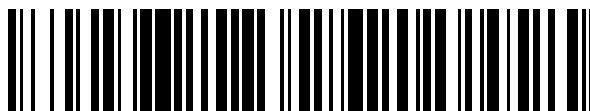


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 272**

51 Int. Cl.:
C12N 15/85 (2006.01)
C07K 14/505 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09174441 .7**
96 Fecha de presentación: **17.04.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **2163640**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.03.2010**

54 Título: **Producción de proteína recombinante en una célula humana**

30 Prioridad:
15.04.1999 EP 99201176
21.12.1999 EP 99204434

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.04.2012

73 Titular/es:
CRUCCELL HOLLAND B.V.
ARCHIMEDESWEG 4
2333 CN LEIDEN, NL

72 Inventor/es:
Hateboer, Guus;
Verhulst, Karina Cornelia;
Uytdehaag, Alphonsus Gerardus Cornelis Maria;
Schouten, Govert Johan y
Bout, Abraham

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 378 272 T3

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

DESCRIPCIÓN

Producción de proteína recombinante en una célula humana

5 La invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Así, la invención también se refiere al campo de la producción de proteínas recombinantes, más en particular al uso de una célula humana para la producción de proteínas. La invención también se refiere al campo de la producción de anticuerpos monoclonales, y más en particular al uso de una célula humana para la producción de anticuerpos monoclonales. La invención también se refiere al campo de la producción de proteínas virales. La invención es particularmente útil para la
10 producción de vacunas para ayudar en la protección frente a patógenos virales para vertebrados, en particular mamíferos y especialmente humanos.

Se describen métodos y composiciones en este documento para la producción de proteínas recombinantes. La invención es particularmente útil para la producción de proteínas que requieren modificaciones post-traduccionales o
15 peri-traduccionales tales como glicosilación y plegamiento apropiado. Se ha documentado bien la expresión de proteínas recombinantes humanas en células heterólogas. Han llegado a estar disponibles muchos sistemas de producción para proteínas recombinantes, variando de bacterias, levaduras, y hongos a células de insecto, células vegetales y células de mamífero. Sin embargo, a pesar de estos desarrollos, algunos sistemas de producción aún no son óptimos, o sólo son apropiados para la producción de clases específicas de proteínas. Por ejemplo, las
20 proteínas que requieren modificaciones post- o peri-traduccionales tales como glicosilación, γ -carboxilación, o γ -hidroxilación no pueden producirse en sistemas de producción procariontes. Otro problema bien conocido con los sistemas de producción procariontes es el plegamiento a menudo incorrecto del producto a producir, incluso conduciendo a cuerpos de inclusión insolubles en muchos casos. Los sistemas eucariotes son una mejora en la producción de, en particular, proteínas derivadas eucariotes, pero los sistemas de producción apropiados aún tienen
25 varios inconvenientes. La hipermanosilación en, por ejemplo, cepas de levadura, afecta a la capacidad de las levaduras de expresar glicoproteínas apropiadamente. La hipermanosilación a menudo conduce incluso a reacciones inmunes cuando se administra a un paciente una proteína terapéutica preparada de este modo. Además, las señales de secreción de levaduras son diferentes de la señales de células de mamífero, lo que conduce a un transporte más problemático de proteínas de mamífero, incluyendo polipéptidos de humano, al medio extracelular,
30 que a su vez da como resultado problemas con la producción continua y/o aislamiento. Se usan ampliamente células de mamífero para la producción de dichas proteínas por su capacidad para realizar modificaciones post-traduccionales extensas. La expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero se ha desarrollado drásticamente en los últimos años, dando como resultado, en muchos casos, una tecnología de rutina.

35 En particular, las células de Ovario de Hámster Chino (CHO) han llegado a ser un sistema de producción de rutina y adecuado para la generación de proteínas biofarmacéuticas y proteínas para propósitos de diagnóstico. Varias características hacen CHO muy apropiada como célula hospedadora: los niveles de producción que pueden alcanzarse en células CHO son extremadamente altos; la línea celular proporciona un sistema de producción seguro, que está libre de partículas infecciosas o tipo virus; las células CHO se han caracterizado ampliamente,
40 aunque la historia de la línea celular original es imprecisa; las células CHO pueden crecer en suspensión hasta altas densidades en biorreactores, usando medios de cultivo libres de suero; se ha desarrollado un mutante dhfr- de CHO (clon DG-44. Urlaub et al, 1983) para obtener un sistema de selección fácil introduciendo un gen dhfr exógeno y usando metotrexato a partir de una amplificación bien controlada del gen dhfr y el transgén.

45 Sin embargo, las glicoproteínas o proteínas que comprenden al menos dos subunidades (diferentes) continúan planteando problemas. La actividad biológica de las proteínas glicosiladas puede estar profundamente influida por la naturaleza exacta del componente oligosacárido. El tipo de glicosilación también puede tener efectos significativos en la inmunogenicidad, dirección y farmacocinética de la glicoproteína. En los últimos años se han hecho avances importantes en los factores celulares que determinan la glicosilación, y se han clonado muchas enzimas glicosil
50 transferasas. Esto ha dado como resultado una investigación dirigida al diseño metabólico de la maquinaria de glicosilación (Fussenegger et al, 1999; Lee et al, 1989; Vonach et al, 1998; Jenkins et al, 1998; Zhang et al, 1998; Muchmore et al, 1989). A continuación se describen ejemplos de dichas estrategias.

Las células CHO carecen de una enzima α -2,6 sialil-transferasa funcional, que da como resultado la adición
55 exclusiva de ácidos siálicos a galactosa mediante enlaces α -2,3. Se sabe que la ausencia de enlaces α -2,6 puede potenciar la eliminación de una proteína del torrente sanguíneo. Para abordar este problema, se han diseñado células CHO para parecerse al perfil de glicanos humano, por transfección de las glicosil transferasas apropiadas. Las células CHO también son incapaces de producir oligosacáridos de Lewis^x. Se han desarrollado líneas celulares CHO que expresan N-acetil-D-glucosaminiltransferasa y α -1,3-fucosil-transferasa III humanas. En contraste, se sabe
60 que las células de roedores, incluyendo las células CHO, producen ácido CMP-N-acetilneuramínico hidrolasa que glicosila ácidos CMP-N-acetilneuramínicos (Jenkins et al, 1996), una enzima que está ausente en humanos. Las proteínas que realizan este tipo de glicosilación pueden producir una fuerte respuesta inmune cuando se inyectan (Kawashima et al, 1993). La reciente identificación del gen de roedores que codifica la enzima hidrolasa probablemente facilitará mucho el desarrollo de células CHO que carecen de esta actividad y evitarán este tipo de
65 modificación de roedores.

De este modo, la técnica muestra que es posible alterar el potencial de glicosilación de células hospedadoras de mamífero por expresión de enzimas glicosil transferasas humanas. Además, aunque las estructuras de glicanos derivadas de CHO en las proteínas recombinantes pueden mimetizar las presentes en sus equivalentes humanos naturales, aún se encuentran lejos de ser idénticas. Otro problema potencial es que no todas las enzimas de glicosilación se han clonado y por tanto no están disponibles para ingeniería metabólica. La administración terapéutica de proteínas que difieren de sus equivalentes humanos naturales puede dar como resultado la activación del sistema inmune del paciente y causar respuestas no deseables que pueden afectar a la eficacia del tratamiento. Usando células no humanas pueden surgir otros problemas del plegamiento incorrecto de las proteínas que sucede durante o después de la traducción que podría ser dependiente de la presencia de las diferentes proteínas chaperonas apropiadas. Puede suceder un plegamiento aberrante, que conduce a una disminución o ausencia de actividad biológica de la proteína. Además, es de gran importancia la expresión simultánea de polipéptidos por separado que formarán juntos proteínas compuestas de las diferentes subunidades, como anticuerpos monoclonales, en cantidades relativas correctas. Las células humanas serán más capaces de proporcionar todas las facilidades necesarias para que las proteínas humanas se expresen y se procesen correctamente.

De este modo es claramente deseable tener métodos para producir proteínas recombinantes humanas que implican una célula humana que proporciona procesamiento de tipo humano uniforme como modificaciones post-traduccionales y peri-traduccionales, tales como glicosilación, que también es preferiblemente apropiado para producción a gran escala.

Por tanto, la invención proporciona un método para producir al menos una sustancia proteica en una célula que comprende una célula eucariota que tiene una secuencia que codifica al menos una proteína E1 de un adenovirus o un homólogo, fragmento y/o derivado funcional de las mismas en su genoma, que no codifica dicha célula una proteína adenoviral estructural de su genoma o una secuencia integrada en el mismo, comprendiendo dicho método proporcionar dicha célula con un gen que codifica una sustancia proteica recombinante, cultivar dicha célula en un medio apropiado y recoger al menos una sustancia proteica de dicha célula y/o dicho medio. Una sustancia proteica es una sustancia que comprende al menos dos aminoácidos unidos por un enlace peptídico. La sustancia también puede comprender una o más moléculas distintas unidas físicamente a dicha porción de aminoácidos o no. Los ejemplos no limitantes de dichas moléculas distintas incluyen carbohidratos y moléculas lipídicas. El ácido nucleico que codifica una proteína estructural de adenovirus no debe estar presente por varias razones. Una de las razones es que la presencia de una proteína estructural de adenovirus en una preparación de proteína producida, es altamente no deseable en muchas aplicaciones de dicha proteína producida. La retirada de dicha proteína estructural del producto se consigue mejor evitando que aparezca en la preparación. Preferiblemente, dicha célula eucariota es una célula de mamífero. En una realización preferida, la sustancia proteica recogida de la célula y la célula en sí misma se obtienen de la misma especie. Por ejemplo, si se pretende administrar la proteína a humanos, se prefiere que tanto la célula como la sustancia proteica recogida de dicha célula sean de origen humano. Una ventaja de una célula humana es que la mayoría de las proteínas comercialmente más atractivas son humanas. La sustancia proteica recogida de dicha célula puede ser cualquier sustancia proteica producida por dicha célula. En una realización, al menos una de dicha al menos una sustancia proteica recogida se codifica por dicho gen. En otra realización, se proporciona un gen a dicha célula para potenciar y/o inducir la expresión de uno o más genes presentes en la célula de forma endógena. Por ejemplo, proporcionando dicha célula con un gen que codifica una proteína que es capaz de potenciar la expresión de una sustancia proteica en dicha célula.

Con un gen que se entiende un ácido nucleico que comprende un ácido nucleico de interés en una forma que se puede expresar, tal como un casete de expresión. El ácido nucleico de interés puede expresarse a partir del promotor natural o derivado del mismo o un promotor completamente heterólogo. El ácido nucleico de interés puede comprender intrones o no. De manera similar, puede ser un ADNc o ácido nucleico tipo ADNc. El ácido nucleico de interés puede codificar una proteína. Como alternativa, el ácido nucleico de interés puede codificar un ARN antisentido.

La invención también proporciona un método para producir al menos una proteína recombinante humana en una célula, que comprende proporcionar una célula obtenida que tiene una secuencia que codifica al menos una proteína E1 inmortalizadora de un adenovirus a un derivado, homólogo o fragmento funcional de las mismas en su genoma, que no produce dicha célula proteínas adenovirales estructurales, con un ácido nucleico que codifica dicha proteína recombinante humana, cultivar dicha célula en un medio apropiado y recoger al menos una proteína recombinante humana de dicha célula y/o dicho medio. Hasta la presente invención hay pocas, si es que hay alguna, células humanas que se ha descubierto que son apropiadas para producir proteínas recombinantes humanas de cualquier modo reproducible y aumentable a escala. Ahora se ha descubierto que las células que comprenden al menos secuencias E1 adenovirales inmortalizadoras en su genoma, son capaces de crecer (están inmortalizadas por la presencia de E1), de manera relativamente independiente de factores de crecimiento exógenos. Además, estas células son capaces de producir proteínas recombinantes en cantidades significativas y que son capaces de procesar correctamente la proteína recombinante a hacer. Por supuesto, estas células también serán capaces de producir proteínas no humanas. Las líneas celulares humanas que se han usado para producir proteínas recombinantes en cualquier cantidad significativa a menudo son líneas celulares tumorales (transformadas). El hecho de que la mayoría de las células que se han usado para la producción de proteínas recombinantes sean derivadas de tumor, añade un riesgo adicional al trabajo con estas líneas celulares particulares y da como resultado

procedimientos de asilamiento muy estrictos para la proteína recombinante para evitar la actividad transformante o el material tumorigénico en cualquier proteína u otras preparaciones. De acuerdo con la invención, se prefiere por lo tanto emplear un método de acuerdo con la invención, por el que dicha célula se obtiene de una célula primaria. Para que sea capaz de crecer indefinidamente, una célula primaria necesita estar inmortalizada de algún modo, que

- 5 en la presente invención se ha conseguido por la introducción de E1 de Adenovirus. La técnica no es precisa en cuanto al límite entre transformada e inmortalizada. Aquí la diferencia radica en que las células inmortalizadas crecen indefinidamente, mientras que el fenotipo aún está presente, y las células transformadas también crecen indefinidamente pero también muestran habitualmente un cambio drástico en el fenotipo.
- 10 Para conseguir una producción a gran escala (continua) de proteínas recombinantes a través del cultivo celular, se prefiere en la técnica tener células capaces de crecer sin la necesidad de anclaje. Las células de la presente invención tienen esa capacidad. La capacidad de crecimiento independiente de anclaje se mejora cuando las células comprenden una secuencia que codifica E2A o un derivado o análogo o fragmento funcional de la misma en su genoma, por lo cual preferiblemente dicha secuencia que codifica E2A codifica un mutante E2A sensible a temperatura, tal como ts125. Para tener un sistema de producción limpio y seguro a partir del cual es fácil aislar la proteína recombinante deseada, se prefiere tener un método de acuerdo con la invención, por el cual dicha célula humana no comprende otras secuencias adenovirales. La célula más preferida para los métodos y usos de la invención es PER.C6 depositada con el número ECACC 96022940 o un derivado de la misma. PER.C6 se comporta mejor en el manejo que, por ejemplo, las células 293 humanas transformadas que también se han inmortalizado por
- 20 la región E1 de Adenovirus. Las células PER.C6 se han caracterizado y se han documentado muy ampliamente, aunque se comportan significativamente mejor en el proceso de aumento a escala, crecimiento en suspensión e independencia de factor de crecimiento. Algo que las hace muy apropiadas para producción a gran escala es especialmente el hecho de que PER.C6 pueden producirse en suspensión de un modo altamente reproducible. Además, la línea celular PER.C6 se ha caracterizado para el crecimiento en biorreactor en el que crece a muy altas densidades.

Las células de acuerdo con la invención, en particular PER.C6, tienen la ventaja adicional de que pueden cultivarse en ausencia de suero obtenido de animal o humano o componentes de suero obtenido de animal o humano. Por tanto, el aislamiento es más fácil, mientras que la seguridad se potencia debido a la ausencia de proteínas humanas o animales adicionales en el cultivo y el sistema es muy fiable (los medios sintéticos son los mejores en la reproducibilidad). Además, la presencia de la región Temprana 1A (E1A) de Adenovirus añade otro nivel de ventajas en comparación con líneas celulares (humanas) que carecen de este gen particular: se conoce E1A como activador transcripcional para potenciar la transcripción a partir del potenciador/promotor de los genes Tempranos Intermedios de Citomegalovirus (Olive et al, 1990; Gorman et al, 1989). Cuando la proteína recombinante a producir está bajo el control del potenciador/promotor de CMV los niveles de expresión aumentan en dichas células y no en células que carecen de E1A. Como el promotor de CMV, los promotores de E1A son más activos en células que expresan uno o más productos de E1A, que en células que no expresan dichos productos. Se sabe que, de hecho, la potenciación de la expresión de E1A es una característica de varios promotores distintos. Para la presente invención, dichos promotores se considera que son homólogos funcionales de los promotores E1A. El efecto de E1A puede medirse a través de la atracción de los activadores de transcripción al promotor de E1A u homólogo del mismo y/o a través de retirar/evitar el acoplamiento de represores transcripcionales al promotor. La unión de activadores y represores al promotor sucede de un modo dependiente de secuencia. Un derivado funcional y/o un fragmento de un promotor de E1A u homólogo del mismo, por lo tanto, comprende al menos la secuencia de unión al ácido nucleico de al menos un activador y/o represor regulado por la proteína E1A.

Otra ventaja de las células de la invención es que albergan y expresan de manera constitutiva el gen E1B de Adenovirus. E1B de Adenovirus es un inhibidor bien conocido de la muerte celular programada, o apoptosis. Esta inhibición sucede a través del producto E1B 55 K por su unión al factor de transcripción p53 y posterior inhibición (Yew y Berk, 1992). El otro producto de la región E1B, E1B 19 K, puede prevenir la apoptosis uniéndose e inhibiendo de ese modo las proteínas de muerte celular Bax y Bak, proteínas que están ambas bajo el control de p53 (White et al, 1992; Debbas y White, 1993; Han et al, 1996; Farrow et al. 1995). Estas características pueden ser extremadamente útiles para la expresión de proteínas recombinantes que, cuando se sobre-expresan, podrían estar implicadas en la inducción de apoptosis a través de la vía dependiente de p53.

Las células usadas en la presente invención se han descrito en la técnica anterior para la producción de vectores adenovirales (por ejemplo documento WO 97/00326; F. Fallaux *et al*, 1998, New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. Human Gene Therapy 9: 1909-1917; A. Bout *et al*, 1998, Production of RCA-free batches of E1 -deleted recombinant adenoviral vectors on PER.C6. Nucleic Acids Symp. Ser. 38 (Advances in Gene Technology: Molecular Biology in the Conquest of Disease): 35-36; A. Bout *et al*, 1997, A novel packaging cell line (PER.C6) for efficient production of RCA-free batches of E1-deleted recombinant adenoviral vectors. Cancer Gene Therapy 4: Conf. Supl. pp. S32-S33 (Sixth International Conference on Gene Therapy of Cancer, Nov 20-22, 1997); A. Bout *et al*, 1996, Improved helper cells for RCA-free production of E1-deleted recombinant adenovirus vectors. Cancer Gene Therapy 3: Conf. Supl. pp. S24 (Fifth International Conference on Gene Therapy of Cancer, Nov 14-16, 1996), no para el fin completamente diferente de producción de proteínas recombinantes, como se describe y reivindica en la presente invención.

El documento WO 93/03163 describe líneas celulares linfoblastoides no tumorales humanas inmortalizadas por VEB, que se usan para la producción recombinante de proteínas heterólogas. No se refiere a líneas celulares usadas en la presente invención.

5 La invención también proporciona el uso de una célula humana para la producción de una proteína recombinante humana, teniendo dicha célula una secuencia que codifica al menos una proteína E1 inmortalizadora de un adenovirus o un derivado, homólogo o fragmento funcional de las mismas en su genoma, que no produce dicha célula proteínas adenovirales estructurales. En otra realización, la invención proporciona dicho uso donde dicha célula humana se obtiene de una célula primaria, preferiblemente donde dicha célula humana es una célula PER.C6
10 o un derivado de la misma. La invención también proporciona un uso de acuerdo con la invención, donde dicha célula también comprende una secuencia que codifica E2A o un derivado o análogo o fragmento funcional de la misma en su genoma, preferiblemente donde dicha E2A es sensible a la temperatura.

15 La invención también proporciona una proteína recombinante humana que se puede obtener por un método de acuerdo con la invención o por un uso de acuerdo con la invención, dicha recombinante humana.

En otra realización, la invención proporciona una célula humana que tiene una secuencia que codifica E1 de un adenovirus o un derivado, homólogo o fragmento funcional de las mismas en su genoma, que no produce dicha célula proteínas adenovirales estructurales y que tiene un gen que codifica una proteína recombinante humana se integra en el genoma de la célula y codifica un anticuerpo monoclonal o eritropoyetina, o un derivado funcional, homólogo o un fragmento, preferiblemente un célula humana que se obtiene de PER.C6 depositada con el número ECACC 96022940.
20

En otra realización más, la invención proporciona dicha célula humana, PER.C6/E2A, que también comprende una secuencia que codifica E2A o un derivado o análogo o fragmento funcional de la misma en su genoma, preferiblemente donde dicha E2A es sensible a temperatura.
25

Las proteínas a expresar en los métodos de la invención son bien conocidas por los especialistas en la técnica. Preferiblemente son proteínas humanas que preferiblemente experimentan algún tipo de procesamiento en la naturaleza, tal como secreción, plegamiento con chaperonas y/o transporte, cosíntesis con otras subunidades, glicosilación, fosforilación. Los ejemplos típicos para uso terapéutico y diagnóstico incluyen anticuerpos monoclonales que están compuestos de varias subunidades, el Activador de Plasminógenos específico de tejido (tPA), el factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF) y eritropoyetina humana (EPO). EPO es un producto típico que, especialmente in vivo, depende mucho de su patrón de glicosilación para su actividad e inmunogenicidad. Hasta ahora, pueden alcanzarse niveles relativamente altos de EPO por el uso de células CHO que se glicosila de manera diferente cuando se compara con EPO purificada de orina humana, aunque igualmente activa en la potenciación de la producción de eritrocitos. La diferente glicosilación de dicha EPO, sin embargo, conduce a problemas de inmunogenicidad y problemas de vida media alterada en un receptor.
30
35

40 La presente invención también describe una nueva línea celular humana inmortalizada para este propósito, y los usos de la misma para producción. Las células PER.C6 (documento WO 97/00326) se generaron por transfección de células de retina embrionarias humanas primarias, usando un plásmido que contenía las secuencias que codifican E1A y E1B (nucleótidos 459-3510 de Ad5) del Adenovirus serotipo 5 (Ad5) bajo el control del promotor de la fosfoglicerato quinasa humana (PGK).
45

Las siguientes características hacen PER.C6 particularmente útil como hospedador para la producción de proteínas recombinantes: 1. línea celular humana completamente caracterizada; 2. desarrollado conforme a GLP; 3. puede crecer como cultivos en suspensión en medio libre de suero definido desprovisto de cualquier proteína obtenida de humano o animal; 4. crecimiento compatible con frascos rotativos, matraces agitadores, matraces rotativos y biorreactores con tiempos de duplicación de aproximadamente 35 horas; 5. presencia de E1A que provoca la sobre-regulación de la expresión de genes que están bajo el control del potenciador/promotor de CMV; 6. presencia de E1B que previene la apoptosis dependiente de p53 posiblemente potenciada a través de la sobre-expresión del transgén recombinante.
50

55 En una realización, la invención proporciona un método de la invención donde dicha célula es capaz de producir de 2 a 200 veces más proteína recombinante y/o sustancia proteica que líneas celulares de mamífero convencionales. Preferiblemente, dichas líneas celulares de mamífero convencionales se seleccionan entre el grupo compuesto por las líneas celulares CHO, COS, Vero, Hela, BHK y Sp-2.

60 En un aspecto de la invención, la sustancia proteica o proteína es un anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos, o inmunoglobulinas (Ig), son proteínas de suero que juegan un papel central en la respuesta inmune humoral, uniendo antígenos e inactivándolos o desencadenando la respuesta inflamatoria que da como resultado su eliminación. Los anticuerpos son capaces de interacciones altamente específicas con una amplia diversidad de ligandos, incluyendo marcadores asociados a tumor, proteínas de cubierta virales, y glicoproteínas de superficie celular de linfocitos. Son, por lo tanto, agentes potencialmente muy útiles para la diagnosis y el tratamiento de enfermedades humanas. La tecnología de anticuerpos monoclonales y de cadena simple está abriendo nuevas perspectivas para el desarrollo de
65

nuevos agentes terapéuticos y de diagnóstico. Se han usado anticuerpos monoclonales de ratón como agentes terapéuticos en una amplia diversidad de ensayos clínicos para tratar enfermedades infecciosas y cáncer. El primer informe de un paciente tratado con un anticuerpo monoclonal murino fue publicado en 1980 (Nadler et al. 1980). Sin embargo, los efectos observados con estos agentes han sido, en general, bastante decepcionantes (para análisis véase Lowder et al. 1986, Mellstedt et al. 1991, Baldwin y Byers 1986). Tradicionalmente, los anticuerpos monoclonales recombinantes (inmunoglobulinas) se producen en hibridomas de células B. Dichos hibridomas se producen por fusión de una célula B productora de inmunoglobulinas, inicialmente seleccionada por su especificidad, a un mieloma celular de ratón e inmortalizando de ese modo la célula B. La estrategia original de inmortalización de células B de ratón se desarrolló en 1975 (Köhler y Milstein). Sin embargo, las inmunoglobulinas producidas en dichos hibridomas tienen la desventaja de que son de origen de ratón, dando como resultado una mala especificidad de anticuerpo, baja afinidad de anticuerpo y una respuesta de anticuerpo anti-ratón fuerte del hospedador (HAMA, Shawler et al. 1985). Esta respuesta HAMA puede conducir a inflamación, fiebre, e incluso muerte del paciente. Los anticuerpos de ratón tienen una baja afinidad en humanos y por razones aún desconocidas tienen una vida media extremadamente corta en circulación humana (19-42 horas) en comparación con anticuerpos humanos (21 días, Frödin et al. 1990). Eso, junto con la severidad de la respuesta HAMA, ha provocado el desarrollo de estrategias alternativas para generar inmunoglobulinas más humanas o completamente humanizadas (analizado por Owens y Young 1994, Sandhu 1992, Vaswani et al. 1998). Una de dichas estrategias hace uso de las regiones constantes de la inmunoglobulina humana para reemplazar sus equivalentes murinos, dando como resultado una nueva generación de anticuerpos "quiméricos" y "humanizados". Se toma este enfoque porque la respuesta HAMA se debe principalmente a los dominios constantes (Oi et al. 1983; Morrison et al. 1984). Un ejemplo de dicho anticuerpo quimérico es CAMPATH-1H (Reichmann et al. 1988). El Ab CAMPATH-1H, usado en el tratamiento de linfoma de células B no de Hodgkin y la artritis reumatoide refractaria, se dirige frente al antígeno CAMPATH-1 humano (CDw52) presente en todas las células linfoides y monolitos pero no en otros tipos celulares (Hale et al. 1988, Isaacs et al. 1992). Otros ejemplos son Rituxan (Rituximab) dirigido frente a CD20 humano (Reff et al. 1994) y 15C5, un anticuerpo quimérico obtenido frente al dímero del fragmento D humano (Vandamme et al. 1990, Bulens et al. 1991) usado en representación de coagulantes sanguíneos. Sin embargo, como esta nueva generación de anticuerpos quiméricos es aún parcialmente murina, puede inducir una respuesta inmune en humanos, aunque no tan fuerte como la respuesta HAMA frente a anticuerpos completamente de origen de ratón.

En otro enfoque más sofisticado, se reemplazan diversos restos presentes en los dominios variables del anticuerpo, pero aparentemente no esenciales para el reconocimiento de antígeno, por tramos de aminoácidos de tipo más humano, dando como resultado una segunda generación de anticuerpos hiperquiméricos (Vaswani et al. 1998). Un ejemplo bien conocido de este enfoque es Herceptin (Carter et al. 1992), un anticuerpo que es 95% humano, que está dirigido frente a HER2 (un antígeno específico de tumor) y usado en pacientes de tumor de mama.

Un modo más preferido de reemplazar inmunoglobulinas recombinantes de ratón podría ser una que da como resultado la generación de inmunoglobulinas humanas. De manera importante, como no es ético inmunizar humanos con materiales biológicos experimentales, no es factible seleccionar posteriormente células B específicas para la inmortalización con se ha mostrado para células B de ratón (Köhler y Milstein 1975). Aunque las células B de pacientes se seleccionaron para anticuerpos específicos frente a antígenos de cáncer, es técnicamente más difícil preparar inmunoglobulinas humanas a partir de material humano en comparación con anticuerpos de ratón (Köhler y Milstein, 1975). Un enfoque recombinante para producir anticuerpos completamente humanos llega a ser factible con el uso de bibliotecas de anticuerpos mostrados por fagos, que expresan dominios variables de origen humano (McCafferty et al. 1990, Clarkson et al. 1991, Barbas et al. 1991, Garrard et al. 1991, Winter et al. 1994, Burton y Barbas, 1994). Estas regiones variables se seleccionan por su afinidad específica para ciertos antígenos y se unen posteriormente a los dominios constantes de inmunoglobulinas humanas, dando como resultado inmunoglobulinas recombinantes humanas. Un ejemplo de este último enfoque es el anticuerpo Fv de cadena simple 17-1A (Riethmuller et al. 1994) que se convirtió en una inmunoglobulina kappa IgG1 humana intacta llamada UBS-54, dirigida frente a la molécula EpCAM asociada a tumor (Huls et al. 1999).

Los sistemas de producción para generar inmunoglobulinas humanas son diversos. Las inmunoglobulinas de ratón usadas por primera vez en ensayos clínicos se produjeron en grandes cantidades en su célula B específica parental y se fusionaron a una célula de mieloma de ratón para la inmortalización. Una desventaja de este sistema es que las inmunoglobulinas producidas son completamente de origen de ratón y dan una respuesta inmune drástica (respuesta HAMA) en el paciente humano (como se ha descrito anteriormente).

Los anticuerpos parcialmente humanizados o humanos carecen de célula B parental que puede inmortalizarse y por lo tanto tiene que producirse en otros sistemas como células de Ovario de Hámster Chino (CHO) o células de Riñón de Crías de Hámster (BHK). También es posible usar células que normalmente son apropiadas para la producción de inmunoglobulinas como células de mieloma humano o de ratón obtenidas de tumor. Sin embargo, los rendimientos de anticuerpos obtenidos en células de mieloma son, en general, relativamente bajos ($\pm 0,1 \mu\text{g/ml}$) cuando se comparan con los obtenidos en las células B originariamente identificadas e inmortalizadas que producen inmunoglobulinas completamente murinas ($\pm 10 \mu\text{g/ml}$, Sandhu 1992).

Para evitar estos y otros defectos, se están desarrollando diferentes sistemas para producir inmunoglobulinas humanizadas o humanas con rendimientos más altos.

Por ejemplo, se ha mostrado recientemente que pueden producirse cepas de ratón transgénicas que tienen los genes de IgG de ratón reemplazados por sus equivalentes humanos (Bruggeman et al., 1991, Lonberg et al., 1994, Lonberg y Huszar, 1995, Jacobovits, 1995). Se introdujeron cromosomas artificiales de levadura (YAC) que
 5 contenían grandes fragmentos de la cadena pesada y ligera (κ) del loci de la inmunoglobulina (Ig) humana en ratones con Ig inactivadas, dando como resultado una producción de anticuerpos humanos que se parecen mucho a los vistos en humanos, incluyendo el reordenamiento génico, ensamblaje, y repertorio (Mendez et al 1997, Green et al. 1994). Asimismo, Fishwild *et al.* (1996) ha construido transgénicos de Ig humanas para obtener inmunoglobulinas humanas usando tecnología de hibridoma convencional posterior. Las células de hibridoma secretan
 10 inmunoglobulinas humanas con propiedades similares a las de ratones de tipo silvestre incluyendo estabilidad, crecimiento, y niveles de secreción. Los anticuerpos recombinantes producidos de dichas cepas de ratones transgénicos llevan secuencias de aminoácidos no humanos.

No obstante, las inmunoglobulinas humanas producidas de este modo tienen la desventaja de ser producidas en
 15 células no humanas, dando como resultado modificaciones post-traduccionales no humanas como glicosilación y/o plegamiento de las subunidades. Todos los anticuerpos se glicosilan en posiciones conservadas en sus regiones constantes, y la presencia de carbohidratos puede ser crítica para las funciones de eliminación del antígeno tales como activación complementaria. La estructura de los carbohidratos unidos puede también afectar a la actividad del anticuerpo. La glicosilación de anticuerpos puede estar influida por la célula en que se produce, la conformación del anticuerpo y las condiciones de cultivo celular. Por ejemplo, los anticuerpos producidos en células de ratón llevan glicanos que contienen el resto Gal alfa1-3Gal, que está ausente en proteínas producidas en células humanas (Borrebaeck et al. 1993, Borrebaeck. 1999). Está presente en humanos un título muy alto de anticuerpos anti-Gal alfa1-3Gal (100 μ g/ml, Galili, 1993) que causan una rápida eliminación de proteínas (murinas) que llevan este resto en sus glicanos.

