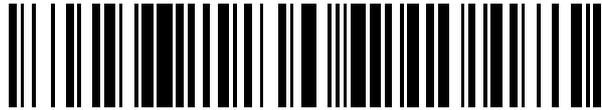


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 473 623**

51 Int. Cl.:

C12N 7/02 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
B01J 20/00 (2006.01)
B01J 20/28 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/67 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2008 E 08787316 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014 EP 2185591**

54 Título: **Procedimiento de producción**

30 Prioridad:

20.08.2007 US 956772 P

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

07.07.2014

73 Titular/es:

**GLAXO GROUP LIMITED (100.0%)
980 Great West Road
Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB**

72 Inventor/es:

**UDEN, MARK y
KOTSOPOULOU, EKATERINI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 473 623 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

Procedimiento de producción

La presente invención proporciona un procedimiento para producir una línea celular que es capaz de secretar una proteína terapéutica. El procedimiento comprende el uso de secuencias génicas adaptadas por codones que tienen como resultado plazos de protocolo reducidos y una disminución en las concentraciones de antifolato requeridas a la hora de generar, por ejemplo, líneas celulares productoras de anticuerpos mediante un sistema de selección y amplificación.

Las células de mamífero, tales como las células CHO (células de ovario de hámster chino), NSO y PerC6 se usan de forma rutinaria en la industria farmacéutica para fabricar productos biofarmacéuticos. Estas células están modificadas genéticamente y, después, se seleccionan de un modo tal que se garantiza que se observa una expresión elevada de títulos de la proteína deseada cuando las líneas celulares resultantes se cultivan en biorreactores.

Actualmente existen varios procedimientos para la modificación y, después, la selección de las células mejores para este fin. A menudo, estos procedimientos implican "amplificación" para aumentar el número de copias del vector o vectores de expresión integradas para mejorar los rendimientos observados de la proteína deseada. Estos procedimientos de "amplificación" se han descrito bien en Bebbington and Hentschel (DNA Cloning Volume III (IRL press, 1987)). Los autores explican que una serie de marcadores seleccionables (que a menudo están en forma de secuencias de ácido nucleico que codifican enzimas implicadas en el metabolismo y esenciales para la supervivencia de las células huésped en determinadas condiciones del medio de cultivo) se pueden unir de forma operativa a los vectores de expresión diseñados para expresar la proteína deseada de forma que tras la selección del marcador seleccionable, también se selecciona para la expresión de la proteína deseada. No obstante, dado que después de esta selección los títulos resultantes de la proteína deseada normalmente no son lo bastante altos, las células seleccionadas también se someten a regímenes de "amplificación". Estos regímenes normalmente implican someter las células a determinados fármacos tóxicos que inhiben el marcador seleccionable. Mediante dicha inhibición, se seleccionarán las poblaciones de células que presenten niveles de expresión aumentados de este marcador. A menudo esto conduce a niveles de expresión aumentados de los casetes de expresión unidos operativamente también. Dicha expresión aumentada o "amplificación" normalmente se produce debido a reorganizaciones genómicas resultantes en un mayor número de copias del marcador seleccionable y casetes de expresión unidos operativamente. A menudo, mediante dicha "coamplificación", los títulos mejoran suficientemente para usar los mejores clones resultantes para producir niveles adecuadamente elevados de la proteína o proteína deseadas. Cuando el número de copias del vector en células individuales sometidas a regímenes de amplificación se han investigado adicionalmente, se ha observado que hasta alcanzar una "meseta" de la producción de proteínas, los niveles de producción observados normalmente son proporcionales al aumento del número de copias de los genes (Bebbington y Hentschel *ibid*).

Hasta la fecha se han identificado muchos marcadores seleccionables diferentes para amplificar y los denominados marcadores de selección amplificables. Cada uno identificado también tiene un agente de "selección y amplificación" asociado añadido al medio de cultivo celular durante los regímenes de selección y amplificación. Los ejemplos de dichas combinaciones de agentes / marcadores seleccionables incluyen: adenosina desaminasa / desoxicoformicina, aspartato transcarbamilasa/ N (fosfoacetil)-L-aspartato, dihidrofolato reductasa / metotrexato, glutamina sintetasa / metionina sulfoximina, metallioneína-I / metal pesado, resistencia a múltiples fármacos / adriamicina (véase Bebbington y Hentschel *ibid*, Kellems 1991; Current Opinion in Biotechnology 2: pp723 - 729). Adicionalmente, más recientemente se ha notificado que los marcadores de selección de antibióticos, tales como los que confieren resistencia a neomicina/G418 y ceocina, también se pueden usar a veces para aumentar el número de copias y, por tanto, ha veces se han utilizado como marcadores de selección y amplificación cuando se combinan con el agente seleccionable (a base de antibióticos) de amplificación y selección afín adecuado (p. ej., Sauttle y Enenkel: Biotech Bioeng 2004 89 pp530 - 538, y Kwaks et al: Nature Biotech 2003; 21; pp553 - 558)

Aunque hay una serie de procedimientos para seleccionar las mejores células modificadas genéticamente para este fin, las dos presiones de selección más usadas son los procedimientos de selección basados en la glutamina sintetasa (GS) y dihidrofolato reductasa (DHFR).

El procedimiento de la GS implica la unión operativa de un casete de expresión de glutamina sintetasa al del casete o casetes de expresión de proteínas terapéuticas. Los vectores unidos operativamente posteriores se liberan a las células y se selecciona a integración cromosómica en el vector para la depleción o eliminación de glutamina del medio en el que se cultivan las células. La adición de los inhibidores de la glutamina sintetasa, tales como metonina sulfoximina (MSX), a menudo se añaden a los medios de cultivo con el fin de asegurar que se selecciona la actividad de la glutamina sintetasa por encima y más allá de los niveles de las células huésped endógenos. El procedimiento de selección alternativo de la DHFR implica la unión operativa de una presión de selección de DHFR a la del casete casete o casetes de expresión de proteínas terapéuticas. Los vectores unidos operativamente se liberan a las células y se selecciona la integración cromosómica en el vector para la depleción o eliminación de nucleósidos (p. ej., hiposantina y timidina). Normalmente para el procedimiento de la DHFR, es habitual usar cepas huésped negativas para la DHFR, tal como CHO DG44 o CHO DUX-B11. También es habitual emplear agentes de selección

y de amplificación, tales como el metotrexato (MTX).

La adición o ajuste gradual de cantidades crecientes de los agentes de selección y amplificación MSX o MTX en los respectivos sistemas de selección con GS y DHFR a menudo se realiza con el fin de aumentar la expresión mediante el aumento de número de copias del gen. Tales procedimientos pueden implicar la adición del agente de selección y amplificación para el cultivo de células directamente. Como alternativa, el agente puede añadirse al medio de crecimiento antes de los medios de comunicación que se utilizan en tal cultivo celular. Esta adición o titulación de tales agentes directos a los cultivos celulares o a los medios usados para los cultivos celulares normalmente se denomina "amplificación". Por ejemplo, en el sistema de GS se pueden añadir o aumentar los niveles de MSX hasta y más allá de 500 μM , mientras que para el sistema DHFR, se pueden añadir o aumentar los niveles de MTC antifolato hasta y más allá de los niveles de concentración de 1 μM . Mediante el uso de tales agentes de esta manera, seguido de un período de cultivo para permitir la selección de células que crecen en la nueva concentración del agente de selección, (cada etapa de concentración se denomina una "ronda" de la amplificación), se ha demostrado que el área del genoma que alberga la presión de selección también puede amplificarse, aumentando de ese modo el número de copias del marcador seleccionable. En consecuencia, cuando el marcador seleccionable está unido operativamente a los casetes de expresión de proteínas terapéuticas, estos casetes también pueden amplificarse. Por el uso de agentes de selección y amplificación adecuados cuando se utiliza el sistema de selección de GS y DHFR, los rendimientos de las proteínas deseadas se pueden mejorar significativamente hasta alcanzar una 'meseta de producción' (véase Bebbington y Hentschel (ibid)). Como consecuencia de ello, los clones que crecen a través de tal selección y amplificación se investigan después sobre el título / rendimiento y los mejores clones se seleccionan y se evalúan adicionalmente. A partir de esta titulación y cribado, es típico identificar y, después, comprometerse a un clon para la posterior producción de la proteína o proteínas deseadas.

Típicamente, tanto el número de "rondas" de amplificación como la concentración del agente de selección y amplificación empleado no se establecen o fijan en los protocolos de selección y amplificación. En cambio, es típico que de los regímenes de selección y amplificación que se conviertan progresivamente en rigurosos hasta un punto en el que se acercan a un umbral de producción o meseta. Específicamente, al expresar anticuerpos, los inventores y otros colegas han observado que los clones que se aproximan a esta meseta producen títulos finales en los modelos de cultivo por lotes sin alimentar extendidos actuales y biorreactores de producción en el intervalo de 0,3 g a 1,5 g por litro. Esto normalmente se traduce en productividades de células (Q_p) en el intervalo de 10-100 pg / célula / por día durante tales condiciones de cultivo por lotes sin alimentar. Sin embargo, es bien sabido que aunque las Q_p (en términos de pg / célula / día) son importante, no es un determinante exclusivo de la productividad, ya que los clones con la mayor Q_p no siempre dan lugar a los títulos volumétricos más altos. Para una revisión reciente véase Wurm 2004; Vol. Nature Biotechnology 22; pp1393-1398.

Los procedimientos de selección y amplificación se han empleado con éxito para generar líneas celulares utilizadas en las campañas de fabricación para fabricar proteínas deseadas utilizadas en los ensayos clínicos. Sin embargo, mientras que los títulos generados mediante la selección y la metodología de amplificación son suficientes, tales procedimientos son todavía indeseables para un número de razones, incluyendo el tiempo, los costes y la seguridad. Por ejemplo, la valoración de los agentes de amplificación y selección en los protocolos de "amplificación" de líneas celulares retrasa la selección de clones y el sobrecrecimiento de colonias, de modo que cada ronda de amplificación requiere un más o más en completarse. En segundo lugar, los agentes de selección y amplificación como metotrexato y sulfoximina de metionina son productos químicos tóxicos que deben ser eliminados si se va a utilizar terapéuticamente. En tercer lugar, se puede producir resistencia a los agentes de selección y amplificación en las células de mamífero que puede producir una presión de selección menos rigurosos y dar lugar a una inestabilidad de los rendimientos clonal y del producto. En cuarto lugar, en ocasiones, la amplificación se puede producir de forma episódica. Tales episodios y cualquier casete de expresión funcionales unidos operativamente no siempre se heredan por igual durante la división celular, que conduce a un aumento de la variación y la inestabilidad en el cultivo. En quinto lugar, los reordenamientos del genoma generados durante los protocolos de amplificación pueden dar lugar a cambios significativos en el genoma de la célula huésped, lo que da lugar a fenotipos variables en los clones resultantes. En sexto lugar, los subproductos del agente de selección y amplificación, tales como el metotrexato poliglutamado, pueden inhibir funciones adicionales de las células (por ejemplo, Allegra et al 1985 J Biological Chem 260;17 pp9720 - 9726). En séptimo lugar, muchos de estos agentes de selección y de amplificación también son potencialmente tóxicos para los operadores involucrados en el cultivo de células y la ejecución de los biorreactores si están expuestos a niveles altos. En octavo lugar, también se ha observado que aumentando el número de copias de vectores de expresión integrados en células huésped de mamífero puede dar lugar a un aumento de la actividad de silenciamiento génica inducida por repeticiones (RIGS) por la célula huésped que, en última instancia, puede dar lugar a una reducción en los niveles de expresión de cada uno de los vectores de expresión integrados (véase, por ejemplo, McBurney MW et al Exp. Cell Res. 2002 274:1-8).

En consecuencia, sería altamente deseable emplear la metodología de selección y amplificación con niveles reducidos de agente de selección y amplificación en un número reducido de rondas de amplificación, mientras que todavía consigue el mismo rendimiento final de la proteína terapéutica, de tal manera que el tiempo necesario para generar la línea celular final es más rápido y / o el nivel del agente tóxico no deseado necesario para generar la línea final se reduce o se excluye totalmente durante la generación de la línea celular, la selección y el cultivo (M. Celina de la Cruz Edmonds et al (Mol Biotecnología 2006 34:179-190).

Con combinaciones de codones triples de 64 pares de bases pero solo 20 aminoácidos, durante muchas décadas se ha sabido que existe redundancia en el código genético. No obstante, el uso de sesgo de codones para aumentar la expresión no se realizó hasta la década de 1980. Por ejemplo, en 1982 Bennetzen y Hall (J Biol Chem 257 pp3026 - 3031) observaron un sesgo de codones específico de la especie en genes de expresión fuerte de procariotas y eucariotas. También observaron que este sesgo era taxonómicamente divergente. Como consecuencia, pronto se observó que se podría modificar el uso de codones de tales marcos de lectura abiertos para aumentar la expresión en sistemas de expresión recombinantes. Por ejemplo, Kotula y Curtis (Biotechnology NY (1991) 9: Alcanzaron una expresión significativamente mejorada de la cadena ligera de anticuerpo de mamífero en la levadura mediante la adaptación de codones del marco de lectura abierto como para desviar el uso del codón hacia los codones preferidos por los genes de levadura endógenos altamente expresados. Otro ejemplo muy notable fue la adaptación de codones de la proteína verde fluorescente para mejorar la expresión en células de mamífero (Zolotukhin Virol SJ (1996) 70: de codones 4646 - 54 y Yang et al Nucleic Acids Res 1996 24:4592 - 3).

Los datos recientes sugieren que al elevar la puntuación del índice de adaptación de codones (CAI) de los marcos de lectura abiertos que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos cadenas se puede mejorar marginalmente los rendimientos de producción en las células huésped de mamífero cuando los casetes de expresión adaptados resultantes están unidos operativamente a los marcadores seleccionables de glutamina sintetasa y cuando las células se incuban con el agente de selección y amplificación MSX. Estos datos (presentados en la IBC 2005 Cell Line Development and Engineering Conference) sugirieron que mientras que los niveles de expresión no mejoraron significativamente, el clon positivo mediano en un grupo aumentó marginalmente (de 37,8 µg/ml a 51,3 µg/ml), pero sólo cuando los marcos de lectura abiertos de las cadenas pesadas y ligeras se adaptaron por codones. Más recientemente, M. Celina de la Cruz Edmonds et al (ibid) también reconoció el deseo de reducir los niveles del agente de selección y amplificación cuando se generan líneas celulares de ingeniería que expresan proteínas deseables con ayuda de regímenes de selección y amplificación. Ellos demostraron que mediante la modificación de la densidad de siembra de las células transfectadas se pueden reducir los niveles de MSX empleados y reducir el número de semanas requeridas para generar y mantener las líneas de células modificadas genéticamente que expresan niveles equivalentes o mayores de la proteína deseada. Un trabajo reciente publicado ha investigado los enfoques de optimización de codones combinado con el uso del marcador seleccionable glutamina sintetasa. Por ejemplo, el trabajo presentado por Kawley et al (Molecular Biotechnology 2006 Vol 34; pp151 - 156) evalúa el impacto de la adaptación de codones sobre los niveles de expresión siguientes generados, sin embargo, los resultados presentados sugieren sólo pequeñas mejoras en los niveles de expresión alcanzados.

Incluso más recientemente, Cartón et al (Protein Expression and Purification 55 (2007) pp279-286) también investigaron el impacto de la optimización de codones. Su trabajo consistió la optimización de codones parcial de los marcos de lectura abiertos de las cadenas pesada y ligera de anticuerpos mediante diversos enfoques. Estas secuencias de codificación modificadas se expresaron después en células de mieloma como formatos de mini-gen (es decir, que contienen intrones) en casetes de expresión unidos operativamente al marcador seleccionable gpt. No se discutieron enfoques de amplificación.

Hay una necesidad en la técnica de reducir los niveles de los agentes de selección y amplificación requeridos cuando se emplean sistemas de expresión unidos operativamente a los marcadores de selección amplificables.

Declaración de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos para reducir los niveles de una presión seleccionable tituable requerida, el número de ciclos de amplificación y el tiempo necesario para generar líneas celulares que expresan la proteína mediante la alteración de los codones de los marcos de lectura abiertos deseados. A través de la utilización de la adaptación de codones para este propósito, los procedimientos de la invención proporcionan consistentemente rendimientos suficientes en marcos de tiempo más rápidos, lo que ahorra muchas semanas en las actividades de desarrollo de líneas celulares. Además, los procedimientos de la invención también se generan líneas celulares con concentraciones más bajas del agente de selección y amplificación que las alcanzadas previamente. De acuerdo con lo anterior, se observan niveles más bajos del marcador de selección y amplificación en las líneas de células finales.

