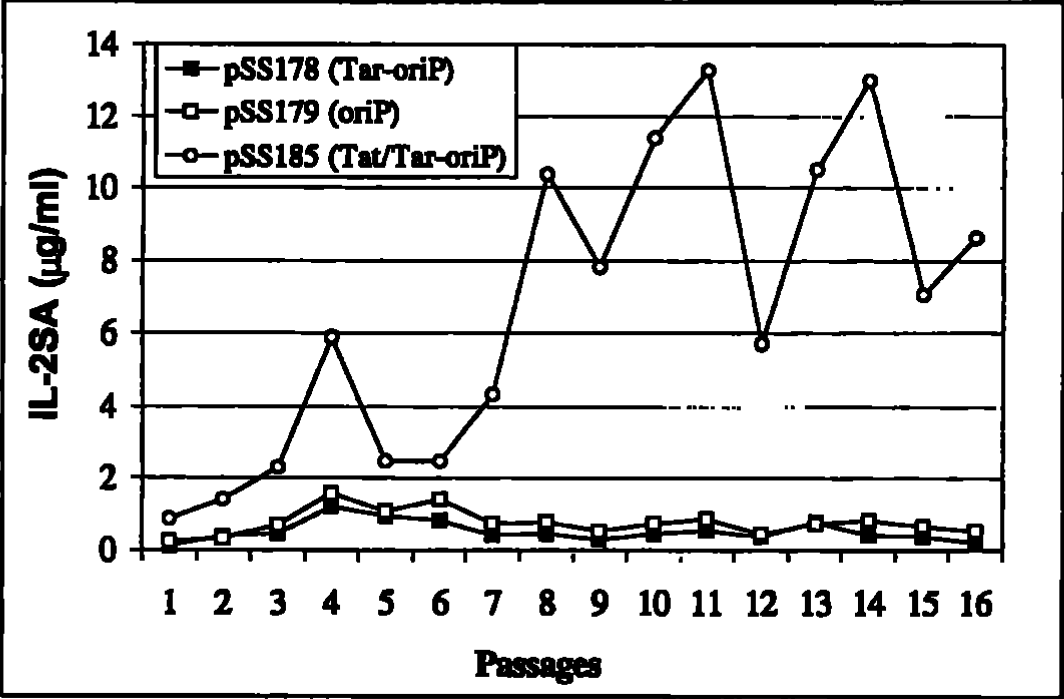


Figure 6

008260-4857960

008260-4852960



Figure 7

TRADUCCIÓN**(EMBLEMA)****ESTADOS UNIDOS DE AMERICA****A QUIEN CORRESPONDA**

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS
Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

17 de agosto, 2001

SE CERTIFICA QUE SE ADJUNTA A LA PRESENTE UNA COPIA FIEL DE LOS REGISTROS DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS DE LOS DOCUMENTOS DE LA SOLICITUD DE PATENTE IDENTIFICADA DEBAJO QUE REUNE LOS REQUISITOS PARA QUE SE LE OTORQUE UNA FECHA DE PRESENTACIÓN SEGUN LO PREVISTO EN EL ARTICULO 35 "USC" (CODIGO DE LOS ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMERICA) 111.

NUMERO DE SOLICITUD: ~~09~~675.847

FECHA DE PRESENTACION: 28 de Setiembre del 2000

(Aparece una oblea dorada que reza:) Oficina de Patentes y Marcas. Estados Unidos de América.

Por autorización del
COMISARIO DE PATENTES Y MARCAS
(Aparece una firma ilegible debajo de la cual se lee:) E. BORNETT
Funcionario Certificante

SOLICITUD DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Título: Técnica de Transfección Intensificada

Inventores: Myung-Sam Cho y Helena Yee

[En el costado izquierdo de todas las páginas dice: 09675847.092800 (28 de setiembre del 2000)]

Campo: Esta invención se refiere en general a una mejora de los sistemas de expresión en células de mamíferos y se relaciona en especial con un sistema vector de expresión génica en células de mamíferos que incluye un sistema de mantenimiento episomal, un fuerte promotor / intensificador, un complejo de transactivación de proteínas y un ADN que codifica para una proteína heteróloga.

Antecedentes: Bien se sabe que diversas células huésped, tales como las células microbianas, células de levadura, células de insectos y células de mamíferos son capaces de producir pequeñas cantidades (cantidades en miligramos) de proteínas específicas en períodos de tiempo relativamente cortos. Se sabe también que las proteínas procedentes de diferentes sistemas de células huésped genéticamente modificadas generan proteínas con diferentes perfiles de glicosilación, dependiendo de la célula empleada. Para aplicaciones farmacéuticas, en algunos casos es conveniente producir proteínas que tengan perfiles de glicosilación similares a los encontrados en los humanos. Esto se logra habitualmente utilizando un sistema celular de mamífero, ya que dichos sistemas producen proteínas con glicosilaciones compatibles con aplicaciones clínicas. La desventaja de emplear células de mamíferos es que típicamente requieren un período de tiempo más prolongado para producir una cantidad equivalente de proteína. Por consiguiente, sería muy ventajoso contar con un sistema de expresión en células de mamífero genéticamente modificadas (para expresar proteínas heterólogas) que puedan expresar cantidades mayores de la proteína en períodos de tiempo más breves.

Se sabe que se pueden introducir diversos elementos de mantenimiento episomal en un vector de un sistema de expresión génica, a fin de garantizar la replicación. También se sabe que los sistemas genéticamente modificados

pueden incluir potentes sistemas de promotores/intensificadores, y en muchos casos se debe hacerlo. Además, se sabe que las líneas celulares genéticamente modificadas pueden incluir sistemas de transfección de proteínas para intensificar la expresión de proteínas de un ADN que codifica para una proteína heteróloga que también se incorpora al sistema. En el marco de dichos antecedentes, no tenemos conocimiento alguno de intentos o sugerencias de incorporar los cuatro elementos o sistemas antes mencionados en un sistema de expresión único en células de mamíferos de manera que estén presentes las ventajas combinadas de todos los elementos en un solo sistema efectivo que exprese proteínas heterólogas. Para sorpresa nuestra, cuando se efectuó la mencionada combinación utilizando las técnicas descritas a continuación, encontramos lo que parece ser un efecto sinérgico sobre la expresión de proteínas. A continuación se describen ejemplos representativos de dos proteínas heterólogas (a las que se designa IL-2SA e IL-4SA).