Pronto llega a ser claro que para ejercer un efecto, los pacientes necesitan tratarse con dosis muy altas de inmunoglobulinas recombinantes durante periodos prolongados de tiempo. Parece probable que las modificaciones post-traduccionales en inmunoglobulinas humanas o humanizadas que no se producen en células humanas afectan claramente a la velocidad de eliminación de estos anticuerpos del torrente sanguíneo.

No está claro porqué las inmunoglobulinas producidas en células CHO también necesitan aplicarse en dosificaciones muy altas, ya que el resto Gal alfa1-3Gal no está presente en glicanos de proteínas obtenidas de esta línea celular (Rother y Squinto. 1996). Por lo tanto, otras modificaciones post-traduccionales además de los restos Gal alfa1-3Gal está probablemente implicadas en respuestas inmunes específicas en humanos frente a
 35 inmunoglobulinas completamente humanas o humanizadas producidas en dichas células CHO.

La técnica, por tanto, muestra que es posible producir anticuerpos humanizados sin secuencias proteicas derivadas murinas. Sin embargo, la actual generación de inmunoglobulinas recombinantes aún difiere de sus equivalentes humanos naturales, por ejemplo, por modificaciones post-traduccionales tales como glicosilación y plegamiento.
 40 Esto puede dar como resultado la activación del sistema inmune del paciente y causar respuestas no deseables que pueden afectar a la eficacia del tratamiento. De este modo, a pesar del desarrollo de anticuerpos quiméricos, los sistemas de producción actuales aún necesitan optimización para producir anticuerpos activos completamente humanos o humanizados.

Es por tanto deseable tener métodos para producir anticuerpos completamente humanos que funcionen en consecuencia, y que, además, se produzcan a rendimientos más altos que los observados en células de mieloma humanas.

Por tanto, podría ser una mejora en la técnica proporcionar una célula humana que produzca procesamiento de proteínas de tipo humano consecuente como modificaciones post-traduccionales y peri-traduccionales, tales como, aunque sin limitación, por ejemplo, glicosilación. También podría ser ventajoso proporcionar un método para producir una célula de mamífero recombinante e inmunoglobulinas de células de mamífero recombinantes en producción a gran escala.

Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método para producir al menos un dominio variable de una inmunoglobulina en una célula de mamífero recombinante, que comprende proporcionar una célula de mamífero que comprende un ácido nucleico que al menos una proteína E1 inmortalizadora de un adenovirus o un derivado, homólogo y/o fragmento funcional del mismo en su genoma, y también comprende un segundo ácido nucleico que codifica dicha inmunoglobulina integrado en su genoma, cultivar dicha célula en un medio apropiado y recoger al menos un anticuerpo monoclonal de dicha célula y/o dicho medio.

Previamente se han encontrado pocas, si las hay, células humanas apropiadas para producir inmunoglobulinas de cualquier modo reproducible y aumentable a escala. Las células de la presente invención al menos una proteína E1 adenoviral inmortalizadora y son capaces de crecer de manera relativamente independiente de factores de crecimiento exógenos.

Además, estas células son capaces de producir inmunoglobulinas en cantidades significativas y son capaces de procesar correctamente las inmunoglobulinas generadas.

5 El hecho de que los tipos celulares que se han usado para la producción de inmunoglobulinas estén obtenidos de tumor añade un riesgo adicional con estas líneas celulares particulares y da como resultado procedimientos de aislamiento estrictos para las inmunoglobulinas para evitar la actividad transformante o material tumorigénico en ninguna preparación. Por lo tanto se prefiere emplear un método de acuerdo con la invención, por el cual dicha célula se obtiene de una célula primaria. Para ser capaz de crecer indefinidamente, una célula primaria necesita immortalizarse, que en la presente invención se ha conseguido por la introducción de una proteína E1 adenoviral.
10 Para conseguir una producción a gran escala (continua) de inmunoglobulinas a través de cultivo celular, se prefiere tener células capaces de crecer sin la necesidad de anclaje. Las células de la presente invención tienen esa capacidad. La capacidad de crecimiento independiente de anclaje se mejora cuando las células comprenden un secuencia obtenida de adenovirus que codifica E2A (o un derivado o análogo o fragmento funcional de la misma) en su genoma. En una realización preferida la secuencia que codifica E2A codifica un mutante de E2A sensible a temperatura, tal como ts125. Dicha célula puede, además, comprender un ácido nucleico (por ejemplo, que codifica tTa), que permite un expresión regulada de un gen de interés cuando se coloca bajo el control de un promotor (por ejemplo, un promotor TetO).

20 El ácido nucleico puede codificar una cadena pesada, una cadena pesada variable, una cadena ligera, y/o una cadena ligera variable de una inmunoglobulina. Como alternativa, un ácido nucleico separado o distinto puede codificar uno o más dominios variables de una Ig (o un derivado, homólogo y/o fragmento funcional del mismo), como equivalente del primer ácido nucleico (descrito anteriormente). Uno o más ácidos nucleicos descritos en este documento pueden codificar un ScFv y puede ser humano o humanizado. El ácido o ácidos nucleicos de la presente invención se colocan preferiblemente bajo el control de un promotor inducible (o un derivado funcional del mismo).

25 Para tener un sistema de producción limpio y seguro a partir del cual es fácil aislar las inmunoglobulinas deseadas, se prefiere tener un método de acuerdo con la invención, por el cual dicha célula humana no incluye otras secuencias adenovirales. La célula más preferida para los métodos y usos de la invención es PER.C6 o un derivado de la misma depositada con el número ECACC 96022940. Se ha descubierto que PER.C6 es más estable, particularmente en el manejo, que, por ejemplo, las células 293 humanas transformadas inmortalizadas por la región E1 adenoviral. Las células PER.C6 se han caracterizado y documentado ampliamente, demostrando un buen proceso de aumento a escala, crecimiento en suspensión e independencia de factores de crecimiento. Además, PER.C6 puede incorporarse en una suspensión de un modo altamente reproducible, haciéndola particularmente apropiada para producción a gran escala. En este aspecto, la línea celular PER.C6 se ha caracterizado para el crecimiento en biorreactor, donde puede crecer a densidades muy altas.
30

35 Las células de la presente invención, en particular PER.C6, pueden cultivarse de manera ventajosa en ausencia de suero obtenido de animal o humano, o componentes de suero obtenido de animal o humano. De este modo, el aislamiento de anticuerpos monoclonales se simplifica y se potencia su seguridad debido a la ausencia de proteínas humanas o animales adicionales en el cultivo. La ausencia de suero aumenta adicionalmente la fiabilidad del sistema ya que el uso de medios sintéticos que se contemplan en este documento, potencian la reproducibilidad. La invención también proporciona el uso de una célula de mamífero recombinante para la producción de al menos un dominio variable de una inmunoglobulina, teniendo dicha célula una secuencia que codifica al menos una proteína E1 inmortalizadora de un adenovirus o un derivado, homólogo o fragmento funcional de las mismas en su genoma, que no produce dicha célula proteínas estructurales adenovirales. En otra realización la invención proporciona un uso tal en el que dicha célula deriva de una célula primaria, preferiblemente dicha célula humana es una célula PER.C6 o derivado de la misma.
40

45 La invención también proporciona un uso de acuerdo con la invención, donde dicha célula también comprende una secuencia que codifica E2A (o un derivado o análogo o fragmento funcional de la misma) en su genoma, preferiblemente donde dicha E2A es sensible a la temperatura. Además, la invención proporciona un método para usar la invención, donde dicha célula también comprende una proteína trans-activadora para la inducción de dicho promotor inducible. La invención también proporciona inmunoglobulinas que se pueden obtener por un método de acuerdo con la invención o por un uso de acuerdo con la invención.
50

55 Las inmunoglobulinas a expresar en las células de la presente invención se conocen por los especialistas en la técnica. Los ejemplos de inmunoglobulinas recombinantes incluyen, aunque sin limitación, Herceptin, Rituxan (Rituximab), UBS-54, CAMPATH-1H y 15C5.

60 La presente invención también proporciona métodos para producir al menos un dominio variable de una inmunoglobulina en una célula de mamífero recombinante utilizando la célula de mamífero recombinante inmortalizada de la invención, cultivando la misma en un medio apropiado, y recogiendo al menos un dominio variable de una Ig seleccionada de la célula de mamífero recombinante y/o medio. Las inmunoglobulinas, dominios variables de las inmunoglobulinas, o derivados de las mismas, pueden usarse para el tratamiento terapéutico de mamíferos o la fabricación de composiciones farmacéuticas.
65

En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir una proteína viral distinta de una proteína de adenovirus o adenoviral par usar como vacuna que comprende proporcionar una célula con al menos una secuencia que codifica al menos un producto génico del gen E1 o un derivado funcional del mismo de un adenovirus, proporcionar dicha célula con un ácido nucleico que codifica dicha proteína viral integrada en su genoma, cultivar dicha célula en una medio apropiado que permite la expresión de dicha proteína viral y recoger la proteína viral de dicho medio y/o dicha célula. Hasta la presente invención hay pocas, si las hay, células (humanas) que se ha descubierto que son apropiadas para producir proteínas virales para usar como vacunas de cualquier modo reproducible y aumentable a escala y/o de rendimientos suficientemente altos y/o fácilmente purificable. Ahora se ha descubierto que las células que comprenden secuencias E1 adenoviral, en su genoma, son capaces de producir la proteína viral en cantidades significativas.

La célula de acuerdo con la invención se obtiene de una célula humana primaria, preferiblemente una célula HER que se inmortaliza por un producto génico de dicho gen E1. Para ser capaz de crecer, una célula primaria necesita, por supuesto, inmortalizarse. Un buen ejemplo de dicha célula es una obtenida de un retinoblasto embrionario humano.

En células de acuerdo con la invención es importante que las secuencias del gen E1 no se pierdan durante el ciclo celular. Por lo tanto se prefiere que dicha secuencia que codifica al menos un producto génico del gen E1 esté presente en el genoma de dicha célula (humana). Por razones de seguridad se tiene el mayor cuidado para evitar secuencias adenovirales no necesarias en la células de acuerdo con la invención. Por tanto, otra realización de la invención es para proporcionar células que no producen proteínas estructurales adenovirales. Sin embargo, para conseguir producción de proteínas víricas a gran escala (continua) a través del cultivo celular se prefiere tener células capaces de crecer sin necesidad de anclaje. Las células de la presente invención tienen esa capacidad. Para tener un sistema de producción limpio y seguro a partir del cual es fácil recuperar y, si se desea, purificar la proteína vírica, se prefiere tener un método de acuerdo con la invención, por el cual dicha célula humana no comprende otras secuencias adenovirales. La célula más preferida para los métodos y usos de la invención es PER.C6 depositada con el número ECACC 96022940, o un derivado de la misma.

De este modo, la invención proporciona un método que usa una célula de acuerdo con la invención, donde dicha célula también comprende una secuencia que codifica E2A o un derivado o análogo o fragmento funcional de la misma, preferiblemente una célula donde dicha secuencia que codifica E2A o un derivado o análogo o fragmento funcional de la misma está presente en el genoma de dicha célula humana y más preferiblemente una célula donde dicha secuencia que codifica E2A codifica un mutante E2A sensible a temperatura.

Además, como se ha expuesto, la invención también proporciona un método de acuerdo con la invención donde dicha célula (humana) es capaz de crecer en suspensión.

La invención también proporciona un método donde dicha célula humana puede cultivarse en ausencia de suero. Las células de acuerdo con la invención, en particular PER.C6 tienen la ventaja adicional de que pueden cultivarse en ausencia de suero o componentes de suero. El aislamiento es fácil, se potencia la seguridad y la fiabilidad del sistema es buena (los medios sintéticos son los mejores en reproducibilidad). Las células humanas de la invención y en particular las basadas en células primarias, y particularmente las basadas en células HER, son capaces de modificaciones post y peri-traduccionales y ensamblaje normales. Esto significa que son muy apropiadas para preparar proteínas virales para usar en vacunas.

Por tanto la invención proporciona un método de acuerdo con la invención, donde dicha proteína viral comprende una proteína que experimenta modificaciones post-traduccionales y/o peri-traduccionales, especialmente donde dichas modificaciones comprenden glicosilación. La vacuna puede usarse para la vacunación de humanos. Sin embargo, la vacuna es también eficaz en animales. En esta realización la vacuna se produce preferiblemente de acuerdo con la invención donde dicha célula se obtiene de la misma especie que la especie de la que se obtiene la proteína viral en la vacuna. Una proteína viral puede ser la proteína viral completa o un equivalente funcional de la misma. Un equivalente funcional de una proteína viral es al menos una parte inmunogénica de la proteína viral. Un buen ejemplo de una vacuna viral que ha sido incómoda de producir de cualquier manera fiable es la vacuna de la gripe. La invención proporciona un método de acuerdo con la invención donde dichas proteínas virales comprenden al menos una neuraminidasa y/o una hemaglutinina del virus de la Gripe. Otras proteínas virales (subunidades) que puede producirse en los métodos de acuerdo con la invención incluyen proteínas de enterovirus, tales como rinovirus, aftovirus, o el virus de la poliomielititis, herpes virus, tales como el virus del herpes simple, el virus de la pseudorrabia o el virus del herpes bovino, ortomixovirus, tales como el virus de la gripe, un paramixovirus, tal como el virus de la enfermedad de newcastle, el virus sincitial respiratorio, el virus de las paperas o el virus del sarampión, retrovirus, tal como el virus de la inmunodeficiencia humana o un parvovirus o un papovavirus, rotavirus o un coronavirus, tal como el virus de la gastroenteritis transmisible o un flavivirus, tal como el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas o el virus de la fiebre amarilla, un togavirus, tal como el virus de la rubéola o el virus de la encefalomielititis equina del este, el oeste o venezolana, un virus que causa la hepatitis, tal como el virus de la hepatitis A o de la hepatitis B, un pestivirus, tal como el virus del cólera porcino o un rbdovirus, tal como el virus de la rabia.

La invención también proporciona el uso de una célula humana que tiene una secuencia que codifica al menos una proteína E1 de un adenovirus o un derivado, homólogo o fragmento funcional de las mismas en su genoma, que no produce dicha célula proteínas adenovirales estructurales para la producción de al menos una proteína viral para usar en una vacuna. Por supuesto, para dicho uso las células preferidas en los métodos de acuerdo con la invención también son preferidas. La invención también proporciona los productos que se obtienen de los métodos y usos de acuerdo con la invención, especialmente proteínas virales que se pueden obtener de acuerdo con esos usos y/o métodos, especialmente cuando se llevan en una composición farmacéutica que comprende excipientes apropiados y en algunos formatos (subunidades) adyuvantes. Las dosificaciones y medios de administración pueden seleccionarse a través de ensayo clínico normal siempre y cuando aún no estén disponibles como vacunas ya registradas.

Por tanto, la invención también proporciona una proteína viral para usar en una vacuna que se puede obtener por un método o por un uso de acuerdo con la invención, estando libre dicha proteína de cualquier material proteico de mamífero no humano y una formulación farmacéutica que comprende dicha proteína viral.

En una realización preferida, la invención proporciona vacunas de la gripe que se pueden obtener por un método de acuerdo con la invención o por un uso de acuerdo con la invención.

Ejemplos

Para ilustrar la invención, se proporcionan los siguientes ejemplos, que no se pretende que limiten el alcance de la invención. La molécula de Eritropoyetina humana (EPO) contiene cuatro cadenas de carbohidrato. Tres contienen enlaces N a asparaginas, y una contiene un enlace O a un resto de serina. La importancia de glicosilación en la actividad biológica de EPO se ha documentado bien (Delorme et al 1992; Yamaguchi et al 1991). El ADNc que codifica EPO humana se clonó y se expresó en células PER. C6 y células PER.C6/E2A, se mostró la expresión, y se analizó el patrón de glicosilación.

Ejemplo 1: Construcción de vectores de expresión básicos

El plásmido pcDNA3.1/Hygro(-) (Invitrogen) se digirió con NruI y EcoRV, se defosforiló en los extremos 5' por Fosfatasa Alcalina de Camarón (SAP, GIBCO Life Tech.) y el fragmento plasmídico que carecía de potenciador temprano inmediato y el promotor de citomegalovirus (CMV) se purificó del gel. El plásmido pAdApt, que contenía el potenciador/promotor de CMV de longitud completa (de -735 a +95) al lado de las secuencias Adeno-derivadas solapantes para producir Adenovirus recombinante, se digirió con AvrII, se rellenó con la polimerasa Klenow y se digirió con HpaI; el fragmento que contenía el potenciador y el promotor de CMV se purificó en gel de agarosa. Este fragmento del potenciador y promotor de CMV se ligó por extremos romos al fragmento NruI/EcoRV de pcDNA3.1/Hygro(-). El plásmido resultante se denominó pcDNA2000/Hyg(-).

El plásmido pcDNA2000/Hyg(-) se digirió con PmlI, y el plásmido linealizado que carecía del gen marcador de resistencia a Higromicina se purificó del gel, y se religó. El plásmido resultante se denominó pcDNA2000. El plásmido pcDNA2000 se digirió con PmlI y se defosforiló por SAP a ambos extremos. Se usó el plásmido pIG-GC9 que contenía el ADNc de DHFR humano tipo silvestre (Havenga et al 1998) para obtener el gen de DHFR de tipo silvestre por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con sitios PmlI introducidos no codificantes cadena arriba y cadena abajo del ADNc. Los cebadores de PCR que se usaron estaban por encima de DHFR: 5'-GAT CCA CGT GAG ATC TCC ACC ATG GTT GGT TCG CTA AAC TG-3' y por debajo de DHFR: 5'-GAT CCA CGT GAG ATC TTT AAT CAT TCT TCT CAT ATAC-3'. El producto de PCR se digirió con PmlI y se usó para el ligamiento en pcDNA2000 (digerido con PmlI y defosforilado por SAP) para obtener pcDNA2000/DHFRwt (Figura 1). Las secuencias de tipo silvestre y los sitios de clonación usados correctamente se confirmaron por secuenciación de doble cadena. Además, se usó una versión mutante del gen DHFR humano (DHFRm) para alcanzar una resistencia superior a 10.000 veces a metotrexato en PER.C6 y PER.C6/E2A por selección de una posible integración del transgén en una región genómica con alta actividad transcripcional. Este mutante lleva una sustitución de aminoácido en la posición 32 (fenilalanina a serina) y en la posición 159 (leucina a prolina) introducida por el procedimiento de PCR. Se usó PCR en el plásmido pIG-GC12 (Havenga et al 1998) para obtener la versión mutante de DHFR humano. La clonación de este mutante es comparable al de DHFR de tipo silvestre. El plásmido obtenido con DHFR mutante se denominó pcDNA2000/DHFRm.

pIPspAdapt 6 (Galapagos) se digirió con las enzimas de restricción AgeI y BamHI. El fragmento polienlazador resultante tiene la siguiente secuencia: 5'-ACC GGT GAA TTC GGC GCG CCG TCG ACG ATA TCG ATC GGA CCG ACG CGT TCG CGA GCG GCC GCA ATT CGC TAG CGT TAA CGG ATC C-3'. Los sitios de restricción AgeI y BamHI usados están subrayados. Este fragmento contiene varios sitios de reconocimiento de enzimas de restricción únicos y se purificó en gel de agarosa y se ligó a un plásmido pcDNA2000/DHFRwt purificado en gel de agarosa y digerido con AgeI/BamHI. El vector resultante se llamó pcDNA2001/DHFRwt (Figura 2).

pIPspAdapt 7 (Galapagos) se digirió con las enzimas de restricción AgeI y BamHI y tiene la siguiente secuencia: 5'-ACC GGT GAA TTG CGG CCG CTC GCG AAC GCG TCG GTC CGT ATC GAT ATC GTC GAC GGC GCG AAT TCG CTA GCG TTA ACG GAT CC-3'. Los sitios de reconocimiento AgeI y BamHI usados están subrayados. El

fragmento polienlazador contiene varios sitios de reconocimiento de enzimas de restricción únicos (diferentes de pIPspAdapt 6), que se purifica en gel de agarosa y se liga a un pcDNA2000/DHFRwt purificado en gel de agarosa y digerido con AgeI/BamHI. Esto da como resultado pcDNA2002/DHFRwt (Figura 3)

5 pcDNA2000/DHFRwt se digirió parcialmente con la enzima de restricción PvuII. Hay dos sitios PvuII presentes en este plásmido y la clonación se realizó en el sitio entre el poli(A) de SV40 y ColE1, no en el sitio PvuII cadena abajo del Poli(A) de BGH. Una mezcla digerida en un único sitio del plásmido se defosforiló con SAP y se hizo romo con la enzima Klenow y se purificó en gel de agarosa. pcDNA2001/DHFRwt se digirió con las enzimas de restricción MunI y PvuII y se rellenó con Klenow y nucleótidos libres para tener ambos con extremos romos. El fragmento que contenía el promotor de CMV-enlazador-poli(A) de BGH resultante se aisló en gel y se separó del vector. Este fragmento se ligó en el vector defosforilado y parcialmente digerido y se comprobó la orientación y el sitio de inserción. El plásmido resultante se llamó pcDNAs3000/DHFRwt (Figura 4).

Ejemplo 2: Construcción de vectores de expresión de EPO.

15 El ADNc de EPO humana de longitud completa se clonó, empleando los cebadores oligonucleotídicos EPO-START (SEC ID N° 5): 5' AAA AAG GAT CCG CCA CCA TGG GGG TGC ACG AAT GTC CTG CCT G-3' y EPO-STOP (SEC ID N° 6): 5' AAA AAG GAT CCT CAT CTG TCC CCT GTC CTG CAG GCC TC-3' (Cambridge Bioscience Ltd) en una PCR sobre una biblioteca de ADNc de hígado humano adulto. El fragmento amplificado se clonó en pUC18 linealizado con BamHI. La secuencia se comprobó por secuenciación de doble cadena. Este plásmido, que contenía el ADNc de EPO en pUC18 se digirió con BamHI y el inserto de EPO se purificó a partir de gel de agarosa. Los plásmidos pcDNA2000/DHFRwt y pcDNA2000/DHFRm se linealizaron con BamHI y se defosforilaron en el saliente 5' por SAP, y los plásmidos se purificaron a partir de gel de agarosa. El fragmento de ADNc de EPO se ligó en los sitios BamHI de pcDNA2000/DHFRwt y pcDNA2000/DHFRm; los plásmidos resultantes se designaron pEPO2000/DHFRwt (figura 5) y pP02000/DHFRm.

30 El plásmido pMLPI.TK (descrito en el documento WO 97/00326) es un ejemplo de un plásmido adaptador diseñado para su uso en combinación con líneas celulares de empaquetamiento mejoradas como PER.C6 (descrita en los documentos WO 97/00326 y US 08/892.873). En primer lugar, se generó un fragmento de PCR de ADN molde de pZipΔMo+PyF101 (N') (descrito en el documento PCT/NL96/00195) con los siguientes cebadores: LTR-1 (SEC ID N°: 7) (5'-CTG TAC GTA CCA GTG CAC TGG CCT AGG CAT GGA AAA ATA CAT AAC TG-3') y LTR-2 (SEC ID N°: 8) (5'-GCG GAT CCT TCG AAC CAT GGT AAG CTT GGT ACC GCT AGC GTT AAC CGG GCG ACT CAG TCA ATC G-3'). El producto de PCR se digirió después con BamHI y se ligó en PULP10 (Levrero *et al* 1991), que se digirió con Pull y BamHI, generando de este modo el vector pLTR10. Este vector contiene secuencias adenovirales de pb 1 hasta pb 454 seguido de un promotor que consiste en una parte del Mo-MuLV LTR que tiene sus secuencias potenciadoras de tipo silvestre reemplazadas por el potenciador de un virus de polioma mutante (PyF101). El fragmento promotor se designó L420. A continuación, se insertó la región codificante del gen de HSA murino. Se digirió pLTR10 con BstBI seguido de tratamiento de Klenow y digestión con NcoI. El gen de HSA se obtuvo por amplificación por PCR en pUC18-HSA (Kay *et al* 1990) usando los siguientes cebadores: HSA1 (SEC ID N°: 9) (5'-GCG CCA CCA TGG GCA GAG CGA TGG TGG C-3') y HSA2 (SEC ID N°: 10) (5'-GTT AGA TCT AAG CTT GTC GAC ATC GAT CTA CTA ACA GTA GAG ATG TAG AA-3'). El fragmento de PCR de 269 pb se subclonó en un vector lanzadera usando sitios NcoI y BglII. La secuenciación confirmó la incorporación de la secuencia codificante correcta del gen de HSA, pero con una inserción extra de TAG inmediatamente después del codón de parada TAG. La región codificante del gen de HSA, incluyendo la duplicación de TAG se escindió como un fragmento NcoI/Sall y se clonó en un pLTR10 cortado con NcoI/BstBI de 3,5 kb, dando como resultado pLTR-HSA10. Este plásmido se digirió con EcoRI y BamHI después de lo cual el fragmento, que contenía el ITR izquierdo, la señal de empaquetamiento, el promotor de L420 y el gen de HSA, se insertó en el vector pMLPI.TK digerido con las mismas enzimas y reemplazando de este modo las secuencias del promotor y el gen, dando como resultado el nuevo plásmido adaptador pAd5/L420-HSA.

50 El plásmido pAd5/L420-HSA se digirió con AvrII y BglII seguido de tratamiento con Klenow y se ligó con un fragmento de 1570 pb romo de pcDNA1/amp (Invitrogen) obtenido por digestión con HhaI y AvrII seguido de tratamiento con ADN polimerasa T4. Este plásmido adaptador se nombró pAd5/CLIP.

55 Para permitir la retirada de secuencias de vector de la ITR izquierdo, se digirió parcialmente pAd5/L420-HSA con EcoRI y se aisló el fragmento lineal. Se hibridó un oligo de la secuencia (SEC ID N°: 11) 5' TTA AGT CGA C-3' consigo mismo dando como resultado un enlazador con un sitio Sall y saliente EcoRI. El enlazador se ligó con el vector pAd5/L420-HSA parcialmente digerido y se seleccionaron clones que tenían el enlazador insertado en el sitio EcoRI 23 pb cadena arriba del ITR de adenovirus izquierdo en pAd5/L420-HSA dando como resultado pAd5/L420-HSA.sal.

65 Para permitir la retirada de secuencias de vector de la ITR izquierda, también se digirió parcialmente pAd5/CLIP con EcoRI y se aisló el fragmento lineal. El enlazador de EcoRI 5' TTA AGT CGA C-3' se ligó con el vector pAd5/CLIP parcialmente digerido y se seleccionaron clones que tenían el enlazador insertado en el sitio EcoRI 23 pb cadena arriba de la ITR de adenovirus izquierda dando como resultado pAd5/CLI P.sal. El vector pAd5/L420-HSA también se modificó para crear un sitio PacI cadena arriba de la ITR izquierda. En esto se digirió pAd5/L420-HSA con EcoRI

y se ligó con un enlazador Pacl (SEC ID N°: 12) (5'-AAT TGT CTT AAT TAA CCG CTT AA-3'). La mezcla de ligación se digirió con Pacl y se volvió a ligar después de aislamiento del ADN lineal de gel de agarosa para retirar enlazadores concatemerizados. Esto dio como resultado el plásmido adaptador pAd5/L420-HSA.pac.

5 Este plásmido se digirió con AvrII y BglII. El fragmento del vector se ligó con un oligonucleótido enlazador digerido con las mismas enzimas de restricción. El enlazador se preparó hibridando oligos de la siguiente secuencia: PLL- 1 (SEC ID N°: 13) (5'- GCC ATC CCT AGG AAG CTT GGT ACC GGT GAA TTC GCT AGC GTT AAC GGA TCC TCT AGA CGA GAT CTG G-3') y PLL-2 (SEC ID N°: 14) (5'- CCA GAT CTC GTC TAG AGG ATC CGT TAA CGC TAG CGA ATT CAC CGG TAC CAA GCT TCC TAG GGA TGG C-3'). Los enlazadores hibridados se ligaron de forma
10 separada al fragmento pAdS/L420-HSA.pac digerido con AvrII/BglII, dando como resultado pAdMire.pac. Posteriormente, se clonó un fragmento de Scal/BsrGI de 0,7 kb de pAd5/CLIP.sal que contenía el enlazador sal, en los sitios Scal/BsrGI del plásmido pAdMire.pac después de la retirada del fragmento que contenía el enlazador pac. Este plásmido resultante se nombró pAdMire.sal.

15 El plásmido pAd5/L420-HSA.pac se digirió con AvrII y los extremos salientes 5' se llenaron usando enzima Klenow. Una segunda digestión con HindIII dio como resultado la retirada de las secuencias promotoras de L420. El fragmento del vector se aisló y se ligó de forma separada a un fragmento de PCR que contenía la secuencia promotora del CMV. Este fragmento de PCR se obtuvo después de amplificación de las secuencias de CMV a partir de pCMVLacl (Stratagene) con los siguientes cebadores: CMVplus (SEC ID N°: 15) (5'-GAT CGG TAC CAC TGC AGT GGT CAA TAT TGG CCA TTA GCC-3') y CMVminA (SEC ID N°: 16) (5'- GAT CAA GCT TCC AAT GCA CCG TTC CCG GC-3'). El fragmento de PCR se digirió en primer lugar con PstI después de lo cual los extremos salientes 3' se retiraron mediante tratamiento con ADN polimerasa T4. Después el ADN se digirió con HindIII y se ligó en el vector pAd5/L420-HSA.pac digerido con AvrII/HindIII. El plásmido resultante se nombró pAd5/CMV-HSA.pac. Este plásmido se digirió después con HindIII y BamHI y el fragmento del vector se aisló y se ligó con la secuencia de poliligador HindIII/BglII obtenida después de digestión de pAdMire.pac. El plásmido resultante se nombró
20 pAdApt.pac y contiene los nucleótidos -735 a +95 del promotor/potenciador de CMV humano (Boshart M *et al* 1985). El ADNc de EPO humana de longitud completa (número de acceso de Genbank: M11319) que contenía una secuencia Kozak perfecta para traducción apropiada se retiró de la cadena principal de pUC18 después de una digestión con BamHI. El inserto de ADNc se purificó en un gel de agarosa y se ligó con pAdApt.pac que también se digirió con BamHI, se desfosforiló posteriormente en los sitios de inserción 5' y 3' usando SAP y también se purificó sobre un gel de agarosa para retirar la secuencia del ligador BamHI-BamHI corta. El plásmido circular obtenido se comprobó con digestiones de restricción con KpnI, DdeI y NcoI que proporcionaban todas las bandas del tamaño adecuado. Además, la orientación y secuencia se confirmó por secuenciación de doble cadena. El plásmido obtenido con el ADNc de EPO humana en la orientación correcta se nombró pAdApt.EPO (Figura 6).
25
30
35

Ejemplo 3: Construcción de los vectores de expresión de UBS-54.

Los dominios constantes (CH1, -2 y -3) del gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina G1 humana (IgG1) que incluye las secuencias intrónicas y el dominio de conexión ('Bisagra') se generaron por PCR usando un cebador
40 cadena arriba y un cebador cadena abajo. La secuencia del cebador cadena arriba (CAMH-UP) es 5'-GAT CGA TAT CGC TAG CAC CAA GGG CCC ATC GGT C-3', en la que los nucleótidos que hibridan se representan en cursiva y los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción secuenciales (EcoRV y NheI) están subrayados.