La presente invención proporciona un procedimiento para producir una línea celular de mamífero que produce al menos una proteína terapéutica que comprende las etapas de:

- a) obtener una primera secuencia de polinucleótidos que codifica dicha al menos una proteína terapéutica,
- b) alterar la primera secuencia de polinucleótidos para obtener una segunda secuencia de polinucleótidos, en la que el índice de adaptación de codones de la segunda secuencia de polinucleótidos es mayor que la de la primera secuencia de polinucleótido y el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido codifican la misma proteína terapéutica.
- c) transformar al menos una primera célula de una línea celular de mamífero con la primera secuencia de polinucleótidos de la etapa (a) y una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica un marcador de selección que es capaz de proporcionar la amplificación de la primera secuencia de polinucleótidos dentro de dicha célula;

y

transformar al menos una segunda célula de dicha línea celular de mamífero con la segunda secuencia de polinucleótidos de la etapa (b) y una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica el marcador de selección que es capaz de proporcionar la amplificación de la segunda secuencia de polinucleótidos dentro de dicha célula,

5 d) cultivar dicha al menos una primera célula de la etapa (c) para crear una primera línea celular que comprende una pluralidad de células, en un medio que contiene una concentración o una concentración cada vez mayor de un agente de selección y amplificación que (i) inhibe el crecimiento de células en dicha línea celular que expresa niveles insuficientes del marcador de selección codificado por el tercer polinucleótido de la etapa (c), y (ii) aumenta el número de copias del gen;

10 cultivar dicha al menos una segunda célula de la etapa (c) para crear una segunda línea celular que comprende una pluralidad de células, en un medio que contiene una concentración o una concentración cada vez mayor del agente de selección y amplificación que (i) inhibe el crecimiento de células en dicha línea celular que expresa niveles insuficientes del marcador de selección codificado por el tercer polinucleótido de la etapa (c), y (ii) aumenta el número de copias del gen; y

15 (e) seleccionar dicha segunda línea celular una vez que se alcanza la meseta de producción de la proteína codificada por el segundo polinucleótido en dicha segunda línea celular, en el que dicha concentración del agente de selección y amplificación es menor que la necesaria para alcanzar un rendimiento de producción equivalente de dicha proteína producida en dicha primera línea celular transformada con el primer polinucleótido.

20 En todos los procedimientos comparativos como se describe en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, todos los otros parámetros tales como protocolos de amplificación o concentraciones de agentes de selección permanecen constantes.

En una realización, la meseta de producción de la proteína codificada por el segundo polinucleótido producido en dicha segunda línea celular se alcanza con un menor número de rondas de amplificación de lo necesario para alcanzar un rendimiento de producción equivalente de dicha proteína producida en dicha primera línea celular transformada con el primer polinucleótido.

25 En una realización de la presente invención, la segunda línea celular se cultiva en biorreactores y la proteína terapéutica producida se purifica.

30 En una realización de la presente invención, el índice de adaptación de codones de la segunda secuencia de polinucleótidos es igual o mayor que 0,9, en una realización adicional el índice de adaptación de codones de la segunda secuencia de polinucleótidos que es mayor que 0,91, en una realización adicional el índice de adaptación de codones de la segunda secuencia de polinucleótidos que es mayor que 0,92, en una realización adicional más el índice de adaptación de codones de la segunda secuencia de polinucleótidos que es mayor que 0,95.

35 En otra forma de realización de la presente invención, la concentración del agente de selección y amplificación necesaria para lograr la equivalencia terapéutica aritmética del rendimiento de la producción de proteína se reduce a igual o menos de 50% en comparación con la concentración del agente de selección y amplificación utilizado para el mismo procedimiento utilizando la primera secuencia de polinucleótidos. En una realización adicional, la concentración del agente de selección y amplificación se reduce a menos del 25% en comparación con la concentración del agente de selección y de amplificación utilizado para el mismo procedimiento que utiliza la primera secuencia de polinucleótido, en una realización adicional más, la concentración del agente de selección y amplificación agente se reduce a menos del 5% en comparación con la concentración del agente de selección y amplificación utilizado para el mismo procedimiento que utiliza la primera secuencia de polinucleótidos, en todavía una realización adicional, la concentración del agente de selección y amplificación se reduce a menos del 3% en comparación con los la concentración del agente de selección y amplificación utilizado para el mismo procedimiento que utiliza la primera secuencia de polinucleótido.

45 En una forma de realización de la presente invención se proporciona el uso de una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína terapéutica en la que el índice de adaptación de codones de la secuencia de polinucleótidos es igual o mayor que 0,9 para reducir (i) los niveles requeridos de un agente de selección y amplificación tituable que aumenta el número de copias del gen, (ii) el número de rondas de amplificación, y (iii) el tiempo necesario en un procedimiento para producir una línea celular de mamífero productora de dicha proteína terapéutica. En otra realización, sólo se requiere una ronda de amplificación.

50 En una forma de realización de la presente invención, se proporciona un procedimiento para producir una línea celular de mamífero que produce al menos una proteína terapéutica que comprende las etapas de:

55 (a) transformar una línea celular con una secuencia de polinucleótidos que comprende (i) una secuencia que codifica la proteína terapéutica y tiene un índice de adaptación de codones que es igual o mayor que 0,9, y (ii) una secuencia que codifica un marcador de selección que es capaz de proporcionar la amplificación de la secuencia de polinucleótidos;

(b) proporcionar al menos una ronda de amplificación en presencia de un agente de selección y amplificación; y

(c) seleccionar la línea celular una vez que se alcanza la meseta de la producción de la proteína terapéutica; en el que la concentración del agente de selección y amplificación es 50% o menos de la concentración requerida para alcanzar un rendimiento de producción equivalente, en comparación con una secuencia que codifica la proteína terapéutica y tiene un índice de adaptación codón que es menor que 0,9.

- 5 En una forma de realización, el agente de selección y amplificación es MSX o MTX. En otra realización, se requiere una ronda de amplificación para alcanzar el rendimiento de la producción equivalente. En aún otra realización, el agente de selección y amplificación es MSX o MTX y se requiere una ronda de amplificación para alcanzar el rendimiento de la producción equivalente.
- 10 En una realización de la presente invención, la línea celular de mamífero que se va a transformar es metabólicamente deficiente debido a la interrupción o la inhibición de una enzima celular endógena.
- En una forma de realización adicional de la presente invención, la línea celular de mamífero que se va a transformar es deficiente en una vía de síntesis de nucleósidos.
- En una realización de la presente invención, la proteína terapéutica es un anticuerpo, un derivado del mismo o un fragmento de unión a antígeno.
- 15 En una realización de la presente invención, la proteína terapéutica es un anticuerpo monoclonal.
- En una realización de la presente invención, el marcador de selección es un polinucleótido que codifica la dihidrofolato reductasa (DHFR) y el agente de selección y amplificación es un antifolato. En una realización adicional, el antifolato es metotrexato (MTX).
- 20 En una realización de la presente invención, el marcador de selección es un polinucleótido que codifica la glutamina sintetasa y el agente de selección y amplificación es metionina sulfoximina (MSX).
- En una forma de realización de la presente invención sólo se requiere una ronda de amplificación para alcanzar la meseta de producción de proteínas.
- En una realización de la presente invención, el rendimiento final de proteína terapéutica es mayor que 0,5 g / l en un lote sin alimentar, en una realización adicional más el rendimiento final es mayor que 0,8 g / l en un lote sin alimentar.
- 25 En otra forma de realización de la presente invención, la concentración de MTX utilizado es igual a o menor que 50 nM o menor que 25 nM o menor que 10 nM. En una forma de realización adicional de la presente invención, la concentración de MTX utilizada es 5 nM.
- 30 En otra forma de realización de la invención, sólo una etapa de amplificación, y, por lo tanto, sólo se requiere una concentración del agente de selección y de amplificación en el medio de cultivo celular para alcanzar una meseta de producción de proteínas en las células que se seleccionan en dicho medio de cultivo.
- En el presente documento se describe un anticuerpo producido por el procedimiento de la invención. También se describe un anticuerpo producido por este procedimiento en el que el anticuerpo producido comprende al menos una cadena pesada y que tiene menos de o igual a 5% de la cadena pesada no glicosilada. La cadena pesada del anticuerpo puede estar un 95% glicosilada o un 96% glicosilada o un 97% glicosilada o está un 98% glicosilada o un 35 99% glicosilada. El anticuerpo puede estar un 100% glicosilado. El anticuerpo altamente glicosilado puede ser un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo altamente glicosilado puede ser un anticuerpo anti- β -amilode. El anticuerpo puede tener una secuencia de la cadena pesada de la SEC ID 18 y una secuencia de la cadena ligera de SEC ID N° 19.
- 40 En el presente documento se describe un fragmento de unión al antígeno en el que el fragmento es un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, biespecíficos, diacuerpos, triacuerpo, tetracuerpos, minianticuerpos, minicuerpos, la región variable de la cadena pesada aislada o la región variable de la cadena ligera aislada, proteínas derivadas de suero (por ejemplo, factores de crecimiento, citocinas, albúminas, etc) o fusión combinatoria de los mismos.
- En el presente documento se describe una célula huésped transformada de manera estable que comprende un vector que comprende uno o más casetes de expresión que codifican una cadena pesada y / o una cadena ligera del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, tales células huésped pueden comprender un primer vector que codifica la cadena ligera y un segundo vector que codifica la cadena pesada. Como alternativa, tales casetes de expresión se pueden combinar antes de la liberación.
- 45 En el presente documento se describe una célula huésped en la que la célula es de mamífero. Ejemplos de tales líneas celulares incluyen ovarios de hámster chino, BHK, HEK-293, ONE o PERC6. (para una revisión reciente véase Wurm 2004: Nature Biotechnology 22;11 pp 1393 - 1398). Tales células huésped también pueden contener modificaciones genotípicas y / o fenotípicas ventajosas, por ejemplo la cepa huésped CHO-DG44 tiene copias de su gen dhfr inactivadas mientras que otros huéspedes podrían tener los genes de la glutamina sintetasa inactivados.. Modificaciones alternativa pueden ser la maquinaria enzima implicada en la glicosilación de proteínas (por ejemplo,
- 50

- 5 Yamane-Ohnuki et al, Biotech Bioeng 2004 87: pp 614 - 622, Kanda et al, Journal of Biotechnology, 2007 130: pp 300 - 310, Imai-Nishiya et al BMC Biotechnol, 2007 7:84). Sin embargo, otros pueden tener modificaciones genotípicas y / o fenotípicas ventajosas de apoptosis del huésped, de expresión y de vías de supervivencia (por ejemplo, vías Tey et al Biotechnol Bioeng 2000 68: 31 - 43, Yallop et al Modern Biopharmaceuticals 2005 Chapter 3 pp779 - 807, Nivitchanyang et al Biotechnol Bioeng 2007 98:825 - 41, Figueroa et al Biotechnol Bioeng 2007 97:87 - 92). Estas y otras modificaciones del huésped solo o en combinación, se pueden generar mediante técnicas convencionales, tales como la sobreexpresión de genes no huéspedes o del huésped, enfoques de inactivación de genes, enfoques de silenciamiento de genes (por ejemplo, siRNA) o la evolución y la selección de subcepas con los fenotipos deseados. Dichas técnicas están bien establecidas en la técnica.
- 10 En el presente documento se describe un procedimiento para la producción de una proteína terapéutica, en el que el procedimiento comprende la etapa de cultivar una célula huésped en un medio de cultivo, por ejemplo medio de cultivo sin suero.
- 15 En el presente documento se describe un procedimiento en el que dicha proteína terapéutica se purifica adicionalmente a por lo menos un 95% o mayor (por ejemplo, 98% o mayor) con respecto a dicho medio de cultivo sin suero que contiene el anticuerpo.
- En el presente documento se describe vectores de expresión de mamíferos que contienen marcos de lectura abiertos que poseen puntuaciones del CAI superiores a 0,9 y que codifican anticuerpos, polipéptidos relacionados con los anticuerpos o derivados o fusiones de los mismos.
- 20 En el presente documento se describe una primera línea celular transformada con una segunda secuencia de polinucleótidos que tiene un índice de adaptación de codones que es mayor que una primera secuencia de polinucleótidos en la que el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido codifican la misma proteína terapéutica y que comprende además una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica un marcador de selección que es capaz de proporcionar la amplificación de la primera secuencia de polinucleótidos, en el que dicha primera línea celular produce un rendimiento más alto de dicha proteína terapéutica en comparación con una segunda línea celular transformada con dicho primer polinucleótido que codifica dicha proteína terapéutica cuando se cultivan en un medio seleccionable.
- 25 En el presente documento se describe una segunda línea celular transformada con una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína terapéutica y tiene un índice de adaptación de codones que es mayor que 0,9 y que comprende además una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica un marcador de selección que es capaz de proporcionar amplificación de una segunda secuencia de polinucleótidos, en el que dicha segunda línea celular produce un mayor rendimiento de dicha proteína terapéutica en comparación con una primera de dicha línea celular transformada con un primer polinucleótido que codifica dicha proteína terapéutica en el que dicho primer polinucleótido tiene un índice de adaptación de codones que es menor de 0,9 cuando se cultiva en un medio seleccionable. La puntuación del CAI superior a 0,9 se puede calcular utilizando la puntuación EMBOSS CAI métrica como se describe en la Tabla 6.
- 30 En el presente documento se describe una línea celular que comprende un vector o un casete de expresión de acuerdo con los párrafos anteriores.
- 35 También se describe una línea celular o su progenie que se puede obtener mediante los procedimientos descritos.
- 40 En el presente documento se describen células de mamífero con genomas que contienen marcos de lectura abiertos integrados o mantenidos episómicamente que poseen puntuaciones del CAI superiores a 0,9 (derivados usando la tabla de uso de codones EMBOSS E.human.cut) que codifican anticuerpos, polipéptidos relacionados con los anticuerpos o derivados de los mismos.
- 45 A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, el término "que comprende" y "comprende" incorpora "que consiste en" y "consiste en". Es decir, se pretende que "que comprende" y "comprende" transmitan la posible inclusión de otros elementos o números enteros no citados específicamente, cuando el contexto lo permita.
- 50 A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, el término "meseta de la producción" significa el nivel de expresión alcanzado en cultivos discontinuos sin alimentar extendidos, por el que las rondas adicionales de amplificación típicamente producen un incremento inferior a 2 veces en relación con el clon amplificado de los padres. Cuando los clones se modifican específicamente para producir anticuerpos, los clones que producen entre 0,3 g y 1,5 g por litro en los cultivos estándar de producción sin alimentar extendidos típicamente pueden considerarse como que se aproximan a esta meseta de la producción cuando se utilizan regímenes actuales de cultivos sin alimentar extendidos y recetas de los medios.
- 55 La subclonación de una sola célula de los clones finales que se acercan a la meseta de producción puede llevarse a cabo mediante muchos procedimientos estándar, incluyendo la clasificación de flujo (por ejemplo, el depósito de una célula por pocillo en una placa de 96 pocillos), la recolección de colonias en agar blando, o clonación por dilución límite. Para garantizar el sobrecrecimiento de una sola célula en los pocillos receptores, los medios acondicionados

a veces o los cultivos de alimentación temporal también deben emplearse como soporte del crecimiento de la célula de otra manera solitaria depositada. Si se requieren cocultivos de alimentación, éstos pueden comprender fácilmente células huésped parentales sin vectores seleccionables integrados, como tales células huésped, pueden seleccionarse en contra una vez que el clon de células individuales depositado comienza a dividirse de forma sana.

5 La expresión marco de lectura abierto (ORF) tal como se utiliza a lo largo de esta memoria descriptiva se refiere a la secuencia de codificación de ácido nucleico que codifica una cadena o cadenas polipeptídicas deseadas. Los codones contenidos dentro de tales secuencias de codificación ORF pueden ser contiguos o, alternativamente, pueden contener intrones. Cuando están incluidos, tales intrones o secuencias intermedias normalmente se eliminan mediante reacciones de corte y empalme en la célula huésped antes de la formación del marco de lectura abierto
10 final contiguo en el ARNm maduro.

El "rendimiento" como se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva se refiere a la concentración de un producto (por ejemplo, un polipéptido expresado de forma heteróloga) en solución (por ejemplo, caldo de cultivo o mezcla de lisis celular o tampón) y por lo general se expresa como mg / l o g / l. Un incremento en el rendimiento puede referirse a un aumento absoluto o relativo en la concentración de un producto producido en dos conjuntos
15 definidos de condiciones.

El término unido operativamente se refiere al uso de marcadores de selección y de amplificación empleados para seleccionar células huésped que contienen casetes de expresión que expresan los productos de proteína deseados. Esto se puede lograr por clonación del marcador seleccionable y de amplificación en el mismo plásmido o vector que el que contiene el casete de expresión que expresa la proteína deseada o, alternativamente, se puede liberar en la
20 célula en un plásmido o vector separado.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Una representación esquemática de los vectores basados en el promotor de RSV utilizados en proyecto 2,3,4,5, 6 (a), 6 (b) y 7 (a). Para las evaluaciones basadas en el promotor de EF-1 alfa (de proyecto 6 y 7), el promotor de RSV se sustituyó con un promotor humano derivado de EF-1 alfa más el primer intrón (véase Kim DW 1990 Gene 91: 217 - 23). Este se obtuvo mediante PCR a partir del ADN genómico humano. Este promotor alfa EF-1 se clonó a continuación en estos vectores en lugar de en el promotor basado en RSV.
25

Figura 2: Cadena pesada no adaptada del proyecto 5 con una puntuación CAI de 0,809 CAI y empleado en el proyecto 5 (a) SEC ID N° 10

Figura 3: Cadena ligera no adaptada del proyecto 5 con una puntuación CAI de 0,761 y empleado en el proyecto 5 (a) SEC ID N° 11
30

Figura 4: ORF de la cadena pesada del proyecto 5 (b) con una puntuación del CAI mayor (0,847). Véase Tabla 5. Véase la SEC ID 12

Figura 5: ORF de la cadena ligera del proyecto 5 (b) con una puntuación del CAI mayor (0,833). Véase Tabla 5. Véase la SEC ID 13

Figura 6: ORF de la cadena pesada del proyecto 5 con una puntuación del CAI mayor (0,872). Esta secuencia se empleó en el proyecto de anticuerpo 5 (c). Véase la SEC ID N° 14.
35

Figura 7: ORF de la cadena ligera del proyecto 5 con una puntuación del CAI mayor (0,894). Esta secuencia se empleó en el proyecto de anticuerpo 5 (c). Véase la SEC ID N° 15.