SINTESIS DE LA INVENCION

Nuestro sistema vector de expresión génica en células de mamíferos comprende:

- (a) un sistema de mantenimiento episomal;
- (b) un fuerte promotor / intensificador
- (c) un complejo de transactivación de proteínas y
- (d) ADN que codifica para la proteína heteróloga.

El sistema de mantenimiento episomal y el complejo de transactivación de proteínas pueden incluir subelementos que están situados en los mismos o diferentes plásmidos dentro del sistema de expresión en células de mamíferos. En una técnica preferida, el sistema de mantenimiento episomal está compuesto por un elemento oriP y un gen que expresa EBNA1. Un fuerte promotor/intensificador

es CMV y el complejo de transactivación de proteínas preferido incluye tanto a los elementos TAT como TAR. Una secuencia codificadora de ADN preferida para la proteína heteróloga incluye ADN que codifica para sustancias (a las que se describe más adelante en forma más detallada) conocidas como IL-2SA e IL-4SA. Una línea celular de mamífero preferida procede de un primate, si bien se pueden utilizar otras líneas celulares de mamíferos. Se ha de tener en cuenta, sin embargo, que las líneas celulares preferidas no deben ser de roedores por las razones expuestas más adelante.

Los componentes empleados para demostrar nuestros sistemas son los que se describen a continuación:

1. Se suplementó un vector de expresión basado en pBR322 con el elemento intensificador/ promotor CMV (descrito en la patente de los Estados Unidos No: 5.854.021).

2. Los elementos EBNA1 y oriP, que pueden sostener el mantenimiento del plásmido ADN como estructura episomal (Yates y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3806-3810 y la patente de los Estados Unidos No: 4.686.186) fueron agregados al vector de expresión antes mencionado.

3. Los elementos TAT (gen transactivador) y TAR (secuencia de respuesta transactivadora), que pueden sostener la función transactivadora de la proteína TAT (descrita en la patente de los Estados Unidos No: 5.801.056), designados en este documento como elementos TAT/TAR, fueron agregados al vector de expresión para dar origen a un vector de expresión oriP con los elementos TAT/TAR.

4. Se insertó en el vector BMLF1 (Lieberman y otros, J Virol 60: 140-148, 1986, Kenney y otros, J Virol 63: 3870-3877, 1989 y Ruvolo y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8852-8857) originado a partir del virus de Epstein-Barr.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Las Figuras 1-1 y 1-2 ilustran mapas físicos de los vectores de expresión de la muteína de Interleuquina-2 (designada IL-2SA) necesarios para el estudio de transfección de la optimización de los vectores de expresión, que incluyó a los elementos oriP y TAT/TAR.

La Figura 2 ilustra mapas físicos de los vectores de expresión para el estudio de transfección del efecto de transactivación de BMLF.

La Figura 3 es un gráfico que ilustra la intensificación de la secreción de IL-2SA en ensayos de transfección transitoria utilizados para identificar y comparar el efecto de oriP, el efecto de transactivación de TAT/TAR y los efectos de transactivación de TAT/TAR más oriP. Nótese que adoptamos el pSS179 linealizado como línea de base del nivel de expresión de IL-2SA puesto que se debe abolir la función de oriP tras la linealización mediante el uso de una enzima de restricción y lo mismo ocurre con el pSS185 linealizado.

La Figura 4 ilustra los efectos de la transactivación de BMLF1 sobre la secreción de IL-2SA de células CHO en un tiempo de cultivo prolongado. A 3 dpt, se trató a las células con tripsina y se las sembró con el mismo número de células en un pocillo con medio fresco suplementado con SFB al 5 %. Los niveles de secreción de IL-2SA originados en células DHO transfectadas con pSS179 se mantuvieron igualmente de 4-7 dpt con los de 3 dpt. Sin embargo, los niveles de expresión de las células CHO transfectadas con pSS212, 213 y 214 al cabo de 4 dpt no exhibieron efecto intensificado sobre la actividad de transfección de BMLF1 que se puso de manifiesto a los 3 dpt.

La Figura 5 ilustra los efectos de transactivación de BMLF1 sobre la secreción de IL-2SA de células HKB11 en un tiempo de cultivo prolongado bajo la selección de fármacos. Los efectos de transactivación de BMLF1 vistos a los 3 dpt, de células HKB11 transfectadas con pSS212, 213 y 214 fueron anulados

después de agregar HygB, si bien el efecto de TAT/TAR se mantuvo bajo la selección de fármacos como se ilustra en la Figura 6.

La Figura 6 ilustra los efectos de transactivación de TAT/TAR sobre la secreción de IL-2SA de células HKB11 bajo la selección de higromicina B. Las células transfectadas se mantuvieron de acuerdo con lo descrito en el texto.

La Figura 7 ilustra mapas físicos de los vectores de expresión utilizados para el estudio de cotransfección para la expresión de alto rendimiento.

REALIZACIONES ESPECÍFICAS

Materiales y Métodos

Células

Células de riñón embrionario humano (293) (ATCC CRL-1573)

293EBNA (células 293 que expresan EBNA 1) obtenidas de Invitrogen (Carlsbad, CA).

Células CHO (Ovario de Hamster de China) dihidrofolato reductasa (dhfr)-negativas, que fueron obtenidas de Genentech Inc.

HKB11 (ATCC, CRL-12568) es una línea celular híbrida somática humana (Solicitud de patente de los Estados Unidos No: No. 09/209.920) derivada de fusiones celulares de células de riñón embrionario humano (293S) y células de origen de linfoma de Burkitt (P3HR-1).

