

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 410 559**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/08** (2006.01)

**C12N 15/85** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2008 E 08758976 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013 EP 2152728**

54 Título: **Vector de expresión de mamíferos con una secuencia señal secretora altamente eficaz**

30 Prioridad:

**04.06.2007 GB 0710614**

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

**02.07.2013**

73 Titular/es:

**LONZA BIOLOGICS PLC. (100.0%)  
228 BATH ROAD  
SLOUGH BERKSHIRE SL1 4DX, GB**

72 Inventor/es:

**YOUNG, ROBERT y  
RANCE, JAMES**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 410 559 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

Vector de expresión de mamíferos con una secuencia señal secretora altamente eficaz

5 La presente invención se refiere a sistemas de expresión a base de células de mamíferos y a la expresión y secreción de proteínas recombinantes usando péptidos señal secretores. La presente invención también se refiere a un casete de expresión útil para la secreción de un gen heterólogo a partir de una célula de mamífero, en particular una célula CHO. La presente invención también se refiere a métodos de secreción de una proteína heteróloga a partir de células de mamíferos tales como células CHO y a métodos para la producción de proteínas recombinantes secretadas en células huésped de mamíferos.

10 Se producen polipéptidos recombinantes para aplicaciones médicas, de investigación y veterinarias tales como anticuerpos usando una amplia variedad de organismos modificados por ingeniería genética que incluyen células procariotas y eucariotas. Sin embargo, muchas de estas proteínas son glicoproteínas que requieren modificaciones postraduccionales. Por tanto, células huésped procariotas tales como células bacterianas no son adecuadas. Por este motivo, se desarrollaron otros sistemas de expresión de proteínas usando las células de eucariotas superiores, por ejemplo células de insectos o células de mamíferos. Sistemas de expresión virales pueden producir proteínas recombinantes tanto en insectos como en líneas celulares de ratón pero padecen varias desventajas graves, en particular que la purificación de proteínas recombinantes a partir de sistemas infectados con virus es muy problemática.

15 Existe un problema importante en la biotecnología en la producción y recuperación de polipéptidos recombinantes que no se secretan fácilmente tales como proteínas intracelulares o subunidades proteicas, a partir de organismos modificados por ingeniería genética. A menudo, estas proteínas intracelulares o subunidades proteicas pueden expresarse a niveles sólo moderados dentro de una célula y su purificación debe incluir en primer lugar etapas para lisar las células, seguido por varios procedimientos para aislar los polipéptidos deseados de las otras proteínas intracelulares.

20 Un enfoque para solucionar estos problemas es hacer que las proteínas recombinantes se secreten al espacio periplásmico o medio de cultivo. Siempre que sea posible, la secreción es la estrategia preferida puesto que permite una purificación fácil y eficaz a partir del medio extracelular. Además, la producción secretora de proteínas recombinantes tiene la ventaja de que puede evitarse la degradación proteolítica y que hay una mejor posibilidad de corregir el plegamiento de las proteínas. La secreción de proteínas satisfactoria requiere una translocación eficaz de la proteína a través del retículo endoplasmático o la membrana plasmática. Las proteínas que se secretan a partir de una célula a través de una membrana celular se producen generalmente dentro de la célula en forma de un precursor, denominada "preproteína". Esta forma de "preproteína" incluye una secuencia peptídica adicional en el extremo amino terminal que se requiere para dirigir la cadena peptídica naciente al retículo endoplasmático para permitir su entrada en la ruta secretora. Esta secuencia peptídica adicional se denomina secuencia señal.

25 Sin embargo, se sabe que la secreción frecuentemente no funciona en el grado deseado, por ejemplo porque la secuencia señal nativa de la proteína recombinante a menudo no funciona bien en la célula huésped. Hasta la fecha, cada sistema de expresión necesita una adaptación específica para cumplir los requisitos de cada producto de proteína para garantizar un plegamiento, una actividad correctos y un rendimiento deseado. Aunque se han identificado muchas secuencias señal que podrían ser útiles para la secreción de proteínas recombinantes particulares, hay todavía una necesidad en la técnica de secuencias señal adicionales que puedan promover una secreción eficaz de proteínas recombinantes, en particular inmunoglobulinas, en células huésped de mamíferos.

30 Por tanto, el problema técnico que subyace a la presente invención es proporcionar un método para secretar eficazmente polipéptidos de secreción no competente, en particular cadenas de anticuerpos a partir de una célula huésped eucariota tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO).

35 La presente invención soluciona este problema técnico proporcionando un casete de expresión para la secreción de una proteína heteróloga a partir de una célula huésped de mamífero, en particular una célula CHO que comprende un promotor, funcionalmente unido a una secuencia de ADN que codifica para un péptido señal que está unido en marco a una secuencia de ADN que codifica para una proteína heteróloga, en el que la secuencia de ADN que codifica para el péptido señal se selecciona de SEQ ID No. 10 o una secuencia de ADN que codifica para una secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID No. 9.

40 Los inventores de la presente invención encontraron que las secuencias señal empleadas en los casetes de expresión proporcionan un procesamiento apropiado y una secreción eficaz de secuencias polipeptídicas operativamente unidas en células huésped de mamíferos. Como examen inicial, se han sometido a prueba diecinueve secuencias señal diferentes que se derivaban de diferentes proteínas secretadas de diferentes especies con respecto a las células CHO usadas de manera rutinaria para la producción de proteínas recombinantes mediante lo cual sólo 5 de las mismas dieron como resultado una secreción mejorada de los polipéptidos sometidos

a prueba. Por tanto, los experimentos demostraron que generalmente no puede predecirse si una secuencia señal de una especie será funcional en otra especie.

Una de las cinco secuencias señal, concretamente V19 (SEQ ID No. 9), dio como resultado líneas celulares con un aumento particularmente fuerte en la concentración de anticuerpos media con respecto a líneas celulares control.

5 Por tanto, la presente invención se refiere a un casete de expresión para la secreción de una proteína heteróloga a partir de una célula huésped de mamífero que comprende un promotor, funcionalmente unido a una secuencia de ADN que codifica para un péptido señal que está unido en marco a una secuencia de ADN que codifica para una proteína heteróloga, en el que la secuencia de ADN que codifica para el péptido señal se selecciona de SEQ ID No. 10 o una secuencia de ADN que codifica para una secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID No. 9

10 En el contexto de la presente invención, un "casete de expresión" está constituido por uno o más genes que van a expresarse y secuencias que controlan su expresión tales como una secuencia promotora/potenciadora, incluyendo cualquier combinación de elementos de control de la transcripción de actuación en cis. Las secuencias que controlan la expresión del gen, es decir, su transcripción y la traducción del producto de transcripción, se denominan comúnmente unidad reguladora. La mayoría de las partes de la unidad reguladora están ubicadas en el sentido de 5' de la secuencia codificante del gen heterólogo y están operativamente unidas a la misma. El casete de expresión puede contener también una región no traducida en 3' en el sentido de 3' que comprende un sitio de poliadenilación. La unidad reguladora de la invención o bien está unida directamente al gen que va a expresarse, es decir, unidad de transcripción, o bien está separada del mismo por ADN intermedio tal como por ejemplo por la región no traducida en 5' del gen heterólogo. Preferiblemente, el casete de expresión está flanqueado por uno o más sitios de restricción adecuados con el fin de permitir la inserción del casete de expresión en un vector y/o su escisión de un vector. Por tanto, el casete de expresión según la presente invención puede usarse para la construcción de un vector de expresión, en particular un vector de expresión de mamíferos.

25 En el contexto de la invención, los términos "secuencia codificante heteróloga", "secuencia génica heteróloga", "gen heterólogo", "gen recombinante" o "gen de interés" se usan de manera intercambiable. Estos términos se refieren a una secuencia de ADN que codifica para un producto de proteína recombinante o heteróloga que se busca para expresarse en la célula de mamífero y recogerse en una alta cantidad. El producto del gen puede ser una proteína o un polipéptido, pero también un péptido. La secuencia génica heteróloga no está presente de manera natural en la célula huésped y se deriva de un organismo de una especie diferente.