Figura 8: ORF de la cadena pesada del proyecto 5 con una puntuación del CAI mayor (0,982). Esta secuencia se empleó en el proyecto de anticuerpo 5 (d). Véase también la SEC ID 16.
40

Figura 9: ORF de la cadena ligera del proyecto 5 con una puntuación del CAI mayor (0,976). Esta secuencia se empleó en el proyecto de anticuerpo 5 (d). Véase también la SEC ID 17. Figura 10: Niveles de ARN y de proteínas de la cadena pesada y de la cadena ligera para el anticuerpo del proyecto 5.

Figura 11: Metodología de la adaptación de codones con detalles.

Figura 12: Datos del producto de ejemplo NGHC obtenidos durante la selección de clones final del proyecto 5.
45

Figura 13: Título de ejemplo generado de 097-7 (proyecto 5 (d), 5 nM MTX clon elegido CAI HC 0,982, 0,976 LC) con aproximadamente 3 meses de trabajo de desarrollo adicional después de la amplificación y selección de la línea celular final.

Figura 14: Niveles relativos de la proteína y copia del gen de DHFR y la copia del gen Neo observados en células modificadas con ingeniería en diversos proyectos.
50

Descripción detallada

La frecuencia de uso de los codones de los genes que codifican los polipéptidos terapéuticos producidos de acuerdo con la presente invención se mide y se define por el índice de adaptación de codones (CAI).

5 La adaptación de codones es la adaptación de los codones de un marco de lectura abierto a los codones sinónimos preferidos en los genes humanos / de mamífero al tiempo que se evita la introducción de funciones de secuencias secundarias no deseadas que impiden la expresión de los marcos de lectura abiertos resultantes. Los inventores han observado que los codones humanos preferidos son también muy adecuados, incluso cuando está prevista la posterior expresión en células de mamíferos no humanas (por ejemplo, células derivadas de hámster). Sin embargo, si el codón más preferido para un aminoácido dado difiere en una especie de mamífero dada, también se puede usar en lugar de la preferencia humana. La "puntuación del CAI" generada para cada marco de lectura abierto pone de relieve el grado en el que el marco de lectura abierto está adaptado al uso de codones sinónimos más preferidos por los genes humanos / de mamífero.

15 En el contexto de la presente invención, una puntuación del CAI de 1 significa que el codón más óptimo se utiliza para cada aminoácido en cada posición de codón. Para obtener resultados óptimos en los procedimientos de la presente invención, los genes que codifican la proteína terapéutica tienen un CAI que está suficientemente cercano a 1 de tal manera que el nivel deseado de expresión de la proteína terapéutica se logra con significativamente menos agente de selección y amplificación y / o en un tiempo más rápido respecto a lo observado en la expresión de la secuencia de partida de origen natural, por ejemplo, el CAI es al menos 0,9, o al menos 0,95 o al menos 0,975.

20 Sin embargo, no es necesario cambiar todos los codones con los codones más preferidos o reemplazar todos los menos preferidos por los codones más preferidos. El único requisito es que la secuencia resultante posee una puntuación del CAI anormalmente alta y que no contiene elementos de alteración de la expresión. Software disponible en el mercado, como Leto 1.0 (Entelechon, Regensburg, Alemania) puede diseñar una secuencia de puntuación del CAI adecuadamente alta. Para mayor guía de ayuda en el diseño de secuencias adaptadas por codones para su utilización en la presente invención, se han analizado las bases de datos 24044 RefSeq de productos de transcripción humanos (números de acceso NM_prefixed) derivados del genoma del NCBI generado con el número 36. Se calculó el intervalo de puntuación del CAI y fue de 0,593-0,894 con una puntuación media de 0,720. La puntuación más alta (0,894) para un gen conocido y expresado (en lugar de la teórica) en esta base de datos se ha generado con la proteína asociada a queratina 5-8 (KRTAP5-8; NM_021046) y mediante la cubierta cornificada 1A (LCE1A; NM_178348). Además una base de datos de 21182 humana ADNc de IgG reveló que las puntuaciones de IgG van 0,576 hasta 0,878, con un promedio de 0.766. Para ayudar a guiar a los expertos en la técnica, secuencias adecuadas para su uso en la invención podrían poseer puntuaciones del CAI por encima y más allá de la cubierta cronificada tardía 1A (LCE1A; NM_178348). Más preferentemente se deben emplear puntuaciones del CAI de 0,9.

35 Se observó que si la adaptación de codones se llevaba a cabo a través de una secuencia más corta (por ejemplo, sólo la región variable), se observa un mayor nivel de clones de alta producción, aunque, cuando la adaptación de codones se lleva a cabo en la totalidad del marco de lectura abierto, la amplitud (es decir, el número) de clones de alta producción generados se incrementa aún más (véase, la Tabla 5).

40 Debido a la secuencia de codones preferidos, los enfoques típicos de adaptación normalmente, por defecto, también evitarán la introducción de secuencias de inestabilidad de ARN con ARE (elementos ricos en AU, véase Akashi et al Blood 1994; Vol 83 pp 3182 - 3187)) alta puntuación. Sin embargo, de vez en cuando, después de la adaptación de codones existe el requisito de eliminar elementos de secuencias de alteración de la expresión introducidos accidentalmente. Estos incluyen entre otros:

- (i) sitios de corte y empalme funcionales,
- 45 (ii) Áreas de simetría de díada (por ejemplo, secuencias directas, invertidas o palindrómicas) que reducen notablemente los niveles de expresión y / o aumentan las tasas de recombinación entre las secuencias.
- (iii) Secuencias de inestabilidad funcionales.

50 En las raras ocasiones en las que se crean estos elementos perturbadores no deseados durante la adaptación se recomienda usar un codón humano menos preferido, pero no el menos preferido (a menos que la elección sea limitado) para interrumpir la secuencia local para inactivar la función. Las pequeñas desviaciones de las puntuaciones máximas no afectarán significativamente al uso de los marcos de lectura abiertos resultantes en la presente invención.

También se reconoce que si las pequeñas áreas de un marco de lectura abierto siguen siendo no adaptadas (por ejemplo, para conservar los sitios de restricción útiles), por lo tanto, esto no afectará significativamente a la puntuación global del CAI.

55 Si el marco de lectura abierto codifica para una proteína de fusión, híbrida o quimérica, se fomenta el incremento de la puntuación del CAI del mismo modo que se ha descrito anteriormente. Una vez más, esta adaptación hacia codones sinónimos preferidos por la célula huésped para la expresión de genes endógenos altamente expresados

debe llevarse a cabo para todos y cada uno de los componentes del gen o ADN afinDNA afin de los marcos de lectura abiertos fusionados o modificados con ingeniería. Para las secuencias de codificación puramente sintéticas presentes en una proteína (es decir, secuencia para la que no existe ninguna secuencia previa), se aconseja introducir las puntuaciones anormalmente altas del CAI del gen humano precisamente de la misma manera. Los marcos de lectura abiertos con puntuaciones de CAI puntuaciones superiores y más altas de gen humano de la cubierta cornificada tardía 1A deberán emplearse en la presente invención.

La presente invención descrita en el presente documento es la primera en describir un procedimiento de reducir los niveles de un agente seleccionable y de amplificación requerido, el tiempo requerido y el número de ciclos de amplificación requeridos para generar líneas celulares modificadas genéticamente que expresan los niveles deseados de la proteína mediante adaptación por codones de los marcos de lectura abiertos. A través de la utilización de la adaptación de codones para este propósito, se observan rendimientos suficientes en marcos de tiempo más rápidos y, por tanto, se ahorran muchas semanas en las actividades de desarrollo de líneas celulares. Además, los inventores también están generando líneas celulares equivalentes o mejoradas usando concentraciones más bajas del agente de selección y amplificación que lo que los inventores ya han conseguido previamente. De hecho, es probable que cuando tales mejoras como se describe en el presente documento se combinan con el cultivo de células estándar y mejoras de protocolo de la siembra, como los descritos por Celina de la Cruz Edmonds et al (ibid), se observarán otras reducciones en los niveles de selección y agentes de amplificación y una mayor reducción en el tiempo necesario para generar rendimientos equivalentes o mejoradas de líneas celulares modificadas genéticamente.

La presente invención es adecuada para su uso cuando la proteína terapéutica es una glicoproteína. Mientras que el trabajo previo divulga el hecho de que uno puede controlar la glicosilación del producto proteico mediante la modificación de la duración del proceso, la temperatura, el pH, la osmolaridad y los constituyentes y aditivos de los medios etc. (por ejemplo, véase el documento WO2002076578y las referencias citadas en el mismo), los inventores han encontrado que la adaptación de codones de los marcos de lectura abiertos que codifican las secuencias de polipéptidos terapéuticos (en el caso de los polipéptidos terapéuticos de anticuerpos) es capaz de disminuir los niveles de glicosilación incompleta y los niveles de ocupación reducida del sitio de forma independiente del subtipo de células CHO, los regímenes de selección y amplificación o condiciones de los medios de cultivo.

Esta observación sorprendente es la primera en demostrar que uno puede afectar al perfil de glicosilación de las proteínas a través de la adaptación de codones del marco de lectura abierto. Usando los abordajes de adaptación de codones como se describe en el presente documento, por tanto, se puede asegurar un sólido proceso de fabricación que depende de la secuencia del gen en lugar de las condiciones en las que se ha cultivado la célula huésped. A su vez, esto permite una mayor oportunidad para mejorar las condiciones de cultivo y los regímenes de alimentación a través de los medios tradicionales y repeticiones del desarrollo de la alimentación sin excesivos problemas sobre el impacto resultante sobre el glicoperfil del producto.

El grado de adaptación de codones se puede medir usando el procedimiento descrito por primera por Sharp y Li (Nucleic Acid Res 1987 15:1281 - 95). Sharp y Li propusieron la puntuación del índice de adaptación de codones (CAI) que deriva esencialmente de las estadísticas de la preferencia de codones, pero normalizada para cada aminoácido a fin de excluir los efectos de la variación en la composición de aminoácidos entre diferentes genes. Esta métrica del CAI está disponible fácilmente (por ejemplo, a través de EMBOSS La European Molecular Biology Open Software Suite (véase Rice et al 2000: Trends in Genetics 16; pp276 - 277)).

Con el fin de puntuar los marcos de lectura abiertos destinados para uso en la presente invención, se debe usar primero la base de datos de referencia adecuada. En primer lugar se debe considerar la célula huésped que se va a usar, después se deberá identificar la tabla de referencia de uso de codones sinónimos relativos (RSCU) para los genes expresados en dicha célula huésped. Normalmente, las bases de datos RSCU humanos son adecuados para referencia al expresar el marco de lectura abierto en cualquier tipo de células de mamíferos. Un ejemplo de una base de datos es que la proporcionada por EMBOSS, que usa como referencia la tabla de uso de codones EHum.cut para determinar las preferencias de uso de codones en las células humanas. Una tabla de uso de codones de referencia alternativos es la que describen Massaer et al (ibid) en el que se emplea un número más pequeño de genes humanos altamente expresados para determinar la preferencia de codones. Mientras que estas dos tablas de referencia están de acuerdo en términos generales en el codón más preferido, existe una divergencia notable para un aminoácido (arginina). Por lo tanto, a la hora de diseñar los marcos de lectura abiertos para uso en la presente invención es lógico hacer una referencia cruzada de las mismas tablas de uso de codones para (i) determinar los codones más preferidos para incluir en el marco de lectura abierto y (ii) la puntuación CAI del marco de lectura abierto generado posteriormente para garantizar que la puntuación es suficientemente alta como para ser adecuado para su uso en la presente invención. Por ejemplo, si se usa la base de datos de Massaer et al regularmente para diseñar marcos de lectura abiertos para la expresión en células humanas y de mamíferos y, por tanto, se considera que el codón CGC es el más preferido para codificar arginina, es lógico utilizar también estos datos de referencia de preferencia a la hora de determinar la puntuación de CAI de los marcos de lectura abiertos resultantes generados.

La metodología tal como se describe en el presente documento es particularmente adecuada al expresar los anticuerpos o derivados de los mismos y es particularmente eficaz cuando se combina con casetes de expresión dirigidos por el promotor y los elementos de expresión derivados del gen de alfa EF-1. Los casetes de expresión

dirigidos por otros promotores y elementos de expresión (por ejemplo, derivados de la LTR de RSV) también son adecuados. Es bien conocido en la técnica que los elementos de casete de expresión (por ejemplo, promotores, potenciadores, regiones de unión a matriz (MARS), aisladores, regiones no traducidas, secuencias intermedias tales como intrones y sitios de poliadenilación) se pueden combinar en muchas combinaciones diferentes para crear casetes de expresión adecuados para dirigir la expresión de los marcos de lectura abiertos deseados y para dirigir la expresión de los marcadores de selección y de amplificación empleados en la presente invención.

Una vez que los clones en cualquier protocolo de desarrollo de línea celular dado se acercan a una meseta de producción en la producción de lotes sin alimentar extendidos, se observa que las actividades adicionales de laboratorio se enfocan mejor a metodologías tales como (i) clonación de una sola célula de los mejores clones, (ii) desarrollo del proceso por lotes con alimentación, (iii) desarrollos de procesos de estilo de perfusión, (iv) recetas de medios a medida y alimentos, y regímenes y (v) adaptación posterior del cultivo. Por ejemplo, una vez que se alcanza un umbral de producción para un clon individual, sus subclones de una sola célula derivados son normalmente más estables y de alto rendimiento que los clones hija amplificados generados por otros regímenes de selección y amplificación en niveles más estrictos del agente de selección y amplificación. De hecho, el aumento de la selección y amplificación de los clones finales que ya se acercan a un umbral de producción a menudo conducen a inestabilidad y después de las mejoras iniciales, pueden conducir en última instancia a títulos similares o incluso inferiores en cultivos discontinuos del modelo de producción din alimentar extendidos que el clon parental amplificado. Por lo tanto, mientras que se reconoce que, en ocasiones, un evento de amplificación más raro y fortuito puede aumentar los títulos por encima de 2 veces en algunos casos, una vez que se acerca a un umbral de expresión, hay técnicas más fiables que se pueden emplear en su lugar para aumentar aún más títulos estables.

La presente invención se ilustra a continuación con más detalle con los siguientes ejemplos.

Ejemplos

En el pasado, la metodología de selección de DHFR se ha empleado en más de quince proyectos de anticuerpos. En todos los casos, cuando se utiliza esta metodología han sido necesarias al menos dos rondas de amplificación y un mínimo de MTX 50 nM como una presión de selección y mantenimiento para generar líneas celulares con rendimientos adecuados. Los resultados típicos generados en este período de tiempo por esta metodología se representan por los anticuerpos 1, 2, 3 y 4 en la Tabla 1. El proyecto 1 del anticuerpo se llevó a cabo utilizando metodologías estándar disponibles en el momento. Los proyectos de anticuerpos 2-9 se llevaron a cabo de acuerdo con los materiales y procedimientos siguientes.

Se ha estudiado el impacto de la mejora del índice de adaptación de codones (CAI) de los marcos de lectura abiertos.

El primero elegido para la investigación fue el anticuerpo 5. Este estudio involucró a expresar el producto de anticuerpo de los marcos de lectura abiertos de las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos tipo salvaje (es decir, no adaptados por codones) (registrados como anticuerpo 5 (a)), marcos de lectura abiertos de las cadenas pesadas y ligeras con adaptación de codones ampliamente de las secuencias de codificación del dominio variable únicamente (registradas como anticuerpo 5 (b) o 5 (c)) o adaptación de codones de los marcos de lectura abiertos de la cadena pesada y ligera (registrado como anticuerpo 5 (d))(d)). Los resultados de este estudio se presentan en las Tablas 1-5.

Ejemplo 1. Materiales y procedimientos

1.1 Clonación de ADN y Construcción de vectores.

Toda la clonación del ADN se realizó mediante subclonación basada en enzimas de restricción establecida y metodologías de ensamblaje de PCR (véase, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Tercera Edición: Sambrook et al (CSH Laboratory Press)). Se muestran las representaciones esquemáticas de los vectores de expresión y selección (véase la Figura 1). Los vectores mostrados ejemplifican el promotor del RSV, no obstante, se usaron diferentes promotores de acuerdo con la tabla 1. A todos los demás respectos, los vectores permanecieron sin modificar.

1.2 Adaptación de codones

En los proyectos en los que se investigaron las secuencias de ORF adaptadas, estas se generaron usando oligonucleótidos solapantes deseados combinados con la ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de fusión antes de la clonación y la confirmación de la secuencia; todo mediante metodología estándar (véase: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Tercera Edición: Sambrook et al (CSH Laboratory Press) and Stemmer et al., Gene. 164(1):49 - 53, 1995). Las secuencias de las regiones adaptadas de los ORF del proyecto 5 (b) y 5 (c) se diseñaron utilizando la preferencia de uso de codones de Massaer para células humanas / de mamíferos (véase la Figura 11).