Construcción de Plásmidos

La IL-2SA es una muteína de IL-2 que tiene una sola sustitución de aminoácidos (N88R), de acuerdo con lo descrito en WO 99/60128. A continuación se presenta una breve descripción de los vectores de expresión individuales de las Figuras 1-1 y 1-2.

pSL160N: se insertó una secuencia codificadora de IL-2SA en el sitio PvuII de pSM97 y se lo modificó además mediante la adición del elemento HSAG1 (fragmento EcoRI y XbaI; 1447 pb) descrito por McArthur y Stanners (J Biol Chem 266: 6000-6005, 1991) en el sitio SpeI de pSM97 y EBV-TR (Cho y otros, solicitud de patente de los Estados Unidos No: 98/209.915) en el sitio NaeI de pSM97.

pSS179: se insertó una secuencia codificadora de IL-2SA en el sitio BamHI/XhoI de pCEP4.

pSS178: el elemento TAR (82 pb) está situado en línea de entrada de pSS179 con respecto a IL-2SA.

pSS185: Se insertó un elemento funcional TAT descrito en la construcción del plásmido en el sitio NruI (sitio en línea de entrada del promotor TK) de pSS178.

pSH201: Una secuencia intrónica, MIS (~270 pb) estaba ubicada en el extremo 3' de la secuencia TAR (NotI/HindIII) de pSS185.

pSC221: Se omitió el elemento HSAG de pSL160N y el elemento TAR estaba situado en el extremo 3' de CMVe/p y en el extremo 5' de MIS.

pSS225: Se escindió EBNA1 y TAT funcional, así como los segmentos de alta expresión de hph de pSH201.

pSS226: Se insertó un elemento de expresión de TAT funcional en el extremo 5' del gen amp-r de pSS225.

La descripción del vector de expresión individual de la Figura 2 es la siguiente:

pSS210: el plásmido oriP que expresa BMLF1 y bph fue descrito en la sección de construcción de plásmidos.

pSS212: la secuencia codificadora de IL-2SA estaba situada en el extremo 3' de CMVe/p con respecto a pSS210.

pSS213: Un elemento TAR está situado en el extremo 3' de IL-2SA con respecto a pSS212.

pSS214: Se agrega además una secuencia intrónica, MIS, en el extremo 5' de IL-2SA con respecto a pSS213.

A continuación se presenta una breve descripción de la estructura de los plásmidos individuales de la Figura 7:

pSS223: Este plásmido es básicamente igual a pSS225, aunque carece de la secuencia codificadora de IL-2SA.

pSC186: Había una secuencia codificadora de TAT situada en el extremo 3' de CMVe/p con respecto a pCEP4 y se suprimió el segmento funcional de expresión de hph.

pSS240: se insertó la secuencia codificadora de IL-2SA en el sitio PvuII de pSS223.

pSS241: Se insertó la secuencia codificadora de IL-4 en el sitio PvuII de pSS223.

El vector de expresión en células de mamífero a base de pBR322 con expresión de un gen funcional dhfr (pSM97; Cho y otros, patente de los Estados Unidos No: 5.854.021). El vector pCEP4, que consistía en oriP, EBNA1 y la expresión del gen funcional hph basado en pBR322 fueron obtenidos de Invitrogen (Carlsbad, CA).

Se prepararon ochenta y dos pares de bases del elemento TAR por PCR utilizando pBennCAT (Gendelman H.E. y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 9759-9763, 1986) como patrón. Se prepararon dos cebadores agregando el sitio KpnI en el extremo 5' de TAR y el sitio HindIII en el extremo 3' de TAR. El producto de PCR así obtenido fue digerido con HindIII y KpnI e insertado en pCEP4 después de la digestión de pCEP4 con KpnI y HindIII. El segmento de expresión del gen funcional TAT fue preparado a partir de pSVTAT (Peterlin B.M y

otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 0734-9738, 1986) digiriéndolo con BamHI (modificado con el fragmento Klenow) y HpaI.

Este fragmento fue insertado en pSV₂neo después de la digestión con PvuII y HpaI. Este segmento de expresión funcional de TAT puede ser fácilmente escindido mediante la digestión con PvuII y BamHI para insertarlo en cualquier otro vector de expresión, como se ilustra en la Figura 1 (pSS185 y pSC221). La secuencia codificadora de BMLF1 y el área de señal de poliA fueron preparados a partir de B95-8 EBV que abarcaba la secuencia de ADN desde 84301 (NheI) a 82180 (HindIII) de los datos de secuencia de B95/8 EBV (P.J. Farrell, "Epstein-Barr Virus Genome" en Advanced Viral Oncology; editado por G. Klein; Ravens Press, Ltd., Nueva York 1989, pág. 103-132) e insertados en el sitio PvuII de pCEP4, un vector con CMV/e/p. Esta expresión de BMLF1 está ahora bajo el control de CMVe/p.

Se eliminó de este vector el segmento de expresión funcional de BMLF1 mediante digestión con SpeI y NheI y se construyó un nuevo vector de expresión. Este plásmido obtenido, pSS210, se encuentra en la Figura 2. Se utilizó a mutelna de Interleuquina-2 (N88R) conocida como IL-2SA (solicitud de patente Acta No. WO9960128, IL-2 Selective Agonists and Antagonists).como gen reportero.

Transfección

Se ejecutaron transfecciones estacionarias utilizando las células en cultivo de modo dependiente del anclaje. Se sembraron células HKB11 en crecimiento logarítmico ($1,5 \times 10^6$ células) en 4 ml de medio fresco con SFB al 5 % o sin suero, en un pocillo de una placa de cultivo de tejidos con formato de 6 pocillos (Corning Inc., Corning, NY) y se lo dejó adherir al fondo de la placa por espacio de dos o más horas en un incubador humedecido con CO₂ a 37°C. Se preparó un cocktail (1 ml) que consistía en 5 µg de ADN y 20 µl de reactivo DMRIE-C (Life

Technologies, Rockville, MD) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se lo agregó al pocillo y se mezcló suavemente. Las placas fueron incubadas en el incubador con CO₂.

Se llevaron a cabo transfecciones con agitación utilizando las células adaptadas a las condiciones de suspensión sin suero. Se mezclaron células HKB11 en crecimiento logarítmico (5×10^6 células) en 4 ml de medio fresco con un ml del complejo ADN/DMRIE-C al igual que en la transfección estacionaria anterior. Estos 5 ml de células transfectadas en un formato de 6 pocillos fueron incubados en un agitador (90-100 rpm) en un incubador con CO₂ humedecido. Las células transfectadas fueron subcultivadas a 3 y 7 días después de la transfección (dpt) dividiéndolas 1:4 o bien 1:5. El volumen de cultivo total fue incrementado desde el volumen de transfección inicial a 20 veces a los 10 dpt. Se analizó el sobrenadante del cultivo tisular mediante un ELISA para determinar los niveles de secreción de proteínas.