30 El producto del gen puede ser cualquier proteína de interés, por ejemplo una proteína terapéutica tal como una interleucina o una enzima o una subunidad de una proteína multimérica tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo. Preferiblemente, la proteína es un anticuerpo o un anticuerpo modificado por ingeniería genética o un fragmento del mismo, lo más preferiblemente es un anticuerpo de inmunoglobulina G (IgG).

35 Según la presente invención, los términos "péptido señal" o "secuencia señal" se usan de manera intercambiable y se refieren a un tramo continuo corto de residuos de aminoácido en el extremo amino terminal de proteínas secretadas y unidas a la membrana. El péptido señal dirige la proteína a la ruta secretora y se escinde de la cadena naciente una vez que se transloca a la membrana del retículo endoplasmático. El péptido señal consiste en tres regiones: una región polar amino-terminal (región N), en la que se observan frecuentemente residuos de aminoácido cargados positivamente, una región hidrófoba central (región H) de 7-8 residuos de aminoácido y una región carboxilo-terminal (región C) que incluye el sitio de escisión. La escisión del péptido señal de la proteína madura se produce en este sitio de escisión.

Un "promotor" se define como una secuencia de ADN reguladora ubicada generalmente en el sentido de 5' de un gen que media en el inicio de la transcripción dirigiendo la ARN polimerasa para que se una al ADN e iniciando la síntesis de ARN.

45 Los términos "funcionalmente unido" y "operativamente unido" se usan de manera intercambiable y se refieren a una relación funcional entre dos o más segmentos de ADN, en particular secuencias génicas que van a expresarse y aquellas secuencias que controlan su expresión. Por ejemplo, una secuencia promotora/potenciadora, incluyendo cualquier combinación de elementos de control de la transcripción de actuación en cis está operativamente unida a una secuencia codificante si estimula o modula la transcripción de la secuencia codificante en una célula huésped apropiada u otro sistema de expresión. Las secuencias reguladoras promotoras que están operativamente unidas a la secuencia génica transcrita son físicamente contiguas a la secuencia transcrita.

55 La presente invención también se refiere a un vector de expresión de mamíferos que comprende un promotor, funcionalmente unido a una secuencia de ADN que codifica para un péptido señal que está unido en marco a una secuencia de ADN que codifica para una proteína heteróloga, en el que la secuencia de ADN que codifica para el péptido señal se selecciona de SEQ ID No. 10 o una secuencia de ADN que codifica para una secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID No. 9.

Por tanto, la presente invención también se refiere a vectores de expresión de mamíferos que comprenden un casete de expresión para la secreción de una proteína heteróloga según la invención.

En el contexto de la presente invención, un "vector de expresión de mamíferos" es una molécula de ADN, preferiblemente aislada y purificada, que tras su transfección en una célula huésped de mamífero apropiada proporciona una expresión de alto nivel de un producto génico recombinante dentro de la célula huésped. Además de la secuencia de ADN que codifica para el producto génico recombinante o heterólogo, el vector de expresión comprende secuencias de ADN reguladoras que se requieren para una transcripción eficaz de la secuencia codificante de ADN para dar ARNm y para una traducción eficaz de los ARNm para dar proteínas en la línea celular huésped.

En una realización preferida de la invención, el vector de expresión de mamíferos comprende al menos dos unidades de transcripción separadas. Un vector de expresión con dos unidades de transcripción separadas se denomina también vector de gen doble. Un ejemplo del mismo es un vector en el que la primera unidad de transcripción codifica para la cadena pesada de un anticuerpo o un fragmento del mismo y la segunda unidad de transcripción codifica para la cadena ligera de un anticuerpo. Otro ejemplo es un vector de gen doble, en el que las dos unidades de transcripción codifican para dos subunidades diferentes de una proteína tal como una enzima. Sin embargo, también es posible que el vector de expresión de la invención comprenda más de dos unidades de transcripción separadas, por ejemplo tres, cuatro o incluso más unidades de transcripción separadas cada una de las cuales comprende una secuencia de nucleótidos diferente que codifica para una cadena polipeptídica diferente. Por tanto, un ejemplo es un vector con cuatro unidades de transcripción separadas, cada una de las cuales contiene una secuencia de nucleótidos diferente que codifica para una subunidad de una enzima que consiste en cuatro subunidades diferentes.

Preferiblemente, los vectores de expresión de mamíferos de la presente invención contienen además al menos un marcador expresable seleccionable en células animales. Puede usarse cualquier marcador de selección comúnmente empleado tal como timidina cinasa (tk), dihidrofolato reductasa (DHFR) o glutamina sintetasa (GS).

En una realización preferida particular, el vector de expresión de mamíferos contiene un marcador de selección de GS (Bebington *et al.*, 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; Cockett *et al.*, 1990, High level expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells using Glutamine synthetase gene amplification, *Bio/Technology* 8: 662-667). El sistema de GS es uno de sólo dos sistemas que son de importancia particular para la producción de proteínas terapéuticas. En comparación con el sistema de dihidrofolato reductasa (DHFR), el sistema de GS ofrece una ventaja temporal grande durante el desarrollo porque pueden crearse a menudo líneas celulares altamente productivas a partir del transfectante inicial evitando así la necesidad de múltiples rondas de selección en presencia de concentraciones crecientes de agente de selección con el fin de lograr amplificación génica (Brown *et al.*, 1992, Process development for the production of recombinant antibodies using the glutamine synthetase (GS) system, *Cytotechnology* 9: 231-236).

Preferiblemente, los vectores de expresión de la invención contienen también un número limitado de sitios de restricción útiles para la inserción del casete de expresión para la inserción de una proteína heteróloga de la presente invención. Cuando se usan en particular para expresión transitoria/episomal sólo, los vectores de expresión de la invención pueden comprender además un origen de replicación tal como el origen del virus de Epstein Barr (VEB) o virus SV40 para la replicación autónoma/mantenimiento episomal en células huésped eucariotas pero pueden carecer de un marcador seleccionable. También es posible la expresión transitoria en una célula que carece de factores relevantes para facilitar la replicación del vector.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una célula huésped de mamífero que contiene el vector de expresión de mamíferos según la invención. Los términos "célula huésped" o "línea celular huésped" se refieren a cualquier célula, en particular células de mamífero, que pueden crecer en cultivo y expresar un producto recombinante de proteína deseado.

La célula huésped de mamífero puede ser una célula humana o no humana. Los ejemplos preferidos de las células huésped de mamíferos incluyen, sin restringirse a, fibroblastos humanos MRC5, células de melanoma humano 983M, células de riñón canino MDCK, fibroblastos de pulmón de rata en cultivo RF aislados de ratas Sprague-Dawley, células de melanoma murino B16BL6, células de mastocitoma murino P815 y células de adenocarcinoma mamario murino MT1A2.

En una realización preferida particular, la célula huésped de mamífero es una célula o línea celular de ovario de hámster chino (CHO) (Puck *et al.*, 1958, *J. Exp. Med.* 108: 945-955). Las líneas celulares CHO adecuadas incluyen por ejemplo CHO K1 (ATCC CCL-61), CHO pro3-, CHO DG44, CHO P12 o la línea celular dhfr-CHO DUK-B11 (Chassin *et al.*, *PNAS* 77, 1980, 4216-4220) o DUXB11 (Simonsen *et al.*, *PNAS* 80, 1983, 2495-2499).

Para introducir el vector de expresión en una célula huésped de mamífero según la presente invención, puede emplearse cualquier técnica de transfección tal como las bien conocidas en la técnica, por ejemplo electroporación, coprecipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano, lipofección, si es apropiado para un tipo de célula huésped dado. Debe indicarse que la célula huésped de mamífero transfectada con el vector de la presente invención debe considerarse como una línea celular transfectada de manera transitoria o estable. Por tanto, según la presente invención, el presente vector de expresión de mamíferos puede mantenerse de manera episomal o puede integrarse de manera estable en el genoma de la célula huésped de mamífero.