Para el proyecto del anticuerpo 5 (d), las secuencias del ORF adaptadas por codones se diseñaron y generaron por el proveedor de servicios de contrato 1. Los ORF resultantes poseían una puntuación CAI >0,9. Las secuencias de adaptadas de codones que codifican los dominios variables de anticuerpos para el proyecto del anticuerpo 6 fueron

diseñados y generados por el proveedor de servicios de contrato 2. Estos dominios variables se combinaron a continuación con las secuencias que codifican los dominios constantes adaptadas por codones del proyecto 5 (d) mediante subclonación estándar con la ayuda de sitios únicos de clonación situados entre las regiones constantes y variables (usando Spel para la cadena pesada, BsiWI para la cadena ligera) (proyectos 6 (b) y 6 (d)). Los ORF resultantes que codifican el anticuerpo de longitud completa para el proyecto 6 (b) y 6 (d) poseían cada uno una puntuación CAI > 0,9. Todos los ORF adaptados por codones del proyecto del anticuerpo 7 fueron diseñados y fabricados por el proveedor de servicios contrato 2 y los ORF resultantes poseían una puntuación CAI > 0,9. Los ORFs de los proyectos 8 y 9 emplearon el algoritmo de software Leto para diseñar la secuencia del dominio variable. Los marcos de lectura abiertos de longitud completa en el marco se generaron después mediante la combinación de estas secuencias con las secuencias de codificación del dominio constante adecuadas (de nuevo, utilizando los sitios Spel y BsiWI como anteriormente); para el anticuerpo 8, las secuencias que codifican los dominios variables se fusionaron con la respectivas secuencias de codificación de dominio constante de proyecto 7. Para el anticuerpo 9, las secuencias de codificación del dominio variable generadas se fusionaron con las respectivas secuencias de codificación del dominio constante del proyecto 6 (d). Una vez más los ORF resultantes que codifican la totalidad de las cadenas pesadas y ligeras para el proyecto de 8 y 9 poseían cada uno puntuaciones CAI > 0,9.

En la figura 11 (A), la secuencia de la cadena ligera que codifica la CDR1 de proyecto del anticuerpo 5 se muestra como una secuencia de muestra representativa. Se muestra la secuencia de aminoácidos de esta CDR. Se muestra un potencial elemento rico en AU de inestabilidad auuuu (ARE) en recuadro y en negrita (véase también Akashi et al Blood 83:pp3182 - 3187). También se destaca el codón de arginina. En primer lugar, el procedimiento de adaptación codones aumentado tuvo como resultado un aumento de la puntuación de CAI a través del ORF. Este anticuerpo se empleó en proyecto 5 (b). Como se muestra este procedimiento incluye la mayoría de los codones preferidos (por ejemplo, para Tyr), pero no en todas las ocasiones (por ejemplo, Leu). En segundo lugar, la puntuación máxima CAI empleó los codones más preferidos de acuerdo con Massaer et al. Esta secuencia se empleó en el proyecto de anticuerpo 5 (c). La secuencia final proporcionada empleó los codones más preferidos de acuerdo con una base de datos más grande, como la disponible en el sitio web de base de datos de uso de codones. Esta secuencia de anticuerpos se empleó en el proyecto 5 (d). En la figura 11 (B), las tablas de preferencia de codones de genes altamente expresados en los seres humanos adaptados de Massaer et al. En la figura 11 (C) La tabla de preferencia de codones de genes humanos adaptados de la bases de datos de uso de codones (www.kazusa.org.jp / codón) para Homo sapiens (que comprenden 89.533 CD (38691091 codones).

Obsérvese que para los ORF de las cadenas pesada y ligera se usaron de forma rutinaria los sitios Hind III (5 ') y EcoR1 (3') para lanzar los marcos de lectura abiertos en los vectores de expresión. Todas las secuencias se confirmaron antes de su uso en la transfección.

Por ejemplo, secuencias, véanse las figuras 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, que registran las secuencias del marco de lectura abierto originales y adaptadas del 5. Obsérvese que en el proyecto 5 solo 5 (d) fue suficientemente adaptado por codones en las regiones de los marcos de lectura abiertos para que la puntuación CAI resultante aumente por encima de 0,9.

Para todas las puntuaciones CAI registradas en el presente documento, se usó la tabla de uso de codones Ehum.cut como referencia (disponible a través de EMBOSS).

Estas puntuaciones se calculan utilizando la aplicación del Índice de Adaptación de Codones que emplea la metodología descrita por primera vez por Sharp y Li (ibid). Esta aplicación es parte de la suite EMBOSS. Versión 2.8.0 archivos de uso de codones Ehum.cut y los ajustes de los parámetros por defecto se usaron para determinar las puntuaciones de CAI de las secuencias.

Tabla 6

Tabla de uso de codones Ehum.cut derivada de EMBOSS . Columna A: Secuencia de codones; Columna B: aminoácido codificado; Columna C: Proporción de uso de un codón dado entre su conjunto redundante; Columna D: Número de codones por 1.000 codones; Columna E: Número de veces que se observó el codón en el conjunto de datos utilizado para derivar la tabla.				
(A)	(B)	(C)	(D)	(E)
GCG	A	0,100	6,950	10994
GCA	A	0,220	15,370	24296
GCT	A	0,270	18,750	29645
GCC	A	0,410	28,340	44818
TGT	C	0,440	9,970	15764
TGC	C	0,560	12,630	19971
GAT	D	0,460	22,530	35629
GAC	D	0,540	26,940	42601

ES 2 473 623 T3

GAA	E	0,420	29,040	45923
GAG	E	0,580	40,670	64302
TTT	F	0,450	16,640	26304
TTC	F	0,550	20,620	32611
GGT	G	0,170	11,880	18792
GGG	G	0,240	16,520	26128
GGA	G	0,250	17,710	28000
GGC	G	0,340	23,940	37852
CAT	H	0,400	9,660	15276
CAC	H	0,600	14,350	22687
ATA	I	0,150	6,920	10941
ATT	I	0,350	16,280	25738
ATC	I	0,500	23,380	36976
AAA	K	0,410	24,120	38145
AAG	K	0,590	34,370	54344
CTA	L	0,070	6,320	9990
TTA	L	0,070	6,400	10123
TTG	L	0,120	11,520	18218
CTT	L	0,130	11,740	18564
CTC	L	0,200	18,690	29552
CTG	L	0,420	38,790	61342
ATG	M	1,000	22,230	35143
AAT	N	0,450	17,340	27422
AAC	N	0,550	21,190	33512
CCG	P	0,110	6,700	10588
CCA	P	0,280	16,810	26574
CCT	P	0,280	16,970	26837
CCC	P	0,330	19,900	31463
CAA	Q	0,260	11,930	18863
CAG	Q	0,740	33,220	52535
CGT	R	0,090	4,770	7535
CGA	R	0,110	6,040	9547
CGC	R	0,200	10,750	17002
AGG	R	0,200	10,780	17049
AGA	R	0,200	10,820	17104
CGG	R	0,200	10,830	17126
TCG	S	0,060	4,390	6942
TCA	S	0,140	11,070	17497
AGT	S	0,150	11,180	17681
TCT	S	0,180	14,120	22320
TCC	S	0,230	17,320	27389
AGC	S	0,250	18,890	29874
ACG	T	0,120	6,550	10364
ACT	T	0,240	13,250	20954
ACA	T	0,270	15,220	24071
ACC	T	0,370	20,980	33176
GTA	V	0,110	6,920	10939

GTT	V	0,170	10,880	17196
GTC	V	0,250	15,440	24415
GTG	V	0,470	29,080	45989
TGG	W	1,000	12,430	19658
TAT	Y	0,430	12,320	19479
TAC	Y	0,570	16,510	26110

1.3 Cultivo celular.

5 Las células CHO DG44 adaptadas a suspensión se pasaron rutinariamente en medios con componentes derivados de animales a los que se habían adaptados previamente. Este medio consistía en una formulación basal que contenía aminoácidos, oligoelementos, vitaminas, glucosa, e hidrolizado de levadura. Este medio también se suplementó con insulina recombinante, lípidos y nucleósidos. Como también se añadió bicarbonato sódico a los medios. En la técnica se conocen muchas recetas de medios sin componentes derivados de animales. La selección inicial de células transformadas con vector se sometió a retirada de nucleósidos (selección con DHFR) y adición de G418 (para selección con neomicina fosfotransferasa). Para la clasificación del título, los títulos de ensayo de 96 pocillos eran propensos a la variación inducida por el crecimiento celular, los números de siembra, los volúmenes de dispensación de medios de comunicación y la cinética de evaporación a través de una placa. Como consecuencia, los títulos que se generan en los modelos de producción en matraces de agitación fueron más indicativos del orden de clasificación de la línea celular en líneas celulares de alto rendimiento, amplificadas. Para este tipo de modelos, todas las células se sembraron a la misma densidad inicial. En tales modelos, también se monitorizaron la viabilidad y el crecimiento.

1.4 Preparación de ADN antes de la transfección

20 Cantidades iguales (15 µg) del vector de expresión de la cadena pesada y la expresión de la cadena ligera se linealizaron hasta su finalización (con Not I) en una reacción de Eppendorf con volumen 200 µl y después se precipitó en etanol / acetato de sodio. El sedimento se lavó después en etanol al 70%, se secó al aire y se resuspendió en 50 µl de agua de calidad para biología molecular.

1.5 Preparación de células CHO DG44 antes de la transfección

25 2×10^7 células (por transfección) de las células en crecimiento sanas se centrifugaron (1.000 rpm durante 2-10 minutos) en un tubo de 15 o 50 ml, se lavaron en 15 ml de PBS enfriado con hielo / sacarosa, se centrifugaron de nuevo y después se resuspendieron en 800 µl de PBS enfriado con hielo / sacarosa. A continuación, esta suspensión celular se añadió al ADN preparado anteriormente y se dejó en hielo durante 15 minutos antes de ser transferido a una cubeta de electroporación enfriada.

1.6 Electroporación

30 La cubeta que contenía el ADN preparado y las células se sometió a electroporación en un Gene Pulser fijado a 25µF y 0,38 kV y luego de devolvió al hielo durante 10 minutos. Después se extrajeron las células y se añadieron a 240-mls de medio no selectivo y a continuación se introdujeron en placas en medio no selectivo en 40 x placas de 96 pocillos a $2-5 \times 10^3$ células por pocillo (es decir, 50 µl por pocillo). Las placas se envolvieron después en papel de aluminio y se incubaron a 37 ° C y 5% de CO₂ durante 48 horas.

1.7 Selección, amplificación e identificación del clon

35 48 horas después de la electroporación, se añadieron 150 µl de medios selectivos a cada pocillo. Este medio selectivo contiene G418 y ningún nucleósido. Una vez a la semana a partir de entonces, 140 µl de medio se intercambiaron cuidadosamente por medio selectivo fresco sin alterar la capa de células sedimentadas y después de 3-4 semanas, todos los clones en crecimiento (normalmente un crecimiento del 0,1 colonias por pocillo, es decir, el crecimiento en 10 pocillos por placa de 96 pocillos) se titularon para la producción de anticuerpos. Los clones de clasificación superior (normalmente 20-100) identificados se escalaron en el mismo medio selectivo a través de placas de 24 pocillos y a placas de 6 pocillos. Estos clones se sembraron después a 1.000 células / por pocillo en una placa de 96 pocillos (96 pocillos por clon) y a continuación se seleccionan en medios selectivos que también contenían metotrexato 5 nM en un volumen de 200 µl por pocillo. Después de dos a tres semanas de incubación adicional, los mejores clones se escalaron de nuevo y se volvieron a sembrar a 1.000 células por pocillo, pero en MTX 50 nM. Estos clones también se sometieron a detección selectiva en placas de 96 pocillos después de 2-3 semanas de crecimiento y el mejor ampliado y después se sembraron en placas a 1.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos pero con MTX 150 nM. Con el fin de evaluar los clones finales para el potencial de producción, los mejores clones en MTX 150 nM se ampliaron y evaluaron en modelos de producción en matraz de agitación para titulación y calidad del producto generado. El mejor clon para el proyecto 5 (a) era un clon marcado 17-9-6-1. Esto

generó 0,3 g por litro de título final en los modelos de producción sin alimentar.

NB. Los niveles de metotrexato y el número de rondas de amplificación necesarios en la etapa 1.7 variaba en función del proyecto y de si las secuencias estaban adaptadas por codones.

1.8 Análisis de titulación.

5 Para las muestras de los medios obtenidas de placas de 96 pocillos, se determinó el título de anticuerpos mediante metodología de estilo ELISA de tipo sándwich automatizado en placa de 96 pocillos en un analizador IGEN M-Series M8/384 (BioVeris, Maryland, EE.UU.) con las recomendaciones del fabricante y las metodologías estándar. El sándwich consistió en fragmentos F(ab)₂ marcados con perlas recubiertas magnéticas revestidas con estreptavidina, proteína A biotilada y rutenio. A continuación, la señal generada por la muestra de ensayo se comparó con una dilución en serie del patrón de referencia del anticuerpo. Mientras que un ensayo altamente sensible, debido a variaciones en el ensayo combinado con variables de crecimiento de células en cultivos de 96 pocillos, la precisión intermedia y la reproducibilidad del ensayo son relativamente bajos para este ensayo de líneas celulares de alto rendimiento, amplificadas. Para las muestras de los medios obtenidas durante la producción en matraz de agitación y biorreactor, el título de anticuerpos se midió con la ayuda de un método nefelométrico en el que una señal de luz se dispersa por la inmuno-precipitina insoluble en la solución de reacción utilizando un sistema de imagen de Beckman Coulter (Buckinghamshire, Inglaterra) y de las recomendaciones y metodologías estándar del fabricante. A continuación, la señal generada por la muestra de ensayo se comparó de nuevo con una dilución en serie del patrón de referencia del anticuerpo. Todos los títulos indicados son aproximados.

1.9 Modelos en matraz de agitación con biorreactor (modelos de producción por lotes sin alimentar extendidos).

20 Típicamente, las células se sembraron en cultivo tisular de 250 ml estándar en matraces de agitación a 800.000 células por ml con tapas ventiladas que contienen medios sin componentes derivados de animales y hasta un volumen total de 120 ml. Estos matraces se incubaron después con agitación en aire enriquecido con dióxido de carbono y se establecieron temperaturas para alentar y sostener el crecimiento celular. Varias condiciones se analizaron para cada clon, por ejemplo en varias condiciones de temperatura. En los resultados presentados en el presente documento se ejemplifica el título más alto para cada clon (mediante condiciones estándar) analizado. Normalmente los títulos del punto final del modelo de producción como se indican en el presente documento se registraron en el punto en el que la viabilidad celular se reduce a aproximadamente el 50% según se determinó mediante el ensayo de exclusión con de azul tripán de en un Vi-Cell (Beckman) usando los ajustes de parámetros estándar Vi-celulares CHO y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Normalmente esta variable título se genera después de 10-20 días de incubación.

1.10 Metodología del cultivo en biorreactor.

En todo momento se usaron metodologías de cultivo del biorreactor estándar y equipos. Típicamente, para generar un tren de semillas, las células se ampliaron en volúmenes más grandes y se pasaron dos veces a la semana en un régimen de 3 días repetido, después de 4 días. Para el trabajo que se muestra en la Figura 13, las células de semillas se utilizaron después para inocular en biorreactores de mesa de 3 litros Applikon (volumen de trabajo de 2 litros) se sometieron a las siguientes condiciones de proceso: Temperatura de 34 ° C, el punto de pH es 6,95, punto fijado de DO 30%. Al igual que con los modelos de frasco en agitación, los cultivos se extendieron hasta que la viabilidad celular se redujo a aproximadamente el 50%. Estos biorreactores imitan ampliamente el título del punto dinal del matraz en agitación, así como biorreactores de mayor tamaño que se utilizan para suministrar material de ensayo clínico, etc.

1.11 Análisis 1RT-QPCR (para los resultados, véase la Figura 10).

Las extracciones de ARN de CHO y las reacciones de RT-cPCR se llevaron a cabo mediante extracción de sílice automatizada utilizando el kit de aislamiento de ARN de alto rendimiento y ARN y MagNA Pure (Roche) y los protocolos. Después de la transcripción inversa usando hexámeros aleatorios, la reacción de PCR se llevó a cabo usando un ABI-7700 (Applied Biosystems) y se analizaron mediante el algoritmo de cuantificación relativa $\Delta\Delta CT$ utilizando metodología estándar. Las reacciones se multiplexaron (18S + gen diana [cadena pesada / cadena ligera]), siendo 18S la diana más abundante como cebador limitado para evitar la inhibición de las reacciones de destino. Las sondas y los pares de cebadores flanqueantes empleadas para Q-PCR se utilizaron de acuerdo con las SEQ ID. N° 1-9.

50 Obsérvese que las sondas/cebadores de la cadena pesada y la cadena ligera anteriores no eran adecuadas para su uso con el proyecto 5 (d) debido al aumento de la adaptación de codones del ORF llevado a cabo en este proyecto, por tanto, su exclusión de la Figura 10 (A).

1.12 Análisis de transferencia de tipo Western (para los resultados, véase la Figura 10).

55 Se usó metodología estándar y se describe en detalle en otra parte (por ejemplo, véase Sambrook et al ibid). En resumen, los extractos de células equivalentes policlonales se realizaron usando el tampón de extracción de proteínas y lisis celular. Cantidades iguales de cada extracto se incubaron después con calor. Se usó tampón de carga de Laemmli y después se cargó y se pasó por geles de SDS-PAGE con tampón de carrera de Tris-glicina para

separar las fracciones de proteína. Una vez separadas, las proteínas se sometieron después a electrotransferencia sobre membranas de nitrocelulosa y después se sondaron con una IgG anti-humana entera (HRP conjugado). Se generó una señal mediante incubación con un sustrato de HRP y se registró con una película de rayos X. Una exposición adicional se requirió para detectar el producto de la cadena ligera de anticuerpos para el proyecto 5 (a).