ELISA

Para la detección de IL-2SA, se revistieron placas de fondo redondo Dynatech Immulo-2 con 1 µg/ml de IL-2 antihumana purificada (PharMingen, San Diego, CA) de rata utilizando buffer de NaHCO₃ 0,1 M (pH 8,2), incubado a 37°C por espacio de 3 horas en una cámara humedecida, se las lavó con PBS/Tween 20 al 0,05 % (Sigma P-1379, St. Louis, MO) y se las bloqueó con PBS/BSA al 1 % durante una hora a temperatura ambiente. Los sobrenadantes del cultivo, que contenían IL-2SA y un patrón de IL-2SA purificada (como curva standard) fueron diluidos en serie con PBS/ BSA al 1 % (50 µl/pocillo) e incubados a temperatura ambiente por espacio de dos horas. Se detectó la IL-2SA capturado utilizando IL-2 biotinilada de ratón (62,5 ng/ml; PharMingen, San Diego, CA) seguida por incubación con HRP-estreptavidina (125 ng/ml; Zymed Laboratories Inc. #43-

4323, San Francisco Sur, CA). Entre todas las incubaciones (una incubación de una hora cada una a temperatura ambiente), las placas fueron lavadas con PBS/Tween 20. Las placas fueron reveladas utilizando soluciones sustrato de tetrametilbencidina (TMB; Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. Producto # 50-65-00 y 50-76-01, Gaithersburg, MD) y la reacción fue detenida con HCl 1 N. Se midió la densidad óptica (DO) a 450 nm/570 nm utilizando un lector cinético de microplacas Vmax de Molecular Devices (S/N 04514, Sunnyvale, CA) y el programa Softmax provisto por Molecular Devices. La concentración de IL-2SA en el sobrenadante de cultivo tisular se determinó comparando con la DO de una curva standard de IL-2SA purificada.

Para medir la secreción de interleuquina-4 humana (IL-4), el ensayo fue similar, excepto que se utilizó el anticuerpo de IL-4 antihumana de ratón (PharMingen, Cat. #18651D, San Diego, CA) para revestir la placa, y se utilizó el anticuerpo de IL-4 biotinilada antirrata (PharMingen, Cat #18502D, San Diego, CA) como anticuerpo de detección. Se utilizó la molécula de IL-4 purificada como patrón.

EJEMPLO 1

Expresión de proteínas en ensayos de transfección transitoria utilizando los vectores de expresión TAT/TAR-oriP

Los vectores de expresión en células de mamíferos equipados con CMV3/p en el plásmido pBR322 exhibieron un nivel de expresión relativamente elevado y secreción de entre 1 – 20 µg/ml de proteína heteróloga. Sin embargo, algunas proteínas habían sido muy difíciles de expresar, por ejemplo IL-2SA. Por lo tanto, construimos diversos vectores de expresión equipados con diferentes elementos intensificadores, fundamentalmente proteínas transactivadoras y el elemento oriP para mantener el plásmido transferido como episoma. Cualquiera de estos

elementos por sí solo exhibió un pequeño nivel de aumento (3-5 veces) en ensayos de transfección transitoria. Construimos dos vectores de expresión, uno con IL-2SA en el vector pCEP4 (pSS179) y otro con la adición de elementos transactivadores TAT/TAR a pSS179 (pSS185). Ambos plásmidos ADN que expresan IL-2SA (pSS179 y pSS185) fueron digeridos con enzimas de restricción y se transfectó la misma cantidad de ADN (5 μ g de cada uno) de ambos plásmidos sin cortar. Se utilizó una pequeña cantidad de ambos ADN digeridos con enzimas de restricción para confirmar la cantidad de ADN precipitado para garantizar las mismas cantidades y calidad (para ver el 100 % de conversión a la forma lineal) en cada transfección. Las transfecciones fueron ejecutadas utilizando el método de transfección estacionario con medio suplementado con SFB al 5 %. Se analizaron los niveles de expresión de cada plásmido bajo la presunción de que la forma lineal del plásmido anula la función de oriP, puesto que el ADN lineal no puede ser replicado en estas condiciones. Si bien oriP y TAT/TAR tienen un efecto intensificador, cuando se los evalúa individualmente bajo la regulación de un promotor CMV, el aumento es considerablemente bajo (3-5 veces) en los ensayos de transfección transitoria.

Como se ilustra en la figura 3, los efectos del elemento oriP (pSS179 sin cortar) y la transactivación con TAT/TAR (pSS185 cortado) sobre la secreción de IL-2SA fueron 2,7 y 6 veces más altos, respectivamente, que el de la forma lineal de pSS179 a los 3 dpt. Los aumentos multiplicadores a los 5 dpt fueron de 5,6 y 10, respectivamente. Sin embargo, el pSS185 sin cortar (transactivación con TAT/TAR intacto y función de oriP) exhibió niveles asombrosamente más elevados (26 veces a los 3 dpt y 34 veces a los 5 dpt) de secreción de IL-2SA que los de pSS179 sin cortar.

Analizamos también otras construcciones de vectores que consistían en el mismo elemento funcional. Se utilizaron vectores que expresan IL-2SA pSC221

(TAT/TAR-dhfr), pSH201 (TAT/TAR-oriP con EBNA1) y pSS226(TAT/TAR-oriP sin EBNA1) para transfectar células HKB11 y 293EBNA a fin de comparar las dos células huésped y comparar los vectores episomales de TAT/TAR y TAT/TAR-oriP. Referirse a la Figura 1 para ver mapas físicos de los vectores de expresión. Como se ilustra en la Tabla 1, el efecto de TAT/TAR-oriP (pSH201) sobre TAT/TAR (pSC221) fue ~ 9 veces mayor en las células HKB11 y ~ 4 veces más elevado en las células 293EBNA a los 3 dpt. Estos efectos fueron similares a los observados (4,4 veces) utilizando pSS185 episomal y lineal (Figura 3). Las células 293EBNA exhibieron niveles de secreción de IL-2SA ligeramente inferiores a los de las células HKB11; sin embargo, resultó evidente que se puede utilizar el vector TAT/TAR-oriP en otras células aparte de las HKB11, en este caso células 293EBNA, para la producción máxima de proteínas. Observamos que el vector TAT/TAR-oriP equipado con el gen EBNA1 era ligeramente mejor que sin el gen EBNA1. Parece que las células HKB11 y 293EBNA pueden no tener suficientes proteínas EBNA1 para mantener el vector episomal.