Una transfección transitoria se caracteriza por la no aplicación de ninguna presión de selección para un marcador de selección portado por un vector. En experimentos de expresión transitoria que duran comúnmente 20-50 horas tras la transfección, los vectores transfectados se mantienen como elementos episomales y no se integran aún en el genoma. Es decir, el ADN transfectado no se integra habitualmente en el genoma de la célula huésped. Las células huésped tienden a perder el ADN transfectado y al sobrecrecimiento de las células transfectadas en la población tras el cultivo del conjunto de células transfectadas de manera transitoria. Por tanto, la expresión es máxima en el período inmediatamente tras la transfección y disminuye con el tiempo. Preferiblemente, un transfectante transitorio según la presente invención se entiende como una célula que se mantiene en cultivo celular en ausencia de presión de selección hasta un tiempo de 90 horas tras la transfección.

En una realización preferida de la invención, la célula huésped de mamífero, por ejemplo la célula huésped CHO, se transfecta de manera estable con el vector de expresión de mamíferos de la invención. Transfección estable significa que ADN foráneo recién introducido tal como ADN de vector está incorporándose en el ADN genómico, habitualmente mediante acontecimientos de recombinación al azar, no homóloga. El número de copias del ADN de vector y de manera concomitante la cantidad del producto génico pueden aumentarse seleccionando líneas celulares en las que las secuencias del vector se han amplificado tras su integración en el ADN de la célula huésped. Por tanto, es posible que tal integración estable dé lugar, tras la exposición a aumentos adicionales en la presión de selección para la amplificación génica, a cromosomas dobles minúsculos en células CHO. Además, una transfección estable puede dar como resultado la pérdida de partes de las secuencias del vector no relacionadas directamente con la expresión del producto génico recombinante, tales como por ejemplo regiones de control del número de copias bacteriano que se han vuelto superfluas tras la integración genómica. Por tanto, una célula huésped transfectada ha integrado al menos parte o diferentes partes del vector de expresión en el genoma.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de una proteína recombinante, que comprende las etapas de

a) transfectar una línea celular huésped o célula huésped de mamífero con un vector de expresión, b) cultivar la célula en condiciones apropiadas para permitir la propagación de la célula y la expresión de la proteína recombinante y la secreción de la proteína recombinante a partir de la célula huésped al medio y c) recoger la proteína recombinante secretada al medio.

Por tanto la presente invención también se refiere a un método para la producción de una proteína recombinante, que comprende a) transfectar una línea celular huésped o célula huésped de mamífero con un vector de expresión, b) cultivar la célula en condiciones apropiadas para permitir la propagación de la célula y la expresión de la proteína recombinante y la secreción de la proteína recombinante a partir de la célula huésped al medio y c) recoger la proteína recombinante producida del medio.

Se conocen bien en la técnica métodos de cultivo y medios adecuados para líneas de celulares de mamíferos, tal como se describe en el documento US 5.633.162 por ejemplo. Los ejemplos de medios de cultivo celular convencionales para cultivo celular de baja densidad o en frascos de laboratorio y que se adaptan a las necesidades de tipos celulares particulares incluyen, sin restringirse a, medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Morre, G., *The Journal of the American Medical Association*, 199, p. 519 y siguiente, 1967), medio L-15 (Leibovitz, A. *et al.*, *Amer. J. of Hygiene*, 78, 1p. 173 y siguientes, 1963), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo de Eagle (MEM), medio F12 de Ham (Ham, R. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sc.*53, p. 288 y siguientes, 1965) o DMEM modificado por Iscoves que carece de albúmina, transferrina y lecitina (Iscoves *et al.*, *J. Exp. med.* 1, p. 923 y siguientes, 1978). Por ejemplo, los medios F10 o F12 de Ham se diseñaron especialmente para cultivo de células CHO. Otros medios especialmente adaptados al cultivo de células CHO se describen en el documento EP-481 791. Se sabe que tales medios de cultivo pueden complementarse con suero bovino fetal (FBS, también denominado suero de ternero fetal FCS), proporcionando esto último una fuente natural de una plétora de hormonas y factores de crecimiento. El cultivo celular de células de mamíferos es actualmente una operación de rutina bien descrita en manuales y libros de texto científicos, se cubre en detalle por ejemplo en R. Ian Fresney, *Culture of Animal cells, a manual*, 4ª edición, Wiley-Liss/N.Y., 2000.

En una realización preferida de la presente invención, el medio de cultivo celular usado carece de suero de ternero fetal (FCS o FBS), denominándose entonces "libre de suero". Las células en medio libre de suero requieren generalmente insulina y transferrina en un medio libre de suero para lograr un crecimiento óptimo. La transferrina puede sustituirse al menos parcialmente por agentes quelantes no peptídicos o sideróforos tales como tropolona tal

como se describe en el documento WO 94/02592 o niveles aumentados de una fuente de hierro orgánico de manera favorable conjuntamente con antioxidantes tales como vitamina C. La mayoría de las líneas celulares requieren uno o más factores de crecimiento sintéticos (que comprenden polipéptidos recombinantes), incluyendo por ejemplo factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento I y II similares a la insulina (IGFI, IGFII), etc. Otras clases de factores que pueden ser necesarios incluyen: prostaglandinas, proteínas de transporte y unión (por ejemplo ceruloplasmina, lipoproteínas de alta y baja densidad, albúmina sérica bovina (BSA)), hormonas, incluyendo hormonas esteroideas, y ácidos grasos. Las pruebas de factores polipeptídicos se realizan de la mejor manera de un modo gradual sometiendo a prueba nuevos factores polipeptídicos en presencia de los que se encuentra que son estimuladores del crecimiento. Esos factores de crecimiento son sintéticos o recombinantes. Hay varios enfoques metodológicos bien conocidos en cultivo de células animales, describiéndose a modo de ejemplo a continuación. La etapa inicial es obtener condiciones en las que las células sobrevivirán y/o crecerán lentamente durante 3-6 días tras su transferencia desde medio de cultivo complementado con suero. En la mayoría de los tipos de células, esto es al menos en parte una función de la densidad de inóculo. Una vez que se encuentra el complemento óptimo de hormonas/factores de crecimiento/polipéptidos, disminuirá la densidad de inóculo requerida para la supervivencia.

En otra realización preferida, el medio de cultivo celular está libre de proteínas, es decir, libre tanto de suero fetal como de complementos de factores de crecimiento de proteína individuales u otras proteínas tales como transferrina recombinante.

En otra realización, el procedimiento de la presente invención dirigido a la expresión y recogida de proteína de producto recombinante incluye un crecimiento a alta densidad de las células huésped animales por ejemplo en un biorreactor de alimentación discontinua industrial. Entonces puede aplicarse procesamiento posterior convencional. En consecuencia, tiene que emplearse un medio de cultivo de crecimiento a alta densidad. Tales medios de crecimiento a alta densidad pueden complementarse habitualmente con nutrientes tales como todos los aminoácidos, fuentes de energía tales como glucosa en el intervalo facilitado anteriormente, sales inorgánicas, vitaminas, oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar), tampones, los cuatro nucleósidos o sus correspondientes nucleótidos, antioxidantes tales como glutatión (reducido), vitamina C y otros componentes tales como lípidos de membrana importantes, por ejemplo colesterol o fosfatidilcolina o precursores lipídicos, por ejemplo colina o inositol. Un medio de alta densidad se enriquecerá con la mayoría de o todos estos compuestos y, excepto por las sales inorgánicas basándose en las cuales se regula la osmolaridad del medio esencialmente isotónico, los comprenderá en cantidades superiores (fortificado) que los medios convencionales mencionados anteriormente tal como puede deducirse del documento GB2251 249 en comparación con RPMI 1640. Preferiblemente, un medio de cultivo de alta densidad según la presente invención está fortificado porque todos los aminoácidos excepto triptófano están en un exceso de 75 mg/l de medio de cultivo. Preferiblemente, conjuntamente con el requisito de aminoácidos general, la glutamina y/o asparagina están en un exceso de 1 g/l, más preferiblemente de 2 g/l de medio de cultivo de alta densidad. En el contexto de la presente invención, el cultivo celular de alta densidad se define como una población de células animales que tienen temporalmente una densidad de células viables de al menos o en exceso de  $10^5$  células/ml, preferiblemente de al menos o en exceso de  $10^6$  células/ml, y población que se ha hecho crecer de manera continua a partir de una única célula o inóculo de densidad de células viable inferior en un medio de cultivo celular en un volumen de cultivo constante o creciente.