La secuencia del cebador cadena abajo (CAMH-DOWN) es: 5'-GAT CGT TTA AAC TCA TTT ACC CGG AGA CAG-3', en la que los nucleótidos que hibridan se representan en cursiva y el sitio de reconocimiento la enzima de restricción PmeI introducido está subrayado.
45

El orden en el que los dominios de la cadena pesada de IgG1 humana se ordenaron es el siguiente: CH1-intrón-Bisagra-intrón-CH2-intrón-CH3. Se realizó la PCR de un plásmido (pCMGgamma NEO Skappa Vgamma Cgamma hu) que contenía la cadena pesada de un anticuerpo humanizado dirigido frente al dímero D de fibrinógeno humano (Vandamme *et al.* 1990). Este anticuerpo se llamó 15C5 y la humanización se realizó con la introducción de los dominios constantes humanos que incluían las secuencias intrónicas (Bulens *et al.* 1991).
50

La PCR dio como resultado un producto de 1621 nucleótidos. Los sitios NheI y PmeI se introdujeron para clonación fácil en el polienlazador pcDNA2000/Hyg(-). El sitio NheI codificaba dos aminoácidos (Ala y Ser), que son parte de la región constante CH1, pero no se hibridaron al ADN presente en el molde (Crowe *et al.* 1992).
55

El producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción NheI y PmeI, se purificó en gel de agarosa y se ligó en un pcDNA2000/Hygro(-) purificado en gel de agarosa y digerido con NheI y PmeI. Esto dio como resultado el plásmido pHc2000/Hyg(-) (Figura 7), que puede usarse para unir los dominios constantes de la cadena pesada humana, que incluyen los intrones, a cualquier región variable posible de cualquier cadena pesada de inmunoglobulina identificada para humanización.
60

El dominio constante de la cadena ligera del gen de la inmunoglobulina humana (IgG1) se generó por PCR usando un cebador cadena arriba y un cebador cadena abajo: La secuencia del cebador cadena arriba (CAML-UP) es 5'-GAT CCG TAC GGT GGC TGC ACC ATC TGT C-3', en la que los nucleótidos que hibridan se representan en
65

cursiva y el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción SunI introducido está subrayado.

La secuencia del cebador cadena abajo (CAML-DOWN) es 5'-GAT CGT TTA AAC CTA ACA CTC TCC CCT GTT G-3', en la que los nucleótidos que hibridan están en cursiva y un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción PmeI introducido está subrayado.

Se realizó la PCR de un plásmido (pCMkappa DHFR13 15C5 kappa humanizado) que llevaba la secuencia señal murina y la región variable murina de la cadena ligera de 15C5 unida al dominio constante de la cadena ligera de IgG1 (Vandamme et al. 1990; Bulens et al. 1991).

La PCR dio como resultado un producto de 340 nucleótidos. Los sitios SunI y PmeI se introdujeron para clonación en el polienlazador pcDNA2001/DHFRwt. El sitio SunI codificaba dos amino ácidos (Arg y Thr), del que el resto de treonina es parte de la región constante de las cadenas ligeras de inmunoglobulina humana, mientras que el resto de arginina es parte de la región variable de CAMPATH-1H (Crowe et al. 1992). Esto permitió la posterior clonación de 3' en el sitio SunI, que fue única en el plásmido. El producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción SunI y PmeI y se purificó en gel de agarosa, se ligó en un pcDNA2001/DHFRwt, purificado en gel de agarosa y digerido con BamHI y PmeI, que se hizo romo por la enzima Klenow y estaba libre de nucleótidos. El ligamiento en la orientación correcta dio como resultado la pérdida del sitio BamHI en el extremo 5' y la conservación de los sitios SunI y PmeI. El plásmido resultante se llamó pLC2001/DHFRwt (Figura 8) que puede usarse dicho plásmido para unir el dominio constante de la cadena ligera humana a cualquier región variable posible de cualquier cadena ligera de inmunoglobulina identificada para humanización.

pNUT-C gamma (Huls et al., 1999) contiene los dominios constantes, los intrones y la región bisagra de la cadena pesada de IgG1 humana (Huls et al. 1999) y acogió cadena arriba del primer dominio constante el dominio variable de la cadena gamma del anticuerpo UBS-54 monoclonal completamente humanizado precedido por la siguiente secuencia peptídica líder: MACPGFLWALVISTCLEFSM (secuencia: 5'-ATG GCA TGC CCT GGC TTC CTG TGG GCA CTT GTG ATC TCC ACC TGT CTT GAA TTT TCC ATG-3'). Esto dio como resultado un inserto de aproximadamente 2 kb de longitud. La cadena gamma completa se amplificó por PCR usando un cebador cadena arriba (UBS-UP) y el cebador cadena abajo CAMH-DOWN. La secuencia de UBS-UP es la siguiente: 5'-GAT CAC GCG TGC TAG CCA CCA TGG CAT GCC CTG GCT TC-3' en la que los sitios MluI y NheI introducidos están subrayados y la secuencia Kozak perfecta está en cursiva. El producto de PCR resultante se digirió con las enzimas de restricción NheI y PmeI, se purificó en gel de agarosa y se ligó al plásmido pcDNA2000/Hygro(-) que también está digerido con NheI y PmeI, se defosforiló con tSAP y se purificó en gel. El plásmido resultante se llamó pUBS-Heavy2000/Hyg(-) (Figura 9). pNUT-C kappa contiene el dominio constante de la cadena ligera de IgG1 kappa humana (Huls et al. 1999) y acogió el dominio variable de la cadena kappa del anticuerpo UBS-54 monoclonal completamente humanizado precedido por el siguiente péptido líder: MACPGFLWALVISTCLEFSM (secuencia: 5'-ATG GCA TGC CCT GGC TTC CTG TGG GCA CTT GTG ATC TCC ACC TGT CTT GAA TTT TCC ATC-3', para detalles del plásmido véase UbiSys). Esto dio como resultado un inserto de aproximadamente 1,2 kb de longitud. El inserto completo se amplificó por PCR usando el cebador cadena arriba UBS-UP y el cebador cadena abajo CAML-DOWN, modificando de este modo el sitio de inicio de la traducción. El producto de PCR resultante se digirió con las enzimas de restricción NheI y PmeI, se purificó en gel de agarosa y se ligó a pcDNA2001/DHFRwt que también se digirió con NheI y PmeI, se defosforiló por tSAP y se purificó en gel, dando como resultado pUBS-Light2001/DHFRwt (Figura 10). Para quitar el intrón adicional que se localiza entre el dominio variable y el primer dominio constante que está presente en pNUT-Cgamma y para unir el péptido señal y el dominio variable a los dominios constantes de tipo silvestre de la cadena pesada de IgG1 humana, que carece de varios polimorfismos presentes en el dominio constante carboxi-terminal en pNUT-Cgamma, se genera un producto de PCR con el cebador UBS-UP y el cebador UBSHV-DOWN que tiene la siguiente secuencia: 5'-GAT CGC TAG CTG TCG AGA CGG TGA CCA G-3', en la que el sitio NheI introducido está subrayado y los nucleótidos que hibridan están en cursiva. El producto de PCR resultante se digiere con la enzima de restricción NheI, se purifica en gel y se liga a un plásmido pHc2000/Hyg(-) defosforilado con SAP y digerido con NheI que se purificó en gel. El plásmido con el inserto en la orientación y la pauta de lectura correctas se llamó pUBS2-Heavy2000/Hyg(-) (Figura 11). Para retirar el intrón adicional que se localiza entre el dominio variable y el dominio constante que está presente en pNUT-Ckappa y para unir el péptido señal y el dominio variable al dominio constante de tipo silvestre de la cadena ligera de IgG1 humana, se generó un producto de PCR con el cebador UBS-UP y el cebador UBSLV-DOWN que tiene la siguiente secuencia: 5'-GAT CCG TAC GCT TGA TCT CCA CCT TGG TC-3', en la que el sitio SunI introducido está subrayado. Después, el producto de PCR resultante se digirió con las enzimas de restricción MluI y SunI, se purificó en gel y se ligó a un plásmido pLC2001/DHFRwt digerido con MluI y SunI que se purificó en gel. El plásmido resultante se llamó pUBS2-Light2001/DHFRwt (Figura 12). El producto PCR de la cadena pesada de longitud completa de UBS-54 se digiere con las enzimas de restricción NheI y PmeI y se hace romo con la enzima Klenow. Este fragmento se liga al plásmido pcDNAs3000/DHFRwt que se digiere con la enzima de restricción BstXI, hecho romo, defosforilado por SAP y purificado en gel. El plásmido con el inserto de la cadena pesada se llama pUBS-Heavy3000/DHFRwt. Posteriormente, la PCR de la cadena ligera se digiere con las enzimas de restricción MluI y PmeI, se hace romo, y se purifica en gel y se liga a pUBS-Heavy3000/DHFRwt, que se digiere con HpaI, se defosforila por tSAP y se purifica en gel. El vector resultante se llama pUBS-3000/DHFRwt (Figura 13). El gen que codifica la cadena pesada de UBS-54 sin un intrón entre el dominio variable y la primera región constante y con una región constante carboxi-terminal de tipo silvestre (2031 nucleótidos) se purifica en gel después de digestión de pUBS2-2000/Hyg(-) con

EcoRI y PmeI y tratamiento con la enzima Klenow y nucleótidos libres para hacer como el sitio EcoRI. Posteriormente, el inserto se liga a un plásmido pcDNAs3000/DHFRwt que está digerido con BstXI, hecho como, defosforilado con SAP y purificado en gel. El plásmido resultante se llama pUBS2-Heavy3000/DHFRwt. pUBS2-Light2001/DHFRwt después se digiere con EcoRV y PmeI, y el inserto de 755 nucleótidos que contiene el péptido señal unido al dominio variable de la cadena kappa de UBS-54 y el dominio constante de la cadena kappa de IgG1 humana sin una secuencia intrónica se purifica en gel y se liga a pUBS2-Heavy3000/DHFRwt que está digerido con HpaI, defosforilado con tSAP y purificado en gel. El plásmido resultante se llama pUBS2-3000/DHFRwt (Figura 14).

El plásmido pRc/CMV (Invitrogen) se digirió con la enzima de restricción BstBI, se hizo como con la enzima Klenow y posteriormente se digirió con la enzima XmaI. El fragmento que contenía el gen de resistencia a Neomicina se purificó en gel de agarosa y se ligó al plásmido pUBS-Light2001/DHFRwt que se digirió con las enzimas de restricción XmaI y PmlI, seguido de defosforilación con SAP y se purificó en gel para retirar el ADNc de DHFR. El plásmido resultante se llamó pUBS-Light2001/Neo. El fragmento también se ligó un plásmido pcDNA2001/DHFRwt purificado en gel y digerido con XmaI/PmlI dando como resultado pcDNA2001/Neo. El producto de PCR del dominio variable de UBS-54 y el producto de PCR del dominio constante purificado y digerido se usaron en un ligamiento de tres puntos con un pcDNA2001/Neo digerido con MluI/PmeI. El plásmido resultante se llamó pUBS2-light2001/Neo.

Ejemplo 4: Construcción de los vectores de expresión CAMPATH-1H.

Cambridge Bioscience Ltd. (UK) genera un fragmento de 396 nucleótidos que contiene una secuencia Kozak perfecta seguida por la secuencia señal y la región variable publicada de la cadena ligera de CAMPATH-1H (Crowe et al. 1992). Este fragmento contiene, en el extremo 5', un sitio HindIII introducido y único y, en el extremo 3', un sitio SunI introducido y único y está clonado en un vector lanzadera apropiado. Este plásmido se digiere con HindIII y SunI y el fragmento de cadena ligera de CAMPATH-1H resultante se purifica en gel y se liga a un pLC2001/DHFRwt purificado en gel de agarosa y digerido con HindIII/SunI. El plásmido resultante se llama pCAMPATH-Light2001/DHFRwt. Cambridge Bioscience Ltd. (UK) generó un fragmento de 438 nucleótidos que contenía una secuencia Kozak perfecta seguida por la secuencia señal y la región variable publicada de la cadena pesada de CAMPATH-1H (Crowe et al. 1992), clonado en un vector de clonación apropiado. Este producto contiene un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción HindIII único en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción NheI único en el extremo 3'. Este plásmido se digirió con HindIII y NheI y el fragmento de la cadena pesada de CAMPATH-1H resultante se purificó en gel y se ligó a un pHC2000/Hyg(-) digerido con HindIII/NheI y purificado. El plásmido resultante se llamó pCAMPATH-Heavy2000/Hyg(-).

Ejemplo 5: Construcción de los vectores de expresión de 15C5.

La cadena pesada de la versión humanizada del anticuerpo 15C5 monoclonal dirigido frente al dímero D del fragmento de fibrina humana (Bulens et al. 1991; Vandamme et al. 1990) que consta de los dominios constantes humanos que incluyen las secuencias intrónicas, la región bisagra y las regiones variables precedidas por el péptido señal de la cadena ligera kappa de 15C5 se amplifica por PCR en el plásmido "pCMgamma NEO Skappa Vgamma Cgamma hu" como molde usando CAMH-DOWN como cebador cadena abajo y 15C5-UP como cebador cadena arriba. 15C5-UP tiene la siguiente secuencia: 5'-GA TCA CGC GTG CTA GCC ACC ATG GGT ACT CCT GCT CAG TTT CTT GGA ATC-3', en la que los sitios de reconocimiento de restricción MluI y NheI introducidos están subrayados y la secuencia Kozak perfecta está en cursiva. Para introducir de manera apropiada un contexto de Kozak apropiado, la adenina en la posición +4 (la adenina en el codón de inicio ATG es +1) se reemplaza por una guanina que da como resultado una mutación de un aminoácido de arginina en un aminoácido de glicina. Para prevenir la dimerización de los cebadores, se reemplaza la guanina de la posición +6 por una timina y la citosina de la posición +9 se reemplaza por timina. Esta última mutación deja un resto de treonina intacto. La PCR resultante se digirió con las enzimas de restricción NheI y PmeI, se purificó en gel y se ligó a un pcDNA2000/Hygro(-) digerido con NheI y PmeI, que está defosforilado por SAP y purificado en gel de agarosa. El plásmido resultante se llama p15C5-Heavy2000/Hyg(-). La cadena ligera de la versión humanizada del anticuerpo 15C5 monoclonal dirigido frente al dímero D del fragmento de fibrina humana (Bulens et al. 1991; Vandamme et al. 1990) que consta del dominio constante humano y las regiones variables precedidas por un péptido señal de 20 aminoácidos se amplifica por PCR en el plásmido pCMkappa DHFR13 15C5kappa hu como molde, usando CAML-DOWN como cebador cadena abajo y 15C5-UP como cebador cadena arriba. La PCR resultante se digiere con las enzimas de restricción NheI y PmeI, se purifica en gel y se liga a un pcDNA2000/DHFRwt digerido con NheI y PmeI que está defosforilado por SAP y purificado en gel de agarosa. El plásmido resultante se llama p15C5-Light2001/DHFRwt.

Ejemplo 6: Determinación de los niveles de selección de metotrexato, higromicina y G418.

Se sembraron PER.C6 y PER.C6/E2A en diferentes densidades. La concentración de partida de metotrexato (MTX) en estos estudios de sensibilidad variaron entre 0 nM y 2500 nM. Se determinó la concentración exacta que era letal para ambas líneas celulares; cuando las células se sembraron en densidades de 100.000 células por pocillo en un plato de 6 pocillos, los pocillos eran aún confluentes al 100% a 10 nM, aproximadamente confluentes al 90-100% a 25 nM, mientras que la mayoría de las células se morían a una concentración de 50 nM y después de aproximadamente 6 días a 15 días de incubación. Estos resultados se resumen en la Tabla 1. Las células PER.C6 se ensayaron para su resistencia a una combinación de Higromicina y G418 para seleccionar las colonias estables

que crecen más que expresaban tanto la cadena pesada como la cadena ligera para los anticuerpos monoclonales recombinantes respectivos codificados por los plásmidos que llevan un gen de resistencia a higromicina o a neomicina. Cuando las células se hacen crecer en medio normal que contiene 100 µg/ml de higromicina y 250 µg/ml de G418, las células no transfectadas se murieron y podrían aparecer colonias estables (véase Ejemplo 7).

5 Se sembraron células CHO-dhfr ATCC:CRL9096 en diferentes densidades en sus medios de cultivo respectivos. La concentración de partida de metotrexato en estos estudios de sensibilidad varía de aproximadamente 0,5 nM a 500 nM. Se determina la concentración exacta que es letal para la línea celular y posteriormente se usa directamente después de la selección de crecimiento en higromicina en el caso de la selección de la cadena pesada de IgG (hyg) y la selección de la cadena ligera (dhfr).

Ejemplo 7: Transfección de los vectores de expresión de EPO para obtener líneas celulares estables.

15 Las células de las líneas celulares PER.C6 y PER.C6/E2A se sembraron en 40 platos de cultivo tisular (10 cm de diámetro) con aproximadamente 2-3 millones de células/plato y se mantuvieron durante una noche en sus condiciones respectivas (concentración de CO₂ al 10% y temperatura, que es 39°C para PER.C6/E2A y 37°C para PER.C6). En el siguiente día, se realizaron todas las transfecciones a 37°C usando Lipofectamina (Gibco). Después del reemplazamiento con medio fresco (DMEM) después de 4 horas, las células PER.C6/E2A se transfirieron a 39°C otra vez, mientras que las células PER.C6 se mantuvieron a 37°C. Se transfectaron veinte platos de cada línea celular con 5 µg de pEPO2000/DHFRwt digerido con Scal y se transfectaron veinte platos con 5 µg de pEPO2000/DHFRm digerido con Scal, todos de acuerdo con los protocolos convencionales. Otros 13 platos sirvieron como controles negativos para la muerte por metotrexato y la eficacia de transfección que fue de aproximadamente el 50%. En el siguiente día se añadió MTX a los platos en concentraciones que varían entre 100 y 1000 nM para DHRFwt y 50.000 y 500.000 nM para DHFRm disuelto en un medio que contenía FBS dializado. Las células se incubaron durante un periodo de 4-5 semanas. El medio tisular (que incluye MTX) se cambió cada 2-3 días. Las células se controlaron diariamente para su muerte, comparando entre los controles positivos y negativos. Las colonias que crecieron más se cogieron y se subcultivaron. No podían subcultivarse clones positivos de los transfectantes que acogieron el gen DHFR mutante muy probablemente debido a los efectos tóxicos de las altas concentraciones de MTX que se aplicaron. A partir de las células PER.C6 y PER.C6/E2A que se transfectaron con el gen DHFR de tipo silvestre, sólo podían establecerse las líneas celulares en el primer pase cuando las células se hacían crecer en MTX 100 nM, aunque las colonias aparecían en platos con MTX 250 y 500 nM. Estos clones no eran viables durante el subcultivo, y se desecharon.

Ejemplo 8: Subcultivo de células transfectadas.

35 A partir de cada línea, se hicieron crecer aproximadamente 50 colonias seleccionadas que eran resistentes a la concentración umbral de MTX posteriormente en placas de 96 pocillos, 24 pocillos, 6 pocillos y matraces T25 en su medio respectivo más MTX. Cuando las células alcanzaron el crecimiento en los matraces de cultivo tisular T25 al menos un vial de cada clon se congeló y se guardó, y posteriormente se ensayó para la producción de EPO recombinante humana. Para esto, se usó el kit comercial ELISA de R&D Systems (Quantikine IVD human EPO, Quantitative Colorimetric Sandwich ELISA, cat. # DEPOO). Como los diferentes clones parecieron tener características y curvas de crecimiento diferentes, se ajustó un patrón para la producción de EPO del siguiente modo: En el día 0, se sembraron las células en matraces de cultivo tisular T25 en concentraciones que varían entre 0,5 a 1,5 millones por matraz. En el día 4, se cogió el sobrenadante y se usó en el ELISA de EPO. A partir de esto, el nivel de producción se ajustó como unidades de ELISA por millón de células sembradas por día. (U/1E6/día) Varios de estos clones se dan en la Tabla 2.

50 La siguiente selección de buenos clones productores se basó en la alta expresión, comportamiento de cultivo y viabilidad. Para permitir controles para la viabilidad a largo plazo, el crecimiento en suspensión en frascos rotativos y biorreactor durante periodos de tiempo extensos, se congelaron más viales de los mejores clones de producción, y los siguientes mejores productores de cada línea celular se seleccionaron para investigaciones adicionales P8, P9, E17 y E55 en las que "P" representa PER.C6 y "E" representa PER.C6/E2A. Estos clones se subcultivan y se someten a dosis en aumento de metotrexato en un tiempo que abarca dos meses. La concentración comienza en el umbral y aumenta aproximadamente a 0,2 mM. Durante estos dos meses, los experimentos ELISA de EPO se realizan en una base regular para detectar un aumento en la producción de EPO. A la concentración de metotrexato más alta, se selecciona el mejor productor estable y se compara a las cantidades del mejor clon CHO y se usa para la creación de un banco de células (RL). De cada clon distinto se congelan 5 viales. La cantidad de copias de ADNC de EPO amplificadas se detecta por transferencia Southern.

60 Ejemplo 9: Producción de EPO en biorreactores.

65 La mejor línea celular de PER.C6 estable transfectada de producción de EPO realizada, P9, se llevó a suspensión y se aumentó a escala a fermentadores de 1 a 2 litros. Para llevar P9 a suspensión, las células adheridas se lavaron con PBS y se incubaron posteriormente con medio JRH ExCell 525 para PER.C6 (JRH), después de lo cual las células se despegaron del matraz y formaron el cultivo en suspensión. Las células se mantuvieron a dos concentraciones de MTX: 0 nM y 100 nM. Los niveles de producción general de EPO que se alcanzaron a estas

concentraciones (en frascos rotativos) fueron respectivamente 1500 y 5700 unidades por millón de células sembradas por día. Aunque los rendimientos inferiores en ausencia de MTX pueden explicarse por retirada del ADN integrado, parece como si hubiera un efecto de cierre en el ADN integrado ya que las células que se mantienen a concentraciones inferiores de MTX durante periodos más largos de tiempo son capaces de alcanzar sus rendimientos de formación cuando se transfieren a concentraciones de MTX 100 nM otra vez (véase Ejemplo 11).

La suspensión de células P9 se hizo crecer normalmente con MTX 100 nM y se usó para la inoculación de biorreactores. Se ensayaron dos ajustes del biorreactor: perfusión y cultivos discontinuos repetidos.

10 A. Perfusión en un biorreactor de 2 litros.

Se sembraron las células a una concentración $0,5 \times 10^6$ células por ml y se comenzó la perfusión en el día 3 después de que las células alcanzaran una densidad de aproximadamente $2,3 \times 10^6$ células por ml. La velocidad de perfusión fue 1 volumen por 24 horas con un flujo de aproximadamente 250 ml por 24 horas. En este ajuste, las células P9 permanecieron a una densidad constante de aproximadamente 5×10^6 células por ml y una viabilidad de casi el 95% durante más de un mes. La concentración de EPO se determinó en una base regular y se muestra en la Figura 15. En el biorreactor de perfusión de dos litros, las células P9 eran capaces de mantener un nivel de producción de aproximadamente 6000 unidades ELISA por ml. Con una velocidad de perfusión de 1 volumen de trabajo por día (1,5 a 1,6 litros), esto quiere decir que en este ajuste de 2 litros las células de P9 producían aproximadamente 1×10^7 unidades por día por biorreactor de 2 litros en ausencia de MTX.

B. Lote repetido en un biorreactor de 2 litros.

Se usaron las células en suspensión P9 que se hicieron crecer en frascos rotativos para inocular un biorreactor de 2 litros en ausencia de MTX y se dejaron crecer hasta una densidad de aproximadamente 1,5 millones de células por ml después de lo cual se recogió una tercera parte de la población (± 1 litro por 2 a 3 días) y el cultivo que quedaba se diluyó con medio fresco para alcanzar otra vez una densidad de 0,5 millones de células por ml. Este procedimiento se repitió durante 3 semanas y el volumen de trabajo se mantuvo a 1,6 litros. Las concentraciones de EPO en el medio retirado se determinaron y se muestran en la Figura 16. La concentración media fue aproximadamente 3000 unidades ELISA por ml. Con un periodo medio de 2 días después del cual se diluyó la población, esto significa que en este ajuste de 2 litros las células P9 produjeron aproximadamente $1,5 \times 10^6$ unidades por día en presencia de MTX.

35 C. Lote repetido en un biorreactor de 1 litro con diferentes concentraciones de oxígeno disuelto, ajustes de temperaturas y pH.

Se hicieron crecer células P9 en suspensión nuevas en presencia de MTX 100 nM en frascos rotativos y se usaron para inoculación de 4 biorreactores de 1 litro a una densidad de 0,3 millones de células por ml en medio JRH ExCell 525. Los rendimientos de EPO se determinaron después de 3, 5 y 7 días. El primer ajuste que se ensayó fue: 0,5%, 10%, 150% y como control positivo oxígeno disuelto al 50% (%DO). DO 50% es la condición en la que normalmente se mantienen las células PER.C6 y P9. En otra realización, las células P9 se inocularon y se ensayaron para la producción de EPO a diferentes temperaturas (32°C, 34°C, 37°C y 39°C) en la que 37°C es el ajuste normal para PER.C6 y P9, y en la tercera realización se inocularon células P9 nuevas y se ensayaron para la producción de EPO a diferentes ajustes de pH (pH 6,5, pH 6,8, pH 7,0 y pH 7,3). Las células PER.C6 se mantienen normalmente a pH 7,3. Se muestra una visión de conjunto de los rendimientos de EPO (tres días después del sembrado) en la Figura 17. Aparentemente, las concentraciones de EPO aumentan cuando la temperatura se aumenta de 32 a 39°C y también se vio con células PER.C6/E2A crecidas a 39°C (Tabla 4), y DO 50% es óptimo para P9 en el intervalo al que se ensayaron aquí. A pH 6,5, las células no pueden sobrevivir ya que la viabilidad en este biorreactor disminuyó por debajo del 80% después de 7 días. Las muestras de EPO producidas en estos ajustes se exploraron para glicosilación y carga en electroforesis 2D (véase también Ejemplo 17).

Ejemplo 10: Amplificación del gen DHFR.

Se usaron varias líneas celulares descritas en el Ejemplo 8 en un experimento de amplificación para determinar la posibilidad de aumentar el número de genes de DHFR aumentando la concentración de MTX en un marco de tiempo de más de dos meses. La concentración comenzó a la concentración umbral (100 nM) y se aumentó hasta 1800 nM con etapas intermedias de 200 nM, 400 nM, 800 nM y 1200 nM. Durante este periodo, los experimentos ELISA de EPO se realizaron en una base regular para detectar las unidades por millón de células sembradas por día (Figura 18). A la concentración de MTX más alta (1800 nM) se congelaron algunos viales. Se obtuvieron sedimentos celulares y se extrajo el ADN y posteriormente se digirió con BglIII, como esta enzima corta alrededor del gen DHFR de tipo silvestre en pEPO2000/DHFRwt (Figura 5), podría distinguirse una banda DHFR distinta de ese tamaño de las bandas DHFR endógenas en una transferencia Southern. Este ADN se corrió y se transfirió y la transferencia se hibridó con una sonda DHFR radiactiva y posteriormente con una sonda E1 de adenovirus como control de fondo (Figura 19). Las intensidades de las bandas de hibridación se midieron en un phosphorimager y se corrigieron para los niveles de fondo. Estos resultados se muestran en la Tabla 3. Aparentemente es posible obtener amplificación del gen DHFR en células PER.C6 aunque en este caso sólo con el DHFR endógeno y no con el vector integrado.

Ejemplo 11: Estabilidad de la expresión de EPO en líneas celulares estables.

Varias líneas celulares mencionadas en el Ejemplo 8 se sometieron a cultivo a largo plazo en presencia y ausencia de MTX. Las concentraciones de EPO se midieron regularmente en las que se sembraron de $1,0$ a $1,5 \times 10^6$ células por matraz T25 y se dejaron durante 4 días para calcular los niveles de producción de EPO por millón de células sembradas por día. Los resultados se muestran en la Figura 20. A partir de esto se concluye que hay una expresión relativamente estable de EPO en células P9 cuando las células se cultivan en presencia de MTX y que hay una disminución en la producción de EPO en ausencia de MTX. Sin embargo, cuando las células P9 se colocaron en MTX 100 nM otra vez después de haber sido cultivadas durante un periodo más largo de tiempo sin MTX, la EPO expresada alcanzó su nivel original (± 3000 unidades ELISA por millón de células sembradas por día), sugiriendo que los plásmidos integrados se apagan pero están integrados de manera estable y pueden encenderse otra vez. Parece que hay diferencias entre las líneas celulares P8 y P9 porque el nivel de producción de P8 en presencia de MTX disminuye en el tiempo sobre una cantidad alta de pases (Figura 20A), mientras que la producción de P9 es estable durante al menos 62 pases (Figura 20B).

Ejemplo 12: Expresión transitoria de EPO recombinante en células adheridas y en suspensión después de transfecciones de ADN plasmídico.

Se purifican los plásmidos pEPO2000/DHFRwt, pEPO2000/DHFRm y pAdApt. EPO del Ejemplo 2 a partir de *E. coli* sobre columnas, y se transfectan usando Lipofectamina, electroporación, PEI u otros métodos. Las células PER.C6 o PER.C6/E2A se cuentan y se siembran en DMEM más suero o medio JRH ExCell 525 o el medio apropiado para transfección en suspensión. La transfección se realiza a 37°C hasta 16 horas dependiendo del método de transfección usado, de acuerdo con procedimientos conocidos por los especialistas en la técnica. Posteriormente las células se colocan a diferentes temperaturas y se reemplaza el medio por medio fresco con o sin suero. En el caso de que sea necesario obtener medio que carezca completamente de componentes de suero, se retira otra vez el medio fresco que carece de suero después de 3 horas y se reemplaza otra vez por medio que carece de componentes de suero. Para la determinación de la producción de EPO recombinante, se toman muestras a diferentes tiempos puntuales. Los rendimientos de proteína recombinante se determinan usando un kit ELISA (R&D Systems) en el que 1 Unidad equivale aproximadamente a 10 ng de proteína EPO producida por CHO recombinante (100.000 Unidades/mg). Las células usadas en estos experimentos crecen a diferentes velocidades, debido a su origen, características y temperatura. Por lo tanto, la cantidad de EPO recombinante producida generalmente se calcula en unidades ELISA/ 10^6 células sembradas/día, teniendo en cuenta que el antisuero en el kit ELISA no distingue entre EPO recombinante no glicosilada y altamente glicosilada. Generalmente, las muestras para estos cálculos se toman en el día 4 después de reemplazar el medio tras la transfección.

Las células PER.C6/E2A, transfectadas a 37°C usando Lipofectamina y posteriormente crecidas a 39°C en presencia de suero produjeron típicamente 3100 unidades/ 10^6 células/día. En ausencia de componentes de suero sin cualquier renovación de medio que carece de suero, estas células transfectadas con Lipofectamina produjeron típicamente 2600 unidades/ 10^6 células/día. Las células PER.C6, transfectadas a 37°C usando Lipofectamina y posteriormente crecidas a 37°C en presencia de suero produjeron típicamente 750 unidades/ 10^6 células/día, y en ausencia de suero 590 unidades/ 10^6 células/día. Para comparación, los mismos plásmidos de expresión pEPO2000/DHFRwt y pEPO2000/DHFRm, también se aplicaron para transfectar células de Ovario de Hámster Chino (CHO, número ECACC 85050302) usando procedimientos de Lipofectamina, PEI, Fosfato Cálcico y otros métodos. Cuando las células CHO se transfectaron usando Lipofectamina y posteriormente se cultivaron en medio Hams F12 en presencia de suero, se obtuvo un rendimiento de 190 unidades/ 10^6 células/día. En ausencia de suero se produjo 90 unidades/ 10^6 células/día, aunque pueden obtenerse rendimientos más elevados cuando las transfecciones se realizan en DMEM.

También se transfectaron diferentes placas que contenían células adheridas PER.C6/E2A a 37°C con el plásmido pEPO2000/DHFRwt y posteriormente se colocaron a 32°C , 34°C , 37°C o 39°C para determinar la influencia de la temperatura en la producción de EPO recombinante. Se observó un nivel de producción dependiente de la temperatura que variaba de 250 a 610 unidades/ 10^6 células sembradas/día, calculado a partir de la muestra del día 4, lo que sugiere que la diferencia entre los niveles de producción observada en PER.C6 y PER.C6/E2A es parcialmente debida a las temperaturas de incubación (véase también Figura 17). Como PER.C6/E2A crece bien a 37°C , se realizaron estudios adicionales a 37°C .