También analizamos otras construcciones vector que consisten en el mismo elemento funcional. Se utilizaron los vectores de expresión de IL-2SA pSC221 (TAT/TAR.dhfr), pSH201 (TAT/TAR-oriP con EBNA1) y pSS226 (TAT/TAR-oriP sin EBNA1) para transfectar células HKB11 y 293EBNA a fin de comparar dos células huésped y comparar los vectores episomales de TAT/TAR y TAT/TAR-oriP. Referirse a la Figura 1 para ver mapas físicos de los vectores de expresión. Como se ilustra en la Tabla 1, el efecto de TAT/TAR-oriP (pSH201) sobre TAT/TAR (pSC221) fue ~9 veces más elevado en las células HKB11 y ~ 4 veces mayor en las células 293EBNA. Estos efectos fueron similares (~ 5 veces) al que observamos utilizando pSS185 episomal y lineal (Figura 2). Las células 293EBNA exhibieron niveles de secreción de IL-2SA ligeramente inferiores a los de las células HKB11, sin embargo, fue evidente que también se observaba el

efecto sinérgico de TAT/TAR-oriP en las células 293EBNA aparte de las células HKB11, para la producción máxima de la proteína. Observamos que el vector TAT/TAR-oriP equipado con el gen EBNA1 era algo mejor que sin el gen EBNA1. Parece que las células HKB11 y 293EBNA pueden no tener suficiente proteína EBNA1 para mantener el vector episomal.

Tabla 1. Comparación de las células HKB11 y 293EBNA transfectadas con los vectores TAT/TAR y TAT/TAR-oriP para la secreción de IL-2SA en medio sin suero a los 3 dpt.

Vector de Expresión	HKB11		293EBNA	
pSC221	0,5	1	0,62	1
pSH201	4,45	8,9	2,55	4,11
pSS226	2,98	5,9	2,27	3,6

Nota: Se calculó el aumento de IL-SA por medio de TAT/TAR y TAT/TAR-oriP presumiendo una producción de IL-2SA a partir de pSC221 de 1.

EJEMPLO 2

Expresión de Proteína en Ensayos de transfección transitoria utilizando los vectores de expresión BMLF1-oriP

En un principio se conoció a BMLF1 como un transactivador promiscuo (Lieberman y otros, J Virol 60: 140-148, 1986). Desde entonces, se ha encontrado que esta proteína era un transactivador posterior a la transcripción (Kenney y otros, J. Virol, 63: 3870-3877, 1989) y muy recientemente se lo describió como transactivador para la expresión génica sin intrones y como inhibidor de la expresión génica vinculada con los intrones (Ruvolo y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8852-8857). Analizamos la proteína BMLF1 en cuanto a la función de

transactivación de la expresión génica en mamíferos (IL-2SA). La secuencia codificadora de IL-2SA sin 5'-IS insertado en línea de salida de CMVe/p con respecto a pSS210 es pSS212. La secuencia codificadora de IL-2SA fue modificada agregando la secuencia TAR en el extremo 5' de IL-2SA (pSS213) y fue modificada también agregando una secuencia intrónica (MIS) en el extremo 5 de IL-2SA con respecto a pSS13, dando origen al vector pSS214. Ver la Figura 2 para encontrar mapas físicos del vector de expresión individual. Los ensayos de transfección transitoria estacionaria indicaron que la proteína bMLF1 intensificaba la expresión de IL-2SA independientemente de los intrones en 3-4 veces en las células HKB11 (Tabla 2) y en 10-20 veces en las células CHO (Tabla 3) utilizando medio con contenido de suero.

Tabla 2. Comparación de la producción de IL-2SA (3 dpt) a partir de células HKB11 transfectadas con diversos vectores de expresión de IL-2SA en medio con contenido de suero.

Vectores de expresión	Títulos de IL-2SA (µg/ml)			Veces de aumento (promedio)
	Exp. 1	Exp. II	Exp. III	
pSS179	0,84	1,24	0,27	1
pSS212	3	4,4	1,23	4
pSS213	2,76	4,16	0,81	3,2
pSS214	2,48	3,1	1,1	3,2

Nota: Se calculó la multiplicación de la producción de IL-2SA por BMLF1 a partir del promedio de tres experimentos tomando la producción de IL-2SA a partir de pSS179 como 1.

De acuerdo con lo descripto en la Figura 3, pSS212, pSS213 y pSS214 tienen segmentos de expresión de IL-2SA incorporados en el extremo 5' de la molécula sin intrones, sin intrones con TAR y TAR-MIS, respectivamente.

Tabla 3. Comparación de la producción de IL-2SA (3 dpt) a partir de células CHO transfectadas con diversos vectores de expresión de IL-2SA en medio con contenido de suero.

Vectores de expresión	Títulos de IL-2SA (µg/ml)			Veces de aumento (promedio)
	Exp. 1	Exp. II	Exp. III	
pSS179	0,062	0,058	0,042	1
pSS212	0,275	0,77	0,7	11,2
pSS213	0,23	0,88	1,33	16,6
pSS214	0,225	1,46	1,52	21,5

Nota: El aumento multiplicador y los vectores de expresión han sido descriptos para la Tabla 2.