En una realización preferida adicional, el procedimiento de la presente invención incluye un cultivo de alimentación discontinua. Un cultivo de alimentación discontinua es un sistema de cultivo en el que al menos glutamina, opcionalmente con uno o varios otros aminoácidos, preferiblemente glicina, se alimenta al medio de cultivo tal como se describe en el documento GB2251249 para mantener su concentración en el medio, aparte de controlar la concentración de glucosa mediante alimentación separada. Más preferiblemente, la alimentación de glutamina y opcionalmente uno o varios otros aminoácidos se combina con la alimentación de una o más fuentes de energía tales como glucosa al cultivo celular tal como se describe en el documento EP-229 809-A. La alimentación se inicia habitualmente a las 25-60 horas tras el comienzo del cultivo; por ejemplo, es útil comenzar la alimentación cuando las células han alcanzado una densidad de aproximadamente  $10^6$  células/ml. Se sabe bien en la técnica que, en células animales en cultivo, la "glutaminólisis" (McKeehan *et al.*, 1984, *Glutaminolysis in animal cells*, en: *Carbohydrate Metabolism in Cultured Cells*, ed. M.J. Morgan, Plenum Press, Nueva York, págs. 11-150) puede convertirse en una fuente importante de energía durante la fase de crecimiento. La alimentación de glutamina y/o asparagina total (para la sustitución de glutamina por asparagina, véase Kurano, N. *et al.*, 1990, *J. Biotechnology* 15, 113-128) está habitualmente en el intervalo de desde 0,5 hasta 10 g por 1, preferiblemente desde 1 hasta 2 g por 1 volumen de cultivo; otros aminoácidos que pueden estar presentes en la alimentación están desde 10 hasta 300 mg de alimentación total por litro de cultivo, en particular glicina, lisina, arginina, valina, isoleucina y leucina se alimentan habitualmente a cantidades superiores de al menos 150 a 200 mg en comparación con los otros aminoácidos. La alimentación puede añadirse como alimentación de una sola vez o como una alimentación bombeada de manera continua, preferiblemente la alimentación se bombea de manera casi continua al interior del biorreactor. Es evidente que el pH se controla cuidadosamente durante el cultivo de alimentación discontinua en un biorreactor a un pH aproximadamente fisiológico óptimo para una línea celular dada mediante la adición de una base o tampón. Cuando se usa glucosa como fuente de energía, la alimentación de glucosa total es habitualmente de desde 1 hasta 10,

preferiblemente desde 3 hasta 6 gramos por litro del cultivo. Aparte de la inclusión de aminoácidos, la alimentación comprende preferiblemente una baja cantidad de colina en el intervalo de 5 a 20 mg por litro de cultivo. Más preferiblemente, tal alimentación de colina se combina con la complementación de etanolamina esencialmente tal como se describe en el documento US 6.048.728, en particular en combinación con alimentación de glutamina. Es evidente que tras el uso del sistema de marcador de GS, se requerirán cantidades inferiores de glutamina en comparación con un sistema de expresión sin GS puesto que la acumulación de glutamina excesiva además de la producida de manera endógena daría lugar a la producción de amoníaco y la toxicidad concomitante. Para GS, la glutamina en el medio o la alimentación se sustituye en general por sus equivalentes y/o precursores, es decir, asparagina y/o glutamato.

Se conocen bien en la técnica métodos para recoger, es decir, aislar y/o purificar una proteína dada del medio en el que se han cultivado las células.

Se ilustran realizaciones preferidas de la invención en las figuras. Lo que se muestra es:

La figura 1 muestra la influencia de diferentes secuencias señal sobre la concentración de anticuerpo secretado cuando se usan en transfecciones transitorias de células CHOK1SV. Concentraciones de anticuerpo logradas mediante la transfección transitoria de células CHOK1SV usando vectores que emplean las secuencias señal variantes. n=6.

La figura 2 muestra la influencia de diferentes secuencias señal sobre la concentración de anticuerpo secretado cuando se usan en líneas celulares estables en cultivo estático. Los gráficos de cajas muestran el intervalo de concentraciones de anticuerpo logradas mediante transfección estable de células CHOK1SV usando vectores que emplean las secuencias señal variantes. Se dejó que líneas celulares de GS sobrecrecieran durante 14 días en placas de 24 pocillos momento en el que se determinó la concentración de anticuerpo mediante HPLC de proteína A. Se muestran las concentraciones de anticuerpo medias y las que muestran un aumento estadísticamente significativo en la concentración de anticuerpo media ( $p \leq 0,05$  calculado mediante ANOVA) se indican con un \*. n=100.

La figura 3 muestra la influencia de la secuencia señal V19 sobre la concentración de anticuerpo secretado cuando se usa en una línea celular estable en cultivo en suspensión. Los gráficos de cajas muestran el intervalo de concentraciones de anticuerpo logradas mediante transfección estable de células CHOK1SV usando vectores que emplean las secuencias señal o bien control o bien V19. Se generaron líneas celulares GS estables y se evaluaron las 60 superiores en un procedimiento de alimentación discontinua diseñado para imitar biorreactores a escala de laboratorio. Se determinó la concentración de anticuerpo mediante HPLC de proteína A. Se muestran las concentraciones de anticuerpo medias, valor de p calculado mediante ANOVA. n=60.

La figura 4 muestra la influencia de la secuencia señal V19 sobre la concentración de anticuerpo secretado cuando se cultivó una línea celular estable en un biorreactor de 10 l. Los gráficos de cajas muestran el intervalo de concentraciones de anticuerpo logradas en biorreactores a escala de laboratorio de 10 l usando líneas celulares estables generadas usando vectores que emplean las secuencias señal o bien control o bien V19. Se generaron líneas celulares GS estables y se evaluaron las 8 superiores en un procedimiento de alimentación discontinua. Se determinó la concentración de anticuerpo mediante HPLC de proteína A. Se muestran las concentraciones de anticuerpo medias. n=8.

La lista de secuencias muestra:

SEQ ID No. 1 muestra la secuencia de aminoácidos del péptido señal usado en el constructo pV12. Este péptido señal se derivaba de una proteína relacionada con la mosca de la arena amarilla y es tal como sigue: mrffvflaivlfqgihg. El péptido señal de SEQ ID No. 1 también se denomina péptido señal V12.

SEQ ID No. 2 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos del péptido señal representado en SEQ ID No. 2 y es tal como sigue: 5'-atgagattctttctgtctctggccatcgtcgtctccaggcatccaccg-3'.

SEQ ID No. 3 muestra la secuencia de aminoácidos del péptido señal usado en el constructo pV14. Este péptido señal se derivaba de fibroína LC del gusano de seda y es tal como sigue: mkpifvlvvttsaya. El péptido señal de SEQ ID No. 3 también se denomina péptido señal V14.

SEQ ID No. 4 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos del péptido señal representado en SEQ ID No. 3 y es tal como sigue: 5'-atgaagcccatcttctgtcgtcgtgctgaccagcgcctacgcc-3'.

SEQ ID No. 5 muestra la secuencia de aminoácidos del péptido señal usando en el constructo pV16. Este péptido señal se derivaba de PLA2 de serpiente y es tal como sigue: mrtlwimavlllgveg. El péptido señal de SEQ ID No. 5 también se denomina péptido señal V16.

SEQ ID No. 6 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos del péptido señal representado en SEQ ID No. 5 y es tal como sigue: 5'-atgaggacctgtgatcatggccgtgctgctgctggcgctggaggccaggtg-3'.