Se transfectaron diferentes placas que contenían células adheridas PER.C6 y PER.C6/E2A con pEPO2000/DHFRwt, pEPO2000/DHFRm y pAdApt.EPO usando Lipofectamina. Cuatro horas después de la transfección se reemplazó el DMEM con DMEM adicional más suero o medio JRH que carece de suero y se dejó que se acumulara EPO en el sobrenadante durante varios días para determinar las concentraciones que se producen en los diferentes medios. Las células PER.C6 se incubaron a 37°C , mientras que las células PER.C6/E2A se mantuvieron a 39°C . Se registraron los datos de los diferentes plásmidos ya que contienen un casete de expresión similar. Se obtuvieron los siguientes datos calculados de la muestra del día 6: PER.C6 crecido en DMEM produjo 400 unidades/ 10^6 células sembradas/día, y cuando se mantuvieron en medio JRH produjeron 300 unidades/ 10^6 células sembradas/día. PER.C6/E2A crecido en DMEM produjo 1800 unidades/ 10^6 células sembradas/día, y cuando se mantuvieron en JRH produjeron 1100 unidades/ 10^6 células sembradas/día. Otra vez se

observó una clara diferencia en los niveles de producción entre PER.C6 y PER.C6/E2A, aunque esto podría deberse parcialmente a las diferencias de temperatura (véase lo anterior). Sin embargo, había una diferencia significativa con células PER.C6/E2A entre la concentración en DMEM versus la concentración en medio JRH, aunque este efecto se perdía casi completamente en células PER.C6.

- 5 Los datos de expresión de EPO obtenidos en este sistema se resumen en la Tabla 4. PER.C6 y los derivados de la misma pueden usarse para ampliar a escala el sistema de transfecciones de ADN. De acuerdo con Wurm y Bernard (1999) pueden realizarse transfecciones en células en suspensión a sistemas de 1-10 litros en los que se han obtenido rendimientos de 1-10 mg/l (0,1-1 pg/célula/día) de proteína recombinante usando electroporación. Hay una
- 10 necesidad de un sistema en el que esto pueda controlarse bien y puedan ser los rendimientos más altos, especialmente para explorar grandes cantidades de proteínas y proteínas tóxicas que no pueden producirse en un ajuste estable. Con las transfecciones con Lipofectamina en las mejores células PER.C6 en ausencia de suero, se alcanzaron 590 unidades/millón de células/día (+/-5,9 pg/célula/día donde 1 unidad ELISA es aproximadamente 10 ng de EPO), mientras que PER.C6/E2A alcanzó 31 pg/célula/día (en presencia de suero). El medio usado para cultivos en suspensión de PER.C6 y PER.C6/E2A (JRH ExCell 525) no mantiene transfecciones de ADN transitorias eficaces usando componentes como PEI. Por lo tanto, el medio se ajusta para posibilitar la producción de EPO recombinante después de la transfección de pEPO2000/DHFRwt y pEPO2000/DHFRm que contienen un ADNc de EPO humana recombinante, y pcDNA2000/DHFRwt que contiene otro ADNc que codifica proteínas recombinantes.
- 15 Se usan cultivos en suspensión de 1 a 10 litros de PER.C6 y PER.C6/E2A crecidos en medio ajustado para mantener transfecciones de ADN transitorias usando ADN plasmídico purificado, para electroporación u otros métodos realizando transfección con los mismos plásmidos de expresión. Después de varias horas, el medio de transfección se retira y se reemplaza por medio fresco sin suero. La proteína recombinante se deja acumular en el sobrenadante durante varios días después de los cuales se recoge el sobrenadante y se retiran todas las células. El
- 20 sobrenadante se usa para procesamiento cadena abajo para purificar la proteína recombinante.

Ejemplo 13: Generación de Adenovirus recombinantes con AdApt.EPO.

- 30 Se cotransfectó pAdApt.EPO con los cósmidos pNVE/Ad.AfIII-rITR.tetO-E4, pWE/Ad.AfIII-rITR.ΔE2A, pVIE/Ad.AfIII-rITR.Δ E2A.tetO-E4 en las líneas celulares apropiadas usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Posteriormente, se dejaron las células a sus temperaturas apropiadas durante varios días hasta que se observó su cpe completo. Después se aplicó a las células varias etapas de congelación/descongelación para liberar todos los virus de las células, después de lo cual los residuos celulares se sedimentaron por centrifugación. Para
- 35 IGAd5/AdAptEPO.dE2A. El sobrenadante se usó para infectar células seguido de una superposición de agarosa para purificación de placas usando varias diluciones. Después de varios días, cuando las placas sencillas eran claramente visibles en las diluciones más altas, se seleccionaron nueve placas y un control negativo (las células seleccionadas entre placas claras, así que probablemente no contendrían virus) y se comprobaron con respecto a producción de EPO en células A549. Todos los virus seleccionados de placas fueron positivos y el control negativo no produjo EPO recombinante. Se usó un productor positivo para infectar las células apropiadas y propagar el virus
- 40 comenzando a partir de un matraz T-25 hasta una situación de frasco rotatorio. Se usaron sobrenadantes de los frascos rotatorios para purificar el virus, después de lo cual se determinó el número de partículas virales (pv) y se comparó con el número de unidades infecciosas (UI) usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Después, se determinó la relación de pv/UI.

- 45 Ejemplo 14: infección de células PER.C6 unidas y en suspensión con IGAd5/AdAptEPOdE2A

- Se usaron virus purificados del ejemplo 13 para expresión transitoria de EPO recombinante en células PER.C6 y derivados de los mismos. Se usó virus IG.Ad5/AdApt.EPO.dE2A para infectar células PER.C6, mientras que los virus IG.Ad5/AdApt.EPO.tetOE4 e IG.Ad5/AdApt.EPO.dE2A.tetOE4 pueden usarse para infectar células
- 50 PER.C6/E2A para reducir la posibilidad de replicación y además, para evitar inhibición de la producción de proteína recombinante debida a procesos de replicación. Se realizaron infecciones en células unidas así como en células en suspensión en su medio apropiado usando intervalos de multiplicidades de infección (moi): 20, 200, 2000, 20000 pv/célula. Se realizaron infecciones durante 4 horas en diferentes situaciones que variaban de placas de 6 pocillos a frascos rotatorios, después de lo cual se retiró el sobrenadante que contenía virus. Las células se lavaron con PBS o se renovaron directamente con nuevo medio. Después se permitió que las células produjeran EPO recombinante durante varios días durante los cuales se tomaron muestras y se determinaron los rendimientos de EPO. Además se comprobó el número de células viables en comparación con células muertas. La cantidad de EPO que se produjo se calculó de nuevo como unidades de ELISA por células sembradas 10^6 /día, debido a que las diferentes líneas celulares tienen diferentes características de crecimiento debido a su número de pases y circunstancias ambientales
- 60 como temperatura y presiones selectivas. Se sembraron células PER.C6 que crecían en suspensión en 250 ml de medio JRH ExCell 525 en frascos rotatorios (1 millón de células por ml) y se infectaron posteriormente con virus IG.Ad5/AdApt.EPO.dE2A purificado con una moi de 200 pv/célula. La estimación usada para la determinación de pv fue alta (la relación de pv/UI de este lote es 330, lo que indica una moi de 0,61 UI/célula). Por lo tanto, no todas las células fueron alcanzadas por un virus infeccioso. Una producción típica de EPO recombinante en esta situación de una muestra del día 6 fue de 190 unidades/ 10^6 células sembradas/día, mientras que en una situación en la que se reemplazó el 50 % del medio que incluía células viables y muertas por medio nuevo, se obtuvieron
- 65

aproximadamente 240 unidades/10⁶ células/día. La renovación no influyó en la viabilidad de las células viables, pero la proteína recombinante retirada podría añadirse a la cantidad que se obtuvo al final del experimento, aunque presente en un mayor volumen. Se realizó un experimento idéntico con la excepción de que las células se infectaron con una moi de 20 pv/célula, similar a aproximadamente 0,06 Unidades Infecciosas/célula. Sin renovación se obtuvo un rendimiento de 70 unidades de ELISA/10⁶ células/día mientras que en el experimento en el que se renovó 50 % del medio el día 3, se midió una cantidad típica de 80 unidades/10⁶ células/día. Esto indica que hay un efecto de respuesta a dosis cuando se usa un número creciente de unidades infecciosas para infección de células PER.C6.

Además, se sembraron células PER.C6 que crecían en DMEM en placas de 6 pocillos y se dejaron durante una noche en 2 ml de DMEM con suero para unirse. Al día siguiente, las células se infectaron con otro lote de virus IG.Ad5/AdApt.EPO.dE2A (relación de pv/UI 560) con una moi de 200 pv/células (0,35 Unidades Infecciosas/célula). Después de 4 horas el medio que contenía virus se retiró y se reemplazó con medio nuevo que incluía suero y las células se dejaron para producir EPO recombinante durante más de dos semanas con reemplazo del medio con medio nuevo cada día. El rendimiento de producción de EPO recombinante calculado a partir de una muestra de 4 días fue de 60 unidades/10⁶ células/día.

Los datos de expresión obtenidos en este sistema se han resumido en la Tabla 5.

Debido al hecho de que una expresión regulada de tTA-tetO de la región Temprana 4 del Adenovirus (E4) perjudica la capacidad de replicación del virus recombinante en ausencia de E4 activo, también es posible usar el posible potencial de producción de la proteína de PER.C6/E2A así como su línea celular parental PER.C6 para producir proteínas recombinantes, en una situación en la que un adenovirus recombinante porta el ADNc de EPO humana como el transgen y en la que el gen E4 está bajo el control de un operón tet. Después se producen niveles muy bajos de ARNm de E4, dando como resultado niveles muy bajos pero detectables de virus recombinante y replicante en la línea celular PER.C6/E2A y niveles no detectables de este virus en células PER.C6. Para producir EPO recombinante de este modo, se usan los dos virus IG.Ad5/AdApt.EPO.tetOE4 e IG.Ad5/AdApt.EPO.dE2A.tetOE4 para infectar células PER.C6 y derivados de las mismas. Se infectan células unidas y en suspensión con diferentes moi de los adenovirus purificados en situaciones pequeñas (placas de 6 pocillos y matraces T25) y situaciones grandes (frascos rotatorios y fermentadores). Se toman muestras en diferentes puntos temporales y se determinan los niveles de EPO.

Puesto que los virus que se suprimen en E1 y E2A en la cadena principal viral pueden complementarse en células PER.C6/E2A pero no en las células PER.C6 originales, se usan situaciones en las que se cultiva una mezcla de ambas líneas celulares en presencia de virus IG.Ad5/AdApt.EPO.dE2A. El virus se replicará en PER.C6/E2A, seguido de lisis de las células infectadas y una infección posterior de células PER.C6 o PER.C6/E2A. Por el contrario, en células PER.C6 el virus no replicará y las células no se lisarán debido a producción de partículas virales, pero producirán EPO recombinante que se secretará al sobrenadante. Se prepara un sistema de producción de EPO/replicación/cultivo de estado estacionario en el que se añade medio nuevo y células PER.C6 y PER.C6/E2A nuevas a un flujo constante, mientras que se retira medio usado, células muertas y residuos. Junto con esto, se toma EPO recombinante del sistema y se usa para purificación en un procedimiento de procesamiento corriente abajo en el que se retiran partículas de virus.

Ejemplo 15: Purificación y análisis de EPO recombinante.

Se producen grandes lotes de células en crecimiento en biorreactores, se purifica la proteína EPO humana recombinante secretada de acuerdo con procedimientos conocidos por los especialistas en la técnica. La proteína EPO humana recombinante purificada de clones estables o transfectantes de PER.C6 y PER.C6/E2A se controlan para la glicosilación y el plegamiento por comparación con EPO disponible en el mercado y EPO purificado de origen humano (orina) usando métodos conocidos por los especialistas en la técnica (véase Ejemplo 16 y 17). Las proteínas EPO purificadas y glicosiladas de PER.C6 y PER.C6/E2A se ensayan para la actividad biológica en experimentos in vivo y en bazos de ratón como se describe por Krystal (1983) y ensayos in vitro (véase Ejemplo 18).

Ejemplo 16: Actividad de beta-galactósido alfa 2,6-sialiltransferasa en PER.C6.

Se sabe que las células de Ovario de Hámster Chino (CHO) no contienen un gen de beta-galactósido alfa 2,6-sialiltransferasa, que da como resultado la ausencia de ácidos siálicos alfa 2,6-unidos a los extremos terminales de oligosacáridos N- y O-enlazados de glicoproteínas endógenas y recombinantes producidas en estas células CHO. Como el gen de alfa 2,3-sialiltransferasa está presente en células CHO, las proteínas que se producen en estas células típicamente son de tipo enlace 2,3. Sin embargo, la EPO que se purificó de orina humana contiene tanto ácidos siálicos alfa 2,3 y alfa 2,6-unidos. Para determinar si las células PER.C6, siendo una línea celular humana, son capaces de producir EPO recombinante que contienen tanto enlaces alfa 2,3 y alfa 2,6, se realizó un ensayo de neuraminidasa directo en EPO recombinante producida en células PER.C6 después de transfección con vectores de expresión de EPO. Como control, se usaron muestras de Eprex disponible en el mercado, que se obtuvo de células CHO y que sólo debe contener enlaces de ácido siálico del tipo alfa 2,3. Las neuraminidasas que se usaron fueron las del Virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV) que escinden específicamente los ácidos neuramínicos alfa 2,3-unidos (ácido siálico) de glicanos N- y O-enlazados, y de Vibrio cholerae (VC) que no escinden específicamente

todos los ácidos siálicos N- y O-enlazados terminales (enlaces alfa 2,3, alfa 2,6 y alfa 2,8). Ambas neuraminidasas son de Boehringer y se incubaron con las muestras de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Los resultados se muestran en la figura 21A. En el carril 2 y 3 (tratamiento con neuraminidasa NDV) se observa un ligero cambio en comparación con el carril 1 (EPO de PER.C6 no tratada). Cuando esta muestra de EPO se incubó con neuraminidasa obtenida de VC, se observa una banda de migración más rápida uniforme en comparación con las muestras tratadas con NDV. Sin embargo, con Eprex disponible en el mercado solo se observó un cambio cuando se aplicó neuraminidasa obtenida de NDV (carril 6 y carril 7 en comparación con la muestra no tratada en el carril 5) y no cuando se usó neuraminidasa VC (carril 8).

Para mostrar también que de hecho los ácidos siálicos de tipo enlace alfa 2,6 no están presentes en células CHO, pero que de hecho existen en proteínas presentes en la superficie celular de células PER.C6, se ejecutó el siguiente experimento: se liberaron células CHO del soporte sólido usando tripsina-EDTA, aunque para PER.C6 se usaron células en suspensión. Ambas suspensiones se lavaron una vez con Mem-FBS al 5% y se incubaron en este medio durante 1 hora a 37°C. Después de lavar con PBS, las células se resuspendieron aproximadamente a 10⁶ células/ml en medio de unión (solución salina tamponada con Tris, pH 7,5, BSA al 0,5%, y 1 mM de MgCl₂, MnCl₂, y CaCl₂). Se incubaron alícuotas de las células durante 1 hora a temperatura ambiente con lectinas marcadas con DIG, aglutinina de Sambucus nigra (SNA) y aglutinina de Maackia amurensis (MAA), que se unen específicamente a enlaces de ácido siálico de tipo alfa 2,6 Gal y alfa 2,3 Gal, respectivamente. Se incubaron células control sin lectinas. Después de 1 hora, se lavaron con PBS tanto las células tratadas con lectina como las células control y después se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo anti-DIG marcado con FITC (Boehringer-Mannheim). Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se analizaron por intensidad de fluorescencia en un sistema FACSort (Becton Dickinson). El análisis FACS se muestra en la Figura 21B. Cuando la lectina SNA se incubaba con células CHO no se observa ningún cambio en comparación con células no tratadas, aunque cuando esta lectina se incubaba con células PER.C6, se observa un cambio claro (campos oscuros) en comparación con células no tratadas (campos abiertos). Cuando ambas líneas celulares se incubaban con lectina MAA, ambas líneas celulares dan un cambio claro en comparación con células no tratadas.

A partir de estas digestiones de EPO y resultados de FACS se concluye que hay una actividad beta-galactósido alfa 2,6 sialiltransferasa presente en células PER.C6 humanas que está ausente en células CHO de hámster.

Ejemplo 17: Determinación del contenido de ácido siálico en EPO producida por PER.C6.

Los ácidos neuramínicos terminales (o ácidos siálicos) que están presentes en los glicanos N- y O-enlazados de EPO protegen la proteína de la eliminación del torrente sanguíneo por enzimas en el hígado. Además, como estos ácidos siálicos están cargados negativamente, se puede distinguir entre diferentes formas de EPO dependiendo de su carga o pI específico. Por lo tanto, la EPO producida en células PER.C6 y CHO se usaron en electroforesis de dos dimensiones en la que la primera dimensión separa la proteína en base a la carga (intervalo de pH 3-10) y la segunda dimensión separa las proteínas adicionalmente en base al peso molecular. Posteriormente, las proteínas se transfirieron y se detectan en una transferencia western con un anticuerpo anti-EPO.

También es posible detectar la proteína EPO separada tiñendo el gel usando azul de Coomassie o métodos de tinción con plata y posteriormente retirando las diferentes manchas del gel y determinar la composición de glicanos específica de las glicosilaciones N- u O-enlazadas diferentes que están presentes en la proteína por espectrometría de masas.

En la Figura 22A se muestran varias muestras de EPO que se obtuvieron de sobrenadantes de P9. P9 es la línea celular PER.C6 que expresa de manera estable EPO humana recombinante (véase Ejemplo 8). Estas muestras se compararon con Eprex disponible en el mercado, que contiene sólo formas de EPO que albergan de 9 a 14 ácidos siálicos. Eprex, por tanto, debe estar cargado negativamente y debe concentrarse hacia el lado de pH 3 del gel. La Figura 22B muestra una comparación entre EPO obtenida de P9 en un ajuste de adhesión en el que las células se cultivaron en medio DMEM y EPO obtenida de células CHO que estaban transfectadas de manera transitoria con el vector pEPO2000/DHFRwt. Aparentemente, las formas inferiores de EPO no pueden detectarse en las muestras de CHO, mientras que todas las formas pueden verse en la muestra de P9. El contenido de ácido siálico se da contando las bandas que se separaron en la primera dimensión de 1 a 14. Como la transferencia western se realizó usando ECL y como no está relativamente claro si el anticuerpo que se usó para detectar las moléculas de EPO en la transferencia y como se desconoce si la glicosilación puede inhibir el reconocimiento por el anticuerpo o transferirse a nitrocelulosa, no es posible determinar el porcentaje de cada forma que está presente en estas mezclas. Sin embargo, es posible determinar la presencia de las formas separadas de moléculas de EPO que contienen ácido siálico. Se puede concluir que PER.C6 es capaz de producir el intervalo completo de isoformas que contienen 14 ácidos siálicos de EPO humana recombinante.

Ejemplo 18: Funcionalidad in vitro de EPO producida por PER.C6.

La función de EPO recombinante in vivo se determina por su vida media en el torrente sanguíneo. La retirada de EPO tiene lugar por las enzimas del hígado que se unen a restos de galactosa en los glicanos que no están protegidos por ácidos siálicos y por retirada a través del riñón. Se desconoce si esta filtración por el riñón se debe a

plegamiento erróneo o se debe a baja glicosilación o glicosilación errónea. Además, las moléculas de EPO que alcanzan sus dianas en la médula ósea y se unen al receptor de EPO en las células progenitoras también se retiran de la circulación. La unión al receptor de EPO y la señalización cadena abajo depende fuertemente del estado de glicosilación apropiado de la molécula de EPO. Los ácidos siálicos pueden inhibir en alguna medida la unión de EPO al receptor de EPO dando como resultado una eficacia más baja de la proteína. Sin embargo, como los ácidos siálicos previenen la retirada de EPO, estos azúcares son esenciales para su función para proteger la proteína en su viaje al receptor de EPO. Cuando se retiran los ácidos siálicos de EPO in vitro, sucede una mejor unión al receptor, dando como resultado una señalización cadena abajo más fuerte. Esto significa que las funcionalidades in vivo e in vitro son significativamente diferentes, aunque puede comprobarse una propiedad de unión al receptor EPO apropiada in vitro a pesar de la posibilidad de una sialilación baja que causa una corta vida media in vivo (Takeuchi et al. 1989).

Se han descrito varios ensayos in vitro para la funcionalidad de EPO en los que la estimulación de IL3, GM-CSF y TF-1 de la línea celular humana dependiente de EPO es la más habitualmente usada. De ese modo, puede determinarse la cantidad de unidades in vitro por mg (Kitamura et al. 1989; Hammerling et al. 1996). Otros ensayos in vitro son la formación de colonias rojas en una capa de agarosa de células de médula ósea que se estimularon para diferenciarse por EPO, se determina la incorporación de ⁵⁹Fe en el grupo hemo en células de médula ósea de ratón cultivadas (Krystal et al. 1981 y 1983; Takeuchi et al. 1989), en células de médula ósea de rata (Goldwasser et al. 1975) y el Radioinmunoensayo (RIA) en el que se determina el reconocimiento de EPO para antisuero. Se usó EPO producido en células PER.C6/E2A para estimular células TF-1 del siguiente modo: se sembraron las células en placas de 96 pocillos con una densidad de alrededor de 10.000 células por pocillo en medio que carece de IL3 o GM-CSF, que son los factores de crecimiento que pueden estimular el crecimiento indefinido de estas células en cultivo. Posteriormente se añadió medio dando como resultado concentraciones finales de 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1 y 10 unidades por ml. Estas unidades se determinaron por ELISA, mientras que las unidades del control positivo Eprex se conocían (4000 unidades por ml) y se diluyeron a la misma concentración. Se incubaron las células con estas muestras de EPO durante 4 días, después de los cuales se realizó un ensayo MTS (Promega) para controlar las células viables por medida de la fluorescencia a 490 nm (la fluorescencia es detectable después de transferir MTS en formazán). La Figura 23 muestra la actividad de dos muestras obtenidas de células PER.C6/E2A que se transfectaron con un vector de expresión de EPO y posteriormente se incubaron a 37°C y 39°C durante 4 días. Los resultados sugieren que las muestras obtenidas a 39°C son más activas que las muestras obtenidas a 37°C que podría indicar que el contenido de ácido siálico está por debajo del óptimo a temperaturas más altas. De este modo se muestra que EPO producida por PER.C6 puede estimular células TF-1 en un ensayo in vitro, sugiriendo claramente que la EPO que se produce en esta línea celular humana puede interactuar con el receptor de EPO y estimular la diferenciación.

Ejemplo 19: Producción de anticuerpos monoclonales recombinantes murinos y humanizados y humanos en PER.C6 y PER.C6/E2A.

A. Transfecciones de ADN transitorias

Se clonan los ANDc que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos monoclonales murinos, humanizados y humanos (mAb) en dos sistemas diferentes: uno en el que las cadenas pesada y ligera se integran en un plásmido único (un plásmido pcDNA2000/DHFRwt modificado) y el otro es un sistema en el que el ADNc de la cadena pesada y ligera se clonan por separado en dos plásmidos diferentes (véanse los Ejemplos 1, 3, 4 y 5). Estos plásmidos pueden llevar el mismo marcador de selección (como DHFR) o pueden llevar cada uno su propio marcador de selección (uno que contiene el gen DHFR y el otro que contiene el marcador de resistencia a neomicina). Para los sistemas de expresión transitorios no importa qué marcadores de selección estén presentes en la estructura del vector ya que no se realiza una selección posterior. En los métodos de transfección habituales y regulares usados en la técnica, se transfectan cantidades iguales de plásmidos. Una desventaja de integrar tanto la cadena pesada como la ligera en un plásmido único es que los promotores que dirigen la expresión de ambos ADNc podrían influirse entre sí, dando como resultado niveles de expresión no iguales de ambas unidades, aunque la cantidad de copias de ADNc de cada gen es exactamente la misma.

Los plásmidos que contienen los ADNc de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo murino y un anticuerpo monoclonal humanizado se transfectan y después de varios días la concentración de anticuerpo plegado correctamente se termina usando métodos conocidos por los especialistas en la técnica. Las condiciones tales como temperatura y medio usado se controlan tanto para las células PER.C6 y PER.C6/E2A. La funcionalidad del anticuerpo recombinante reducido se controla por determinación de la afinidad para el antígeno específico.

B. Infecciones Virales Transitorias

Se clonan ADNc que codifican una cadena pesada y una ligera en dos sistemas diferentes: uno en el que las cadenas pesada y ligera se integran en un plásmido adaptador sencillo (un pAdApt.pac modificado) y el otro es un sistema en el que se clonan ADNc de cadena pesada y ligera de forma separada en dos adaptadores diferentes (cada uno de forma separada en pAdApt.pac). En el primer sistema, se propagan virus que portan una delección E1 (dE1) junto con una delección E2A (dE2A) o ambas delecciones en el contexto de una inserción tetOE4 en la

cadena principal adenoviral. En el segundo sistema las cadenas pesada y ligera se clonan de forma separada en pAdApt.pac y se propagan de forma separada a virus con la misma cadena principal adenoviral. Estos virus se usan para realizar infecciones sencillas o conjuntas en células PER.C6 y PER.C6/E2A que crecen en suspensión o unidas. Después de varios días, se toman muestras para determinar la concentración de anticuerpos recombinantes de longitud completa después de lo cual la funcionalidad de estos anticuerpos se determina usando el antígeno especificado en estudios de afinidad.

C. Producción estable y amplificación del plásmido integrado.

Los plásmidos de expresión que llevan juntas la cadena pesada y la cadena ligera y los plásmidos que llevan la cadena pesada y la cadena ligera por separado se usan para transfectar células PER.C6 y PER.C6/E2A adheridas y CHO-dhfr. Posteriormente las células se exponen a MTX y/o higromicina y neomicina para seleccionar la integración de los diferentes plásmidos. Además, se realiza una doble selección con G418 e higromicina para seleccionar la integración de plásmidos que llevan el gen de resistencia a neomicina e higromicina. Se determina la expresión de los anticuerpos monoclonales de longitud completa funcionales y se usan los mejores clones de expresión para estudios posteriores que incluyen estabilidad de la integración, detección de número de copias, determinación de los niveles de ambas subunidades y capacidad para amplificar tras el aumento de la concentración de MTX después de usar las líneas celulares mejor realizadas para la producción de mAb en ajustes más grandes como de perfusión, y biorreactores discontinuos (de alimentación) después de lo cual se ejecuta la optimización de la cantidad y calidad de los mAb.

Ejemplo 20: Transfección de vectores de expresión de mAb para obtener líneas celulares estables.

Se sembraron células PER.C6 en DMEM más FBS al 10% en 47 platos de cultivo tisular (10 cm de diámetro) con aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células por plato y se mantuvieron durante una noche en sus condiciones de cultivo normales (concentración de CO₂ al 10% y 37°C). El siguiente día, se realizaron cotransfecciones en 39 platos a 37°C usando Lipofectamina en protocolos convencionales con 1 µg de pUBS-Heavy2000/Hyg(-) purificado y digerido con MunI y 1 µg de pUBS-Light2001/Neo purificado y digerido con Scal (véase Ejemplo 3) por plato, mientras que 2 platos se cotransfectaron como controles con 1 µg de pcDNA2000/Hyg(-) purificado y digerido con MunI y 1 µg de pcDNA2001/Neo purificado y digerido con Scal. Como control para la eficacia de transfección, se transfectaron 4 platos con un vector de control LacZ, mientras que no se transfectaron 2 platos y sirvieron como controles negativos.

Después de 5 horas, se lavaron las células dos veces con DMEM y se volvieron a suministrar con medio fresco sin selección. El siguiente día, se reemplazó el medio por medio fresco que contenía diferentes reactivos de selección: se incubaron 33 platos de los cotransfectantes de cadena pesada y ligera, 2 platos que fueron transfectados con los vectores vacíos y los 2 controles negativos (no transfección) sólo con 50 µg por ml de higromicina. Se incubaron 2 platos de los cotransfectantes de la cadena pesada y ligera y 2 platos de los platos de eficacia de transfección (vector LacZ) sólo con 500 µg por ml de G418, mientras que 2 platos de eficacia de transfección no se trataron con medio de selección pero se usaron para determinar la eficacia de transfección que estuvo alrededor del 40%. Se incubaron 2 platos con una combinación de 50 µg por ml de higromicina y 250 µg por ml de G418 y se incubaron 2 platos con 25 µg por ml de higromicina y 500 µg por ml de G418.

Como las células crecieron mucho cuando se incubaron sólo con higromicina se decidió que una combinación de selección con higromicina y G418 eliminaría inmediatamente las células que integraron solo un tipo de los dos vectores que se transfectaron. Por tanto, 7 días después de la siembra, todos los cotransfectantes se incubaron adicionalmente con una combinación de 100 µg por ml de higromicina y 500 µg por ml de G418. Las células se renovaron 2 ó 3 días con medio que contenía las mismas concentraciones de agentes de selección. 14 días después de la siembra las concentraciones se ajustaron a 250 µg por ml de G418 y 50 µg por ml de higromicina. 22 días después de la siembra había crecido una gran cantidad de colonias a una extensión a la que era posible seleccionar, coger y subcultivar. Se seleccionaron aproximadamente 300 colonias por separado y se cogieron a partir de los platos de 10 cm y se hicieron crecer posteriormente mediante placas de 96 pocillos y/o 24 pocillos mediante placas de 6 pocillos a matraces T25. En esta etapa, se congelaron las células (4 viales por colonia subcultivada) y se determinaron los niveles de producción de mAb UBS-54 recombinante en el sobrenadante usando el ELISA descrito en el Ejemplo 26.

Se sembraron células CHO-dhfr en DMEM más FBS al 10% y que incluía hipoxantina y timidina en platos de cultivo tisular (10 cm de diámetro) con aproximadamente 1 millón de células por plato y se mantuvieron durante una noche en condiciones normales y se usaron para una cotransfección al día siguiente con pUBSHeavy2000/Hyg(-) y pUBS-Light2001/DHFRwt en protocolos convencionales usando Lipofectamina. Se reemplazó el medio con medio fresco después de unas pocas horas y se dividieron en diferentes densidades para permitir a las células ajustarse al medio de selección cuando tiene lugar la integración estable sin un posible sobrecrecimiento de células no transfectadas. Las colonias primero se seleccionaron en base a resistencia a higromicina y posteriormente se añadió MTX para seleccionar las dobles integraciones de los 2 plásmidos en estas líneas celulares subcultivadas.

Las transfecciones descritas para pUBS-Heavy2000/Hyg(-) y pUBS-Light2001/Neo se realizan con pUBS2-Heavy2000/Hyg(-) y pUBS2-Light2001/Neo en PER.C6 y PER.C6/E2A y la selección se realiza con incubación

posterior con higromicina seguida de G418 o como se ha descrito anteriormente con una combinación de ambos reactivos de selección. Las células CHO-dhfr se transfectan con pUBS2-Heavy2000/Hyg(-) y pUBS2-Light2001/DHFRwt como se describe para pUBS-Heavy2000/Hyg(-) y pUBS-Light2001/DHFRwt y la selección se realiza en un modo secuencial en el que las células primero se seleccionan con higromicina después de lo cual se controla una integración del vector de la cadena ligera por selección en MTX.

Además, las células PER.C6 y PER.C6/E2A también se usan para transfecciones con pUBS-3000/Hyg(-) y pUBS2-3000/Hyg(-), mientras que las células CHO-dhfr se transfectan con pUBS-3000/DHFRwt y pUBS2-3000/DHFRwt después de lo cual se realiza una selección y amplificación adicional de los plásmidos integrados por aumento de la concentración de MTX. En el caso de los plásmidos pcDNAs3000, se espera una cantidad igual de ARNm tanto de la cadena pesada como de la ligera, mientras que en el caso de dos vectores por separado no está claro si se consigue un equilibrio correcto entre las dos subunidades de la inmunoglobulina. Las transfecciones también se realizan en PER.C6, PER.C6/E2A y CHO-dhfr con vectores de expresión descritos en el Ejemplo 4 y 5 para obtener líneas celulares estables que expresan mAb de la IgG1 CAMPATH-1H humanizada y mAb de la IgG1 15C5 humanizada respectivamente.

Ejemplo 21: Subcultivo de células transfectadas.