EJEMPLO 3

Producción de la proteína en ensayos prolongados de transfección transitoria

Para preparar grandes cantidades de proteínas, analizamos estas proteínas transactivadoras en el plásmido oriP en un tiempo de cultivo prolongado posterior a la transfección hasta 10 días. En este experimento, utilizamos un vector de expresión básico de IL-2SA (pSL160N) un vector de expresión de IL-2SA suplementado con elementos transactivadores TAT/TAR (pSC221), un vector de expresión de IL-2SA con el elemento oriP solo (pSS225) y el elemento de expresión de IL-2SA tanto con los elementos transactivadores TAT/TAR como oriP (pSS185). Referirse a la Figura 1 para ver mapas físicos de la estructura de

los plásmidos. Se adaptaron células HKB11 adaptadas a la condición de suspensión sin suero según el método de transfección con agitación de acuerdo con lo descrito anteriormente. Las células transfectadas fueron subcultivadas utilizando medio libre de suero dividiendo 4-5 veces dos veces a los 3 dpt y 7 dpt durante un período de 10 días después de la transfección. El volumen total del cultivo transfectado fue incrementado en 20-25 veces.

Observamos que el efecto de oriP y los efectos de transactivación de TAT/TAR (Tabla 4) fueron ligeramente diferentes de los datos expuestos en la Figura 3, lo que se podría explicar por los diferentes estados plasmídicos de la forma lineal del ADN plásmido oriP (por ejemplo, pSS170 y pSS185 linealizados) y la estructura plasmídica sin el elemento oriP (por ejemplo, pSL160N y pSS221). Por ejemplo, se presumió que un vector de expresión de pSS179 lineal basal exhibía el mismo resultado con pSL160N y se presumió que pSS185 lineal era igual a pSC221 a causa de la función interrumpida de oriP al linealizar la estructura plasmídica. Sin embargo, el efecto combinado de TAT/TAR y la función oriP fue similar. Durante este tiempo de cultivo prolongado, como se ilustra en la Tabla 4, el aumento visto en la expresión de la proteína (títulos de IL-2SA) se mantuvo sin disminuir drásticamente los niveles de expresión. El rendimiento total de producción de IL-2SA a partir de pSS185 (vector de expresión de IL-2SA con los elementos TAT/TAR y oriP) en el tiempo de transfección transitoria prolongada (10 días) exhibió un rendimiento sumamente elevado de la proteína (460,8 µg) a partir de 5 µg de ADN transfectado con un número de células iniciales de 5×10^6 , en tanto que el vector de expresión no optimizado (pSL160N) en un cultivo de 3 días utilizando las mismas cantidades de ADN y células puede dar origen a sólo 28,8 µg de la proteína a los 10 dpt y 1,4 µg de la proteína a los 3 dpt utilizando un vector de expresión standard.

Se demostró que este sistema se podría aumentar fácilmente a escala para utilizar en la producción eficiente de proteínas, por ejemplo cuando se transfectaron 50×10^8 células HKB11 (50 ml de cultivo) con 50 μ g de pSS185, pudimos obtener aproximadamente 5 mg de proteína a los 10 días después de la transfección con un volumen final de cultivo de 1 litro. Según nuestra experiencia, encontramos que este efecto es proporcional y que la producción de proteína a partir de 500 μ g de ADN utilizando un frasco agitador fue aproximadamente 100 veces mayor que la encontrada en una transfección standard utilizando 5 μ g de ADN en formato de 6 pocillos. Este resultado de la transfección a escala más grande indica que podemos ahorrar en el costo de la preparación del ADN y los reactivos de transfección utilizando esta técnica de transfección aumentada en escala en comparación con la técnica de transfección standard que utiliza 20-25 veces más materiales de partida (ADN, reactivo de transfección y células).

Como se ilustra en la Figura 4 y 5, no se pudo utilizar el transactivador BMLF1 en una técnica de transfección prolongada, puesto que los títulos de IL-2SA y el número de células se redujeron drásticamente al cabo de 3 dpt. La proteína BMLF1 podría ser tóxica, en última instancia, para las células que expresan BMLF1 en el modo de transfección transitoria prolongada.

Tabla 4. Comparación de la producción de IL-2SA en una técnica de transfección transitoria aumentada a escala utilizando diversos vectores de expresión en condiciones sin suero.

Vectores de expresión	Título (µg/ml)			Rendimientos totales (µg)		
	3 dpt	7 dpt	10 dpt	3 dpt	7 dpt	10 dpt
pSL160N	0,28	0,36	0,36	1,4	7,2	28,8
pSS221	0,64	0,68	0,74	3,2	13,6	58,2
pSS225	1,22	1,42	1,31	6,1	28,4	104,8
pSS185	5,08	7,29	5,76	25	145,8	460,8

Nota: Los rendimientos totales indican una multiplicación de los títulos de IL-2SA (µg/ml) en volumen (ml).

- pSL160N: Secuencia codificadora de IL-2SA en un vector dhfr
- pSS221: Secuencia codificadora de IL-2SA en un vector TAT/TAR
- pSS225: Secuencia codificadora de IL-2SA en un vector oriP
- pSS185: Secuencia codificadora de IL-2SA en un vector TAT/TAR-oriP.

Las células fueron divididas 1:4 a los 3 dpt y 1:5 a 7 dpt.

EJEMPLO 4

Expresión de proteínas bajo la selección de fármacos

Se analizó la expresión de IL-2SA de los vectores oriP, pSS178 y pSS179 (referirse a Figura 1 para ver los mapas de los plásmidos), y se la comparó con la expresión de IL-2SA de un vector TAT/TAR-oriP, pSS185, bajo la selección de fármacos para obtener células resistentes a los fármacos para la producción de proteínas a mayor escala durante períodos de tiempo aun más prolongados. Se transfectaron células HKB11 que se desarrollaban en un frasco agitador en condición sin suero con los tres vectores de expresión empleando un formato de 6 pocillos. Tres días después de la transfección, las células transfectadas fueron inoculadas en un frasco agitador, a razón de 2 x 10⁶ células en 20 ml de medio suplementado con suero (5 %) con 100 µg/ml de higromicina B (HygB). Las

células fueron subcultivadas dos veces por semana empleando estos mismos medios de selección. Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en el mismo volumen de medio fresco en las primeras tres pasadas. Después de esta fase de selección inicial, el cultivo celular fue subcultivado manteniendo una densidad celular de 5×10^5 células/ml. Se midieron los títulos de producción de IL-2SA de cada pasada por medio de un ELISA. Cuatro semanas después de la producción, la productividad de IL-2SA de pSS185 se mantenía con un título superior a los de pSS178 y pSS179 en más de 10 veces (Figura 6). Estos resultados indican que los elementos de transactivación TAT/TAR con los elementos oriP, juntos (pSS185), bajo el modo de selección de fármacos exhiben una productividad mucho mayor en comparación con la productividad de IL-2SA de los vectores oriP, pSS178 y pSS179.