5 SEQ ID No. 7 muestra la secuencia de aminoácidos del péptido señal usado en el constructo pV17. Este péptido señal se derivaba de luciferasa de *Cypridina Noctiluca* y es mktllilavalvycatvhc. El péptido señal de SEQ ID No. 7 también se denomina péptido señal V17.

SEQ ID No. 8 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos del péptido señal representado en SEQ ID No. 7 y es tal como sigue: 5'-atgaaaacctgatcctggcctggccctggtgtactgcgccaccgtgcactgc-3'.

10 SEQ ID No 9 muestra la secuencia de aminoácidos del péptido señal usado en el constructo pV19. Este péptido señal se derivaba de fibroína LC de la polilla de los pinos y es mmrpivlvlfatsala. El péptido señal de SEQ ID No. 9 también se denomina péptido señal V19.

15 SEQ ID No. 10 muestra la secuencia de ácido nucleico correspondiente que codifica para la secuencia de aminoácidos del péptido señal representado en SEQ ID No. 9 y es tal como sigue: 5'-atgatgaggcccatcgtgctggtgctgctgttcgcccctccgcccaggtg-3'.

La presente invención se explica en más detalle mediante los siguientes ejemplos.

## Ejemplos

### Materiales y métodos

#### Células usadas

20 Línea celular CHO CHOK1SV: es una variante de la línea celular CHO-K1 y se ha adaptado al crecimiento en suspensión y medio libre de proteína.

#### Propagación de células CHOK1SV:

25 Se propagaron de manera rutinaria células CHOK1SV en frascos agitadores en suspensión en medio CD-CHO (Invitrogen) complementado con L-glutamina 6 mM. La concentración de siembra fue de  $2 \times 10^5$  células/ml, y las células se dividen cada 4 días. Se gasificaron los frascos con un 5% de CO<sub>2</sub> y se incubaron a 36,5°C (entre 35,5°C y 37,0°C) con agitación orbital a 140 rpm.

#### Transfección transitoria:

30 Se realizaron transfecciones transitorias usando células que crecen en suspensión. Se contaron las células y se distribuyeron sobre pocillos de una placa de 24 pocillos a  $2,5 \times 10^5$  células viables por pocillo en un medio basado en DMEM complementado con suero al 10% y L-glutamina 6 mM, y se incubaron durante la noche a +36,5°C. El siguiente día, se reemplazó el medio condicionado por 1 ml de medio nuevo (como anteriormente) y se incubaron las células durante 3 horas a +37°C.

35 Para cada transfección, se resuspendieron 5 µg de cada uno de los SGV (HC y LC-SGV mezclados entre sí) o 5 µg de los DGV en 100 µl de medio de transfección (OptiMEM, Invitrogen). Para los controles positivos, se transfectaron también las células con el vector pcB72.3, que codifica para los genes de cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo IgG4/kappa que sirve como anticuerpo modelo. También se incluyó un control negativo (sólo agua).

40 Para cada transfección, se diluyeron 5 µl de reactivo Lipofectamine-2000 (Invitrogen) en 100 µl de medio de transfección, se mezcló y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se combinaron el ADN y el reactivo Lipofectamine diluido, se mezclaron y se dejaron reposar adicionalmente a temperatura ambiental durante 20 minutos. Se añadió entonces esta mezcla de 200 µl a un pocillo de la placa de 24 pocillos que contenía las células, y se incubaron las células durante 4 ó 10 días a +37°C. Se recogió el sobrenadante de cultivo y se clarificó mediante centrifugación antes del ensayo para detectar la presencia de anticuerpo mediante ELISA de ensamblaje.

#### Transfecciones estables para la generación de cultivos estáticos:

45 Se hicieron crecer las células usadas para las transfecciones en cultivo celular en suspensión, tal como se detalló anteriormente. Se centrifugaron células de cultivos en crecimiento y se lavaron una vez en medio libre de suero antes de resuspenderse hasta una concentración de  $1,43 \times 10^7$  células/ml. Se añadieron un volumen de 0,7 ml de la



5 suspensión celular y 40 µg de ADN de plásmido a una cubeta de electroporación. Se colocó entonces la cubeta en el aparato de electroporación y se suministró un único pulso de 250 V y 400 µF. Tras la transfección, se distribuyeron las células en placas de 96 pocillos a aproximadamente 2.500 células huésped/pocillo ( $5 \times 10^4$ /ml), usando el medio basado en DMEM no selectivo complementado con dFCS al 10%. Se incubaron las placas a 36,5°C (entre 35,5°C y 37,0°C) en una atmósfera del 10% de CO<sub>2</sub> en aire.

10 El día tras la transfección, se añadió a cada pocillo (150 µl/pocillo) medio basado en DMEM complementado con dFCS al 10%/L-metionina sulfoximina 66 µM para dar una concentración de L-metionina sulfoximina final de 50 µM. Se monitorizaron las placas para determinar cuándo morían las células no transfectadas y cuándo aparecían focos de células transfectadas. Eran evidentes focos de células transfectadas de aproximadamente tres a cuatro semanas tras la transfección. Todas las líneas celulares examinadas y que se hicieron avanzar hacia delante procedían de pocillos que contenían sólo una única colonia.

#### Evaluación de la productividad de líneas celulares en cultivo estático

15 Se incubaron las placas de transfección de 96 pocillos durante aproximadamente tres semanas para permitir la formación de colonias. Se examinaron microscópicamente las colonias resultantes para verificar que las colonias eran de un tamaño adecuado para el ensayo (que cubrían más del 60% del fondo del pocillo), y que sólo una colonia estaba presente en cada pocillo.

20 Se transfirieron colonias adecuadas a pocillos de placas de 24 pocillos que contenían 1 ml de medio de crecimiento selectivo (medio basado en DMEM/dFCS al 10%/L-metionina sulfoximina 25 µM). Se incubaron estos cultivos durante 14 días a 36,5°C (entre 35,5°C y 37,0°C) en una atmósfera del 10% de CO<sub>2</sub> en aire. Se recogió el sobrenadante de cada pocillo y se analizó para determinar la concentración de anticuerpo presente mediante el método de HPLC de proteína A.

#### ELISA de ensamblaje:

25 Se determinó la concentración de anticuerpo de las muestras usando un ELISA de tipo "sándwich" que mide la IgG humana ensamblada. Esto implicaba la captura de muestras y patrón sobre una placa de 96 pocillos recubierta con un anticuerpo anti-Fc humano. Se revela el anticuerpo unido con un anticuerpo anti-cadena ligera humana unido a peroxidasa del rábano y el sustrato cromogénico TMB. El desarrollo de color era proporcional a la concentración de anticuerpo presente en la muestra en comparación con el patrón.

#### HPLC de proteína A:

30 Se realizó el método de cromatografía de afinidad de proteína A para la medición de IgG en una HPLC Agilent 1100. El producto IgG se une selectivamente a una columna de inmunodetección de proteína A Poros. Se lava el material no unido de la columna y se libera el anticuerpo unido restante disminuyendo el pH del disolvente. Se monitorizó la elución mediante absorbancia a 280 nm y se cuantificó el producto (usando el software Chemstation) frente a un patrón de anticuerpo genérico y se hace una corrección para las diferencias en los coeficientes de extinción.

#### Transfecciones estables para la generación de cultivos en suspensión:

35 Se revivificaron células huésped CHOK1SV a partir de una disolución madre de la línea celular CHOK1SV. Se centrifugaron células de los cultivos en crecimiento posteriores y se lavaron una vez en medio CD-CHO antes de resuspenderse a una concentración de  $1,43 \times 10^7$  células viables/ml. Para cada transfección, se añadieron aproximadamente 0,7 ml de la suspensión celular y 40 µg de ADN de plásmido a cada cubeta de electroporación. Se prepararon cuatro transfecciones usando el contenido de dos cubetas de electroporación. Se colocó cada cubeta de electroporación en el aparato de electroporación y se suministró un único pulso de 300 V, 900 µF. Tras la transfección, se agruparon las células de todas las cubetas requeridas y se distribuyeron en placas de 96 pocillos a de aproximadamente 2.500 células huésped/pocillo ( $0,50 \times 10^9$ /ml) a 10.000 células huésped/pocillo ( $2,00 \times 10^9$ /ml), usando el medio CD-CHO/rojo fenol. Se añadió rojo fenol sólo para indicar el crecimiento celular. Se incubaron las placas a de 35,5 a 37,0°C en una atmósfera del 10% v/v de CO<sub>2</sub> en aire.