A partir de células PER.C6 transfectadas con pUBS-Heavy2000/Hyg(-) y pUBS-ligth2001/Neo, aproximadamente 300 colonias que crecieron en medio que contenía higromicina y G418 generalmente crecieron posteriormente en placas de 96 pocillos, 24 pocillos y 6 pocillos en sus respectivos medios más sus agentes de selección respectivos. Las células que eran capaces de crecer en placas de 24 pocillos, se controlaron para la producción de mAb usando el ELISA descrito en el Ejemplo 26. Si las células se registraban positivamente, se congelaba al menos un vial de cada clon y se guardaba, y las células se ensayaban posteriormente y se subcultivaban. La selección de un buen clon productor se basa en la alta expresión, comportamiento de cultivo y viabilidad. Para permitir controles de viabilidad a largo plazo, amplificación de los plásmidos integrados y crecimiento en suspensión durante periodos de tiempo grandes, se congelan los mejores clones productores, de los cuales se seleccionan varios de los mejores productores de cada línea celular para trabajo posterior. Se están realizando experimentos similares en células CHO-dhfr transfectadas con diferentes plásmidos y células PER.C6 y PER.C6/E2A que se transfectaron con otras combinaciones de cadenas pesada y ligera y otras combinaciones de marcadores de selección.

Ejemplo 22: Producción de mAb en biorreactores

La mejor línea celular de PER.C6 transfectada de producción de UBS-54 se lleva a suspensión lavando las células en PBS y después cultivando las células en medio JRH ExCell 525, primero en matraces de cultivo pequeños y posteriormente en frascos rotativos, y se aumentan a escala a fermentadores de 1 a 2 litros. Las células se mantienen en selección de higromicina y G418 hasta que se prueba que la integración de los vectores es estable durante periodos más largos de tiempo. Esto se hace cuando las células aún están en la fase de adhesión o cuando las células están en suspensión.

Las células PER.C6 que producen mAb en crecimiento en suspensión generalmente se cultivan con higromicina y G418 y se usan para inoculación de biorreactores a partir de frascos rotativos. Los rendimientos de producción, funcionalidad y calidad de los mAb producidos se controlan después del crecimiento de las células en biorreactores por perfusión y en ajustes discontinuos de alimentación.

A. Perfusión en un biorreactor de 2 litros.

Las células se siembran en medio de suspensión en ausencia de agentes de selección a una concentración de aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células por ml y la perfusión se comienza después de varios días cuando la densidad celular alcanza aproximadamente de 2 a 3×10^6 células por ml. La velocidad de perfusión es generalmente de 1 volumen por 24 horas con un flujo de aproximadamente 250 ml por 24 horas. En este ajuste, las células están normalmente a una densidad constante de aproximadamente 5×10^6 células por ml y una viabilidad de casi el 95% durante más de un mes. Los niveles de producción de mAb se determinan en una base regular.

B. Lote de alimentación en un biorreactor de 2 litros.

En una realización inicial, se usan las células PER.C6 en suspensión que producen mAb que crecen en frascos rotativos para inocular un biorreactor de 2 litros en ausencia de agentes de selección a una densidad de 0,3 a 0,5 millones de células por ml en un volumen de trabajo de 300 a 500 ml y se dejan crecer hasta que la viabilidad del cultivo celular baja hasta el 10%. Como patrón de vida del cultivo se determina a qué día después de la inoculación la densidad de células viables baja por debajo de 5 millones de células por ml. Las células normalmente crecen hasta una densidad de 2 a 3 millones de células por ml después de lo cual los componentes del medio llegan a ser limitantes y disminuye la viabilidad. Además, se determina cuánto de los componentes esenciales en el medio, como glucosa y aminoácidos, se están consumiendo por las células. Después de esto, se determina qué aminoácidos se están produciendo y qué otros productos se acumulan en el cultivo. Dependiendo de esto, se están produciendo muestras de alimentación concentradas que se añaden a tiempos puntuales regulares para aumentar la vida del

cultivo y de ese modo se aumenta la concentración de mAb en el sobrenadante. En otro ajuste se desarrollan muestras de medio concentrado 10x que se añaden a las células a diferentes tiempos puntuales y que también aumentan la viabilidad de las células durante un periodo de tiempo más largo, dando finalmente como resultado una concentración más alta de mAb en el sobrenadante.

5

Ejemplo 23: Expresión transitoria de anticuerpos monoclonales recombinantes humanizados.

Las combinaciones correctas de los vectores que contienen los genes de la cadena pesada y ligera de UBS-54 se usaron en experimentos de transfección transitoria en células PER.C6. Por esto, no es importante qué marcador de selección se introduce en la estructura del plásmido, porque la expresión dura sólo un corto periodo (2-3 días). El método de transfección generalmente es Lipofectamina, aunque pueden usarse otros compuestos lipídicos catiónicos para la transfección eficaz. Los métodos transitorios se extrapolan de ajustes de matraces T25 a biorreactores de al menos 10 litros. Se sembraron aproximadamente 3,5 millones de células PER.C6 y PER.C6/E2A en el día 1 en un matraz T25. En el día 2, las células se transfectoron con, como mucho, 8 µg de ADN plasmídico usando Lipofectamina y se renovaron después de 2-4 horas y se dejaron durante 2 días. Después, se recogió el sobrenadante y se midieron los títulos de anticuerpo en un ELISA cuantitativo para inmunoglobulinas IgG1 humanas (CLB, véase también el Ejemplo 26). Los niveles de anticuerpo humano total en este sistema son aproximadamente 4,8 µg/millón de células sembradas para PER.C6 y 11,1 µg/millón de células sembradas para PER.C6/E2A. Para determinar cuánto del anticuerpo producido es del tamaño completo y se ha formado a partir de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, así como los niveles de expresión de la cadena pesada y/o ligera sola y conectadas por puentes disulfuro, se desarrollan controles ELISA que reconocen las subunidades por separado. Se usan las diferentes combinaciones de anticuerpo recogidas y teñidas que detectan todas las subunidades de IgG1 humanas o humanizadas. Los sobrenadantes de los transfectantes PER.C6 (transfectados con vectores de control o pUBS-Heavy2000/Hyg(-) y pUBS-Light2001/DHFRwt) se controlaron para la producción de mAb de tamaño completo (Figura 24). Las muestras se trataron con y sin DTT, por lo cual se puede distinguir entre mAb de tamaño completo (no reducido) y la cadena pesada y ligera por separado (reducido). Como se espera, la cadena pesada sólo se secreta cuando la cadena ligera se coexpresa y la mayoría del anticuerpo es de tamaño completo.

30

Ejemplo 24: Sistema de aumento a escala para transfecciones transitorias.

Se usan PER.C6 y derivados del mismo para aumentar a escala el sistema de transfecciones de ADN. De acuerdo con Wurm y Bernard (1999), pueden realizarse transfecciones en células en suspensión a sistemas de 1-10 litros en los que se han obtenido rendimientos de 1-10 mg/ml (0,1-1 pg/célula/día) de proteína recombinante usando electroporación.

35

Hay una necesidad de un sistema en el que esto pueda controlarse bien y los rendimientos puedan ser superiores, especialmente para explorar grandes cantidades de proteínas y proteínas tóxicas que no pueden producirse en un ajuste estable. Además, como estas líneas celulares como CHO están fuertemente influidas por agentes inductores de la apoptosis como lipofectamina, la técnica muestra que hay una necesidad de células que sean resistentes a esto. Como PER.C6 está fuertemente influida por los métodos de transfección, parece que PER.C6 y derivados de la misma son útiles para estos propósitos. Se usaron cultivos en suspensión de 1 a 50 litros de PER.C6 y PER.C6/E2A que crecen en medio ajustado para mantener transfecciones de ADN transitorias usando ADN plasmídico purificado, para electroporación u otros métodos, realizando la transfección con los mismos plásmidos de expresión. Después de varias horas, el medio de transfección se retira y se reemplaza por medio fresco sin suero. La proteína recombinante se deja acumular en el sobrenadante durante varios días después, de lo cual se recoge el sobrenadante y todas las células se retiran. El sobrenadante se usa para el procesamiento cadena abajo para purificar la proteína recombinante.

45

Ejemplo 25: Sistema de cambio de escala para infecciones virales

50

Se clonan los ADNc de cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en los ejemplos 3, 4 y 5 en plásmidos adaptadores adenovirales recombinantes de forma separada y en combinación. Las combinaciones se preparan para asegurar un nivel de expresión igual para la cadena tanto pesada como ligera del anticuerpo que va a formarse. Cuando se clonan la cadena pesada y ligera de forma separada, entonces se producen y se propagan de forma separada los virus, de los que se determina la infectabilidad y la concentración de partículas virales y finalmente se co-infectan en PER.C6 y derivados de las mismas para producir mAb recombinantes en el sobrenadante. La producción de vectores adaptadores y adenovirus recombinantes y producción de mAb son como de describe para EPO recombinante (véase ejemplos 13 y 14).

55

Ejemplo 26: Desarrollo de un ELISA para la determinación de mAb humanos.

60

Se recubrieron placas Greiner microlon N° 655061 con un anticuerpo monoclonal kappa anti-IgG1 humana (Pharmingen N° M032196 0.5) con 100 µl por pocillo en una concentración de 4 µg por ml en PBS. La incubación se realizó durante una noche a 4°C o durante 90 minutos a 37°C. Después, los pocillos se lavaron tres veces con Tween al 0,05%/PBS (400 µl por pocillo) y posteriormente se bloquearon con 100 µl de leche al 5% disuelta en Tween al 0,05%/PBS por pocillo durante 30 minutos a 37°C y después, la placa se lavó tres veces con 400 µl de

65

Tween al 0,05%/PBS por pocillo. Como patrón, se usó un anticuerpo IgG1 humano purificado (Sigma, N° 108H9265) diluido en leche al 0,5%/Tween al 0,05%/PBS en diluciones que varían de 50 a 400 ng por ml. Se incubaron 100 µl de patrón por pocillo durante 1 hora a 37°C. Después, la placa se lavó tres veces con 400 µl por pocillo de Tween al 0,05%/PBS. Como anticuerpo secundario, se usó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG1 humana marcado con biotina (Pharmingen N° M045741) a una concentración de 2 µg por ml. Se añadieron 100 µl por pocillo de este anticuerpo y se incubaron durante 1 hora a 37°C y se lavaron los pocillos tres veces con 400 µl de Tween al 0,05%/PBS.

Posteriormente, se añadió el conjugado: 100 µl por pocillo de una dilución 1:1000 de solución Estreptavidina-HRP (Pharmingen N° M045975) y se incubó durante 1 hora a 37°C, y la placa se lavó otra vez tres veces con 400 µl por pocillo con Tween al 0,05%/PBS.

Se disolvió un comprimido ABTS (Boehringer Mannheim N° 600191-01) en 50 µl de tampón ABTS (Boehringer Mannheim N° 60328501) y 100 µl de esta solución a cada pocillo y se incubó durante 1 hora a TA o 37°C. Finalmente, se midió la OD a 405 nm. Las muestras sobrenadantes de las células transfectadas con vectores que codifican mAb, generalmente se disolvieron y se diluyeron en leche al 0,5%/ Tween al 0,05%/PBS. Si las mezclas no coincidían con el intervalo lineal de la curva patrón, se usaron otras diluciones.

Ejemplo 27: Producción de proteínas HA y NA de la Gripe en una célula humana para vacunas de subunidades recombinantes.

Se están determinando secuencias de ADNc de genes que codifican las proteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) de nuevas cepas del virus de la Gripe conocidas y que aparecen de manera regular y se están generando por PCR con cebadores para clonación adecuada en vectores pcDNA2000, pcDNA2001, pcDNA2002 y pcDNAs3000 (véase Ejemplo 1). Posteriormente, estos vectores de expresión resultantes se están transfectando en PER.C6 y derivados de la misma para expresión estable y transitoria de las proteínas recombinantes para dar como resultado la producción de proteínas HA y NA recombinantes que por lo tanto se producen en un modo estandarizado completo con células humanas en condiciones estrictas y bien definidas. Se deja que las células acumulen estas proteínas HA y NA recombinantes durante un periodo de tiempo convencional. Cuando se usa el vector pcDNAs3000, es posible clonar ambos ADNc simultáneamente y que las células produzcan ambas proteínas al mismo tiempo. A partir de cultivos por separado o combinados, las proteínas se están purificando siguiendo técnicas convencionales y se están determinando titulaciones de HA y NA finales por especialistas en la técnica y se están controlando las actividades de la proteína. Después, las proteínas recombinantes purificadas se usan para estudios de vacunación y finalmente se usan para propósitos de vacunación a gran escala.

El fragmento HA1 del virus de la gripe porcina A/swine/Oedenrode/7C/96 (número de acceso a Genbank AF092053) se obtuvo por PCR usando un cebador directo con la siguiente secuencia: 5' ATT GGC GCG CCA CCA TGA AGA CTA TCA TTG CTT TGA GCT AC 3', y con un cebador inverso con la siguiente secuencia: 5' GAT GCT AGC TCA TCT AGT TTG TTT TTC TGG TAT ATT CCG 3'. El producto de PCR que contiene 1,0 kb resultante se digirió con las enzimas de restricción *Ascl* y *NheI* y se ligaron con un vector pcDNA2001/DHFRwt purificado y digerido con *Ascl* y *NheI*, dando como resultado pcDNA2001/DHFRwt-swHA1. Además, el fragmento HA2 del mismo virus se amplificó por PCR usando el mismo cebador directo que se ha descrito para HA1 y otro cebador inverso con la siguiente secuencia: 5' GAT GCT AGC TCA GTC TTT GTA TCC TGA CTT CAG TTC AAC ACC 3'. El producto de PCR H2A de 1,6 kb resultante se clonó de un modo idéntico al descrito para HA1, dando como resultado pcDNA2001/DHFRwt-swHA2.

Ejemplo 28: Integración de ADNc que codifica enzimas de modificación post-traduccional.

Como los niveles de producción de proteína recombinante en PER.C6 y PER.C6/E2A infectadas y transfectadas de manera transitoria y estable son extremadamente altos y como se obtiene habitualmente un nivel de expresión más alto tras la amplificación dependiente de DHFR para aumentar la concentración de MTX, podría suceder un "sobretitulación" de los niveles endógenos de enzimas que están implicados en las modificaciones post-traduccionales.

Por lo tanto, los ADNc que codifican enzimas humanas implicadas en diferentes tipos de modificaciones post-traduccionales y procesos como glicosilación, fosforilación, carboxilación, plegamiento y tráfico, se están sobre-expresando en PER.C6 y PER.C6/E2A para posibilitar un producto recombinante más funcional para que se produzca a niveles extremos en ajustes grandes y pequeños. Se mostró que pueden diseñarse células CHO en las que se introdujo alfa-2,6-sialiltransferasa para potenciar la expresión y bioactividad de tPA y eritropoyetina humana (Zhang et al. 1998, Minch et al. 1995, Jenkins et al 1998). Otros genes como beta 1,4-galactosiltransferasa también se introdujeron en células de insecto y CHO para mejorar las estructuras ramificadas de oligosacáridos N-enlazados y para potenciar la concentración de ácidos siálicos en los restos terminales (Weikert et al. 1999; Hollister et al 1998). Las células PER.C6 se modifican por integración de ADNc que codifica las proteínas alfa 2,3-sialiltransferasa, alfa 2,6-sialiltransferasa y beta 1,4-galactosiltransferasa para aumentar de manera adicional el contenido de ácido siálico de proteínas recombinantes producidas en esta línea celular humana.

Ejemplo 29: Inhibición de apoptosis por sobreexpresión de Adenovirus E1B en células CHO-dhfr

Se sabe que las células de ovario de hámster chino, que sobreexpresan proteínas exógenas recombinantes, son altamente sensibles a señales apoptóticas, dando como resultado una tasa de muerte general mayor entre estas líneas celulares productoras estables en comparación con las células de tipo silvestre u originales de las que derivaron estas células. Además, las células CHO mueren por efectos apoptóticos cuando se usan agentes como Lipofectamine en estudios de transfección. Por lo tanto, las células CHO tienen una gran desventaja en producción de proteína recombinante en el sentido de que las células mueren muy fácilmente por apoptosis debido a diferentes razones. Puesto que se sabe que el gen E1B del adenovirus tiene efectos anti-apoptóticos (White *et al.* 1992; Yew y Berk 1992), se transfectan células CHO-dhfr estables que expresan la cadena tanto pesada como ligera de los anticuerpos descritos (véase Ejemplo 3, 4 y 5) con ADNc de adenovirus E1B para producir una expresión transitoria o estable de las proteínas E1B para asegurar finalmente un efecto apoptótico inferior en estas células y aumentar de este modo la tasa de producción de las proteínas recombinantes. Se comparan células transfectadas de forma transitoria y células transfectadas de forma estable con células CHO-dhfr de tipo silvestre en análisis de FACS con respecto a muerte celular debido al método de transfección o debido al hecho de que sobreexpresan las proteínas recombinantes.

Se generan líneas celulares de CHO estables en las que se sobreexpresan proteínas E1B del adenovirus. Posteriormente, se compara la respuesta apoptótica debido a efectos de por ejemplo Lipofectamine en estas células CHO que producen E1B estables con la respuesta apoptótica de las células parentales que no recibieron el gen E1B. Estos experimentos se ejecutan usando análisis de FACS y kits disponibles en el mercado que pueden determinar la tasa de apoptosis.

Ejemplo 30: Inhibición de apoptosis por sobreexpresión de E1B de Adenovirus en células humanas

Las células PER.C6 y derivados de las mismas expresan los genes E1A y E1B de adenovirus. Otras células humanas, como células A549, se usan para sobreexpresar de forma estable E1B de adenovirus para determinar los efectos anti-apoptóticos de la presencia del gen E1B de adenovirus como se ha descrito para las células CHO (véase ejemplo 29). La mayoría de las células responden a los agentes de transfección como Lipofectamine u otros lípidos catiónicos dando como resultado apoptosis masiva, dando como resultado finalmente bajas concentraciones de las proteínas recombinantes que se secretan, simplemente debido al hecho de que solo pocas células sobreviven al tratamiento. Las células que sobreexpresan E1B estables se comparan con las líneas celulares parentales en su respuesta a sobreexpresión de proteínas tóxicas o proteínas que inducen a apoptosis y su respuesta a agentes de transfección como Lipofectamine.

Ejemplo 31: Generación de PER.C6 obtenidas de líneas celulares que carecen de proteína DHFR funcional.

Las células PER.C6 se usan para eliminar el gen DHFR usando diferentes sistemas para obtener líneas celulares que pueden usarse para amplificación del gen DHFR integrado exógeno que se codifica en los vectores que se describen en los Ejemplos 1 a 5 u otros vectores de expresión de DHFR. Las células PER.C6 se exploran para la presencia de los diferentes cromosomas y se selecciona para un bajo número de copias del cromosoma que lleva el gen DHFR humano. Posteriormente, estas células se usan en experimentos knock-out en los que la pauta de lectura abierta del gen DHFR se interrumpe y se reemplaza por un marcador de selección. Para obtener una línea celular knock-out doble, ambos alelos se retiran por medio de recombinación homóloga usando dos diferentes marcadores de selección o por otros sistemas como por ejemplo los descritos para células CHO (Urlaub *et al.* 1983).

También se aplican otros sistemas en los que la funcionalidad de la proteína DHFR se disminuye o se retira completamente, por ejemplo por el uso de ARN sin sentido o mediante híbridos ARN/ADN, en los que el gen no se retira o elimina, pero los productos cadena abajo del gen se interrumpen en su función.

Ejemplo 32: Producción a largo plazo de proteínas recombinantes usando inhibidores de proteasa y neuraminidasa.

Los clones estables descritos en el Ejemplo 8 se usan para expresión a largo plazo en presencia y ausencia de MTX, suero e inhibidores de proteasa. Cuando las células estables o transfectadas se dejan durante varios días que acumulen la proteína EPO humana recombinante, se observa una curva plana en lugar de un aumento claro que indica que la EPO acumulada se degrada al instante. Esto podría ser un proceso inactivo debido a los factores externos como luz o temperatura. También puede ser que las proteasas específicas que se producen por las células viables o que se liberan tras la lisis de las células muertas, digieren la proteína EPO recombinante. Por lo tanto, se añade una concentración en aumento de CuSO₄ al medio de cultivo después de la transfección y en las células de producción estable para detectar una curva de producción más estable: las células se cultivan durante varios días y la cantidad de EPO se determina a diferentes tiempos puntuales. Se sabe que CuSO₄ es un inhibidor de la actividad proteasa, que puede quitarse fácilmente durante el procesamiento cadena abajo y la purificación de EPO. La concentración más óptima de CuSO₄ se usa para producir proteína EPO humana recombinante después de la expresión transitoria tras la transfección de ADN e infecciones virales. Además, la concentración óptima de CuSO₄ también se usa en la producción de EPO en clones estables. En el caso de EPO en la que la presencia de los ácidos siálicos terminales es importante para asegurar una vida media de circulación larga de la proteína recombinante, es

necesario producir EPO altamente sialilada. Como las células vivas producen neuraminidasas que pueden secretarse tras la activación por factores de estrés, es probable que la EPO producida pierda sus ácidos siálicos debido a estos factores de estrés y neuraminidasas producidas. Para prevenir el corte de los ácidos siálicos, se añaden inhibidores de neuraminidasa al medio para dar como resultado una unión prolongada de los ácidos siálicos a la EPO que se produce.

Ejemplo 33: Expresión estable de proteínas recombinantes en células humanas usando el sistema de Glutamina Sintetasa amplificable.

Se están usando PER.C6 y derivados de la misma para expresar de manera estable proteínas recombinantes usando el sistema de glutamina sintetasa (GS). Primero, las células se están explorando para su capacidad de crecer en medio libre de glutamina. Si las células no pueden crecer en medio libre de glutamina esto quiere decir que estas células no expresan suficiente GS, dando finalmente como resultado la muerte de las células. El gen GS puede integrarse en vectores de expresión como marcador de selección (como se describe para el gen DHFR) y puede amplificarse aumentando la concentración de metionina sulfoximina (MSX) dando como resultado la sobre-expresión de la proteína recombinante de interés, aunque el vector integrado de manera estable por completo se coamplificará como se muestra para DHFR. El sistema de expresión del gen GS llegó a ser factible después de un informe de Sanders et al. (1984) y se hizo una comparación entre el sistema de selección DHFR y GS por Cockett et al. (1990). La producción de mAb recombinantes usando GS se describió por primera vez por Bebbington et al. (1992).

El gen GS se clona en las estructuras de vector descritas en el Ejemplo 1 o en ADNc que codifican proteínas recombinantes y las cadenas pesada y ligera de mAb se clonan en los vectores apropiados que llevan el gen GS. Posteriormente, estos vectores se transfectan en PER.C6 y se seleccionan en concentraciones de MSX que permitirán crecer las células con integración estable de los vectores.

Ejemplo 34: Producción de la proteína gp120 de VIH recombinante en una célula humana.

El ADNc que codifica la proteína gp120 de la cubierta altamente glicosilada del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) se determina y se obtiene por PCR usando cebadores que albergan una secuencia Kozak perfecta en el cebador cadena arriba para una iniciación de la traducción apropiada y secuencias de reconocimiento de restricción adecuadas para clonación en los vectores de expresión descritos en el Ejemplo 1. Posteriormente, este producto de PCR se secuencian en ambas cadenas para asegurar que no hay errores de PCR introducidos.

El vector de expresión se transfecta en PER.C6, derivados de la misma y células de CHO-dhfr para obtener líneas celulares de producción estable. Se están determinando diferencias en la glicosilación entre gp120 producida por CHO y producida por PER.C6 en experimentos de electroforesis 2D y posteriormente en experimentos de espectrometría de masas, ya que gp120 es una proteína fuertemente glicosilada con oligosacáridos principalmente O-enlazados. La proteína recombinante se purifica por especialistas en la técnica y posteriormente se usa para ensayos de funcionalidad y otros ensayos. La proteína purificada se usa para propósitos de vacunación para prevenir infecciones de VIH.

Leyendas de las Figuras

1. pcDNA2000/DHFRwt
2. pcDNA2001/DHFRwt
3. pcDNA2002/DHFRwt
4. pcDNAs3000/DHFRwt
5. pEPO2000/DHFRwt
6. pAdApt.EPO
7. pHc2000/Hyg(-)
8. pLC2001/DHFRwt
9. pUBS-Heavy2000/Hyg (-)
10. pUBS-Light2001/DHFRwt
11. pUBS2-Heavy2000/Hyg(-)
12. pUBS2-Light2001/DHFRwt
13. pUBS-3000/DHFRwt
14. pUBS2-3000/DHFRwt
15. Concentración de EPO en un biorreactor de perfusión de 2 litros dada en unidades ELISA por ml.
16. Concentración de EPO en un biorreactor discontinuo repetido de 2 litros en el que las densidades celulares se restauraron a $0,5 \times 10^6$ células por ml cada 2 a 3 días.
17. Concentración de EPO de células P9 de producción estable, tres días después de inoculación con $0,3 \times 10^6$ células por ml en 4 biorreactores discontinuos repetidos de 1 litro que se ajustan con diferentes condiciones: Izquierda. Diferentes ajustes para Oxígeno Disuelto. Centro. Diferentes temperaturas. Derecha. Diferente pH constante. Los ajustes convencionales para células P9 son DO 50%, 37°C y pH 7,3. En cada serie se realizó una serie control por separado con estos ajustes representados como la cuarta barra en cada serie.

18. Producción de EPO sobre el aumento de la concentración de MTX en las líneas celulares P8 y P9 derivadas de PER.C6 calculada como unidades ELISA por millón de células sembradas por día.
19. Amplificación del gen DHFR sobre el aumento de la concentración de MTX. Transferencia Southern de ADN digerido con BgIII obtenido de células PER.C6 normales (no crecidas en presencia de MTX) y de células P8 y P9 (cultivadas en presencia de MTX 100 nM, 800 nM y 1800 nM). La transferencia primero se hibridó con una sonda DHFR radiactiva, posteriormente se extrajo y después se incubó con una sonda E1 de adenovirus radiactiva como control interno.
20. Estabilidad de la expresión de EPO recombinante de dos líneas celulares: P8(A) y P9(B). Las células se cultivaron en presencia o ausencia de MTX durante aproximadamente 60 pases en un periodo de tiempo de más de 4 meses y se calculó la producción de EPO como unidades ELISA por millón de células sembradas por día.
21. Actividad de beta-galactósido alfa2,6-sialiltransferasa en PER.C6 en comparación con células CHO. A. Transferencia western de EPO a partir del sobrenadante de células PER.C6 que se transfectaron con un plásmido de expresión de EPO (izquierda) y Epnex (derecha). PER.C6-EPO se corrió sin tratamiento (carril 1), después de tratamiento con neuraminidasa obtenida de NDV en dos tampones por separado (carriles 2 y 3) y después de tratamiento con neuraminidasa obtenida de VC (carril 4). Epnex sólo se corrió sin tratamiento (carril 5) y después de tratamientos similares con neuraminidasas (carriles 5 a 8). B. Cambio en el análisis FACS de células PER.C6 (diagramas de la derecha) y CHO (diagramas de la izquierda) después de tratamiento con anticuerpo anti-DIG que reconoce dos lectinas unidas a DIG que se incubaron con las células (dando como resultado campos oscuros), que reconocen específicamente enlaces alfa2,6 entre ácidos siálicos y galactosas (aglutinina de Sambucus nigra, diagramas superiores) y enlaces alfa2,3 ácido siálico-galactosa (aglutinina de Maackia amurensis, diagramas inferiores) en comparación con un análisis FACS con células no tratadas con lectina (campos abiertos).
22. 2D/análisis western de EPO recombinante producida en diferentes ajustes de cultivo. A. Células P9, que expresan de manera estable EPO humana recombinante se hicieron crecer en matraces T175 en DMEM y en frascos rotativos y biorreactores en medio JRH ExCell 525, y se separaron en electroforesis 2D, se transfirieron y se incubaron con H162, un antisuero anti-EPO. Las muestras que contenían el intervalo completo de EPO que contiene ácido siálico (de sobrenadantes de P9) se compararon con Epnex disponible en el mercado que contiene únicamente las formas de EPO que contenían ácidos siálicos superiores (izquierda). B. EPO obtenida de células P9 adheridas crecidas en medio DMEM en un ajuste de adhesión en comparación con EPO obtenida de células CHO transfectadas de manera transitoria que también se cultivaron en DMEM. FBS estaba presente durante el cultivo, pero se retiró antes de comenzar la acumulación de EPO. Los contenidos de ácido siálico sugeridos en estas muestras (1-14) se indican entre las dos transferencias.
23. Ensayo de funcionalidad in vitro de PER.C6/E2A-EPO producidas a 37°C usando células TF-1 en comparación con Epnex disponible en el mercado que se produce en células CHO.
24. Transferencia western usando un anticuerpo anti-cadena pesada de IgG1 humana en sobrenadantes de células PER.C6 que se cotransfectaron con pUBS-Heavy2000/Hyg(-) y pUBS-Light2001/DHFRwt (carril 6) o con los vectores por separado (carriles 4 y 5). Como control positivo se cargó suero humano diluido (IgG, carril 1) y como controles negativos se transfectó un vector de expresión que codifica LacZ (control, carril 3) y se cargó (carril 2) un marcador (M, los tamaños no se representan). El diagrama superior es de un gel que se cargó con muestras de los transfectantes que no se trataron con DTT en los que los puentes disulfuro de la cadena pesada y ligera están intactos y se detecta un mAb completo de aproximadamente 220 kD. El diagrama inferior muestra muestras de los mismos transfectantes tratados con DTT que tienen los puentes disulfuro quitados dando como resultado una separación completa de la cadena pesada y ligera. La transferencia se incubó con un anticuerpo que reconoce las cadenas pesadas de IgG1 humana. La cadena ligera se tiñe debido al reconocimiento anterior por el anticuerpo secundario (policlonal) usado para el procedimiento ECL-western.