- 5 1.13 Tinción con metotrexato fluorescente para determinar los niveles de DHFR en los clones que producen la proteína recombinante deseada

10 Cada clon se cultivó sin metotrexato durante 4-5 días antes de la adición de Alexa-Fluor 488 10 μ M - Metotrexato (Molecular Probes / Invitrogen, Paisley) durante 18 – 22 horas a 37 ° C con 5% de CO₂ a 700.000 de células vivas. Las células teñidas se recogieron a continuación y se lavaron con medios y se incubaron a 37 ° C, 5% de CO₂ durante 30 minutos. Las células cosechadas se lavaron de nuevo con los medios de comunicación y a continuación se volvieron a suspender en los medios, se filtraron y se añadió el colorante de exclusión de vivas/muertas yoduro de propidio (Sigma, St Louis) antes de analizar en BD FACS ARIA. Los datos mostrados en la Figura 14 (A) son sólo del conjunto de células vivas.

1.14 Análisis qPCR del ADN genómico para determinar los niveles de DHFR y Neo.

- 15 La extracción de ADN genómico de CHO se realizó usando kits estándar de Qiagen. Después de la cuantificación y normalización del ADN usando una lectura en espectrofotómetro, la reacción de PCR se llevó a cabo usando un ABI-7700 (Applied Biosystems) y se analizaron mediante el algoritmo de cuantificación relativa $\Delta\Delta$ CT utilizando metodología estándar. Las sondas y los pares de cebadores flanqueantes empleadas para Q-PCR se utilizaron de acuerdo con las SEQ ID. N° 20 – 25 se muestran en la Figura 14 (B).

20 **Ejemplo 2. Expresión de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo monoclonal en células CHO**

25 Sorprendentemente, mientras que la alta puntuación CAI de los ORF, pero aún así puntuación natural (es decir, puntuación inferior a la de los ORF humanos naturales más alta observada, tal como la cubierta cornificada tardía aLCE1A; NM 1783480) de proyecto 5 (c) generó un título más alto que la puntuación CAI artificialmente alta de los marcos de lectura abiertos del proyecto 5 (d), mejoró la amplitud (número) de los altos productores en 5 (d) (véase la Tabla 5). Los mejores clones de 5 (a), (c) y (d) se amplificaron después y se evaluaron adicionalmente. Para esta nueva evaluación, los clones 5 (a) progresaron como el control y para representar los títulos del proyecto típico observado antes de los resultados descritos en el presente documento. Los resultados de este trabajo generaron una alta producción, clon estable (título y el crecimiento observado durante 40 pases) del proyecto 5 (d) en un tiempo inesperadamente rápido y con niveles reducidos de amplificación. De hecho, los niveles de metotrexato requeridos para generar la línea celular final de 5 (d) fueron significativamente menores (97% menos de metotrexato) con respecto a los requeridos para generar líneas celulares equivalentes que expresan niveles equivalentes similares o inferiores de la misma proteína producto de los marcos de lectura abiertos no adaptados por codones del proyecto 5 (a) (véase la Tabla 1). Un análisis más detallado se llevó a cabo - Véanse las Tablas 2-4.

35 Para investigar si las propiedades de unión de las proteínas recombinantes resultantes generadas por ORF puntuados con CAI modificado se vieron afectados por la adaptación de codones, las características de unión se compararon y analizaron para el anticuerpo de proyecto 5 codificado por cualquier ORF de la puntuación CAI 0,809 (HC) / 0,761 (LC) o ORF de la puntuación CAI 0,982 (HC) / 0,976 (LC). Ambos materiales se generaron en biorreactores y después se purificaron mediante regímenes de purificación equivalentes. Mediante esta comparación se demostró que las características de unión del anticuerpo no se vieron afectados por las alteraciones del CAI a los ORF que codifican este anticuerpo.

40 Del proyecto 5 (d), el clon más productor 097-7, como se muestra en la Tabla 1, se clonó en una sola célula para asegurar la clonalidad de la línea celular, con el título resultante del mejor subclon que genera un incremento cercano a por 2 veces en cultivos discontinuos extendidos sin alimentar respecto al parental no clonado. Los títulos mostrados en la Figura 13 se generan a partir de cultivos por lotes sin alimentar en dos biorreactores de mesa de 3-litros Applikon como se describe en 1.10.

Tabla 1.

50 Para cada proyecto, se presenta el clon final elegida para el posterior desarrollo e introducción en el banco. También se destacan los títulos de 96 pocillos (ng / ml) generados para cada clon final en cada etapa de este desarrollo de líneas celulares. Los datos típicos generados con anterioridad a los resultados como se describe en el presente documento se representan como proyectos de anticuerpos 1, 2, 3 y 4. Obsérvese que el proyecto 2 y el proyecto 4 expresan el mismo producto. Para los proyecto 2 y 4 todas las actividades se llevaron a cabo en dos laboratorios independientes que usan los mismos vectores, células huésped y protocolos, pero operadores de laboratorio y equipos diferentes. Todos los títulos mostrados a continuación a MTX 0, 5, 50 y 150 nM son los generados en la etapa de 96 pocillos. Titulaciones más altas no mostraron una mejor significativa en los modelos de producción por lotes y, por tanto, progresó el clon de MTX menor (véase la Tabla 2). FIO = solo a título indicativo, no necesario. El proyecto 6 (a) se interrumpió antes de llegar a la meseta debido a que se alcanzaron mejores títulos de los proyectos 6 (b) -6 (d).

Tabla 1

Anticuerpo	1	2	3	4	5 (a)	5 (d)	6 (a)	6 (b)	6 (c)	6 (d)	7 (a)	7 (b)	8	9
Mejor clon final	ACC522(L4)	15-27-4	C9-13-9	129-13-1 (DRC349)	17-9-6-1	097-7	141-6-4 (mejor título A2 de 96 pocillos)	280-9-6	58-3-3	P100-1	C65-5	74-3	454-6	390-8
MTX 0nM	120	110	20	41	12	340	16	78	76	2350	64	2054	1280	2055
MTX 5nM	530	180	150	920	32	880	72	1140	1160	2025	5700	2125	1690	14055
MTX 50nM	1720	1240	490	5231	310	6700 (FIO)	438	4170	5775	No necesario	No necesario	No necesario	No necesario	
MTX 150nM	No necesario	No necesario	1910	23000	1670	No necesario	No realizado-requerido	No necesario						
¿Optimizado por codones?	No	No	No	No	No	Sí	No	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Promotor	CMV	RSV	RSV	RSV	RSV	RSV	RSV	RSV	EF-1a	EF-1a	RSV	EF-1a	EF-1a	EF-1A
CAI (Cadena pesada)	0.679	0.811	0.814	0.811	0.809	0.982	0.818	0.976	0.818	0.976	0.977	0.977	0.954	0.975
CAI (Cadena ligera)	0.674	0.767	0.763	0.767	0.761	0.976	0.755	0.978	0.755	0.978	0.973	0.973	0.919	0.973

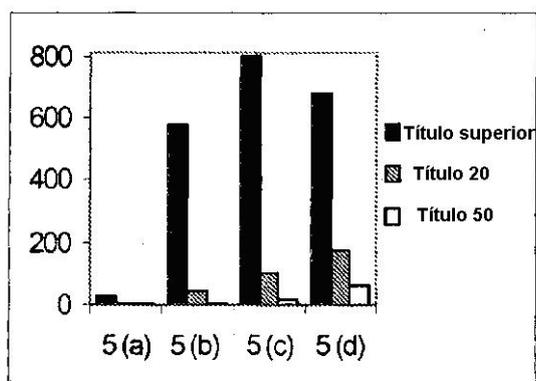
Anticuerpo	1	2	3	4	5 (a)	5 (d)	6 (a)	6 (b)	6 (c)	6 (d)	7 (a)	7 (b)	8	9
Semanas para generar la última línea en 96 pocillos	-15	12	19,5	18	19	7	> 15	14	~15	10	8,5	8,5	7,5	8
Modelo de biorreactor de producción sin alimentar (% MTX)	0,3 g (100 %)	0,3 g (100 %)	0,5 g (300 %)	0,9 g (300 %)	0,2 g (300 %)	0,7 g (10 %)	No determinado a < 0,1 g (100 %)	0,5 g (100 %)	0,9 g (100 %)	0,9 g (10 %)	0,4 g (10 %)	0,5 g (10 %)	0,6 g (10 %)	2,2 g (10 %)

Tabla 5

5 Comparación de títulos de los clones no amplificados generados mediante protocolo de transfección y selección estándar y después seleccionados con retirada de nucleósidos y adición de G418. Todas las líneas celulares contienen los mismos vectores que expresan el mismo anticuerpo (del proyecto 5), pero de los marcos de lectura abiertos que codifican con diferentes puntuaciones del CAI. Para el proyecto 5 (a) (no optimizado) se realizaron tres transfecciones adicionales, pero no se muestran ya que los resultados eran esencialmente los iniciales. En la Figura (A), “% título > 5 ng” hace referencia al % de los pocillos tras el registro de detección selectiva por encima de 5 ng/ml. El “% título > 50 ng” hace referencia al % de los pocillos tras el registro de detección selectiva por encima de 50 ng/ml. “Título superior” se refiere a la puntuación más alta de todos los sometidos a selección. “Valor 50^a” se refiere al 50^a mejor título sometido a selección. “Valor 20^a” se refiere al 20^a mejor título sometido a selección. En (B), los resultados promedio para los títulos superiores, 20^a y 50^a indicados en (A) se representan en formato de histograma.

(A)

Transfección	PUNTUACIÓN HCCAI	PUNTUACIÓN LHCCAI	% con título > 5 ng/ml	% con título > 50 ng/ml	Título superior	Valor 50 ^a	Valor 20 ^a
1	0,809	0,761	23	0	43	6	8
2	0,809	0,761	26	0	16	5	6
3	0,809	0,761	26	0	23	6	7
4	0,847	0,833	43	7	376	2	17
5	0,847	0,833	62	24	778	9	76
6	0,872	0,894	47	20	674	23	105
7	0,872	0,894	63	30	923	12	103
8	0,982	0,976	57	25	706	46	178
9	0,982	0,976	82	61	653	80	171



15

Tabla 3

Análisis detallado del título en placas de 96 pocillos de los proyectos que se muestran en la Tabla 1. Título del menor clon y del clon 50 se muestra después de la selección con adición de G418 y retirada nucleósido pero sin adición de metotrexato.

Proyecto	¿Adaptación de codones?	Promotor usado para dirigir la expresión de los ORF de anticuerpos	Título superior (ng/ml)	Título 50 (ng/ml)
2	No	RSV	130	2 (22nd)
3	No	RSV	71	12
4	No	RSV	152	22
5 (a)	No	RSV	43	6
5 (d)	Yes	RSV	653	80
6 (a)	No	RSV	116	14

Análisis detallado del título en placas de 96 pocillos de los proyectos que se muestran en la Tabla 1. Título del menor clon y del clon 50 se muestra después de la selección con adición de G418 y retirada nucleósido pero sin adición de metotrexato.

Proyecto	¿Adaptación de codones?	Promotor usado para dirigir la expresión de los ORF de anticuerpos	Título superior (ng/ml)	Título 50 (ng/ml)
6 (b)	Yes	RSV	840	89
6 (c)	No	EF-1a	1153	87
6 (d)	Yes	EF-1a	2499	1426
7 (a)	Yes	RSV	830	50
7 (b)	Yes	EF-1a	3467	528
8	Yes	EF-1a	4090	739
9	Yes	EF-1a	3108	573

Tabla 4

Los mejores 20-100 clones como se observa en los proyectos 5 y 6 se escalaron a las placas de 6 pocillos antes de volver a sembrarse en placas de 96 pocillos en medios que contienen metotrexato 5nM. La media y los títulos altos de los clones en crecimiento observados en los experimentos 5 y 6 a las concentraciones 5nM (A1) y 50nM (A2) del metotrexato antifolato en placas de 96 pocillos se muestran a continuación.

Proyecto	A1 MTX 5nm		A2 MTX 50nm	
	Título medio	Título máximo	Título medio	Max Titre
5 (a)	42	253	137	452
5 (d)	626	1760	1130	9500
6 (a)	134	316	129	809
6 (b)	761	6340	2525	15030
6 (c)	593	2592	949	3884
6 (d)	1012	5075	3017	12360

Tabla 2

- 5 Ejemplos de mesetas de producción; Ejemplo (A), el clon elegido final para el proyecto 5 (d) se amplificó adicionalmente en MTX 50nM. Se muestran los títulos de los modelos de producción sin alimentar (sombreado) y el título más alto resultante de los clones hija "amplificados". También se muestran ejemplos similares (8, C, O, E, F, G). Para cada ejemplo se registra el título más alto del clon hija y su amplificación posterior. Esto demuestra que
- 10 alcanzar títulos más altos es más beneficioso que intentar alcanzar títulos más altos mediante rondas de amplificación.

Ejemplo	Línea celular	Niveles de MTX	Títulos en 96 pocillos (ng/ml)	Títulos finales del modelo de producción (mg/l)	% cambios en los títulos finales del modelo de producción tras la amplificación adicional
Ejemplo A: Clon elegido del	097-7	5 nM	880	690	
	097-7-1	50 nM	6700	550	-20 %

Ejemplo	Línea celular	Niveles de MTX	Títulos en 96 pocillos (ng/ml)	Títulos finales del modelo de producción (mg/l)	% cambios en los títulos finales del modelo de producción tras la amplificación adicional
proyecto 5 (d)	097-7-3	50 nM	3300	216	-69 %
	097-7-5	50 nM	3100	615	-11 %
	097-7-6	50 nM	1900	566	-18 %
Ejemplo B: Clon elegido del proyecto 6 (d)	P100-1	5 nM	2025	901	
	P100-1-8	50 nM	4570	499	-45 %
Ejemplo C: Clon no elegido del proyecto 6 (d)	P100-6	5 nM	1435	468	
	P100-6-8	50 nM	5650	125	-73 %
Ejemplo D: Clon no elegido del proyecto 6 (d)	P634-2	5 nM	3205	692	
	P634-2-4	50 nM	3685	369	-47 %
Ejemplo E: Clon no elegido del proyecto 6 (d)	P502-1	5 nM	2385	357	
	P502-1-4	50 nM	5325	157	-56 %
Ejemplo F Clon elegido del proyecto 7 (a)	O65-5	5 nM	5700	400	
	O65-5-7	50 nM	4515	168	-58 %
Ejemplo G: Clon elegido del proyecto 7 (b)	74-3	5 nM	2125	488	
	74-3-3	50 nM	820	239	-51 %

Ejemplo 3. Anticuerpos 6 y 7 y el promotor de EF-1a

La adaptación de codones de los marcos de lectura abiertos de las cadenas pesada y ligera para el anticuerpo 6 se llevó a cabo, de nuevo para generar puntuaciones finales CAI a través de los ORF > 0,9.(véase la Tabla 1.). Los marcos de lectura abiertos adaptados por codones y de partida/silvestre se expresaron en vectores de expresión del promotor basado en RSV así como un vector de expresión en base al promotor del factor de elongación humano 1 (EF-1a) en la que el aislante de acción en cis, el potenciado y los elementos de expresión del promotor se suministran en su lugar de una fuente de promotor no viral. Los resultados de este trabajo de nuevo demostraron que era necesario significativamente menos metotrexato para generar una línea celular final de alta producción cuando el marco de lectura abierto de la proteína deseada se adaptó por codones primero. De hecho, la transfección 6 (a) en la que el anticuerpo 6 estaba codificada por ORF no adaptados (es decir, con una puntuación CAI < 0,9) se abandonó en la etapa de MTX 5 nM antes de la generación de las células que se acercan a una meseta de producción. El régimen de la amplificación no se persiguió adicionalmente en la transfección 6 (a), ya que era evidente que se habrán necesitado significativamente más recursos y tiempo para generar líneas celulares capaces de producir rendimientos equivalentes de proteínas en relación a los rendimientos ya obtenidos de las líneas celulares en las que se han empleado ORF > 0,9 habían (es decir, las transfecciones 6 (b) y 6 (d)). Por otra parte, al comparar de igual a igual vectores 'más o menos adaptación por codones, se observó que la adaptación por codones siempre reducía los niveles antifolato requeridos. Una vez más, para el proyecto 7, la adaptación por codones se llevó a cabo de una manera similar al proyecto 6 (véase la Tabla 1) y los ORF adaptados por codones (CA > 0,9) se expresaron en un RSV así como en un vector de expresión basado en el promotor de EF-1a. Una vez más, y con independencia del promotor, se generaron líneas celulares de alto rendimiento equivalentes en un tiempo más rápido y con menos metotrexato de los ORF adaptados por CAI en comparación con todos los proyectos anteriores en los que se emplearon los ORF no adaptados para codificar los productos recombinantes (que se resumen en la Tabla 1).

Ejemplo 4. Niveles de mRNA

Para investigar más a fondo esta metodología, el impacto de la adaptación por codones a los niveles de ARNm generados se investigaron en las poblaciones de células policlonales de igual a igual que expresan el mismo producto (el anticuerpo de proyecto 5) a partir de los mismos vectores pero a partir de marcos de lectura abiertos

que indican diferentes puntuaciones de CAI.