45 El día tras la transfección, se añadieron 150 µl del medio de selección (CD-CHO/rojo fenol/MSX 66,6 µM) a cada pocillo. La concentración final de MSX en cada pocillo era de 50 µM. Se monitorizaron las placas para determinar cuándo morían las células no transfectadas dejando focos de células transfectadas. Eran evidentes focos de células transfectadas de tres a cuatro semanas tras la transfección. Todos los transfectantes examinados y que se hicieron avanzar hacia delante procedían de pocillos que contenían sólo una única colonia, tal como se determinó mediante evaluación visual.

50

Selección de líneas celulares para su evaluación en cultivo estático:

5 Se incubaron las placas de transfección de 96 pocillos durante de aproximadamente tres a cuatro semanas para permitir la formación de colonias. Se examinaron microscópicamente las colonias resultantes para verificar que eran de un tamaño adecuado para la evaluación (que cubrían más del 60% del fondo del pocillo), y que sólo una colonia estaba presente en cada pocillo. Se retiró el sobrenadante de cultivo y se sometió a ensayo para detectar anticuerpo usando el método de ELISA de Lonza. Se evaluó el porcentaje de confluencia del pocillo en el momento de toma de muestras. Se usó el valor obtenido dividiendo los resultados del ensayo entre el porcentaje de confluencia para clasificar las líneas celulares.

10 Se expandieron líneas celulares de clasificación alta en placas de 24 pocillos en el medio CD-CHO/rojo fenol/MSX 25  $\mu$ M (se usó este medio para todo el periodo de cultivo estático). Al alcanzar la confluencia, se usó este cultivo para inocular un frasco T25, mientras que al cultivo restante se le volvió a alimentar con medio de crecimiento nuevo y se devolvió al incubador. Cuando se alcanzó la confluencia en el frasco T25, se alimentó este cultivo con medio nuevo para estimular a las células a que formaran múltiples capas y se adaptaran al cultivo en suspensión.

15 Para las líneas celulares que se hicieron avanzar desde las placas de 96 pocillos, se emprendió una segunda evaluación de la productividad. Se incubaron los cultivos en placas de 24 pocillos que no se habían hecho avanzar y que se volvieron a alimentar, durante catorce días adicionales hasta que se alcanzó la confluencia o una baja viabilidad ("sobrecrecimiento"). En este momento, se recogió el sobrenadante de cultivo y se midió la concentración de anticuerpo usando un método de HPLC de proteína A. Se clasificaron las líneas celulares según la productividad y líneas celulares de clasificación alta se hicieron avanzar para evaluarse en cultivo en suspensión.

20 Expansión de líneas celulares a cultivo en suspensión en CDACF:

25 Se iniciaron cultivos en suspensión a partir de cultivos en frascos T25 confluentes, usando el medio CD-CHO/MSX 25  $\mu$ M. La elección de la concentración celular de inoculación dependía de la concentración de células viables medida en el frasco T25. Si la concentración de células viables era mayor de  $0,40 \times 10^6$  células viables/ml, se añadió medio CD-CHO/MSX 25  $\mu$ M para dar una concentración de células viables de  $0,20 \times 10^6$  células viables/ml en un volumen final de 5 a 30 ml en un frasco de agitación de 125 ml. Si la concentración de células viables era de  $0,25$  a  $0,40 \times 10^6$  células viables/ml, se añadió medio CD-CHO/MSX 25  $\mu$ M para dar una concentración de células de  $0,1 \times 10^6$  células viables/ml en un volumen final de 5 a 30 ml en un frasco de agitación de 125 ml. Si la concentración de células viables era inferior a  $0,25 \times 10^6$ /ml tras un máximo de catorce días en frascos T25, se hicieron avanzar 10 ml de cada cultivo automáticamente a 10 ml de medio CD-CHO/MSX 25  $\mu$ M en frascos de agitación de 125 ml.

30 Tras la transferencia desde cultivo estático hasta cultivo en suspensión, se subcultivaron en serie las líneas celulares en medio CD-CHO/MSX 25  $\mu$ M en un régimen de subcultivo de cuatro días, hasta que se lograron características de crecimiento aceptables y reproducibles. Se prepararon cultivos en frascos de agitación de 125 ml, que contenían un volumen de cultivo de 30 ml, con una concentración de células de inoculación inicial de  $0,05$  a  $0,20 \times 10^6$  células viables/ml. Una vez que la concentración viable en el día 4 (día de subcultivo) estaba de manera sistemática por encima de  $0,40 \times 10^6$  células viables/ml, se inocularon rutinariamente los cultivos a  $0,20 \times 10^6$  células viables/ml.

Cultivo en frasco de agitación de alimentación discontinua:

40 Se prepararon cultivos de cada línea celular seleccionada en frascos de agitación de 250 ml con 30 ml de suspensión celular usando el medio CM42/SPE. Se inocularon los cultivos a  $0,20 \times 10^6$  células viables/ml y se equilibró el espacio libre de cada cultivo con un 5% v/v de CO<sub>2</sub> en aire. Se incubaron los cultivos a de 35,5 a 37,0°C sobre una plataforma de agitación a  $140 \pm 5$  rpm hasta que la concentración de células viables, tras el pico, era inferior o igual a  $1,00 \times 10^6$  células viables/ml o se alcanzó el día 15 ("sobrecrecimiento"). En este momento se recogieron los cultivos.

45 Se determinó la concentración de células en los días 7 y 14 usando un contador de células automatizado Vi-Cell. En el día 3, se añadieron 2,1 ml de SF40 como un bolo a cada cultivo de 30 ml. Se aplicó una inyección de 360  $\mu$ l de la segunda alimentación de SF41 a los cultivos de alimentación discontinua en los días 8 y 11. Se tomaron muestras del sobrenadante de cultivo en los días 7 y 14 y se congelaron a  $-20 \pm 5^\circ\text{C}$  hasta que se sometieron a ensayo para la detección de anticuerpo ensamblado mediante HPLC de proteína A.

Cultivo en biorreactor de 10 l:

50 Se evaluaron las líneas celulares en biorreactores de 10 l. Se aumentó el volumen de los 16 cultivos de líneas celulares hasta que se obtuvo un volumen suficiente para inocular un biorreactor con ventilación de 10 litros. Se ajustó el volumen del inóculo para lograr una densidad de simiente de aproximadamente  $0,2 \times 10^6$  células/ml. Se hicieron funcionar los biorreactores durante 15 días usando una estrategia de alimentación discontinua. Se tomaron muestras del sobrenadante de cultivo y se sometieron a ensayo para detectar anticuerpo ensamblado mediante

HPLC de proteína A.

#### Construcción de vectores

Se sintetizaron secuencias de ADN optimizadas para genes que codificaban para la región variable del anticuerpo cB72.3. Como parte de la síntesis, se añadió una secuencia de ácido nucleico que codificaba para una cadena de secuencia señal. En total, se usaron 19 secuencias señal diferentes (secuencias V1-V19). Se clonaron secuencias de cadena ligera en el vector de expresión derivado de pEE12.4 pConPlusKappa que incluye la secuencia de ADN de la región constante Kappa. Se clonaron cadenas pesadas en el vector derivado de pEE6.4 pConPlusIgG4 que incluye la secuencia de ADN de la región constante de IgG4. Se generaron entonces vectores de expresión de gen doble clonando fragmentos *Not I/Pvu I* del vector relevante juntos. Se confirmó la secuencia de todos los constructos mediante secuenciación del ADN.