Referencias

- Baldwin RW, Byers VS (1986) Monoclonal antibodies in cancer treatment. *Lancet* 1, 603-605.
- Barbas CF, Kang AS, Lerner RA and Benkovic SJ (1991) Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: The gene III site. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88, 7978
- Bebbington CR, Renner G, Thomson S, Abrams D, Yarranton GT (1992) High-level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker. *Bio/technology* 10, 169-175.
- Borrebaeck CAK, Malmberg A-C and Ohlin M (1993) Does endogenous glycosylation prevent the use of mouse monoclonal antibodies as cancer therapeutics? *Immunology Today* 14, 477-479.
- Borrebaeck CAK (1999) Human monoclonal antibodies: The emperor's new clothes? *Nature Biotech.* 17, 621.
- Boshart W, Weber F, Jahn G, Dorsch-Hasler K, Fleckenstein B, Schaffner W (1985) A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41, 521-530.
- Bruggeman M, Spicer C, Buluwela L, Rosewell I, Barton S, Surani MA, Rabbits TH (1991) Human antibody production in transgenic mice: expression from 100 kb of the human IgH locus. *Eur J Immunol.* 21, 1323-1326.
- Bulens F., Vandamme A-M., Bernar H., Nelles L., Lijnen RH. and Collen D (1991) Construction and characterization of a functional chimeric murine-human antibody directed against human fibrin fragment-D dimer. *Eur J Biochem.* 195, 235-242.
- Burton DR and Barbas III CF (1994) Human antibodies from combinatorial libraries. *Adv Immunol.* 57, 191-280.
- Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME and Shephard

- HM (1992) Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 4285-4289.
- Clarkson T, Hoogenboom HR, Griffiths A and Winter G (1991) Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 353, 624.
- 5 Cockett MI, Bebbington CR, Yarranton GT (1990) High level expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in chine hamster ovary cells using glutamine synthetase gene amplification. *Bio/technology* 8, 662-667.
- Crowe JS., Hall VS., Smith--MA., Cooper HJ. and Tite JP (1992) Humanized monoclonal antibody CAMPATH-1H: myeloma cell expression of genomic constructs, nucleotide sequence of cDNA constructs and comparison of effector mechanisms of myeloma and Chinese hamster ovary cell-derived material. *Clin Exp Immunol* 87, 105-110.
- 10 Debbas M, White E (1993) Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev.* 7, 546-554.
- Delorme E, Lorenzini T, Giffin J, Martin F, Jacobsen F, Boone T, Elliot S (1992) Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin. *Biochemistry* 31, 9871-9876.
- Farrow SN, White JH, Martinou I, Raven T, Pun KT, Grinham CJ, Martinou JC, Brown R (1995) Cloning of a bcl-2
15 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* 374, 731-733.
- Fishwild DM, O'Donnell SL, Bengoechea T, Hudson DV, Harding F, Bernhard SL, Jones D, Kay RM, Higgins KM, Schramm SR, Lonberg N (1996) High-avidity human IgG kappa monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice. *Nat Biotechnol.* 14, 845-851.
- Fussenegger M, Bailey JE, Hauser H, Mueller PP (1999) Genetic optimization of recombinant glycoprotein production by mammalian cells. *Trends Biotechn.* 17, 35-42.
- 20 Frödin JE, Lefvert AK, Mellstedt H (1990) Pharmacokinetics of the mouse monoclonal antibody 17-1A in cancer patients receiving various treatment schedules. *Cancer Res.* 50, 4866-4871 .
- Galili U (1993) Interaction of the natural anti-Gal antibody with alpha-galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunol Today* 14, 480-482.
- 25 Garrard L, Yang M, O'Connell M, Kelley R and Henner DJ (1991) Fab assembly and enrichment in a monovalent phage display system. *BioTechnology* 9, 13 73.
- Goldwasser E, Eliason JF, Sikkema D (1975) An assay for erythropoietin in vitro at the milliunit level. *Endocrinology* 97, 315-23.
- Green LL, Hardy MC, Maynard-Currie CE, Tsuda H, Louie DM, Mendez MJ, Abderrahim H, Noguchi M, Smith DH, Zeng Y (1994) Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat Genet.* 7, 13-21.
- Gorman CM, Gies D, McCray G, Huang M (1989) The human cytomegalovirus major immediate early promoter can be transactivated by adenovirus early proteins. *Virology* 171, 377-385.
- 35 Hale G, Dyer MJS, Clark MR, Phillips JM, Marcus R, Reichmann L, Winter G and Waldmann H (1988) Remission induction in non-Hodgkin lymphoma with reshaped human monoclonal antibody CAMPATH-1H. *Lancet* 2, 1394-1399.
- Hammerling U, Kroon R, Wilhelmssen T, Sjödin L (1996) In vitro bioassay for human erythropoietin based on proliferative stimulation of an erythroid cell line and analysis of carbohydrate-dependent microheterogeneity. *J Pharm Biomed An.* 14, 1455-1469.
- 40 Han J, Sabbatini P, Perez D, Rao L, Modha D, White E (1996) The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes Dev.* 10, 461-477.
- Havenga MJ, Werner AB, Valerio D, van Es HH (1998) Methotrexate selectable retroviral vectors for Gaucher disease. *Gene Ther.* 5, 1379-1388.
- Hollister JR, Shaper JH, Jarvis DJ (1998) Stable expression of mammalian beta1,4-galactosyltransferase extends the N-glycosylation pathway in insect cells. *Glycobiology* 8, 473-480.
- 45 Huls GA. , Heijnen IAFM., Cuomo ME., Koningsberger JC, Wiegman L., Boel E., Van der Vuurst de Vries A-R. , Loyson SAJ., Helfrich W., Van Berge Henegouwen GP., Van Meijer M., De Kruij J. and Logtenberg T (1999) A recombinant, fully human monoclonal antibody with antitumor activity constructed from phage-displayed antibody fragments. *Nature Biotechnol.* 17, 276-281.
- 50 Isaacs JD, Watts RA, Hazleman BL, Hale G, Keogan MT, Cobbold SP, Waldmann H (1992) Humanised monoclonal antibody therapy for rheumatoid arthritis. *Lancet* 340, 748-52.
- Jacobovits A (1995) Production of fully human antibodies by transgenic mice. *Curr Opin Biotechnol.* 6, 561-566.
- Jenkins N, Parekh RB, James DC (1996) Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry. *Nat Biotechnol.* 14, 975-81.
- 55 Jenkins N, Buckberry L, Marc A, Monaco L (1998) Genetic engineering of alpha 2,6-sialyltransferase in recombinant CHO cells. *Biochem Soc Trans.* 26, S115.
- Kawashima I, Ozawa H, Kotani M, Suzuki M, Kawano T, Gomibuchi M, Tai T (1993) Characterization of ganglioside expression in human melanoma cells: immunological and biochemical analysis. *J Biochem (Tokyo)* 114, 186-193.
- Kay R, Takei F, Humphries RK (1990) Expression cloning of a cDNA encoding MI/69. *J Immunol.* 145, 1952-1959.
- 60 Kitamura T, Tange T, Terasawa T, Chiba S, Kuwaki T, Miyagawa K, Piao Y-F, Miyazono K, Urabe A, Takaku F (1989) Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J Cell Physiol.* 140, 323-334.
- Köhler G and Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495.
- 65 Krystal, G, Eaves, AC, Eaves CJ (1981) A quantitative bioassay for erythropoietin, using mouse bone marrow. *J Lab Clin Med.* 97, 144-157.

- Krystal G (1983) A simple microassay for erythropoietin based on 3H-thymidine incorporation into spleen cells from phenylhydrazine treated mice. *Exp Hematol.* 11, 64 9-660.
- Lee EU, Roth J, Paulson JC (1989) Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. *J Biol Chem.* 264, 13848-13855.
- Levrero M, Barban V, Manteca S, Ballay A, Balsamo C, Avantaggiata ML, Natoli G, Skellekens H, Tiollais P, Perricaudet M (1991) Defective and non-defective adenovirus vectors for expression foreign genes in vitro and in vivo. *Gene* 101, 195-202.
- Lonberg N, Taylor LD, Harding FA, Trounstein M, Higgins KM, Schramm SR, Kuo CC, Mashayekh R, Wymore K, McCabe JG (1994) Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 368, 856-859.
- Lonberg N, Huszar D (1995) Human antibodies from transgenic mice. *Int Rev Immunol.* 13, 65-93.
- Lowder JTNT, Meeker TC, Levy R (1985) Monoclonal antibody therapy of lymphoid malignancy. *Cancer Surv.* 4, 359-375.
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G and Chiswell DJ (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 343, 552.
- Mellstedt H, Frodin JE, Masucci G, Ragnhammar P, Fagerberg J, Hjelm AL, Shetye J, Wersall P, Osterborg A (1991) The therapeutic use of monoclonal antibodies in colorectal carcinoma. *Semin Oncol.* 18, 462-477.
- Mendez MJ, Green LL, Corvalan JR, Jia XC, Maynard-Currie CE, Yang XD, Gallo ML, Louie DM, Lee DV, Erickson KL, Luna J, Roy CM, Abderrahim H, Kirschenbaum F, Noguchi M, Smith DH, Fukushima A, Hales JF, Klapholz S, Finer MH, Davis CG, Zsebo KM, Jakobovits A (1997) Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nat Genet.* 15, 146-156.
- Minch SL, Kallio PT, Bailey JE (1995) Tissue plasminogen activator coexpressed in Chinese hamster ovary cells with alpha (2,6)-sialyltransferase contains NeuAc alpha(2,6) Gal beta(1,4)Glc-N-AcR linkages. *Biotechn Prog.* 11, 348-351.
- Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT (1984) Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 81,6851-6855.
- Muchmore EA, Milewski M, Varki A, Diaz S (1989) Biosynthesis of N-glycolyneuraminic acid. The primary site of hydroxylation of N-acetylneuraminic acid is the cytosolic sugar nucleotide pool. *J Biol Chem.* 264, 20216-20223.
- Nadler L, Stashenko P, Hardy R, Kaplan W, Burton L, Kufe DW, Antman KH, Schlossman SF (1980) Serotherapy of a patient with a monoclonal antibody directed against a human lymphoma-associated antigen. *Cancer Res.*-40, 3147-3154.
- Oi VT, Morrison SL, Herzenberg LA, Berg P (1983) Immunoglobulin gene expression in transformed lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci US A.* 1983 80, 825-829.
- Olive DM, Al-Mulla W, Simsek M, Zarban S, al-Nakib W (1990) The human cytomegalovirus immediate early enhancer-promoter is responsive to activation by the adenovirus-5 13S E1A gene. *Arch Virol.* 112, 67-80.
- Owens RJ and Young RJ. (1994) The genetic engineering of monoclonal antibodies. *J. Immunol Methods* 168, 149-165.
- Reff ME, earner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, Newman RA, Hanna N and Anderson DR (1994) Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 83, 435-445.
- Reichmann L, Clark M, Waldmann H and Winter G (1988) Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 322, 323-327.
- Riethmuller G, Riethmuller G, Schneider-Gadicke E, Schlimok G, Schmiegel W,- Raab R, Hoffken K, Gruber R, Pichlmaier H, Kirche H, Pichlmayr R, et al. (1994) Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. *Lancet* 343, 1177-1183.
- Rother RP and Squinto SP (1996) The alpha-Galactosyl epitope: A sugar coating that makes viruses and cells unpalatable. *Cell* 86, 185-188.
- Sanders PG, Wilson RH (1984) Amplification and cloning of the Chinese hamster glutamine synthetase gene. *EMBO J.* 3, 65-71.
- Sandhu JS (1992) Protein Engineering of antibodies. *Critical Rev Biotechnology* 12, 437-462.
- Shawler DL, Bartholomew RM, Smith LM and Dillman RO (1985) Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG. *J Immunol.* 135, 1530.
- Takeuchi M, Inoue N, Strickland TW, Kubota M, Wada M, Shimizu R, Hoshi S, Kozutsumi H, Takasaki S, Kobata A (1989) Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86, 7819-7822.
- Urlaub G, Kas E, Carothers AM, Chasin LA (1983) Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells. *Cell* 33, 405-412.
- Vandamme A-M., Bulens F., Bernar H., Nelles L., Lijnen RH. and Collen D (1990) Construction and characterization of a recombinant murine monoclonal antibody directed against human fibrin fragment-D dimer. *Eur J Biochem.* 192, 767-775.
- Vaswani SK and Hamilton RG (1998) Humanized antibodies as potential therapeutic drugs. *Ann Allergy, Asthma and Immunol.* 81, 105-115.
- Vonach B, Hess B, Leist C (1998) Construction of a novel CHO cell line coexpressing human glucosyltransferases and fusion PSGL-1-immunoglobulin G. In: O.-W.Merten et al (eds), *New developments and new applications in animal cell technology*, pp.181-183, Kluwer Academic Publishers.

Weikert S, Papac D, Briggs J, Cowfer D, Tom S, Gawlitzek M, Lofgren J, Mehta S, Chisholm V, Modi N, Eppler S, Carroll K, Chamow S, Peers D, Berman P, Krummen L (1999) Engineering Chinese hamster ovary cells to maximize sialic acid content of recombinant glycoproteins. *Nature Biotechnology* 17, 1116-1121.

5 White E, Sabbatini P, Debbas M, Wold WS, Kusher DI, Gooding LR (1992) The 19-kilodalton adenovirus E1B transforming protein inhibits programmed cell death and prevents cytolysis by tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol.* 12, 2570-2580.

Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE and Hoogenboom HR (1994) Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol.* 12, 433-455.

10 Wurm F, Bernard A (1999) Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. *Curr Opin Biotechnol.* 10, 156-159.

Yamaguchi K, Akai K, Kawanishi G, Ueda M, Masuda S, Sasaki R (1991) Effects of site-directed removal of N-glycosylation sites in human erythropoietin on its production and biological properties. *J Biol Chem.* 266, 20434-20439.

15 Yew PR, Berk AJ (1992) Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early IB protein. *Nature* 357, 82-85.

Zhang X, Lok SH, Kom OL (1998) Stable expression of human alpha-2,6-sialyltransferase in Chinese hamster ovary cells: functional consequences for human erythropoietin expression and bioactivity. *Biochim Biophys Acta.* 27, 441-452.

20 **TABLAS: Rendimientos de EPO recombinante**

Tabla 1. Resumen de la muerte de PER.C6 y PER.C6/E2A por metotrexato (MTX) después de 6 y 15 días de incubación con diferentes concentraciones de MTX. Las células se sembraron en el día 0 y las incubaciones con MTX comenzaron en el día 1 y continuaron durante 6 días. Después se registró la confluencia (%) y se reemplazó el medio con medio fresco más MTX y se continuó la incubación durante otros 9 días, después de los cuales se registró la confluencia (%) otra vez (día 15).

PER.C6		0	1	5	10	25	50	100	250	500	1000	2500	nM MTX
Células 1E5/pocillo	día 6	70	70	70	60	<5	<1	0,5	0	0	0	0	% confluencia
Placa de 6 pocillos	día 15	100	100	100	100	<10	<5	0	0	0	0	0	% confluencia
PER.C6/E2A		0	1	5	10	25	50	100	250	500	1000	2500	nM MTX
Células 1E5/pocillo	día 6	100	100	100	100	<100	5	5	4	1	<1	<1	% confluencia
Placa de 6 pocillos	día 15	100	100	100	100	<10	<5	0	0	0	0	0	% confluencia

30 Tabla 2. Líneas celulares PER.C6 y PER.C6/E2A adheridas que expresan EPO humana recombinante de manera estable. Las líneas celulares se generaron por integración estable y expresión de pEPO2000/DHFRwt (Figura 5). Los niveles de producción se determinaron en el sobrenadante, después de crecimiento de 4 días en un matraz T25 ajustado en presencia de MTX 100 nM.

líneas celulares PER.C6	Unidades ELISA/células E16 sembradas/día
P3	735
P5	0
P7	1733
P8	2522
P9	3839
P13	0
P15	0
P42	<1
líneas celulares PER.C6/E2A	Unidades ELISA/células E16 sembradas/día
E17	325
E55	1600

Tabla 3. Velocidad de amplificación de ADN DHFR endógeno e integrado. Las intensidades de las bandas de hibridación en las transferencias Southern de la Figura 19 se midieron en un phosphorimager y se corrigieron para niveles de fondo para calcular finalmente las velocidades de amplificación aproximadas de los genes DHFR endógeno e integrado.

5

P8	sonda E1	dhfr integrado	amplificación	dhfr endógeno	amplificación
100 nM	719624	3375		18649	
800 nM	913578	2976	x 0,882	45283	x 2,428
1800 nM	831952	2950	x 0,874	81506	x 4,371
P9	sonda E1	dhfr integrado	amplificación	dhfr endógeno	amplificación
100 nM	804142	16606		31161	
1800 nM	842268	14430	x 0,869	69542	x 2,232

Tabla 4. Rendimientos de EPO en transfecciones de ADN transitorias. Los rendimientos por millón de células sembradas se determinaron con un ELISA de EPO en sobrenadantes de células PER.C6, PER.C6/E2A y CHO que se transfectaron con el vector de expresión pEPO2000/DHFRwt en ausencia o presencia de Suero Bovino Fetal a diferentes temperaturas de incubación, como se describe en el Ejemplo 12.

10

Línea celular	± FBS	Temperatura	Rendimientos de EPO (unidades ELISA/células 1E6/día)
PER.C6/E2A	+	39°C	3100
PER.C6/E2A	-	39°C	2600
PER.C6	+	37°C	750
PER.C6	-	37°C	590
CHO	+	37°C	190
CHO	-	37°C	90

Tabla 5. Rendimientos de EPO obtenidos después de infecciones virales. Se determinaron los rendimientos por millón de células sembradas con un ELISA de EPO en sobrenadantes de células PER.C6 que se infectaron con adenovirus IG.Ad5.AdApt.EPO.dE2A recombinante como se ha descrito en el ejemplo 14. Se usaron dos lotes diferentes del virus con diferentes relaciones de pv/UI (330 y 560) en dos situaciones diferentes (cultivos de suspensión en frascos rotatorios y cultivos unidos a 6 pocillos).

15

moi (partículas virales por célula)	relación (partículas virales/unidades infecciosas)	condiciones de cultivo	medio	Renovación	rendimientos de EPO (unidades de ELISA/10 ⁶ células/día)
200	330	frasco rotatorio	JRH	día	3240
200	330	frasco rotatorio	JRH	Ninguna	190
20	330	frasco rotatorio	JRH	día 3	80
20	330	frasco rotatorio	JRH	Ninguna	70
200	560	6 pocillos	DMEM+FBS	cada día	60

20

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una proteína de interés, comprendiendo el método:
 - 5 a) proporcionar uno o más vectores adenovirales recombinantes que comprenden ácido nucleico que codifica la proteína de interés bajo el control de un promotor, teniendo dichos uno o más vectores adenovirales deleciones en las regiones E1 y E2A del genoma de adenovirus,
 - b) propagar dichos uno o más vectores adenovirales en células PER.C6 que expresan proteína E2A (células PER.C6/E2A), para obtener partículas adenovirales recombinantes,
 - 10 c) infectar un cultivo de células PER.C6 con dichas partículas adenovirales recombinantes, para producir la proteína de interés, y
 - d) recoger la proteína de interés.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que el promotor es un promotor de citomegalovirus (CMV).
3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que la proteína de interés es un anticuerpo.
4. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que la proteína de interés es eritropoyetina (EPO).
- 20 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células PER.C6 están en suspensión.