EJEMPLO 5

Sistema TAT/TAR para la transfección de alto rendimiento

Si bien el vector de expresión TAT/TAR-oriP exhibió una expresión asombrosamente elevada de la proteína, el tamaño del vector es excesivo para utilizar en clonación de alto rendimiento. Por lo tanto, separamos el vector de expresión par formar dos grupos funcionales. El principal vector de clonación (4,0 kb) consiste en CMVe/p, TAR, MIS, el sitio de clonación (PvuII) y la señal de poliA en un vector oriP, pSS223. El vector oriP de expresión de TAT (8,7 kb), el plásmido pSC186, fue un plásmido cotransfectado. En ensayos de transfección transitoria para el screening de alto rendimiento, podemos transfectar 5 µg de pSS223 con el gen de interés y 1 µg del plásmido oriP pSS186 para expresión de TAT. Como se ilustra en la Figura 8, insertamos las secuencias codificadoras de IL-2SA e IL-4 en el sitio de clonación PvuII de pSS223. Los plásmidos resultantes son pSS240 y pSS241, respectivamente. Se cotransfectaron células HKB11 con 5

µg de pSS240 y pSS241 y 1 µg de pSC186 en un modo de transfección con agitación en condiciones libres de suero. Observamos un resultado similar de un aumento de 3-5 veces en los ensayos de cotransfección (Tabla 5) como en el vector TAT/TAR-oriP (pSS185) con respecto al vector oriP (pSS225 (Tabla 4). Este resultado indica que el método de cotransfección de los dos plásmidos funcionalmente separados es equivalente a la transfección de un solo vector de expresión que consiste en los elementos TAT/TAR y oriP.

Tabla 5. Comparación de la producción de proteína (µg/ml) del vector TAR-oriP con la de la cotransfección con el vector TAT-oriP

	Transfección simple	Cotransfección con pSC186	Veces de aumento
IL-2SA (3 dpt)	4,28	14,2	3,3
IL-2SA (6 dpt)	3,07	15,9	5,1
IL-4 (3 dpt)	13,4	41,6	3,1
IL-4 (6 dpt)	11,6	37,2	3,2

Nota: Se calculó el aumento multiplicador a partir de los valores de cotransfección sobre los valores de la transfección simple.

COMENTARIOS

Las proteínas heterólogas expresadas por células de mamíferos tienen habitualmente cualidades mejores o más convenientes para caracterizar las proteínas que las proteínas expresadas a partir de células no de mamíferos y, por consiguiente, son preferibles las células de mamíferos. Sin embargo, la cantidad de proteína preparada por células de mamíferos es habitualmente menor que en otros sistemas. Para compensar los mencionados problemas, optimizamos un

método de transfección transitoria para dar lugar a la producción de proteínas "en vía rápida". Nuestros resultados se basan en numerosos factores, a saber:

1. Una célula huésped HKB11 optimizada que ha sido adaptada a una condición de suspensión sin suero.

2. Métodos de transfección con agitación utilizando medio libre de suero. En este método pudimos utilizar una densidad celular inicial mayor en condiciones de cultivo óptimas, que posteriormente puede producir más proteína. En las transfecciones estacionarias, no se pudo utilizar más de $1,5 \times 10^6$ células por pocillo a causa de la condición de cultivo no óptima de las células que se desarrollaron en forma de monocapa. Utilizando células en monocapa (por ejemplo, células CHO) para la transfección, las condiciones de agitación del cultivo transfectado dieron lugar a una mayor secreción de proteína (2-3 veces) con respecto a las condiciones sin agitación, por razones que permanecen sin dilucidar.

3. Vectores de expresión optimizados mediante el uso del elemento oriP, que puede mantener a los plásmidos transferidos como episomas, así como elementos de transactivación, que pueden intensificar la expresión de proteínas, respectivamente.

4. La parte más crítica y el resultado inesperado de esta técnica de transfección mejorada fueron la combinación del elemento oriP y los elementos de transactivación TAT/TAR para la expresión proteica y dicha combinación en un solo sistema vector o de transfección no había sido propuesto en la técnica anterior.

No se llevó a cabo intensamente el experimento utilizando células CHO después de obtener datos ineficaces en el sistema de transactivación TAT/TAR-oriP y se basó en la siguiente información publicada. Un plásmido oriP no se replica con eficiencia (Yates y otros, Nature 313: 812-815, 1985 y Mizuguchi y

otros, FEBS lett 472: 173-178, 2000) en células de roedor y las células CHO carecen de factores celulares para el sistema de transactivación TAT/TAR (Alonso y otros, J Virol 66: 4617-4621, 1992 y Wimmer y otros, Virology 255: 182-189, 1999).

Dada la descripción que antecede, los expertos en la técnica podrán idear variaciones de lo expuesto. En consecuencia, se pretende que los ejemplos consignados sean considerados ilustrativos y el alcance de las invenciones descritas en este documento sólo debe estar limitado por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema vector de expresión génica en células de mamíferos que incluye una pluralidad de plásmidos y comprende:

- (a) un sistema de mantenimiento episomal;
- (b) un fuerte promotor/intensificador
- (c) un complejo de transactivación de proteínas y
- (d) ADN que codifica para la proteína heteróloga.

2. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el sistema de mantenimiento episomal comprende un elemento oriP y un gen que expresa EBNA1.

3. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el elemento oriP y el gen que expresa EBNA1 están en el mismo plásmido.

4. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual el elemento oriP y el gen que expresa EBNA1 están en plásmidos separados.

5. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual el elemento oriP está en un plásmido y la proteína EBNA1 en las células huésped.

6. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual el fuerte promotor/intensificador es CMV.

7. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual el complejo de transactivación de proteínas incluye tanto al elemento TAT como TAR.