Como examen inicial, se transfectaron de manera transitoria diecinueve constructos junto con un control apropiado empleando las secuencias señal usadas de manera rutinaria en la línea celular huésped CHOK1SV usando Lipofectamine-2000 (Invitrogen). Se transfectaron los constructos seis veces y se determinó la concentración de anticuerpo en los medios mediante ELISA. El ensayo identificó que cinco de los diecinueve constructos daban como resultado concentraciones de anticuerpo medias drásticamente aumentadas con respecto al control dando como resultado los constructos restantes concentraciones de anticuerpo o bien equivalentes o bien reducidas. Estos constructos eran pV12 que contenía la secuencia señal de SEQ ID No. 1 (secuencia señal V12), pV14 que contenía la secuencia señal de SEQ ID No. 3 (secuencia señal V14), pV16 que contenía la secuencia señal de SEQ ID No. 5 (secuencia señal V16), pV17 que contenía la secuencia señal de SEQ ID No. 7 (secuencia señal V17) y pV19 que contenía la secuencia señal de SEQ ID No. 9 (secuencia señal V19).

Se usaron entonces los constructos que empleaban las cinco secuencias señal que demostraban una expresión mejorada en el sistema de transfección transitoria para crear líneas celulares estables en células CHOK1SV. Se determinó la concentración de anticuerpo en los medios de 100 líneas celulares por constructo mediante HPLC de proteína A. La concentración de anticuerpo media de las líneas celulares control era de 89 mg/l. Dos de las cinco secuencias señal dieron como resultado líneas celulares con un aumento estadísticamente significativo en la concentración de anticuerpo media con respecto a líneas celulares control dando como resultado la secuencia V17 (SEQ ID No. 7) una concentración de anticuerpo media de 106 mg/l (aumento del 19%,  $p < 0,05$ ) y dando como resultado la secuencia V19 (SEQ ID No. 9) una concentración de anticuerpo media de 118 mg/l (aumento del 32%,  $p < 0,05$ ). Los datos de líneas celulares estables se representan en la figura 1.

Cuando se evaluó la calidad del producto mediante electroforesis en SDS, no se observaron diferencias estructurales grandes entre anticuerpos generados usando las secuencias señal alternativas o control. La evaluación de la calidad de los productos mediante espectroscopía de masas demostró que los anticuerpos generados usando las secuencias señal alternativas eran de la masa esperada en comparación con el control, lo que sugiere que era probable que se procesaran apropiadamente. Este trabajo demuestra que diferentes secuencias señal funcionan con eficacia variable, lo que indica que es probable que la elección de la secuencia señal sea un factor contribuyente clave para una expresión de anticuerpos óptima.

Con el fin de determinar si esta secuencia conducirá a un aumento en la concentración de anticuerpo a lo largo de todo el procedimiento de construcción de líneas celulares, se generaron constructos que codificaban para la versión de anticuerpo IgG1/kappa de cB72.3. Los constructos usaron o bien los genes optimizados para genes fusionados a una secuencia de ADN que codifica para la secuencia señal de SEQ ID No. 9 (V19) (pcB72.3IgG1V19) o bien secuencias señal derivadas de anticuerpos usadas de manera rutinaria (pcB72.3IgG1).

Estos constructos se transfectaron de manera estable en células CHOK1SV. Se seleccionaron transfectantes en placas de 96 pocillos y se expandieron las líneas celulares de clasificación alta a placas de 24 pocillos. Al alcanzar la confluencia, se hicieron avanzar las 60 líneas productoras superiores a frascos T25 y entonces se adaptaron a suspensión en frascos de agitación. Se evaluó la productividad en cultivos de frasco de agitación tanto discontinuos como de alimentación discontinua y se analizó la calidad de los productos usando el sobrenadante de cultivo de cultivos sobrecrecidos de alimentación discontinua de 14 días.

En cultivos de alimentación discontinua, el constructo que emplea la secuencia señal de SEQ ID No. 9 demostró un aumento del 6% en la concentración de anticuerpo media en comparación con los controles ( $p = 0,08$ ). La evaluación de la calidad de los productos no reveló diferencias notables entre cultivos transfectados con el control o constructos con la secuencia señal de SEQ ID No. 9 (V19) cuando se analizaron mediante electroforesis en SDS, IEF, análisis de oligosacáridos. Se usó espectroscopía de masas por electrospray para mostrar que la masa del anticuerpo generado usando la secuencia V19 era la misma que cuando se generaba usando el constructo control, lo que sugiere que la secuencia V19 se procesó correctamente durante la secreción del anticuerpo.

En cultivos en biorreactor de alimentación discontinua empleando biorreactores a escala de laboratorio de 10 l, se

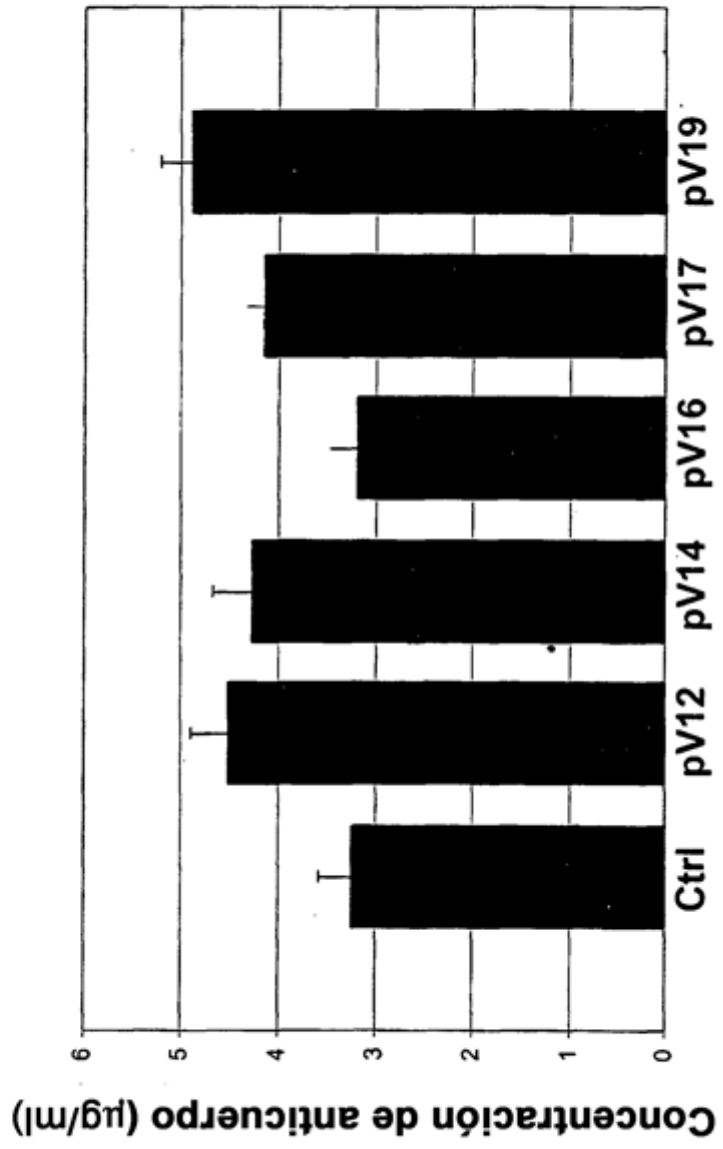
## ES 2 410 559 T3

- 5 realizaron dieciséis cultivos en biorreactor a escala de laboratorio de 10 litros. Las líneas celulares alcanzaron un amplio intervalo de concentraciones de células viables máximas. Las líneas celulares que contenían la secuencia señal de SEQ ID No. 9 (V19) alcanzaron entre 9,6 y 17,9 x 10<sup>6</sup> células/ml y las líneas celulares con la secuencia señal control alcanzaron entre 8,5 y 19,1 x 10<sup>6</sup> células/ml. La integral del tiempo promedio de la concentración de células viables (IVC) para los cultivos con la “nueva secuencia señal” era de 2395 x 10<sup>6</sup> células.h/ml mientras que la IVC era de 2511 x 10<sup>6</sup> células.h/ml para las líneas celulares control. La concentración de producto promedio en la recogida era de 2870,3 mg/l para las líneas celulares con la secuencia señal V19 (SEQ ID NO. 9) y de 2577,1 mg/l para las líneas celulares control. Se recogieron los cultivos en biorreactor en el día 15.
- 10 Basándose en los cultivos en biorreactor a escala de laboratorio, se concluyó que las líneas celulares que contenían V19 daban como resultado un aumento en la concentración de anticuerpo media del 11%, sin embargo, la diferencia no era estadísticamente significativa debido al amplio intervalo de productividades observado.