Las células CHO se cotransfectaron con vectores de expresión que codifican la cadena pesada (HC) y la cadena que codifican el mismo producto de proteína (anticuerpo del proyecto 5). Cada población transfectada se mantuvo como conjuntos policlonales. Cada par de vectores codifica la misma cadena pesada (HC) y cadena ligera (LC) del anticuerpo pero a partir de marcos de lectura abiertos con diferentes puntuaciones de CAI.

Los resultados de este experimento se capturan en la figura 10 y revelan que se observa un aumento significativo de los niveles de ARNm cuando la puntuación de CAI se eleva para el mensaje de la cadena pesada y ligera respecto a los controles no adaptados. Un aumento equivalente en los niveles de ARN (respecto a la secuencia no adaptada) se produjo en todas las secuencias adaptadas analizadas. Del mismo modo, y dentro de los límites del ensayo de transferencia de tipo Western, se observó un aumento equivalente en los niveles de proteínas intracelulares para todas las secuencias adaptadas. Sin embargo, mientras que dicha equivalencia se observó en los niveles de proteínas intracelulares, no había diferencia en los niveles secretados. Se observó que las células que contienen los marcos de lectura abiertos de puntuación CAI anormalmente alta generaron títulos policlonales más altos. Esto apoya adicionalmente la conclusión de que la amplitud de los clones de producción alta se mejora cuando se usan marcos de lectura abiertos de puntuación CAI anormalmente alta en los protocolos de desarrollo de líneas celulares.

Figura 10

(A): Niveles de ARN intracelulares del mensaje de HC y LC medido mediante RT Q-PCR: Todas las señales normalizadas con respecto al ARN ribosómico y aumentadas son en relación a las señales generadas para el inicio de los vectores de HC y LC codificados por los marcos de lectura abiertos no adaptados por codones. Eje Y: Los valores aumentan de 0 a 50 veces en la señal de ARN. Eje X: a (h) representa la señal HC del control negativo generada a partir de extractos de ARN extraídos de las células no transfectadas (por duplicado); b (h) representa la señal HC generada a partir de extractos de ARN derivados de las células transfectadas con vectores de expresión de HC y LC no adaptados por codones, tal como se utiliza para el proyecto 5 (a) (las puntuaciones CAI de 0,809 para HC y 0,761 para LC); c (h) representa la señal HC generada a partir de extractos de ARN derivados de las células transfectadas con vectores de expresión de HC y CL adaptados por codones, tal como se utiliza para el proyecto 5 (b) (puntuaciones de CAI de 0,847 para HC y 0,833 para LC); d (h) representa la señal HC generada a partir de extractos de ARN derivados de las células transfectadas con otros vectores de expresión de HC y CL adaptados por codones, como se usa para el proyecto 5 (c) (puntuaciones CAI de 0,872 para la HC y 0,894 para el LC). Las señales de la cadena ligera generadas a partir de los mismos extractos de ARN como se describe anteriormente se muestran como a(l), b(l), c(l) y d(l) respectivamente.

(B): Análisis de transferencia de tipo Western; los extractos de células equivalentes se separaron mediante SDS-PAGE, se transfirieron e interrogaron con anticuerpos anti-producto (conjugados con HRP). El control de las células no transfectadas se muestra en el carril 1. Las células policlonales que expresan los marcos de lectura abiertos de la cadena pesada y ligera del siguiente modo; Carril 2 y 3; HC con una puntuación CAI 0,809 y LC con una puntuación de CAI 0,761 (proteína expresada a partir experimento b (h) y b (i) anterior, los vectores equivalentes a los usados en el proyecto 5 (a).; Carril 4 y 5; HC con una puntuación de CAI de 0,847 y LC con una puntuación de CAI de 0,833 (proteína expresada a partir del experimento c (h) y c (i) anterior, los vectores equivalentes a los utilizados en el proyecto 5 (b); los carriles 6 y 7; HC con una puntuación de CAI de 0,872 CAI y LC con una puntuación de CAI 0,894 (proteína expresada a partir del experimento d (h) y d (l) anterior, los vectores equivalentes a los utilizados en el proyecto 5 (c); carriles 8 y 9; HC con una puntuación de CAI de 0,982 y LC con una puntuación de CAI de 0,976 (proteína expresada por los vectores equivalentes a los utilizados en el proyecto 5 (d).

(C) Títulos del producto a 24 horas indicados en ng/ml para las células policlonales descritas en la Figura 10 (B).

Ejemplo 5. Diferentes procedimientos para alcanzar un CAI elevado. Ejemplo (a) Proyecto 8 y ejemplo (b) Proyecto 9.

a) Para el proyecto 8 se utilizó el software Leto para diseñar los dominios variables. Estos se condensaron después a los dominios constantes idénticos previamente generados para el proyecto 7 con ayuda de digestión con enzimas de restricción estándar y metodología de ligación. Los ORF de la cadena pesada y la cadena ligera resultantes tuvieron una puntuación de 0,954 y 0,919 respectivamente. Estos datos se usaron después en un proyecto de desarrollo de línea celular y una vez más se generaron líneas celulares de alto rendimiento en un marco de tiempo más rápido y con menos metotrexato que lo empleado anteriormente antes de la adaptación de codones (véase la Tabla 1)

a) Para el proyecto 9 se utilizó de nuevo el software Leto para diseñar los dominios variables. Estos se condensaron después a los dominios constantes idénticos previamente generados para el proyecto 6 (d) con ayuda de digestión con enzimas de restricción estándar y metodología de ligación. Los ORF de la cadena pesada y la cadena ligera resultantes tuvieron una puntuación de 0,975 y 0,973 respectivamente. Estos datos se usaron después en un proyecto de desarrollo de línea celular y una vez más se generaron líneas celulares de

alto rendimiento en un marco de tiempo más rápido y con menos metotrexato que lo empleado anteriormente antes de la adaptación de codones (véase la Tabla 1)

Ejemplo 6 Impacto sobre la glicosilación

5 Se observó que los niveles de la cadena pesada no glicosilada (NGHC) fueron significativamente más bajos cuando se expresaron a partir de marcos de lectura abiertos adaptados por codones respecto a los niveles generados cuando se expresaron a partir de marcos de lectura abiertos no adaptados a pesar de que se usó el mismo huésped, medios de cultivo y sistema de selección con DHFR y amplificación para la expresión en ambas situaciones. Aún más interesante, también se observaron niveles altos similares de NGHC cuando los mismos marcos de lectura abiertos no adaptados se expresaron lugar en diferentes células huésped que se emplean en diferentes condiciones de cultivo y vectores de diferentes y distintivos regímenes de selección y amplificación (glutamina sintetasa / MSX) (véase la Figura 12). Esta correlación entre la adaptación de codones del marco de lectura abierto y los niveles reducidos de la cadena pesada no glicosilada revela que a través del aumento de la puntuación CAI de un marco de lectura abierto también se puede mejorar la calidad general del producto.

6.1 Desarrollo de la línea celular con el sistema de selección Lonza CHOK1 SV y glutamina sintetasa (Figura 12).

15 La construcción del vector y el desarrollo de líneas celulares se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos recomendados de Lonza (Slough). Los medios empleados en todo momento fueron CD-CHO (Invitrogen). Los marcos de lectura abiertos usados en el proyecto de anticuerpos 5 (a) que contienen marcos de lectura abiertos no adaptados se subclonaron primero en los vectores pEE14.4 de Lonza (para la cadena ligera) y pEE6.4 (para la cadena pesada). Estos vectores se combinaron a continuación, de acuerdo con el protocolo recomendado de Lonza en un único vector de doble gen que expresa las cadenas pesadas y ligeras. Este vector se liberó después en la cepa CHOK1 de suspensión adaptada de Lonza denominada células huésped CHOK1SV utilizando electroporación según las instrucciones recomendadas por Lonza y se seleccionaron y amplificaron con la retirada de glutamina y con la adición de MSX también como se recomienda

25 Los clones resultantes se titularon en 96 pocillos y los mejores se pasaron a matraces de agitación y se evaluaron adicionalmente. El mejor clon se seleccionó para hacer el producto en biorreactores a gran escala. Para más detalles generales sobre este enfoque, véase La Cruz Edmonds et al 2006 Biotecnología Molecular 34:179-190).

6.2 Análisis del producto NGHC

30 La proteína se purificó a partir del sobrenadante del cultivo con la ayuda de las columnas de proteína A. El producto se analizó posteriormente con electroforesis capilar SDS Bioanalyzer, equipo de laboratorio en un chip (Agilent Technologies, Cheshire UK) en condiciones reductoras y de acuerdo con el protocolo del fabricante. La cadena pesada no glicosilada se observa como una especie de migración ligeramente más rápida con respecto a la especie de cadena pesada principal glicosilada (véase la Figura 12B).

35 Figura 12 - Tabla (A) que muestra los datos representativos de todos los análisis. También se incluye el trabajo adicional realizado para expresar los marcos de lectura abierta no adaptados en un protocolo de selección y amplificación diferente (glutamina sintetasa / metotrexato) empleando una célula huésped, vector, medios y regímenes de cultivo diferentes (véase el ejemplo 6.1 anterior). (B) Trazas del Ejemplo NGHC observados a partir de los ORF no adaptados de partida frente a los ORF de codones adaptados. Este análisis se llevó a cabo en el producto purificado a partir de biorreactores (1.000 litros) de tamaño equivalente. En estas superposiciones de trazas representativas, la cosecha de los cultivos de células biorreactores que expresan el producto de los ORF no adaptados (CAI: HC 0,809, LC 0,761) generaron la cadena pesada con la ocupación del sitio reducida (10% de la cadena pesada no glicosilada) en relación con el producto producido a partir de ORF adaptados (CAI: HC 0,982, LC 0,976) que contenía sólo el 1,5% de la cadena pesada no glicosilada.

Ejemplo 7. Impacto sobre los niveles de agentes de selección y amplificación en las líneas celulares finales+

45 La adición o ajuste gradual de cantidades crecientes del agente de selección y amplificación MTX en los respectivos sistemas de selección con DHFR se realiza con el fin de aumentar la expresión mediante el aumento de número de copias del gen. Para investigar el impacto de la adaptación de codones sobre el número de copias del ADN plasmídico transfectado, se emplearon dos metodologías semicuantitativas diferentes (véanse las secciones 1.13 y 1.14 para la descripción de los experimentos).

50 En primer lugar se utilizó el análisis FACS. Para este fin, las líneas celulares finales o clones de células individuales de los mismos para los proyectos de 2, 3, 4, 5 (d), 6 (d) y 7 (b) se tiñeron con metotrexato fluorescente y se analizaron por FACS. Los resultados (mostrados en la Figura 14A) demuestran que los niveles de metotrexato, como se indica por la intensidad de fluorescencia media, y, por lo tanto, los niveles de DHFR, se correlacionan con el nivel de amplificación de la línea celular, es decir, las líneas celulares finales seleccionadas en MTX 5 nM (proyectos 5 (d), 6 (d) y 7 (b)) tienen las líneas celulares más bajas y finales seleccionadas en MTX 150 nM (proyecto 3) tienen los niveles más altos de DHFR. Además, la qPCR para la DHFR y Neo se llevó a cabo sobre el ADN genómico extraído de las líneas celulares finales o de clones de células individuales de los mismos para los proyectos de 3, 4, 5 (a), 5 (d), 7 (b) y 9. Los resultados (mostrados en la Figura 14B) demostrar que las líneas

seleccionadas en MTX 5 nM (proyectos 5 (d), 7 (b) y 9) tienen niveles significativamente más bajos de ADN de la DHFR y Neo y, por lo tanto, el número de copias inferior, que las líneas seleccionadas en MTX 150 nM (proyectos 3, 4 y 5 (a)).

- 5 Los resultados discutidos anteriormente demuestran que las líneas celulares derivadas de los ORF adaptados por codones (proyectos 5 (d), 6 (d), 7 (b) y 9 para este ejemplo) tienen un menor número de copias del gen en comparación con líneas derivadas de los ORF no adaptados (proyectos 2, 3, 4, 5 (a) para este ejemplo). El uso de codón de ORF adaptados por codones (CA >0,9), por lo tanto, resulta en la generación de líneas celulares (en comparación con líneas celulares derivadas de los ORF no adaptados) con títulos iguales o mayores, con niveles más bajos de la amplificación y un número de copias menor del ADN transfectedo. La generación de clones que hacen los niveles de anticuerpo equivalentes o superiores con respecto al menor número de copias, son deseables vectores de expresión menos amplificadas. Por ejemplo, se ha demostrado que el silenciamiento génico inducido de repetición (RIGS) se puede inducir cuando se aumenta el número de copias de un vector de expresión integrado y que dicho RIGS puede resultar en los niveles de expresión reducida de dichos vectores en células de mamífero (por ejemplo, véase McBurney MW et al Exp. Cell Res. 2002 274:1-8).
- 10
- 15 Figura 14 (A). Gráfico de la fluorescencia media observada para la línea celular final para cada uno de los proyectos 2, 3, 4, 5 (d), 6 (d) y 7 (b). Se llevó a cabo la tinción de las células para DHFR como se describe en Materiales y Procedimientos, Ejemplo 1. (B) Niveles de ADN de DHFR y Neo mediante qPCR con el ADN genómico de las líneas celulares finales para los proyectos de 3, 4, 5 (a), 5 (d), 7 (b) y 9. La cPCR se realizó como se describe en Materiales y Procedimientos, Ejemplo 1. Para los niveles de referencia observados, los valores más bajos (vistos en el Proyecto 7 (b)) para la DHFR y Neo se fijaron en 1, después se representaron todos los demás valores con respecto al incremento por encima de éstos. A continuación también se indica cada valor si la proteína expresada por la línea celular analizada procede de un ORF con CA > 0.9 (S = Sí y N = No) y los niveles de MTX requeridos para generar la línea celular (en nM de MTX).
- 20

Listado de secuencias

SEC ID N°	DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA
1	Sonda de ARN 18S - nucleótidos
2	Cebador 1
3	Cebador 2:
4	Sonda de cadena pesada:
5	Cebador 1:
6	Cebador 2:
7	Sonda de cadena ligera:
8	Cebador 1:
9	Cebador 2:
10	Cadena pesada no adaptada del proyecto 5 con una puntuación CAI de 0,809 CAI y empleado en el proyecto 5 (a)
11	Cadena ligera no adaptada del proyecto 5 con una puntuación CAI de 0,761 CAI y empleado en el proyecto 5 (a)
12	ORF de la cadena pesada del proyecto 5 con una puntuación del CAI mayor (0,847): Véase la Tabla 5 y la Figura 6. Esta secuencia se usó en el Proyecto 5 (b)
13	ORF de la cadena ligera del proyecto 5 con una puntuación del CAI mayor (0,833): Véase la Tabla 5 y la Figura 6. Esta secuencia se usó en el Proyecto 5 (b)
14	ORF de la cadena pesada del proyecto 5 con una puntuación del CAI mayor (0,872). Esta secuencia se empleó en el proyecto de anticuerpo 5 (c).
15	ORF de la cadena ligera del proyecto 5 con una puntuación del CAI mayor (0,894). Esta secuencia se empleó en el proyecto de anticuerpo 5 (c).
16	ORF de la cadena pesada del proyecto 5 con una puntuación del CAI mayor (0,982). Esta secuencia se empleó en el proyecto de anticuerpo 5 (d).
17	ORF de la cadena ligera del proyecto 5 con una puntuación del CAI mayor (0,976). Esta secuencia se empleó en el proyecto de anticuerpo 5 (d).