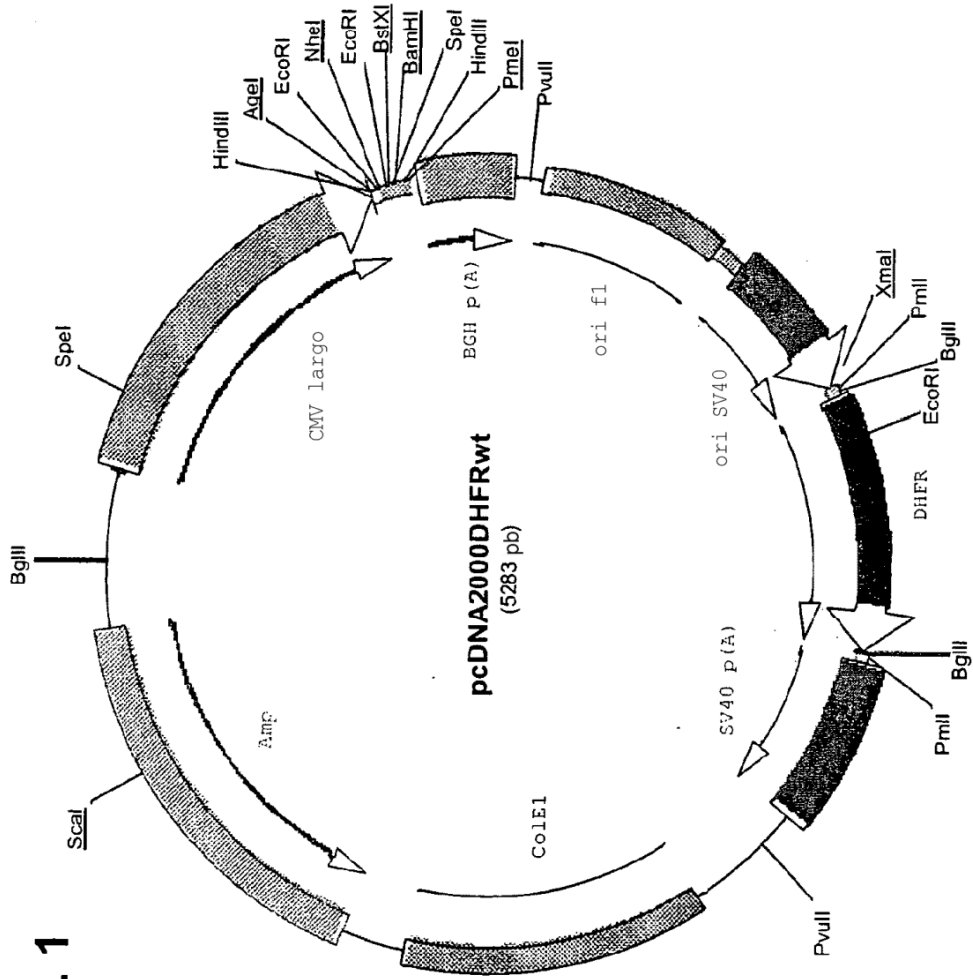


Fig. 1

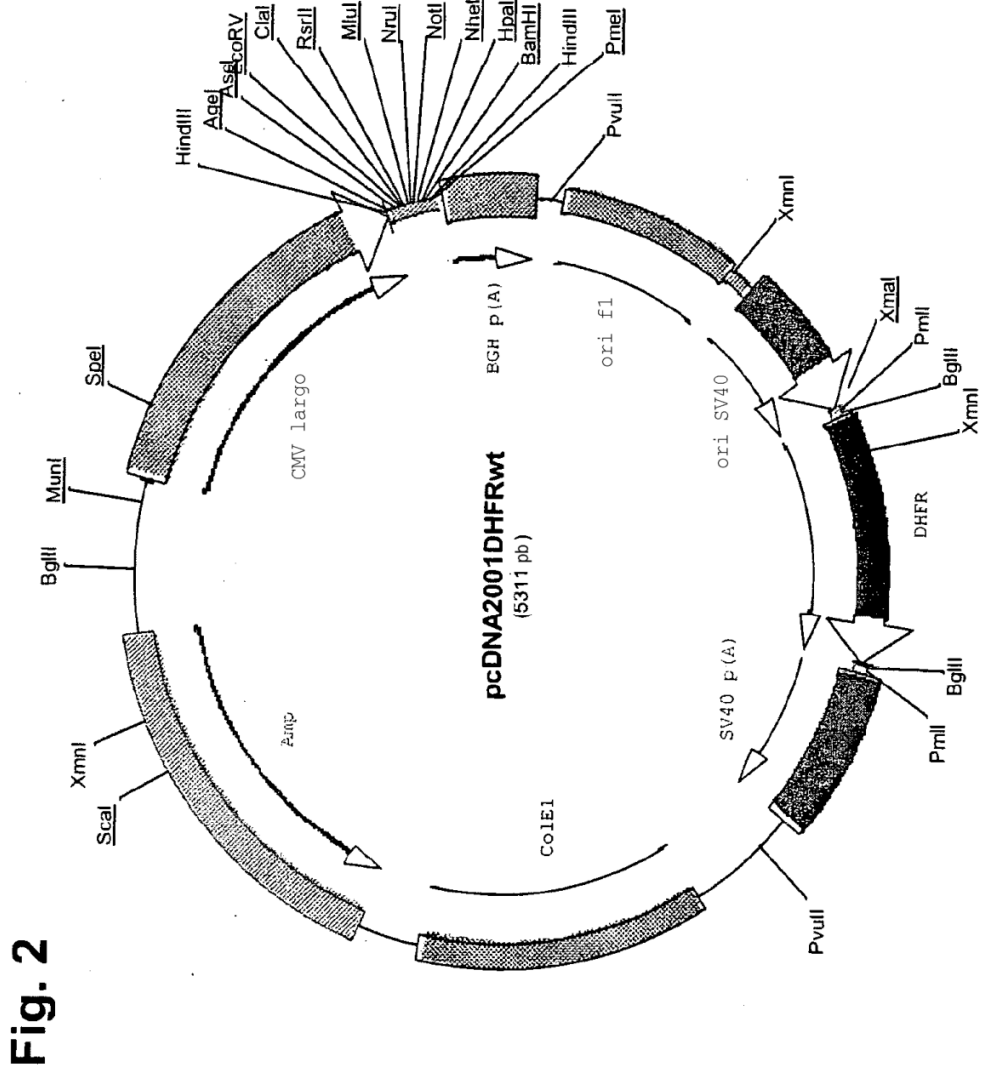


Fig. 2

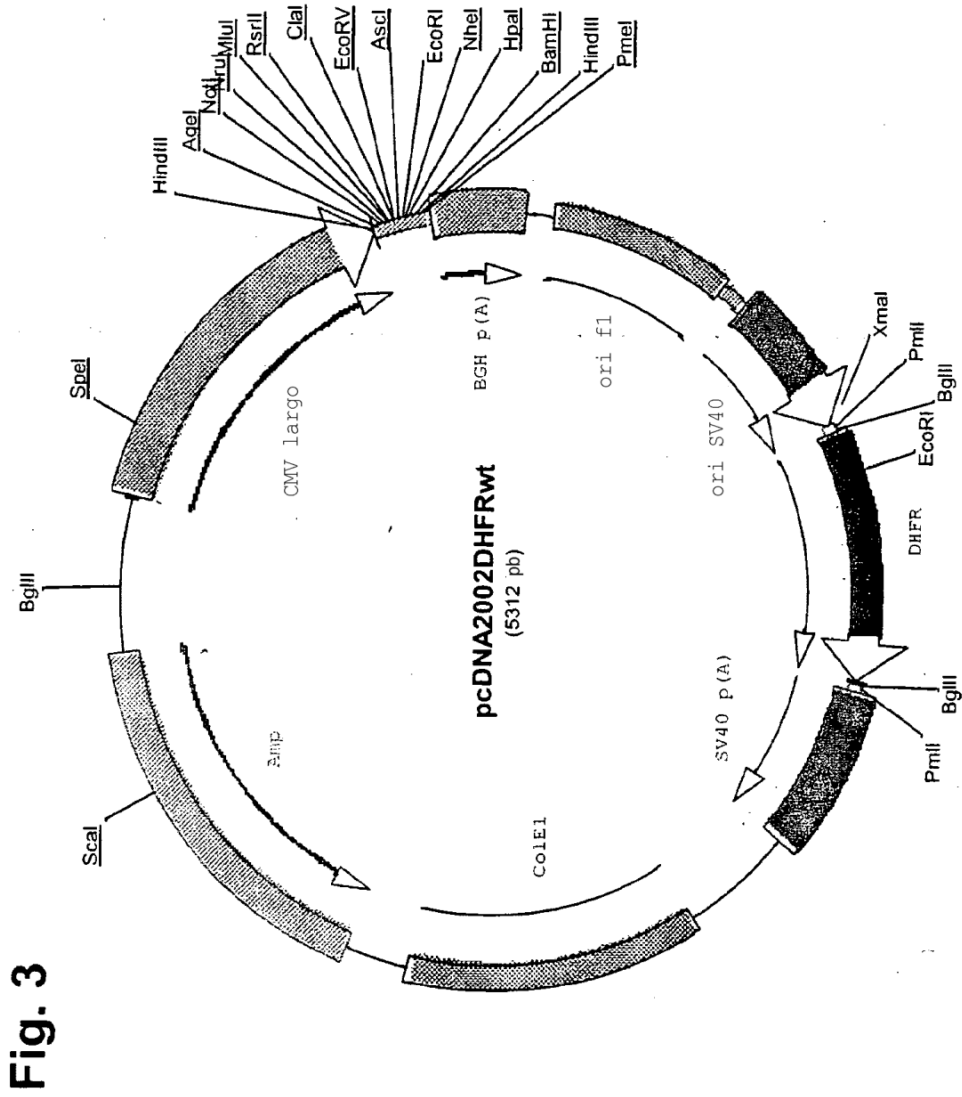


Fig. 3

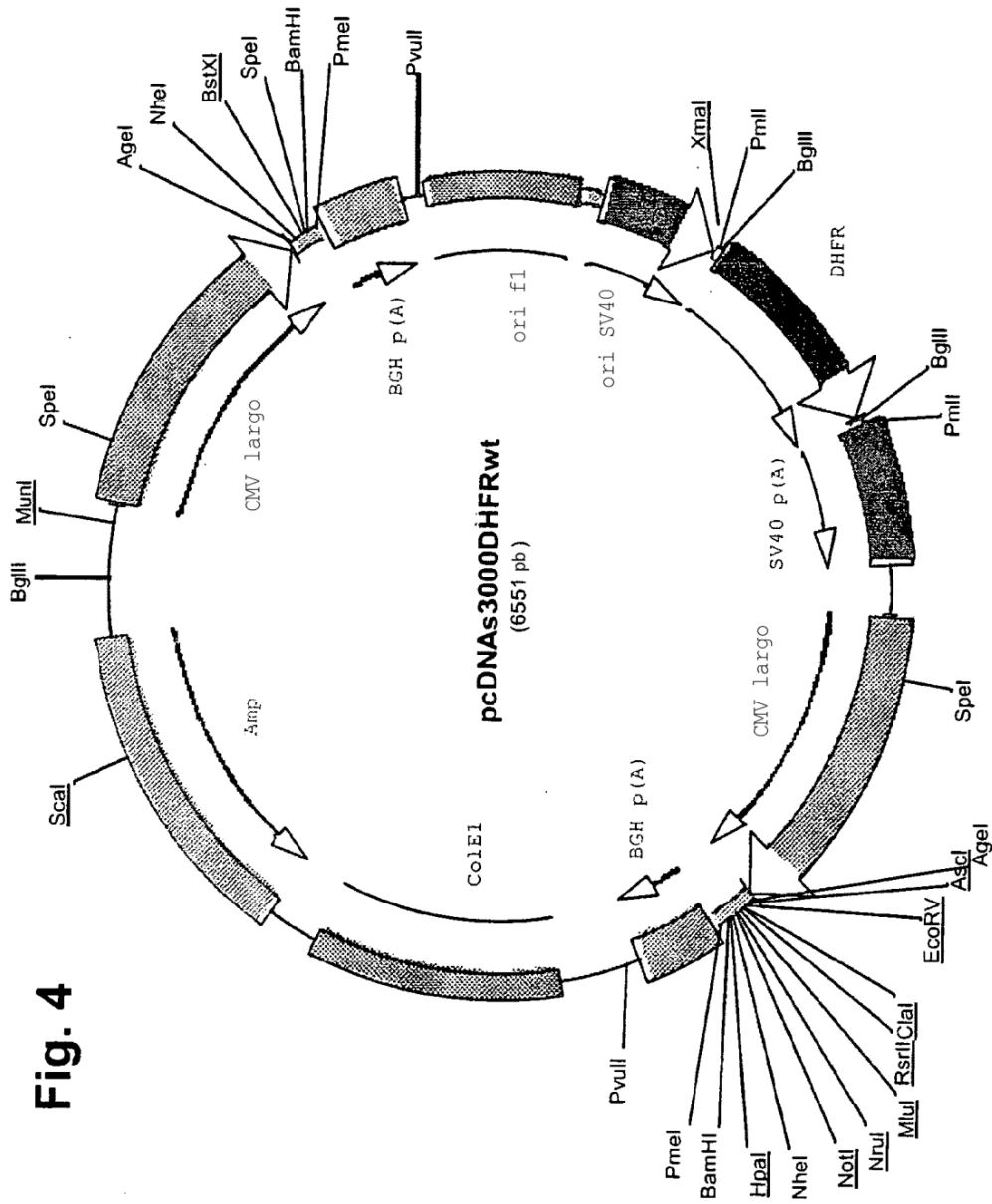


Fig. 4

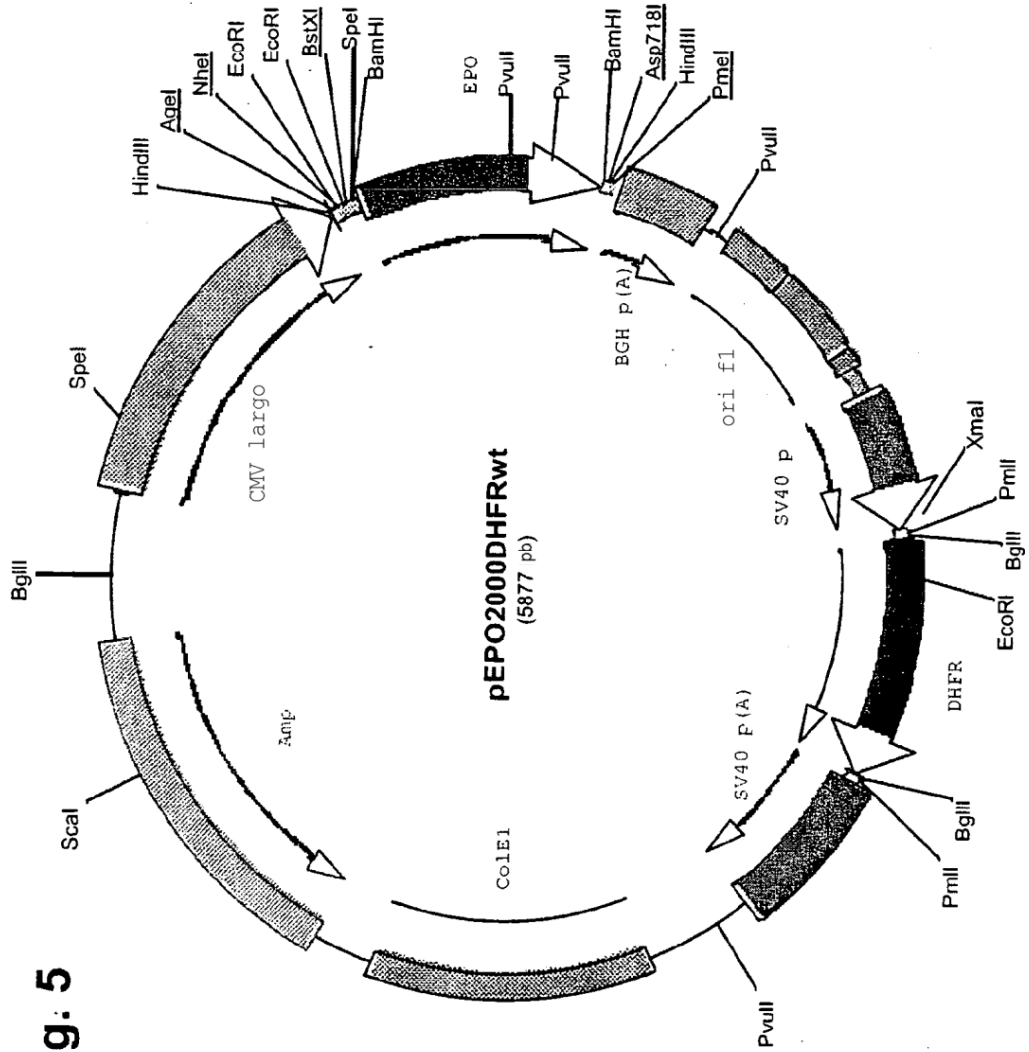


Fig. 5

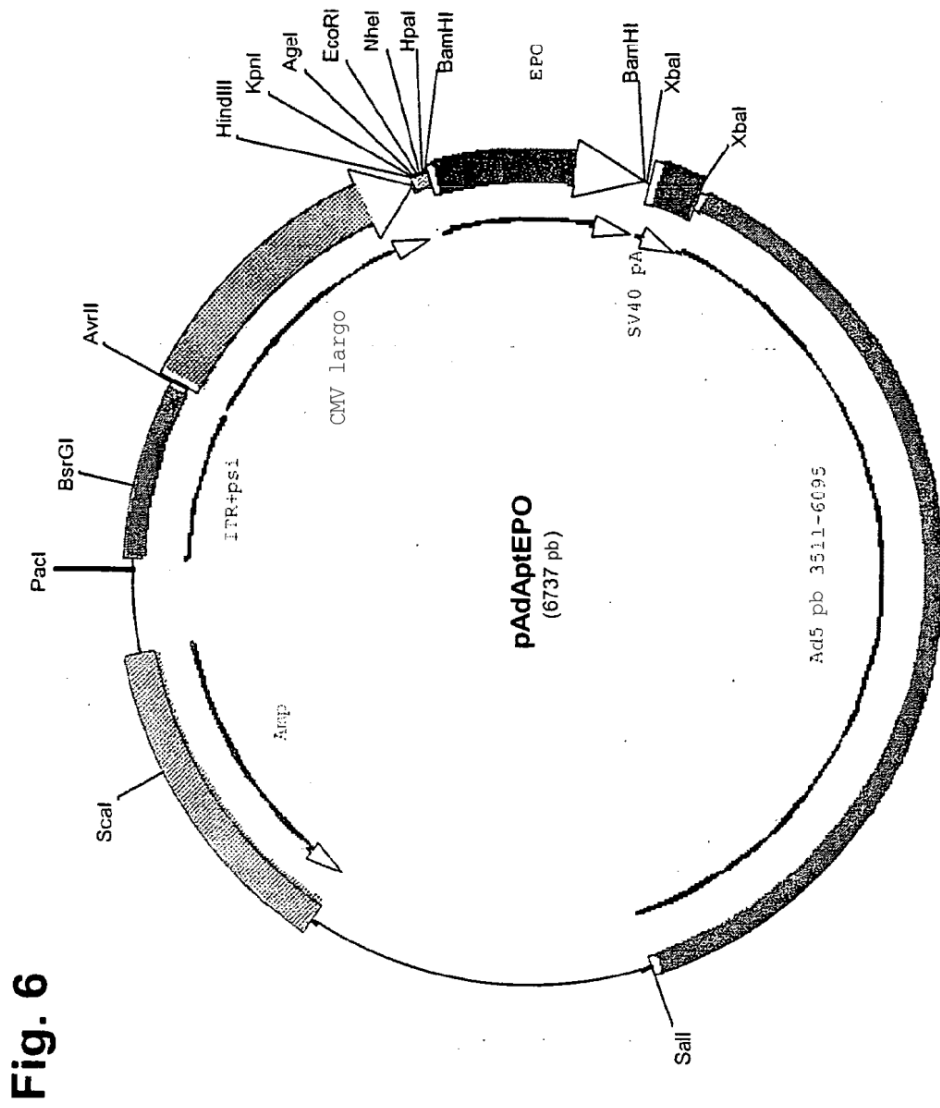
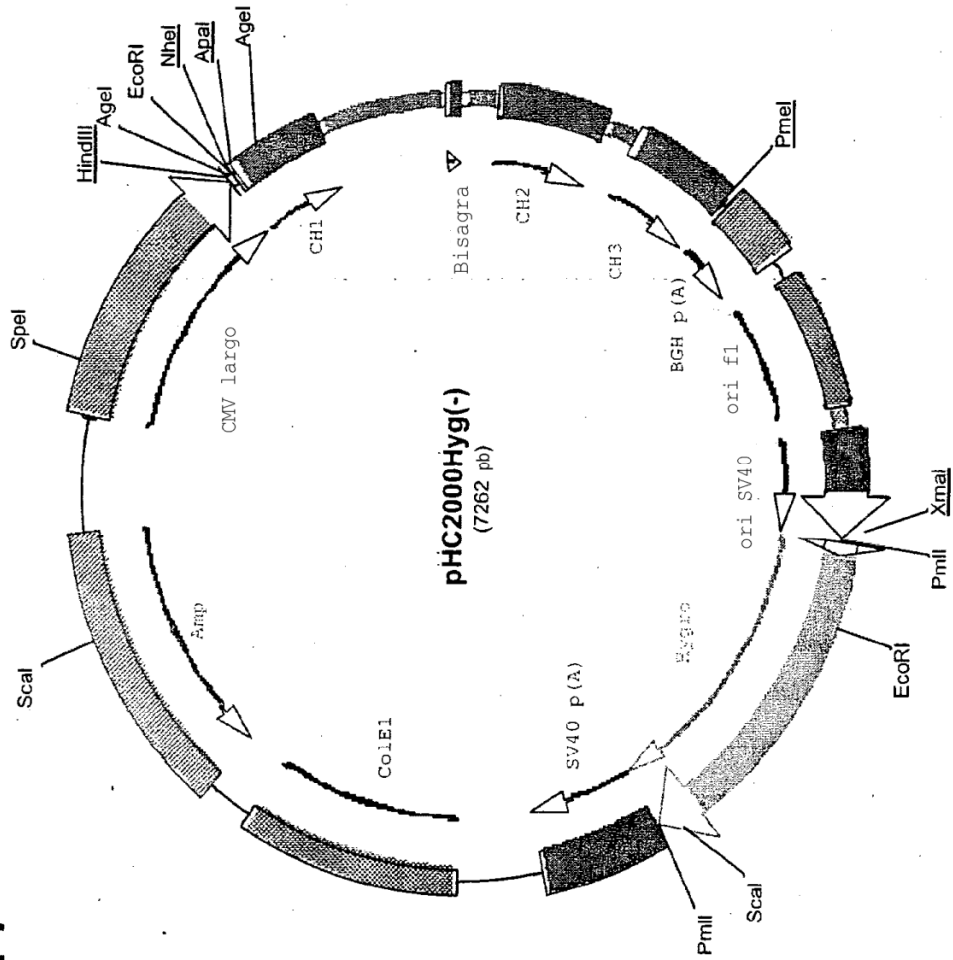


Fig. 6

Fig. 7



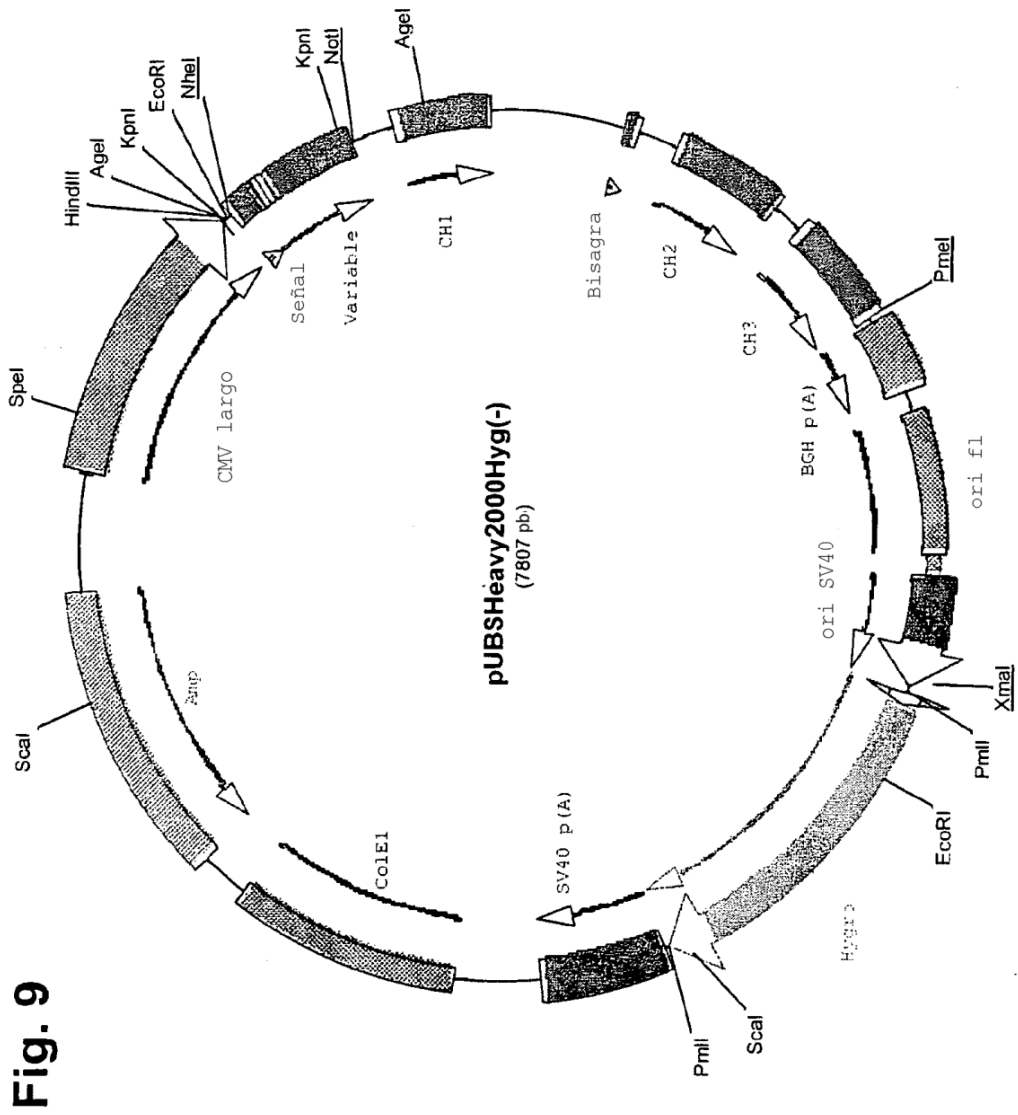


Fig. 9

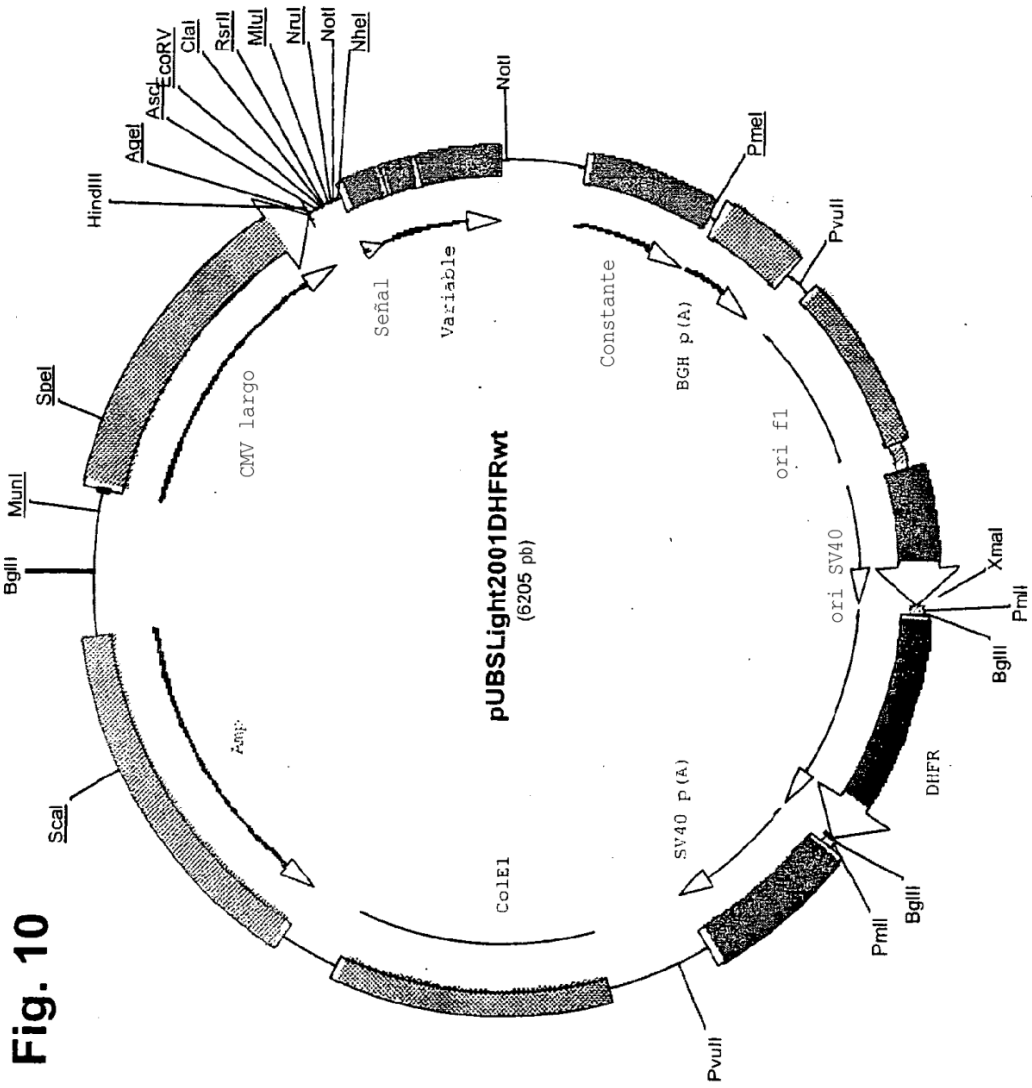


Fig. 10

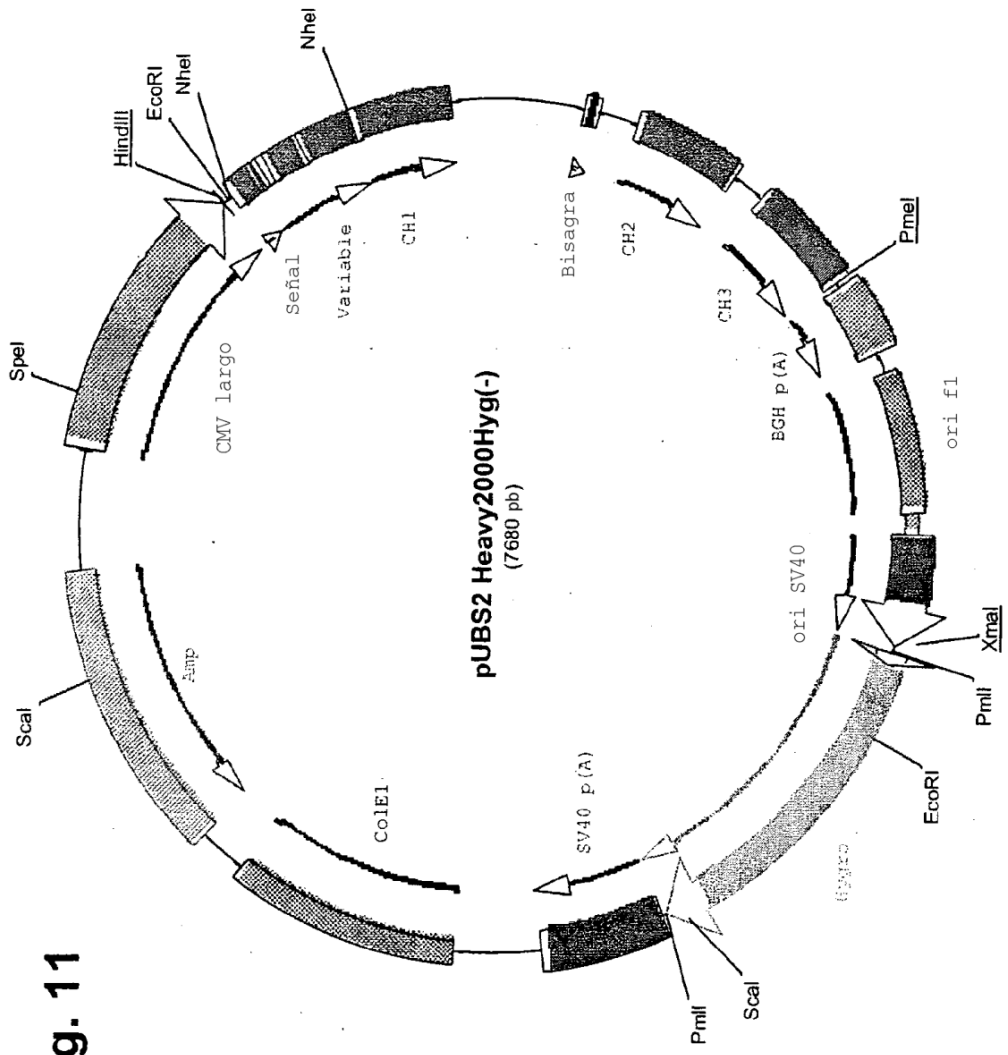
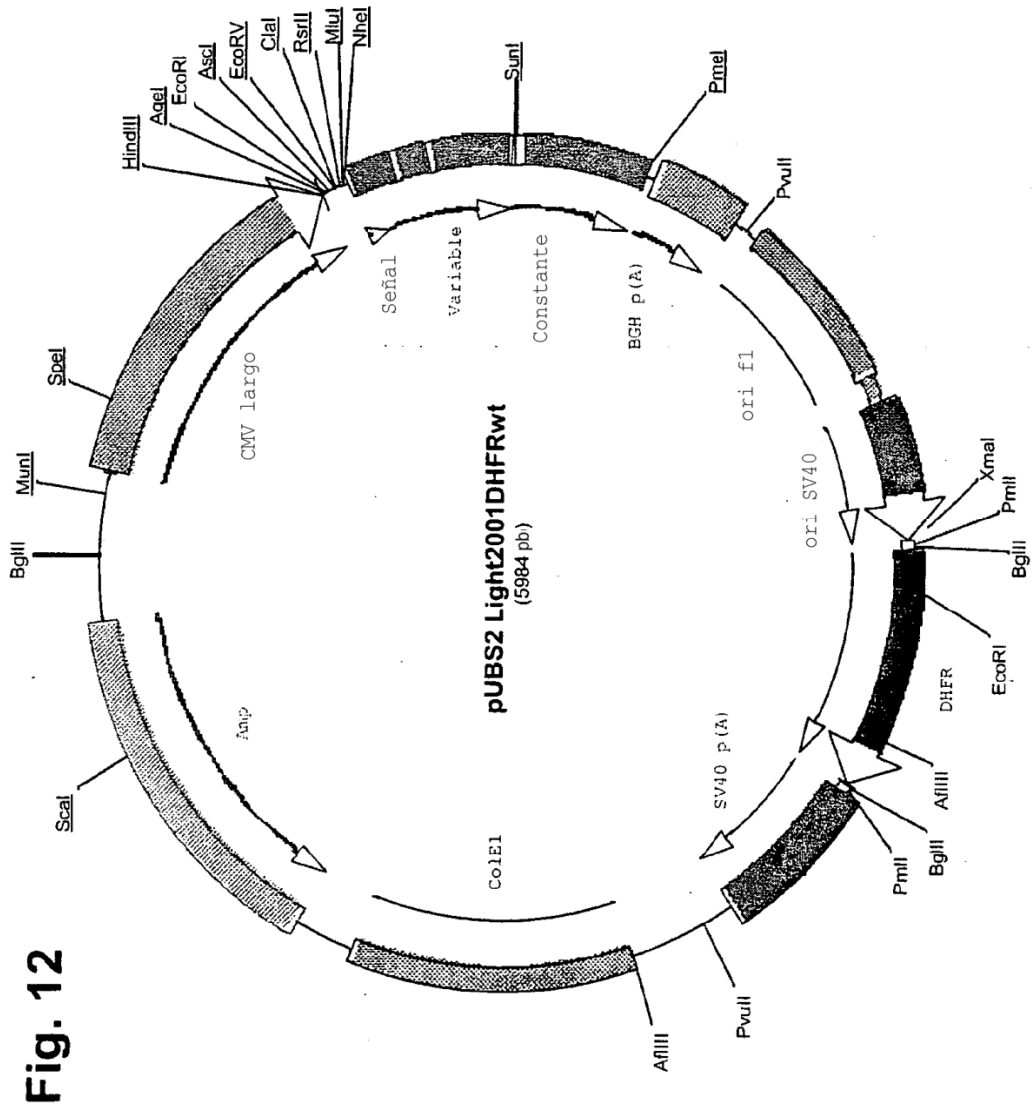