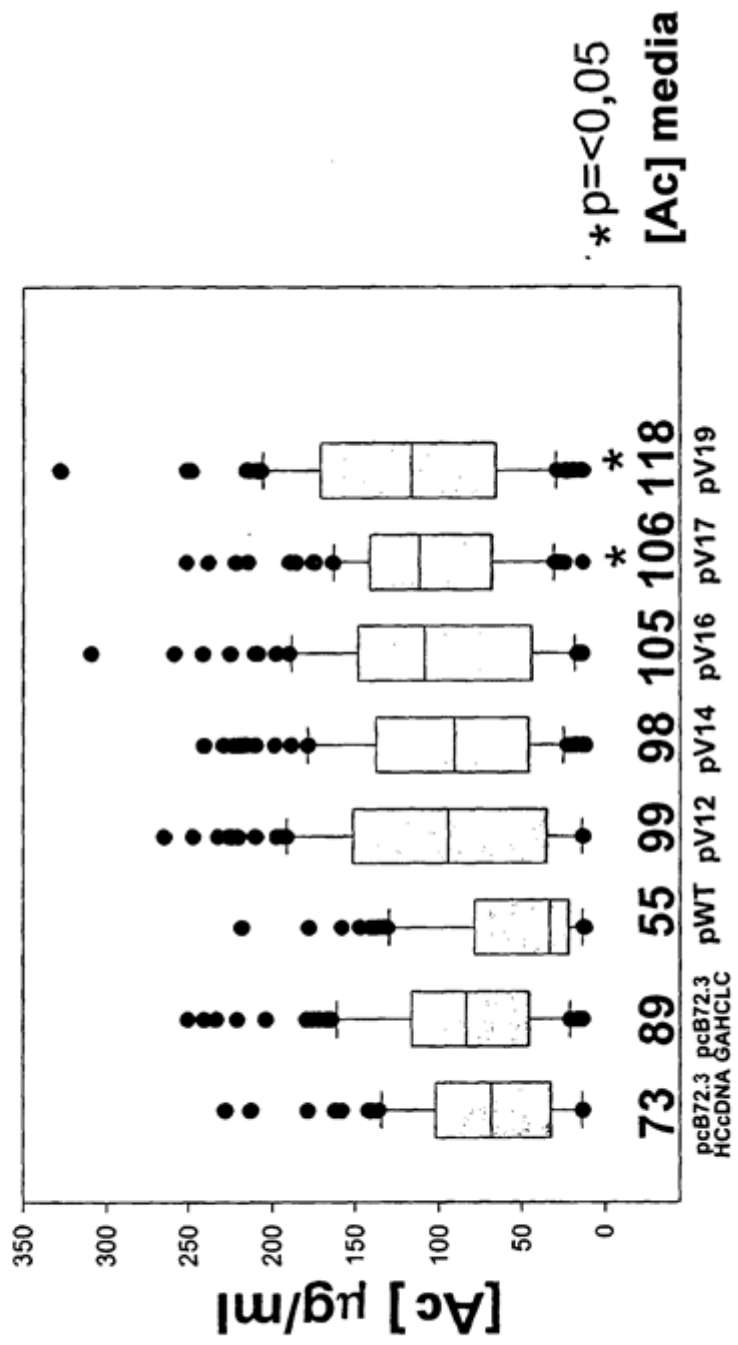
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Casete de expresión para la secreción de una proteína heteróloga a partir de una célula huésped de mamífero que comprende un promotor, funcionalmente unido a una secuencia de ADN que codifica para un péptido señal que está unido en marco a una secuencia de ADN que codifica para una proteína heteróloga, en el que la secuencia de ADN que codifica para el péptido señal se selecciona de SEQ ID No. 10 o una secuencia de ADN que codifica para una secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID No. 9.
- 10 2. Vector de expresión de mamíferos que comprende un promotor, funcionalmente unido a una secuencia de ADN que codifica para un péptido señal que está unido en marco a una secuencia de ADN que codifica para una proteína heteróloga, en el que la secuencia de ADN que codifica para el péptido señal se selecciona de SEQ ID No. 10 o una secuencia de ADN que codifica para una secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID No. 9.
3. Célula huésped de mamífero que contiene un vector de expresión de mamíferos según la reivindicación 2.
4. Célula huésped de mamífero según la reivindicación 3, siendo la célula una célula de ovario de hámster chino (CHO).
- 15 5. Procedimiento para la producción de una proteína recombinante, que comprende las etapas de
  - a) transfectar una célula huésped de mamífero con un vector de expresión según la reivindicación 2
  - b) cultivar la célula huésped en condiciones apropiadas en un medio para permitir la propagación de la célula y la expresión de la proteína recombinante y la secreción de la proteína recombinante a partir de la célula huésped al medio
  - c) recoger la proteína recombinante secretada del medio.
- 20 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que la célula huésped de mamífero es una célula CHO.

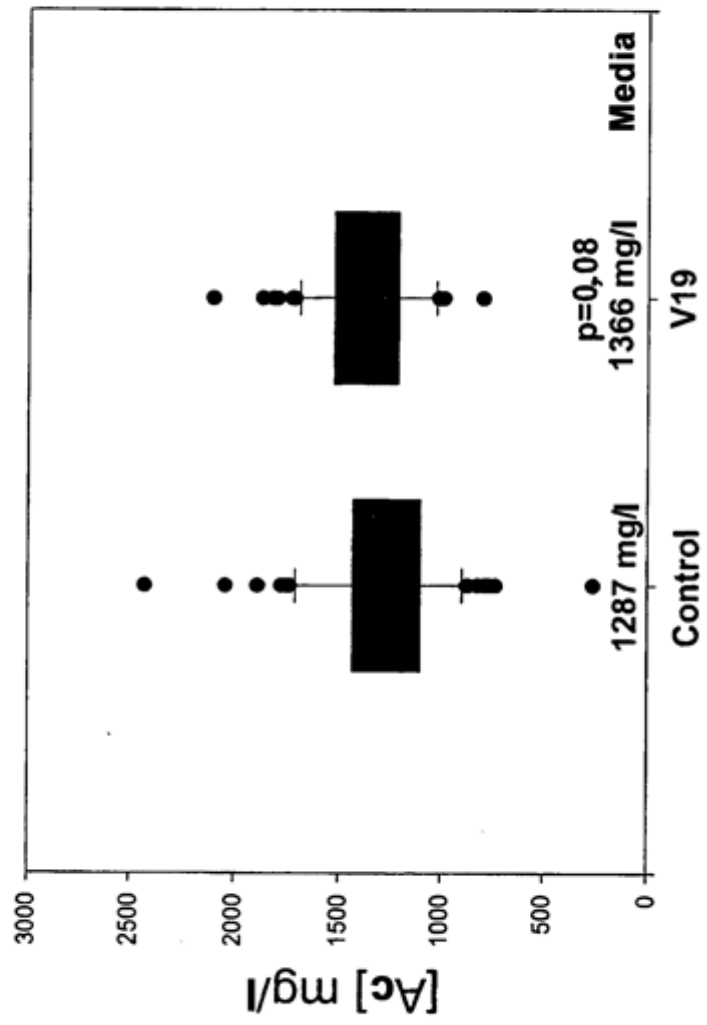
**Figura 1**



**Figura 2**



**Figura 3**





**Figura 4**