SEC ID Nº	DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA
18	candidato (H2L1) de la cadena pesada
19	candidato (H2L1) de la cadena ligera
20	Cebador 1:
21	Cebador 2:
22	Sonda de DHFR:
23	Cebador 1:
24	Cebador 2
25	Sonda de Neo:

Listado de secuencias

- 5 <110 > UDEN Mark KOTSOPOULOU, Ekaterina
 <120 > Procedimiento de producción
 <130 > PB62449P
- 10 <150 > US60/956772
 <151 > 2007 - 08 - 20
 <160 > 25
- 15 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
 <210 > 1
 <211 > 27
 <212 > ADN
- 20 <213> Secuencia artificial
 <220 >
 <223 > Cebador/Sonda
- 25 <400 > 1
 tggctgaacg ccactgtgcc ctctaaa 27
- 30 <210 > 2
 <211 > 20
 <212 > ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220 >
 <223 > Cebador/Sonda
- 35 <400 > 2
 aggaattgac ggaaggcac 20
- 40 <210 > 3
 <211 > 20
 <212 > ADN
 <213> Secuencia artificial
- 45 <220 >
 <223 > Cebador/Sonda
- 50 <400 > 3

ggacatctaa gggcatcaca 20
 <210 > 4
 <211 > 22
 5 <212 > ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220 >
 <223 > Cebador/Sonda
 10 <400 > 4
 ctccggctgc ccattgctct cc 22
 15 <210 > 5
 <211 > 21
 <212 > ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220 >
 <223 > Cebador/Sonda
 <400 > 5
 25 ggaggcgtgg tctttagtt g 21
 <210 > 6
 <211 > 21
 <212 > ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220 >
 <223 > Cebador/Sonda
 35 <400 > 6
 ggcttctatc ccagcgacat c 21
 <210 > 7
 40 <211 > 27
 <212 > ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220 >
 45 <223 > Cebador/Sonda
 <400 > 7
 tctcgtagtc tgctttgctc agcgtca 27
 50 <210 > 8
 <211 > 21
 <212 > ADN
 <213 > Secuencia artificial
 55 <220 >
 <223 > Cebador/Sonda
 <400 > 8
 60 cttcgaggc gtagacttg t 21
 <210 > 9
 <211 > 20
 65 <212 > ADN
 <213 > Secuencia artificial

ES 2 473 623 T3

<220 >
<223 > Cebador/Sonda

<400 > 9

5 gccctccaat cgggtaactc 20

<210 > 10
<211 > 1392
<212 > ADN
<213 > Secuencia artificial

<220 >
<223 > Cadena pesada

15 <400 > 10

```

atggagttgg ggctgtgctg ggttttcctt gttgctattt tagaagggtg ccagtgtgag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg ggggggccct gagactctcc 120
tgtgcagctc ctggattcac cttcagtgac aacggaatgg cgtgggtccg ccaggctcca 180
gggaaggggc tggagtgggt ttcattcatt agtaatttgg catatagtat cgactacgca 240
gacactgtga cgggcccatt caccatctcc agagacaatg ccaagaactc actgtatctg 300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgtcag cgggacctgg 360
tttgcttact ggggccaggg cacactagtc acagtctcct cagcctccac caagggccca 420
tcggtcttcc ccctggcacc ctccctccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc 480
tgctgtgca aggactactt ccccgaaacc gtgacgggtg cgtggaactc aggcgcctg 540
accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct caggactcta ctccctcagc 600
agcgtgggtg ccgtgccctc cagcagcttg ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat 660
cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag aaagttgagc ccaaatcttg tgacaaaact 720
cacacatgcc caccgtgcc cagcactgaa ctgcggggg caccgtcagt ctccctcttc 780
cccccaaac ccaaggacac cctcatgac tcccggacc ctgaggtcac atgctgtggtg 840
gtggacgtga gccacgaaga cctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 900
gtgcataatg ccaagacaaa gcccgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 960
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtaca gtgcaaggtc 1020
tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1080
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1140
agcctgacct gectgttcaa agcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc cagcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1260
ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1320
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1380
tctccgggta aa 1392

```

20 <210 > 11
<211 > 717
<212 > ADN
<213 > Secuencia artificial

25 <220 >
<223 > Cadena ligera

<400 > 11

```

atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct ggttctctgg atccagtggg 60
gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 120
atctcctgca gagttagtca gagcctttta cacagtaatg gatacaceta ttacattgg 180
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct ataaagtttc caaccgattt 240
tctggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 300
agcagagtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ctcaaactag acatgttccg 360
tacacgttcg gcggagggac caagtgga atcaaacgta cggtggtctg acctctgtc 420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggaaa cgcctccca 540
tcgggtaact cccagagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagctc 600
agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctcgcaa 660
gtcaccatc agggcctgag ctgcccctc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 717

```

<210 > 12
<211 > 1392
<212 > ADN

ES 2 473 623 T3

<213 > Secuencia artificial

<220 >

<223 > Cadena pesada con codones adaptados

5

<400 > 12

```

atggagctcg ggctgtgctg ggtgttctc gtggccatcc tggagggagt gcaagtgtgag 60
gtgcagctgg tggagagtgg gggcggcctg gtgcageccg gcggcagcct gcggtgtgctg 120
tgcgccgtga ggggttcac cttcagtgc aacggcatgg cttgggtcag gcaggccccc 180
ggaagggggc tcgagtgggt gagttcacc agtaacctgg cctacagtat cgactatgct 240
gacaccgtga ccggccgctt cactatctct cgggataatg ctaagaacag cctgtaccctc 300
cagatgaaca gcctgcgcgc tgaggacacc gccgtgtact actgcgtgtc tggaaccttg 360
ttcgcctact ggggccaggg tacactagtc acagtctcct cagcctccac caagggccca 420
tcggctcttc ccctggcacc ctccccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc 480
tgctgtgca aggaactct cccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc aggcgcctcg 540
accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct caggactcta ctccctcagc 600
agcgtggtga ccgtgcctc cagcagcttg ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat 660
cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag aaagttgagc ccaaactctg tgacaaaact 720
cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa ctccggggg caccgtcagt cttcctcttc 780
cccccaaac ccaaggacac cctcatgata tcccggacc ctgaggtcac atgcgtgggtg 840
gtggacgtga gccacgaaga cctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 900
gtgcataatg ccaagacaaa gcccgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 960
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1020
tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1080
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1140
agcctgacct gcctgtgcaa aggtctctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctccc tgctggactc cgacggctcc 1260
ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1320
tcctgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1380
tctccgggta aa . 1392
    
```

10

<210 > 13

<211 > 717

<212 > ADN

<213 > Secuencia artificial

15

<220 >

<223 > Cadena ligera con codones adaptados

<400 > 13

20

```

atgcgcctgc ctgcccagct gctcggcctg ctgatgctgt ggggtgctgg cagctccggc 60
gacatcgtca tgacccagag cccctgagt ctccccgtea cccccggcga acctgccagc 120
atcagctgca ggggtgtcca gtcgctgctc cattccaacg ggtacacgta cctgcattgg 180
tacctgcaga agcccgggca atcccctcag ctgctgatct acaagggtgag caaccgcttc 240
tccggcgtcc cggaccggtt cagtggcagc ggctctggaa ccgacttcac cctgaaaatc 300
agccgcgtgg aagctgagga cgtggcgctc tactactgca gccagaccgg gcatgtgccc 360
tacaccttcg gcggcggcac aaaggtggag atcaagcgta cgggtggctgc accatctgtc 420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgctcg 480
ctgaataaact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggacaa cgccctccaa 540
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600
agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 660
gtcacccatc agggcctgag ctgcgccgctc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 717
    
```

<210 > 14

<211 > 1392

25

<212 > ADN

<213 > Secuencia artificial

<220 >

<223 > Cadena pesada codones adaptados

30

<400 > 14

ES 2 473 623 T3

```

atggagctgg gcctgtgctg ggtgttctcg gtggccatcc tggagggcgt gcagtgcgag 60
gtgcagctgg tggagagcgg egggcgctcg gtgcagcccg gcggcagcct gcgcctgagc 120
tgcgccgtga ggggcttcac cttcagcgac aacggcatgg cctgggtgcg ccaggcccc 180
ggcaagggcc tggagtgggt gagcttcac agcaacctgg cctacagcat cgactacgcc 240
gacaccgtga ccggccgctt caccatcagc cgcgacaacg ccaagaacag cctgtacctg 300
cagatgaaca gcctgcgcgc cgaggacacc gccgtgtact actgcgtgag cggcacctgg 360
ttcgctact ggggccaggg cacactagtc acagtctcct cagcctccac caagggccca 420
tcggtcttcc ccctggcacc ctctccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc 480
tgcctggtoa aggactactt cccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg 540
accagcggcg tgcacacctt cccggtgtc ctacagtcct caggacteta ctccctcagc 600
agcgtggtga ccgtgcctc cagcagcttg ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat 660
cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag aaagttgagc ccaaactctg tgacaaaact 720
cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctgcgggggg caccgtcagt ctctctcttc 780
ccccaaaac ccaaggacac cctcatgac tcccggacc ctgaggtcac atgcgtggtg 840
gtggacgtga gccacgaaga cctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 900
gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcagta ccgtgtggtc 960
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1020
tccaacaaa g cctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1080
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccagtc 1140
agcctgacct gcctgtgcaa aggtctctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgetggactc cgacggctcc 1260
ttcttctct acagcaaget caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1320
tcattgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1380
tctccgggta aa 1392

```

- 5 <210 > 15
- <211 > 717
- <212 > ADN
- <213 > Secuencia artificial

- 10 <220 >
- <223 > Cadena ligera codones adaptados

<400 > 15

```

atgcgcctgc ccgcccagct gctgggctcg ctgatgctgt gggtgagcgg cagcagcggc 60
gacatcgtga tgacccagag cccctgagc ctgcccgtga ccccggcga gcccgccagc 120
atcagctgcc gcgtgagcca gagcctgctg cacagcaacg gctacaccta cctgactgg 180
tacctgcaga agcccggcca gagccccag ctgctgatct acaaggtgag caaccgcttc 240
agcggcgtgc ccgaccgctt cagcggcagc ggcagggca ccgacttcac cctgaagatc 300
agccgcgtgg aggccgagga cgtggcgtg tactactgca gccagaccg ccacgtgccc 360
tacaccttcg gcggcggcac caaggtggag atcaagcgta cgggtggtgc accatctgtc 420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgctg 480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggacaa cgccctccaa 540
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600
agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaagctta cgcctgcgaa 660
gtcaccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 717

```

- 15 <210 > 16
- <211 > 1392
- <212 > ADN
- <213 > Secuencia artificial

- 20 <220 >
- <223 > Cadena pesada con codones adaptados

<400 > 16

25

ES 2 473 623 T3

```

atggagctgg gcctgtgctg ggtgttctctg gtggccatcc tggagggcgt gcagtgcgag 60
gtgcagctgg tggagtctgg cggcggactg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120
tgtgccgtgt cgggcttcac cttcagcgac aacggcatgg cctgggtgag gcaggcccct 180
ggcaagggcc tggagtgggt gtccttcac agcaacctgg cctacagcat cgactacgcc 240
gacaccgtga cgggcagatt caccatcagc cgggacaacg ccaagaacag cctgtacctg 300
cagatgaaca gcctgagagc cgaggacacc gccgtgtact actgtgtgag cggcacctgg 360
ttcgcctact ggggccaggg caccctgggtg accgtgtcca gcgccagcac caagggcccc 420
agcgtgttcc ccctggcccc cagcagcaag agcaccagcg gcggcacagc cgccctgggc 480
tgccctggta aggactactt ccccgaaccg gtgaccgtgt cctggaacag cggagccctg 540
accagcggcg tgcacacctt ccccgccgtg ctgcagagca gcggcctgta cagcctgagc 600
agcgtggtga cagtgcaccg cagcagcctg ggcacccaga cctacatctg taacgtgaac 660
cacaagccca gcaacacca ggtggacaag aaggtggagc ccaagagctg tgacaagacc 720
cacacctgcc cccccctgcc tgcccccgag ctggccggag cccccagcgt gttcctgttc 780
ccccccaagc ctaaggacac cctgatgata agcagaacct ccgaggtgac ctgtgtggtg 840
gtggatgtga gccacgagga cctgaggtg aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 900
gtgcacaatg ccaagacca gcccagggag gagcagtaga acagcaccta cggggtggtg 960
tccgtgctga ccgtgctgca ccaggattgg ctgaacggca aggagtaca gtgtaagggtg 1020
tccaacaagg ccctgcctgc cctatcgag aaaacctca gcaaggccaa gggccagccc 1080
agagagcccc aggtgtacac cctgccccct agcagagatg agctgacca gaaccaggtc 1140
tccctgacct gcctggtgaa gggcttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200
aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc accccccctg tgctggacag cgatggcagc 1260
ttcttccctg acagcaaget gaccgtggac aagagcagat ggcagcaggg caacgtgttc 1320
agctgctccg tgatgcacga ggcctgcac aatcactaca cccagaagag cctgagcctg 1380
tccccctgca ag 1392

```

- 5 <210 > 17
- <211 > 717
- <212 > ADN
- <213 > Secuencia artificial

- 10 <220 >
- <223 > Cadena ligera con codones adaptados

<400 > 17

```

atgagaactgc ccgcccagct gctgggcctg ctgatgctgt ggggtgtccg cagcagcggc 60
gacatcgtga tgacccagag cccctgagc ctgcccgtga cccctggcga gcccgcagc 120
atcagctgta gagtgagcca ggcctgctg cacagcaacg gctacaccta cctgcactgg 180
tatctgcaga agcctggcca gagccctcag ctgctgatct acaaggtgtc caaccggttc 240
agcggcgtgc ctgatagatt cagcggcagc ggtccggca ccgacttcac cctgaagatc 300
agcagagtgg aggccgagga tgtggcgtg tactactgct cccagaccag acacgtgcct 360
tacacctttg gcggcggaac aaaggtggag atcaagcgtg cgggtggccg ccccagcgtg 420
ttcatcttcc cccocagcga tgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 480
ctgaacaact tctacccccg ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa tgcctgcag 540
agcggcaaca gccaggagag cgtgaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 600
agcagcacc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag 660
gtgacccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaaccgggg cgagtgc 717

```

- 15 <210 > 18
- <211 > 445
- <212 > PRT
- <213 > Secuencia artificial

- 20 <220 >
- <223 > Cadena pesada H2L1

<400 > 18

25

ES 2 473 623 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
 20 25 30
 Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Phe Ile Ser Asn Leu Ala Tyr Ser Ile Asp Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Ser Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

- 5 <210 > 19
- <211 > 219
- <212 > PRT
- <213 > Secuencia artificial

- <220 >
- 10 <223 > Cadena ligera H2L1

- <400 > 19

ES 2 473 623 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Val Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Tyr Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Thr
 85 90 95
 Arg His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

5 <210 > 20
 <211 > 23
 <212 > ADN
 <213 > Secuencia artificial

10 <220 >
 <223 > Cebador/Sonda

<400 > 20

15 gaggcagttc tgttaccag gaa 23

<210 > 21
 <211 > 21
 <212 > ADN
 <213 > Secuencia artificial

20 <220 >
 <223 > Cebador/Sonda

<400 > 21

25 cctgcatgat cctgtcaca a 21

<210 > 22
 <211 > 25
 <212 > ADN
 <213 > Secuencia artificial

35 <220 >
 <223 > sonda de DHFR

<400 > 22

cctaatca accaggccac ctcag 25

40 <210 > 23
 <211 > 20

ES 2 473 623 T3

<212 > ADN
<213 > Secuencia artificial

<220 >
5 <223 > Cebador/Sonda

<400 > 23

10 gcccggttct tttgtcaag 20

<210 > 24
<211 > 19
<212 > ADN
<213 > Secuencia artificial

15 <220 >
<223 > Cebador/Sonda

<400 > 24

20 ctgcctcgtc ctgcagttc 19

<210 > 25
<211 > 20
<212 > ADN
<213 > Secuencia artificial

<220 >
<223 > Cebador/Sonda

30 <400 > 25

35 ccgacctgct cggcgccctg 20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir una línea celular de mamífero que produce al menos una proteína terapéutica que comprende las etapas de:
 - 5 a) obtener una primera secuencia de polinucleótidos que codifica dicha al menos una proteína terapéutica,
 - b) alterar la primera secuencia de polinucleótidos para obtener una segunda secuencia de polinucleótidos, en la que el índice de adaptación de codones de la segunda secuencia de polinucleótidos es mayor que la de la primera secuencia de polinucleótido y el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido codifican la misma proteína terapéutica.
 - 10 c) transformar al menos una primera célula de una línea celular de mamífero con la primera secuencia de polinucleótidos de la etapa (a) y una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica un marcador de selección que es capaz de proporcionar la amplificación de la primera secuencia de polinucleótidos dentro de dicha célula; y
 - 15 transformar al menos una segunda célula de dicha línea celular de mamífero con la segunda secuencia de polinucleótidos de la etapa (b) y una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica el marcador de selección que es capaz de proporcionar la amplificación de la segunda secuencia de polinucleótidos dentro de dicha célula,
 - 20 d) cultivar al menos una primera célula de la etapa (c) para crear una primera línea celular que comprende una pluralidad de células, en un medio que contiene una concentración o una concentración cada vez mayor de un agente de selección y amplificación que (i) inhibe el crecimiento de células en dicha línea celular que expresa niveles insuficientes del marcador de selección codificado por el tercer polinucleótido de la etapa (c), y (ii) aumenta el número de copias del gen;
 - 25 cultivar al menos una segunda célula de la etapa (c) para crear una segunda línea celular que comprende una pluralidad de células, en un medio que contiene una concentración o una concentración cada vez mayor del agente de selección y amplificación que (i) inhibe el crecimiento de células en dicha línea celular que expresa niveles insuficientes del marcador de selección codificado por el tercer polinucleótido de la etapa (c), y (ii) aumenta el número de copias del gen; y
 - 30 (e) seleccionar dicha segunda línea celular una vez que se alcanza la meseta de producción de la proteína codificada por el segundo polinucleótido en dicha segunda línea celular, en el que dicha concentración del agente de selección y amplificación es menor que la necesaria para alcanzar un rendimiento de producción equivalente de dicha proteína producida en dicha primera línea celular transformada con el primer polinucleótido.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la meseta de producción de la proteína codificada por el segundo polinucleótido producido en dicha segunda línea celular se alcanza con un menor número de rondas de amplificación de lo necesario para alcanzar un rendimiento de producción equivalente de dicha proteína producida en dicha primera línea celular transformada con el primer polinucleótido.
- 35 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la segunda línea celular se cultiva en biorreactores y la proteína terapéutica producida se purifica.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el índice de adaptación de codones de la segunda secuencia de polinucleótidos es igual o superior a 0,9.
- 40 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la concentración del agente de selección y amplificación se reduce a igual o menos del 50% o a menos del 25% o a menos del 5% o a menos del 3%, en comparación con la concentración del agente de selección y amplificación usado para el mismo procedimiento usando la primera secuencia de polinucleótidos.
- 45 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la proteína terapéutica es un anticuerpo, un derivado del mismo o un fragmento de unión a antígeno.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la proteína terapéutica es un anticuerpo monoclonal.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la línea celular de mamífero que se va a transformar es metabólicamente deficiente debido a la interrupción o la inhibición de una enzima celular endógena.
- 50 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la línea celular de mamífero que se va a transformar es deficiente en una vía de síntesis de nucleósidos.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el marcador de selección es un polinucleótido que codifica la

dihidrofolato reductasa (DHFR) y el agente de selección y amplificación es un antifolato.