8. El sistema de acuerdo con la reivindicación 7 en el cual los elementos TAT y TAR se encuentran en el mismo plásmido.

9. El sistema de acuerdo con la reivindicación 7 en el cual los elementos TAT y TAR se encuentran en plásmidos separados.

10. El sistema de acuerdo con la reivindicación 7 en el cual el elemento TAR está en un plásmido y el elemento TAT se encuentra en las células de expresión.

11. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual el complejo de transactivación de proteínas incluye a la proteína BMLF1.

12. El sistema de acuerdo con la reivindicación 11, en el cual el gen BMLF1 está en el mismo plásmido.

13. El sistema de acuerdo con la reivindicación 11, en el cual el gen BMLF1 está en un plásmido aparte.

14. El sistema de acuerdo con la reivindicación 11, en el cual la proteína BMLF1 es expresada en las células.

15. El sistema vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la proteína heteróloga es seleccionada entre el grupo que consiste en IL-2SA e IL-4R.

16. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la línea celular de mamífero es de un primate.

17. Una línea celular de mamífero que comprende el sistema vector de expresión génica en mamíferos de acuerdo con la reivindicación 1.

18. La línea celular de mamífero de acuerdo con la reivindicación 17 en la cual la línea celular es HKB11.

19. La línea celular de mamífero de acuerdo con la reivindicación 17 en la cual la línea celular es 293EBNA.

20. La línea celular de mamífero de acuerdo con la reivindicación 17 en la cual la línea celular es una línea celular 293.

21. Un método para expresar una proteína heteróloga empleando una línea celular de acuerdo con la reivindicación 1.

RESUMEN

Un sistema vector de expresión génica en células de mamíferos que incluye una pluralidad de plásmidos y comprende: (a) un sistema de mantenimiento episomal; (b) un fuerte promotor/intensificador; (c) un complejo de transactivación de proteínas y (d) ADN que codifica para la proteína heteróloga. Los complejos de mantenimiento episomal y de transactivación de proteínas pueden incluir subelementos situados en el mismo o en diferentes plásmidos dentro del sistema de expresión celular.

ES TRADUCCION: Del documento de la solicitud de patente Estadounidense N° 09/675.847, en idioma inglés, que he tenido a la vista y al que me remito en Buenos Aires,

**Royal
Technologies S.A.**

117-

Expediente No		01081102	No de Folia
Item		No de unidades	
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA		
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA		
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS:		

Observaciones: Arte final

118



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 01001102 00300000

Folios: 119

Fecha (RAD): 2001-09-21 16:39:40

Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTE

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 55,358
FECHA : SEPTIEMBRE 3 DE 2001

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	4028372	03/09/2001	17,543,436.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. HISTORICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 003-01-01 SOLICITUDES	7 TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUS	357,480.00
	TOTAL :	\$ 357,480.00

SON: TRESCIENTOS CINCUENTA Y SIETE MIL CUATROCIENTOS OCHENTA PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

66 09597-801-020-5

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: Info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia



119

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 01001102 63000000

Folios: 119

Fecha (GCB): 2001-09-21 16:59:48

Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 48,094
FECHA : AGOSTO 6 DE 2001

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	4028374	06/08/2001	15,970,240.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NU	100,000.00
	TOTAL :	\$ 100,000.00

SON: CIENTO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

C610 09597-801-020-5

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

1111

- 【】

[] []

$\left[\begin{array}{c} 1 \\ 1 \end{array} \right]$	$\left[\begin{array}{c} 1 \\ 1 \end{array} \right]$
$\left[\begin{array}{c} 1 \\ 1 \end{array} \right]$	$\left[\begin{array}{c} 1 \\ 1 \end{array} \right]$
$\left[\begin{array}{c} 1 \\ 1 \end{array} \right]$	$\left[\begin{array}{c} 1 \\ 1 \end{array} \right]$
$\left[\begin{array}{c} 1 \\ 1 \end{array} \right]$	$\left[\begin{array}{c} 1 \\ 1 \end{array} \right]$

- | | |
|--|--|
| $\left[\begin{array}{c} 1 \\ 1 \end{array} \right]$ | $\left[\begin{array}{c} 1 \\ 1 \end{array} \right]$ |
| $\left[\begin{array}{c} 1 \\ 1 \end{array} \right]$ | $\left[\begin{array}{c} 1 \\ 1 \end{array} \right]$ |
| $\left[\begin{array}{c} 1 \\ 1 \end{array} \right]$ | $\left[\begin{array}{c} 1 \\ 1 \end{array} \right]$ |
| $\left[\begin{array}{c} 1 \\ 1 \end{array} \right]$ | $\left[\begin{array}{c} 1 \\ 1 \end{array} \right]$ |

11 12 13 14

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100

- | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 |

1114

Fecha: _____

Tel: 50 52 20 e-mail: info@sicap.ro
 Bucuresti, Romania

Folio 121

2020
Bogotá DC

Doctor(a)
EMILIO FERRERO
Apoderado

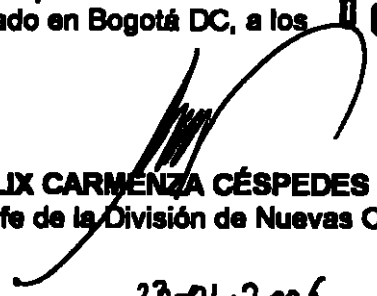
REFERENCIA:	Radicación No.	01-81102
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	416
	Oficio No.	3030
	Folios	001

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, y en las demás disposiciones vigentes sobre la materia, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial, conforme lo establece el artículo 40 de la misma Decisión.

Siendo manifestación expresa del interesado, la solicitud no será publicada antes de los 18 meses contados a partir de la fecha de presentación de la solicitud, esto es a partir del día 21 de marzo de 2003.

Cúmplase

Dado en Bogotá DC, a los 06 DIC. 2001


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Bogotá, DC, 23-01-2006 El extracto de esta solicitud fue publicado en el número 527 de la Gaceta de Propiedad Industrial, de fecha 30-04-2003. El término hábil señalado por la ley expiró el 29-07-2003 y SI ☐ NO ☒ se presentaron oposiciones por parte de terceros.

202027

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10

Conmutador: 382 0840

Fax: 382 2695

E-mail: Info@sic.gov.co

Bogotá, D.C., Colombia