Fig. 11



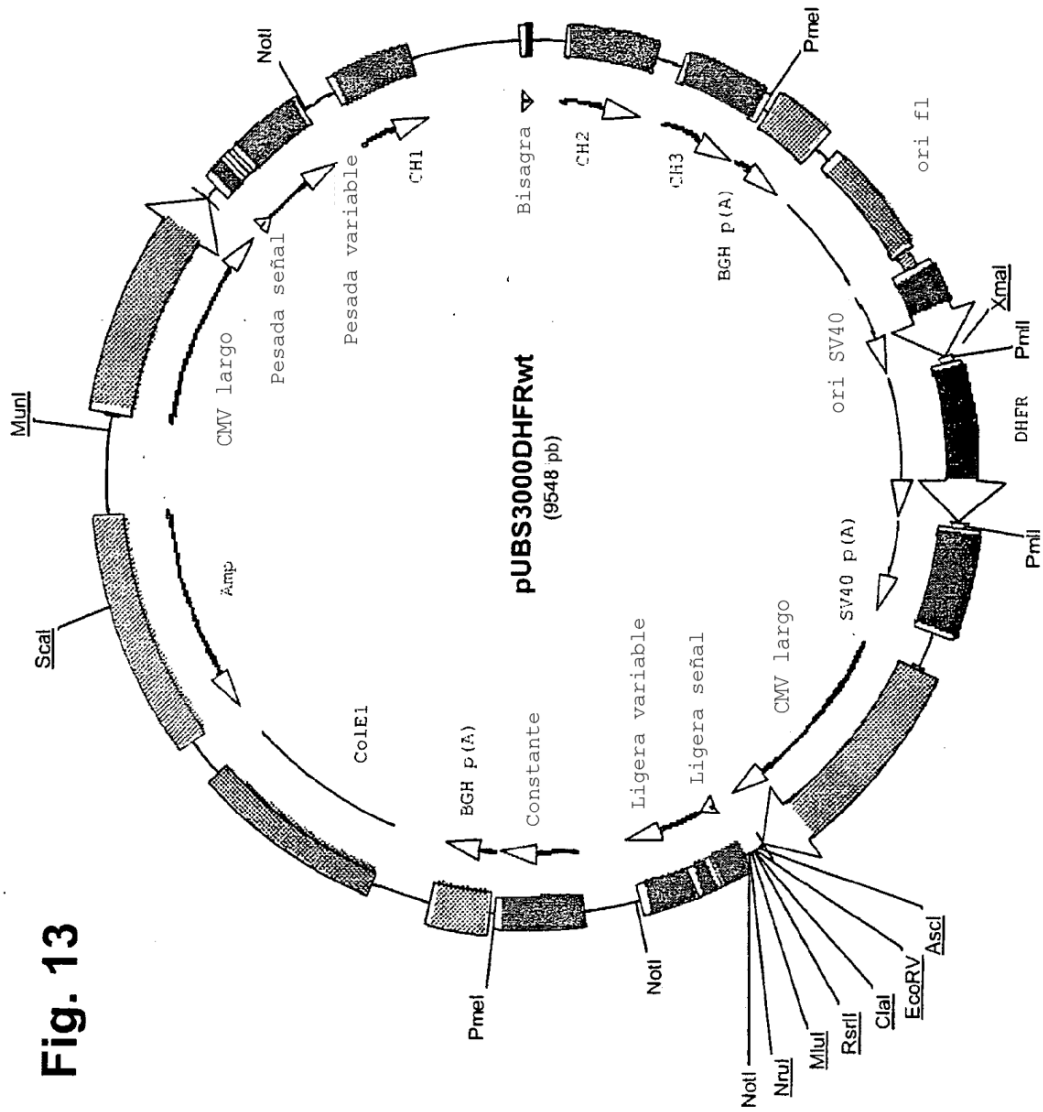


Fig. 13

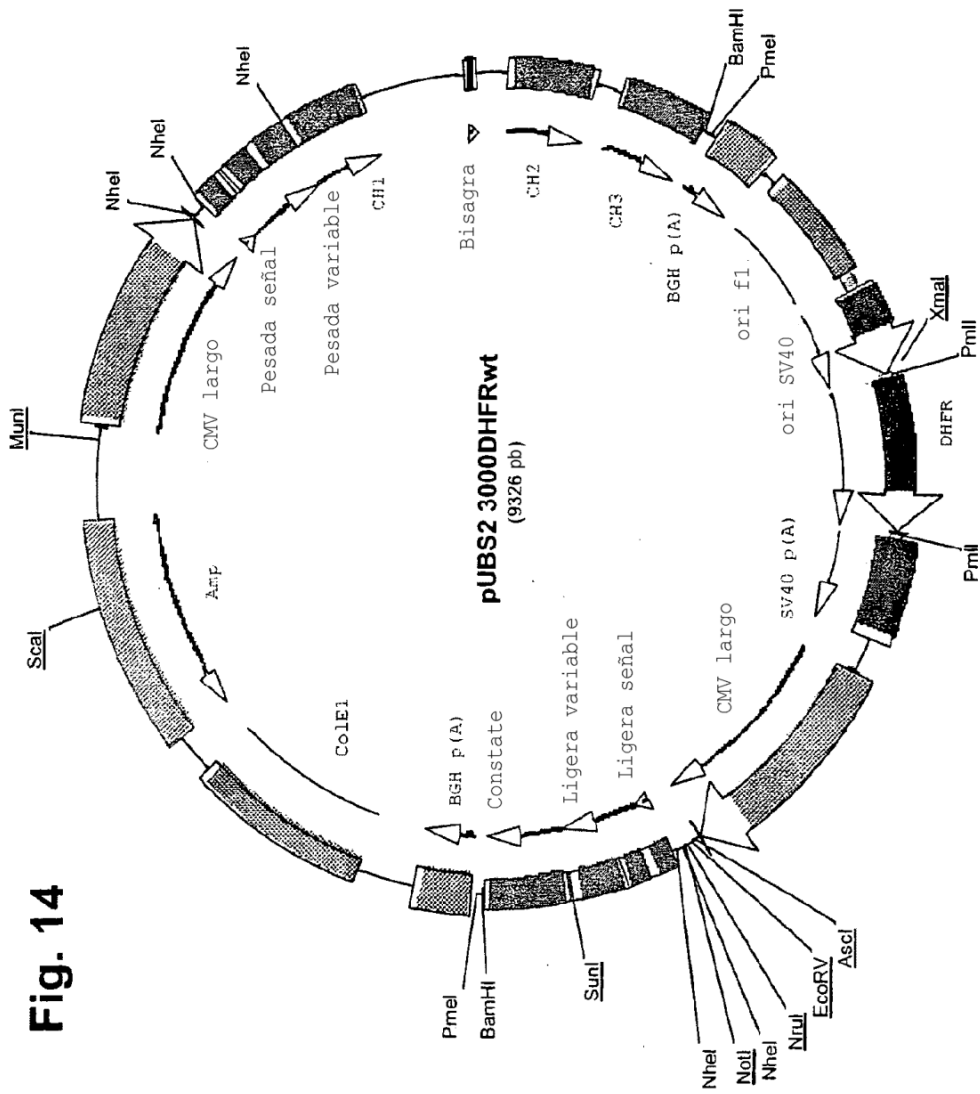


Fig. 15

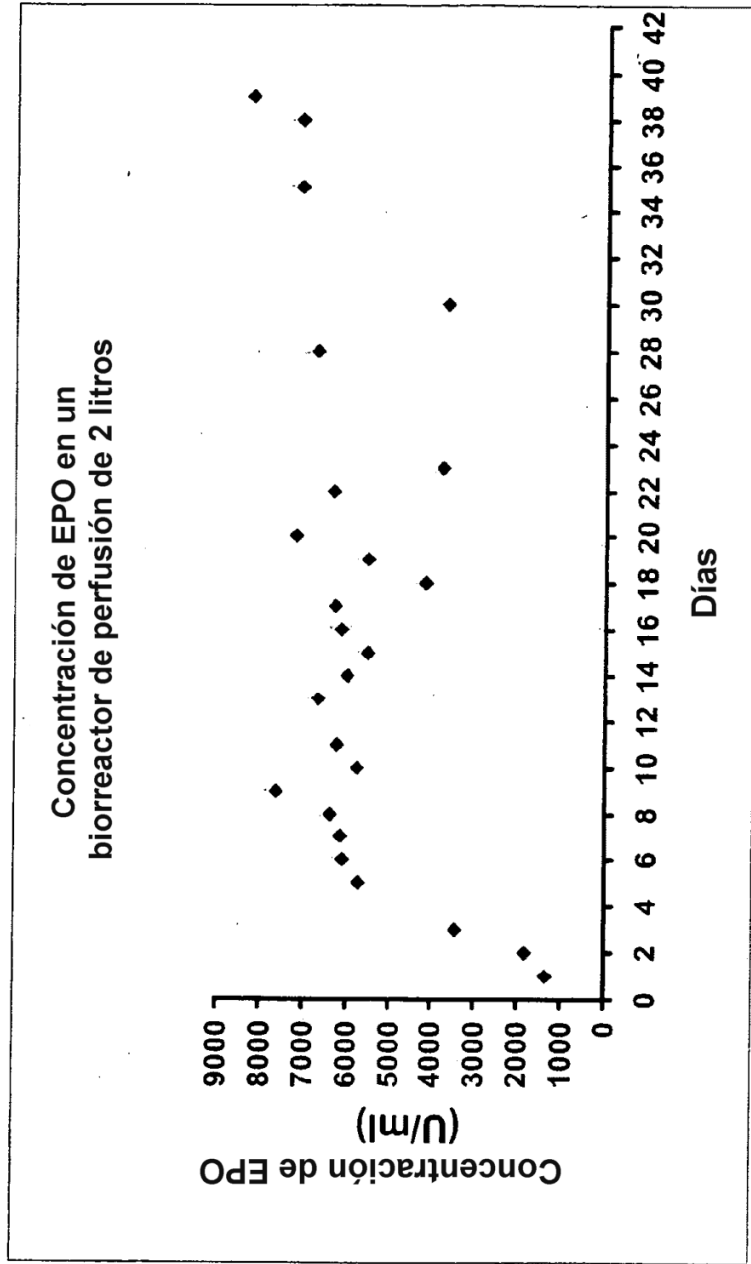


Fig. 16

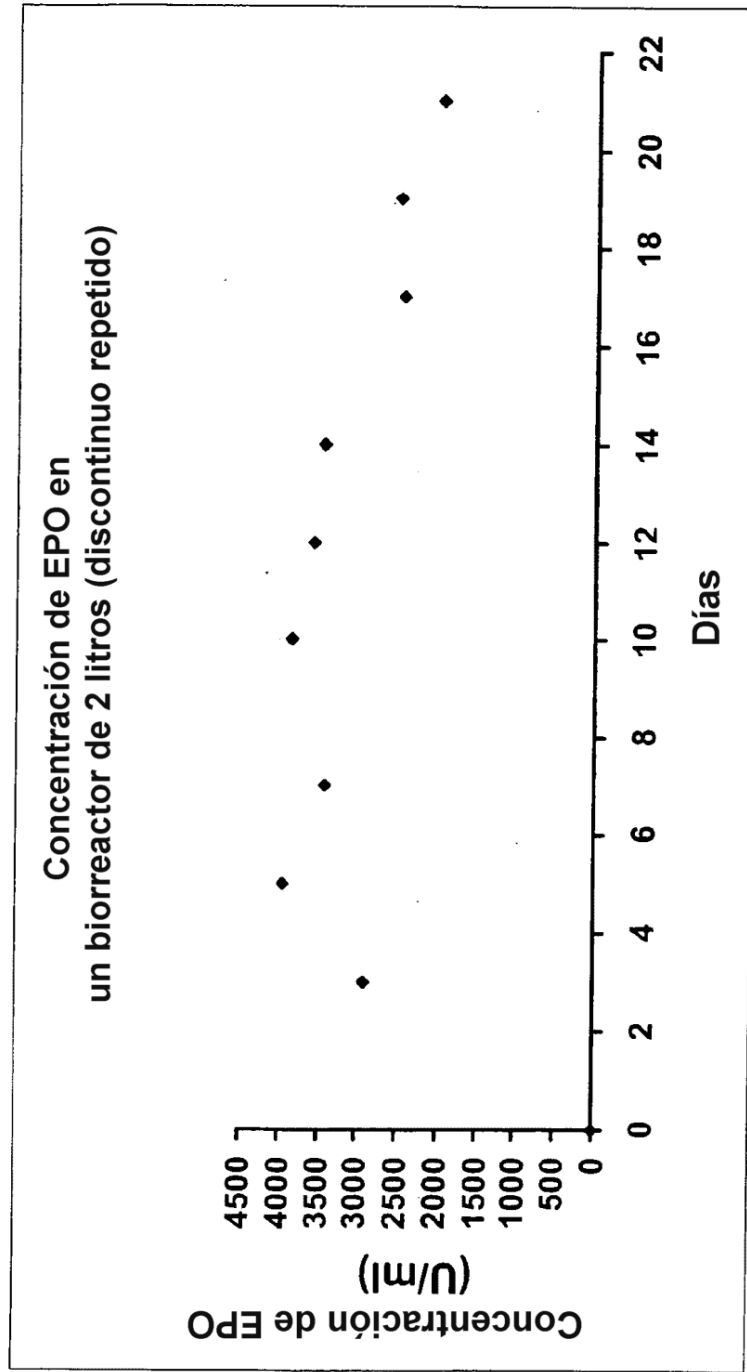


Fig. 17

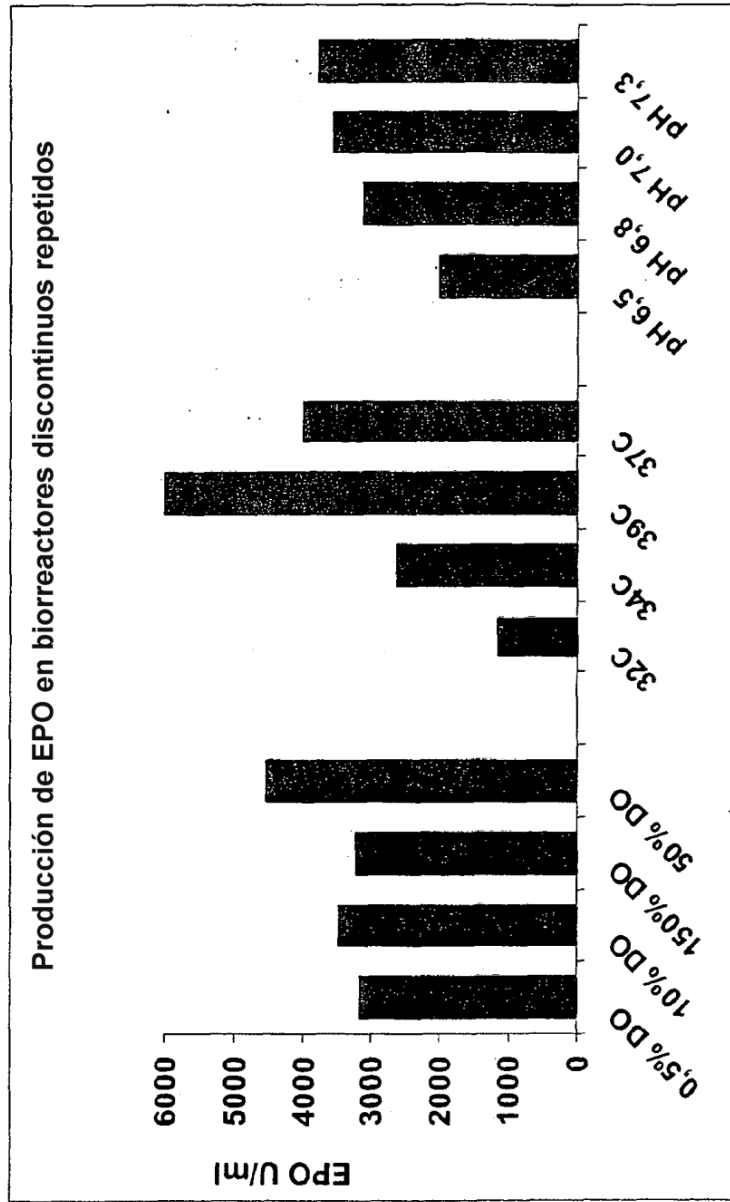


Fig. 18

Producción de EPO tras aumento de la concentración de MTX

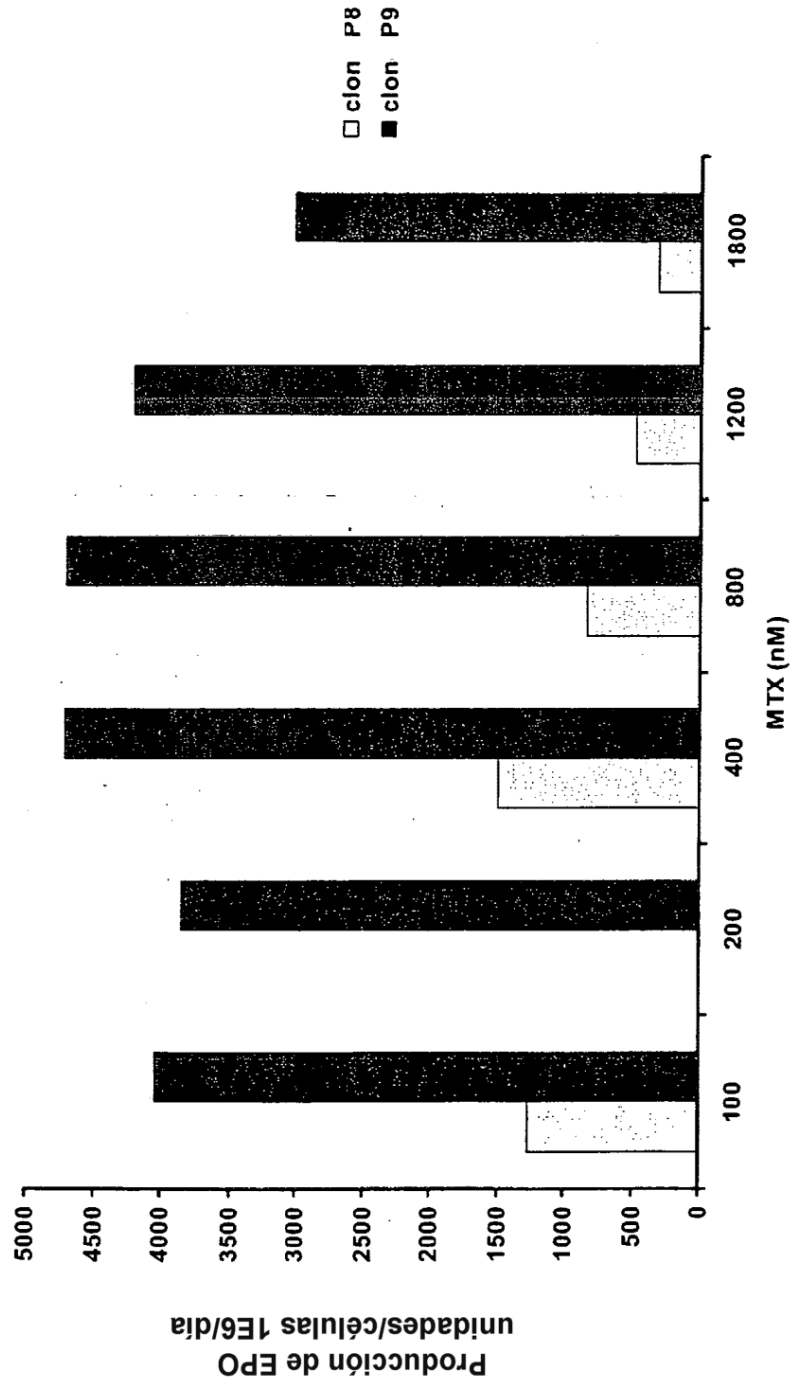


Fig. 19

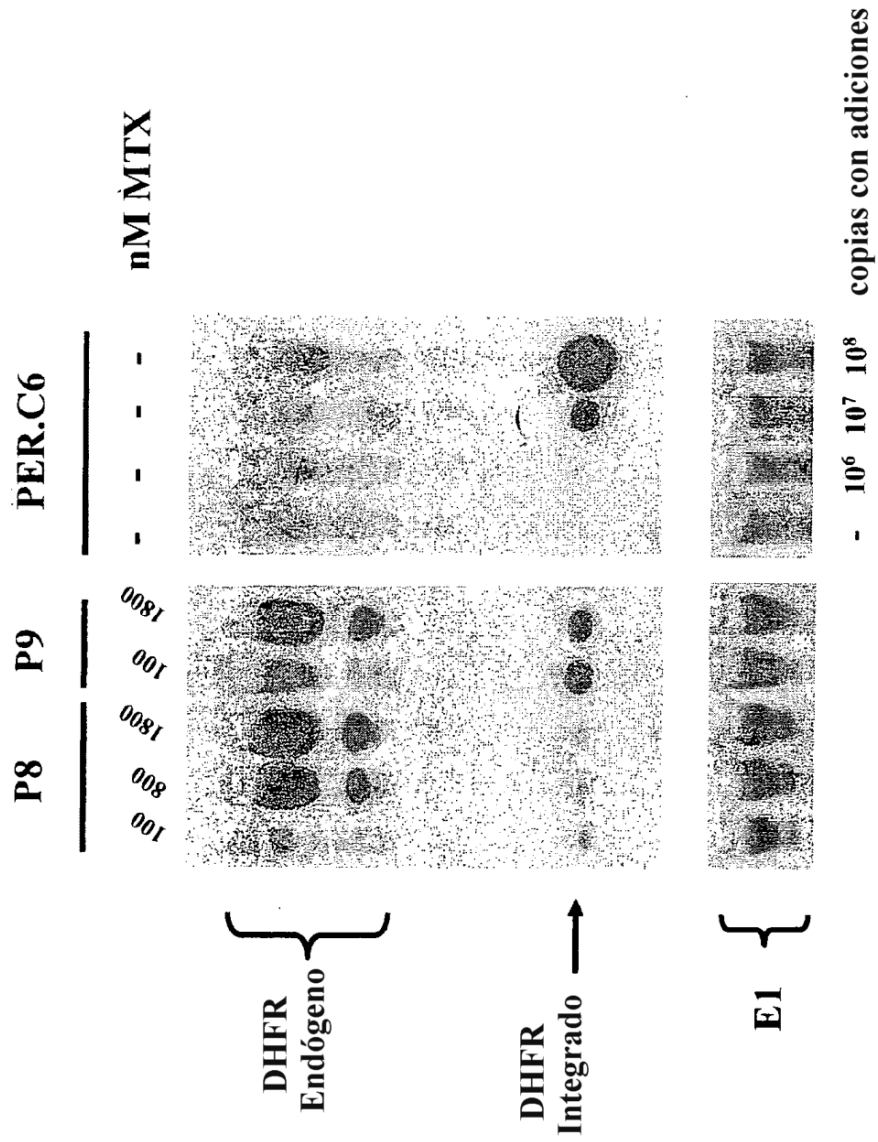


Fig. 20 A

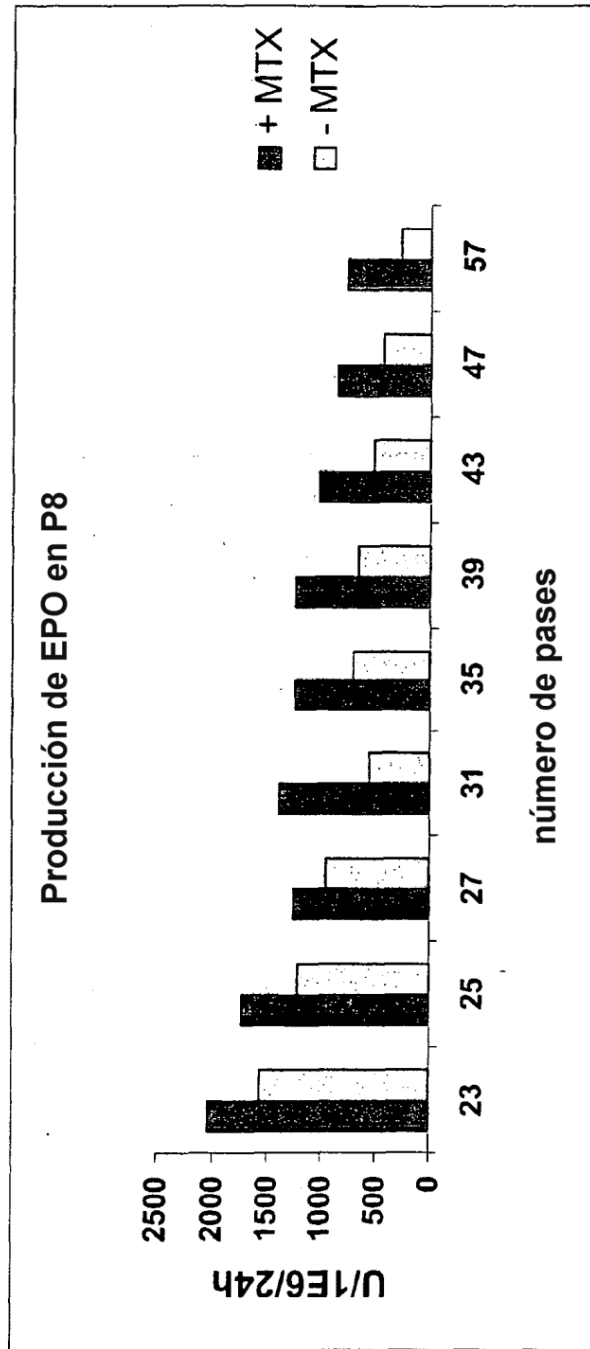


Fig. 20 B

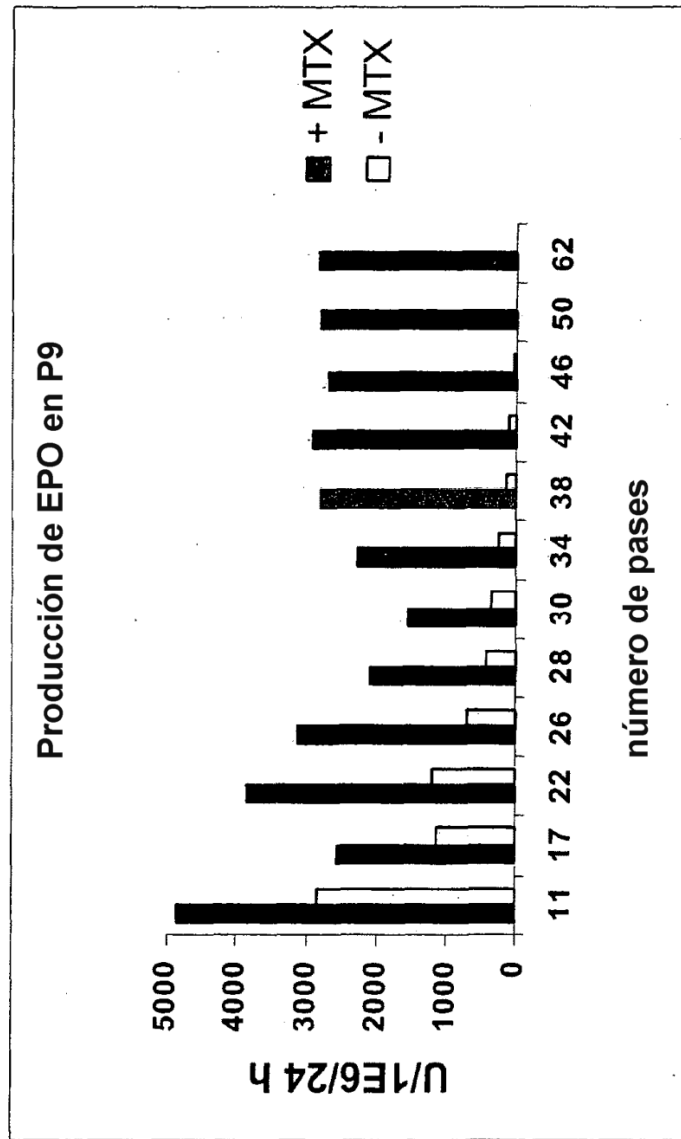


Fig. 21 A

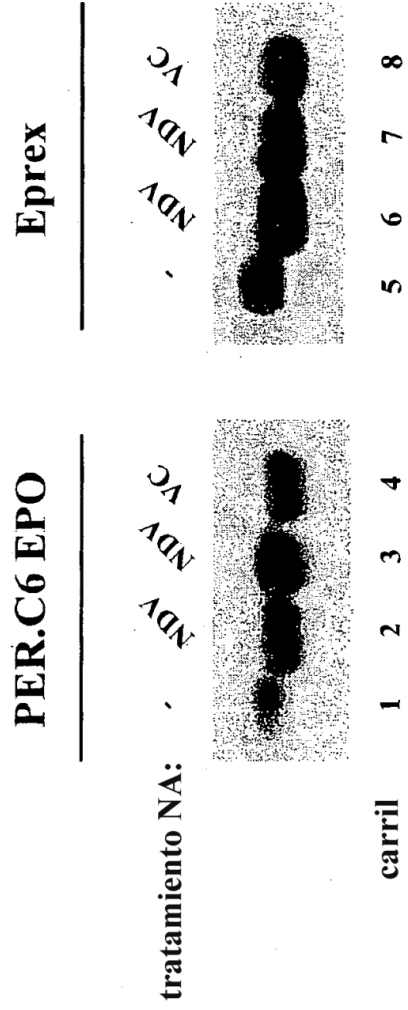
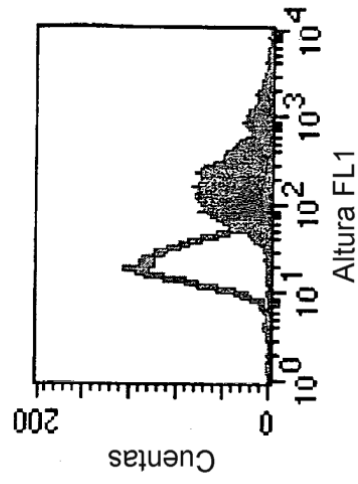
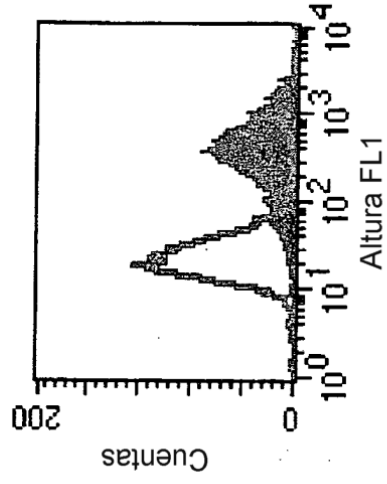
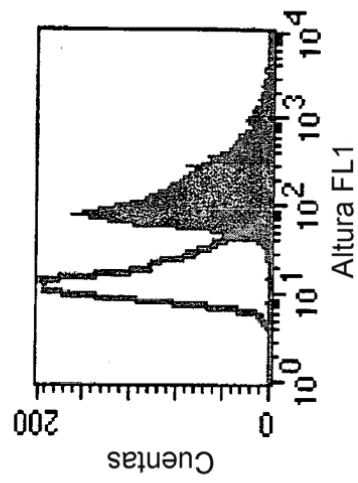
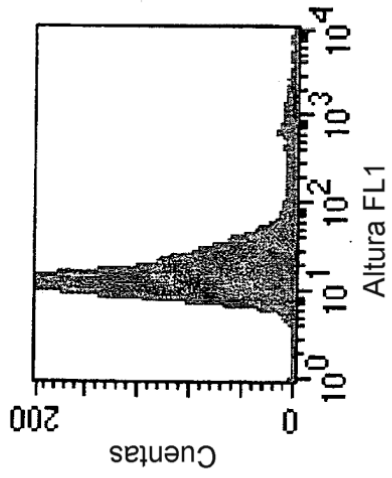


Fig. 21 B

PER.C6



CHO



Sia2-6Gal

Sia2-3Gal

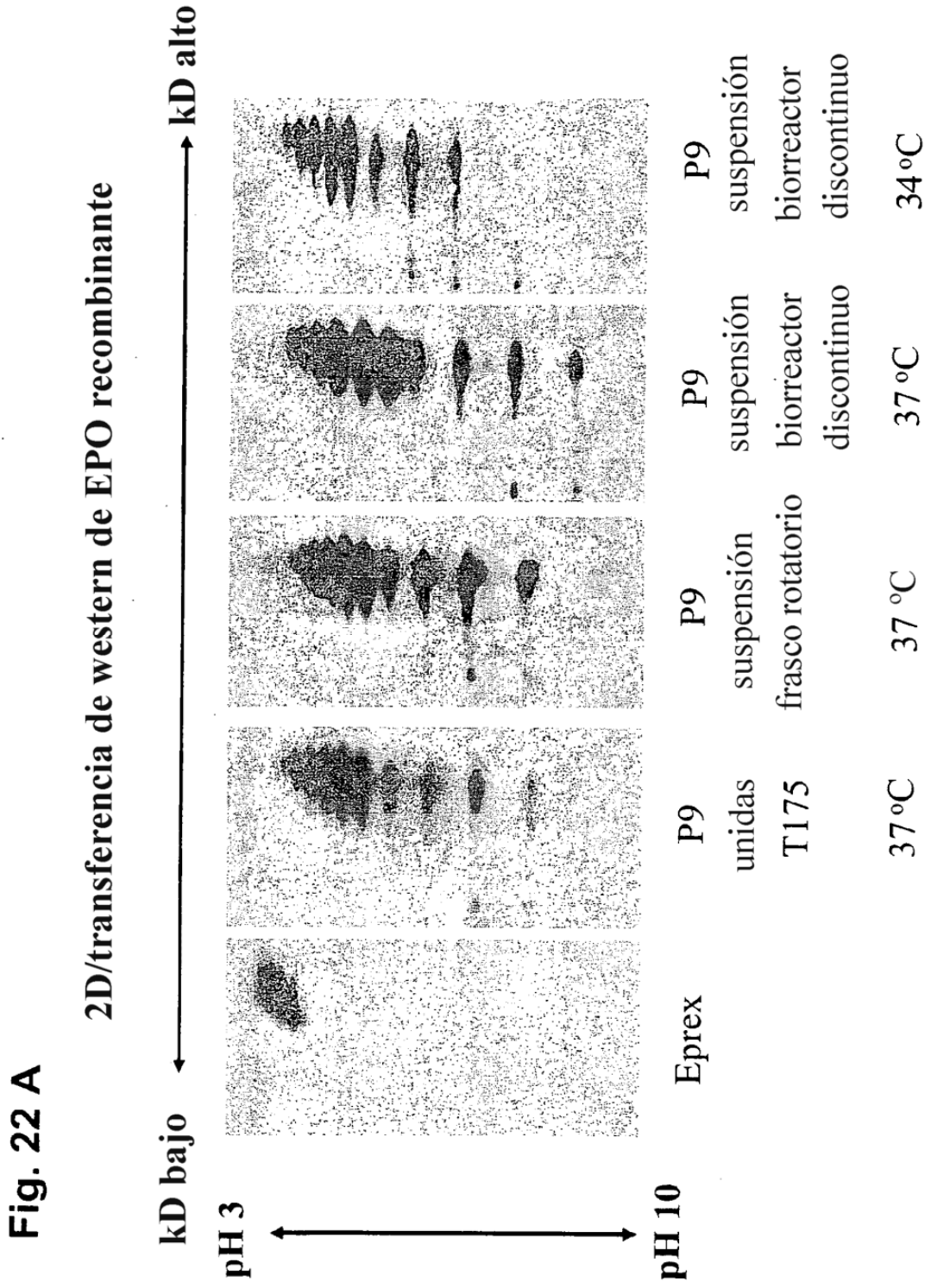
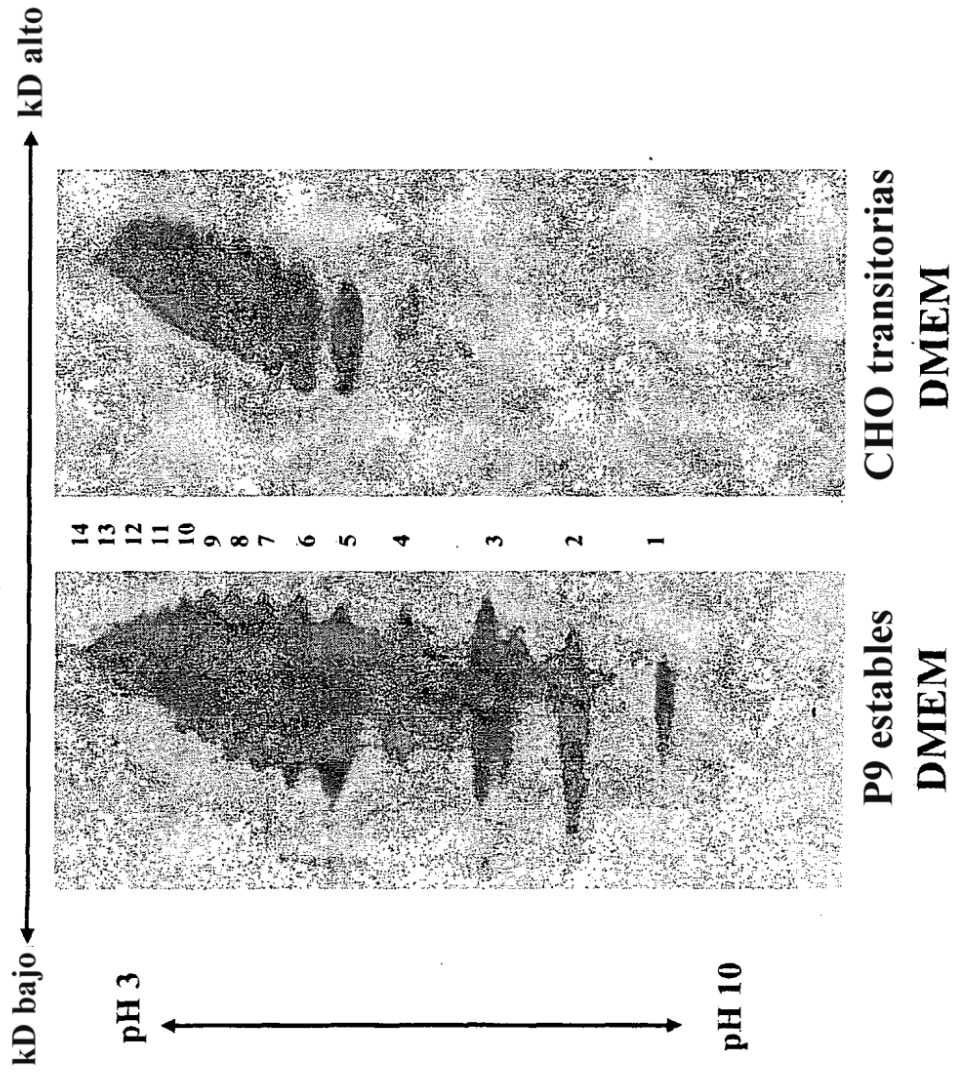


Fig. 22 B 2D/transferencia de western de EPO recombinante



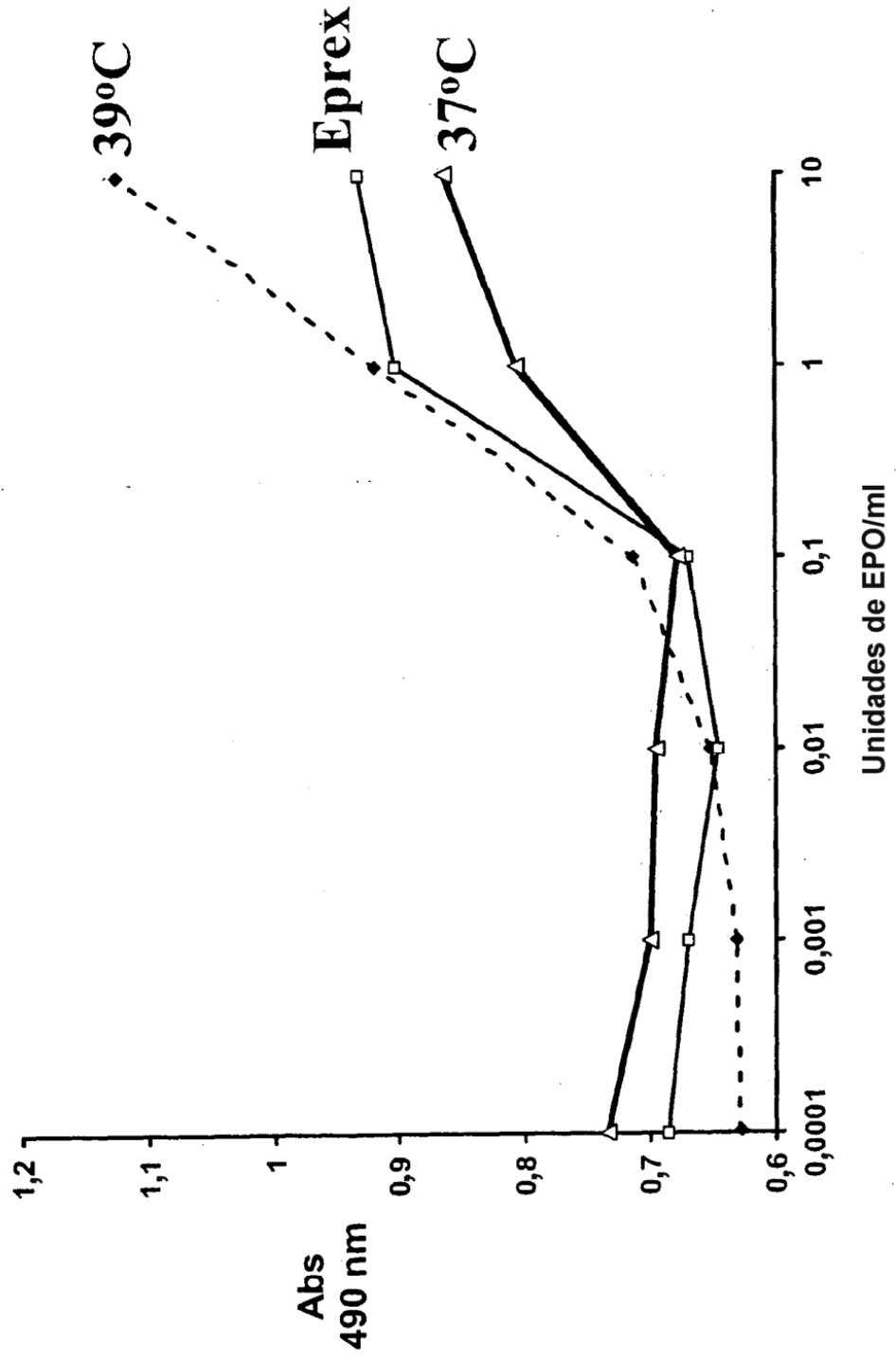


Fig. 23

Fig. 24

Transferencia de western de expresión transitoria de UBS-54 en PER.C6