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el antifolato es metotrexato (MTX).
- 5 12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el marcador de selección es un polinucleótido que codifica la glutamina sintetasa y el agente de selección y amplificación es metionina sulfoximina (MSX).
13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que solo se requiere una ronda de amplificación para alcanzar la meseta de producción de proteínas.
14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el rendimiento final de la proteína terapéutica es superior a 0,5 g/l en un lote sin alimentar.
- 10 15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 11, 13 or 14, en el que la concentración de MTX usada es:
 - (a) igual o inferior a 50nM; or
 - (b) 5nM.
- 15 16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la línea celular de mamífero es CHO o NSO.
17. Uso de una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína terapéutica en la que el índice de adaptación de codones de la secuencia de polinucleótidos es igual o mayor que 0,9 para reducir (i) los niveles requeridos de un agente de selección y amplificación titulable que aumenta el número de copias del gen, (ii) el número de rondas de amplificación, y (iii) el tiempo necesario en un procedimiento para producir una línea celular de mamífero productora de dicha proteína terapéutica.
- 20 18. Uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que sólo se requiere una ronda de amplificación.
19. Un procedimiento para producir una línea celular de mamífero que produce al menos una proteína terapéutica que comprende las etapas de:
 - 25 (a) transformar una línea celular con una secuencia de polinucleótidos que comprende (i) una secuencia que codifica la proteína terapéutica y tiene un índice de adaptación de codones que es igual o mayor que 0,9, y (ii) una secuencia que codifica un marcador de selección que es capaz de proporcionar la amplificación de la secuencia de polinucleótidos;
 - (b) proporcionar al menos una ronda de amplificación en presencia de un agente de selección; y
 - 30 (c) seleccionar la línea celular una vez que se alcanza la meseta de la producción de la proteína terapéutica; en el que la concentración del agente de selección y amplificación es 50% o menos de la concentración requerida para alcanzar un rendimiento de producción equivalente, en comparación con una secuencia que codifica la proteína terapéutica y tiene un índice de adaptación codón que es menor que 0,9.
20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que:
 - 35 (a) el agente de selección y amplificación es MSX o MTX; y/o
 - (b) se requiere una ronda de amplificación para alcanzar el rendimiento de la producción equivalente.

Figura 1.

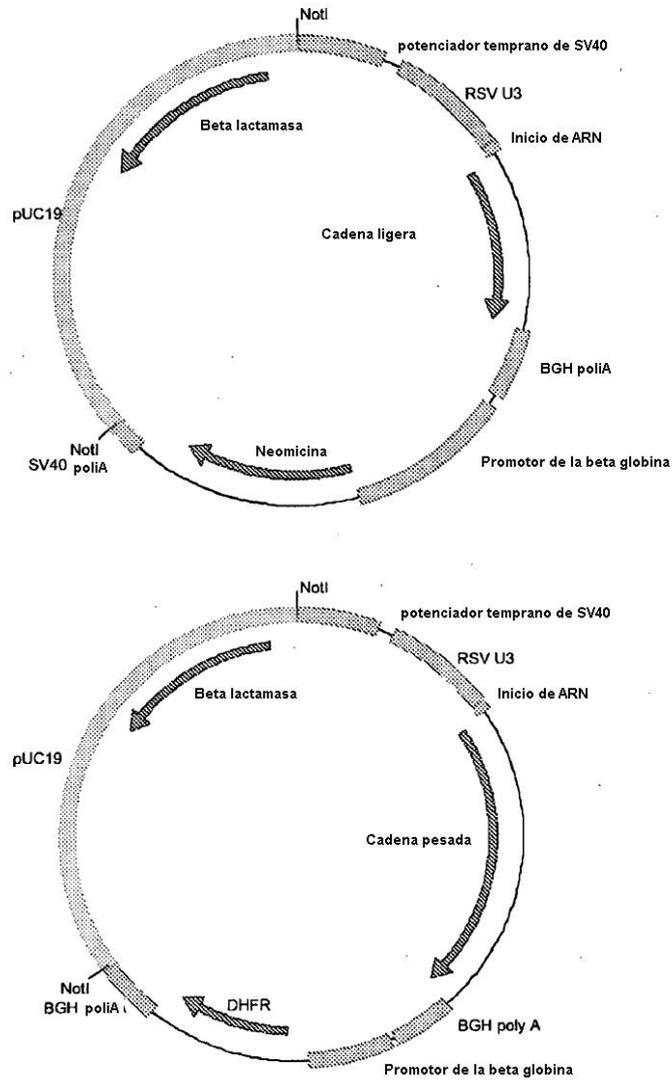


Figura 2.

ATGGAGTTGGGGCTGTGCTGGGTTTTCTTGTGCTATTTTAGAAGGTGTCCAG
 TGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGT
 CCCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGATTACCTTCAGTGACAACGGAATGG
 CGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATTATTAGT
 AATTTGGCATATAGTATCGACTACGCAGACACTGTGACGGGCCGATTACCCATC
 TCCAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
 GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTCAGCGGGACCTGGTTTGCTTACTGGGG
 CCAGGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT
 TCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG
 CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAG
 GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGCCTACAGTCTCAGGA
 CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA
 GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA
 AAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCAC
 CTGAACTCGCGGGGGCACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCCAAGGAC
 ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG
 CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC
 ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG
 GTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA
 GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
 AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGG
 GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA
 TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC
 TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGC
 AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
 CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
 CTCCGGGTAAA

FIGURA 3

ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGGTCTCTGGATC
CAGTGGGGATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGG
AGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGAGTTAGTCAGAGCCTTTTACACAGTAATGG
ATACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCT
GATCTATAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAG
TGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGT
TGGGGTTTATTACTGCTCTCAAACCTAGACATGTTCCGTACACGTTCCGGCGGAGG
GACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC
GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAA
TAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTCC
AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC
TACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA
AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA
GCTTCAACAGGGGAGAGTGT

FIGURA 4.

ATGGAGCTCGGGCTGTGCTGGGTGTTCCCTCGTGGCCATCCTGGAGGGAGTGCA
GTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGTGGGGGCGGCCTGGTGCAGCCCGGCGG
CAGCCTGCGGCTGTCGTGCGCCGTGAGCGGCTTCACCTTCAGTGACAACGGCA
TGGCTTGGGTCAGGCAGGCCCCCGGAAAGGGGCTCGAGTGGGTGAGCTTCAT
CAGTAACCTGGCCTACAGTATCGACTATGCTGACACCGTGACCGGCCGCTTCA
CTATCTCTCGGGATAATGCTAAGAACAGCCTGTACCTCCAGATGAACAGCCTGC
GCGCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGTGTCTGGAACCTGGTTCGCCTAC
TGGGGCCAGGGTACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATC
GGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC
CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAA
CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT
CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC
ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA
CAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCC
AGCACCTGAACTCGCGGGGGCACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAACCCA
AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC
GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC
GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG
TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATC
TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATC
CCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT
TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA
CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTA
CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC
CTGTCTCCGGGTAAA

FIGURA 5

ATGCGCCTGCCTGCCAGCTGCTCGGCCTGCTGATGCTGTGGGTGTCGGGCA
GCTCCGGCGACATCGTCATGACCCAGAGCCCCCTGAGTCTCCCCGTACCCCC
GGCGAACCTGCCAGCATCAGCTGCAGGGTGTCCAGTCGCTGCTCCATTCCAA
CGGGTACACGTACCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCCGGGCAATCCCCTCAGC
TGCTGATCTACAAGGTGAGCAACCGCTTCTCCGGCGTCCCGGACCGGTTCAGT
GGCAGCGGCTCTGGAACCGACTTCACCCTGAAAATCAGCCGCGTGGAAGCTGA
GGACGTGGGCGTCTACTACTGCAGCCAGACCCGGCATGTGCCCTACACCTTCG
GCGGCGGCACAAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTC
ATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGC
CTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGACAAC
GCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGA
CAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGA
AACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

FIGURA 6

ATGGAGCTGGGCCTGTGCTGGGTGTTCTGGTGGCCATCCTGGAGGGCGTGC
 AGTGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGGCCCTGGTGCAGCCCGGCG
 GCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGTGAGCGGCTTACCTTCAGCGACAACGG
 CATGGCCTGGGTGCGCCAGGCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCTTC
 ATCAGCAACCTGGCCTACAGCATCGACTACGCCGACACCGTGACCGGCCGCTT
 CACCATCAGCCGCGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCC
 TGC GCGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGTGAGCGGCACCTGGTTCGC
 C TACTGGGGCCAGGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCC
 CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG
 GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTG
 GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGT
 CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCTCCAGCAGCTTG
 GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT
 GGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTG
 CCCAGCACCTGAACTCGCGGGGGCACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAC
 CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG
 GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT
 GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT
 ACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG
 GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAAC
 CATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC
 CATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA
 GGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
 AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
 CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
 CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC
 TCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

FIGURA 7

ATGCGCCTGCCCCGCCAGCTGCTGGGCCTGCTGATGCTGTGGGTGAGCGGCA
GCAGCGGCGACATCGTGATGACCCAGAGCCCCCTGAGCCTGCCCGTGACCCC
CGGCGAGCCCCGCCAGCATCAGCTGCCGCGTGAGCCAGAGCCTGCTGCACAGC
AACGGCTACACCTACCTGCACTGGTACCTGCAGAAGCCCCGGCCAGAGCCCCCA
GCTGCTGATCTACAAGGTGAGCAACCGCTTCAGCGGCGTGCCCGACCGCTTCA
GCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCCGCGTGAGGGC
CGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCAGCCAGACCCGCCACGTGCCCTACACCT
TCGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGT
CTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGT
GTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG
ACAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTA
CGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC
CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

FIGURA 8

ATGGAGCTGGGCCTGTGCTGGGTGTTCTGGTGGCCATCCTGGAGGGCGTGC
AGTGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGG
CAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGTGTCCGGCTTCACCTTCAGCGACAACGGCA
TGGCCTGGGTGAGGCAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCTTCAT
CAGCAACCTGGCCTACAGCATCGACTACGCCGACACCGTGACCGGCAGATTCA
CCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAAGAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTG
AGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGAGCGGCACCTGGTTCGCCTA
CTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCC
AGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCG
CCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCCCTGG
AACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGA
GCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCT
GGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGG
TGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCC
TGCCCTGCCCCCGAGCTGGCCGGAGCCCCCAGCGTGTTCTGTTCCCCCCAA
GCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGG
TGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
GTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGTCACCAGGATTGGCTGAACGGC
AAGGAGTACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCGAGAA
AACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTG
CCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGT
GAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAG
CCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTT
CTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACG
TGTTACAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCAGAAAG
AGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

FIGURA 9

ATGAGACTGCCCCGCCAGCTGCTGGGCCTGCTGATGCTGTGGGTGTCCGGCA
GCAGCGGCGACATCGTGATGACCCAGAGCCCCCTGAGCCTGCCCGTGACCCC
TGGCGAGCCCGCCAGCATCAGCTGTAGAGTGAGCCAGAGCCTGCTGCACAGC
AACGGCTACACCTACCTGCACTGGTATCTGCAGAAGCCTGGCCAGAGCCCTCA
GCTGCTGATCTACAAGGTGTCCAACCGGTTTCAGCGGCGTGCCTGATAGATTCA
GCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGC
CGAGGATGTGGGCGTGTACTACTGCTCCCAGACCAGACACGTGCCTTACACCT
TTGGCGGCGGAACAAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGT
GTTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGG
TGTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG
GACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACA
GCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGAC
TACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAG
CCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

Figura 10:

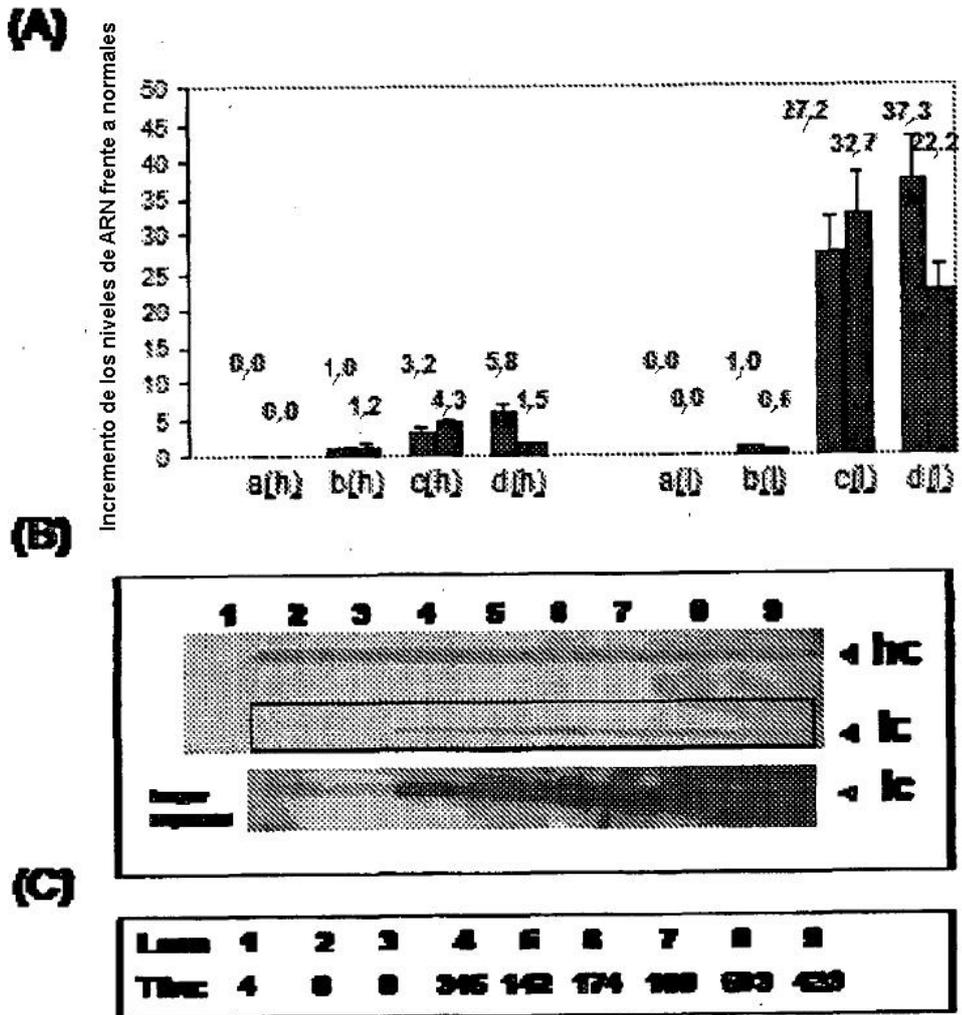


Figura 11.

(A)

CDR1 de la cadena ligera del proyecto 5

R	V	S	Q	S	L	L	H	S	N	G	Y	T	Y	L	H				
AGA	GTT	AGT	CAG	AGC	CTT	TTA	CAC	AGT	AAT	GGA	TAC	ACC	TAT	TTA	CAT	Original CAI	Project 5(a)		
AGG	GTG	TCC	CAG	TCG	CTG	CTC	CAT	TCC	AAC	GGG	TAC	ACG	TAC	CTG	CAT	Increased CAI	Project 5(b)		
CGC	GTG	AGC	CAG	AGC	CTG	CTG	CAC	AGC	AAC	GGC	TAC	ACC	TAC	CTG	CAC	High CAI	Project 5(c)		
AGA	GTG	AGC	CAG	AGC	CTG	CTG	CAC	AGC	AAC	GGC	TAC	ACC	TAC	CTG	CAC	High CAI	Project 5(d)		

(B)

Preferencia de codones humanos en genes de expresión alta

(adaptado de Massaer et al., Int Arch Allergy Immunol 2001: pp32-43)

Ala: GCC>GCT=GCG>GCA	Ile: ATC>ATT>ATA
Arg: CGC>CGG>AGG>AGA>CGT>CGA	Leu: CTG>CTC>TTG>CTT>CTA>TTA
Asn: AAC>AAT	Lys: AAG>AAA
Asp: GAC>GAT	Phe: TTC>TTT
Cys: TGC>TGT	Pro: CCC>CCT>CCG>CCA
Gln: CAG>CAA	Ser: AGC>TCC>TCT>AGT>TCG>TCA
Glu: GAG>GAA	Thr: ACC>ACG>ACA=ACT
Gly: GGC>GGG>GGA>GGT	Tyr: TAC>TAT
His: CAC>CAT	Val: GTG>GTC>GTT>GTA

(C)

Preferencia de codones humanos adaptado de la Base de Datos del Uso de Codones (89533 CD)

(www.kazusa.org.jp/codon)

Ala: GCC>GCT>GCG>GCA	Ile: ATC>ATT>ATA
Arg: <u>AGA=AGG>CGG>CGC>CGA>CGT</u>	Leu: CTG>CTC>TTG=C <u>TT>TTA>CTA</u>
Asn: AAC>AAT	Lys: AAG>AAA
Asp: GAC>GAT	Phe: TTC>TTT
Cys: TGC>TGT	Pro: CCC>CCT>CCA>CCG
Gln: CAG>CAA	Ser: AGC>TCC>TCT>AGT= <u>TCA>TCG</u>
Glu: GAG>GAA	Thr: ACC>ACA>ACT>ACG
Gly: GGC>GGG=GGA>GGT	Tyr: TAC>TAT
His: CAC>CAT	Val: GTG>GTC>GTT>GTA

Figura 12.

(A)

	Production Model	%NGHC	Promedio
Marcos de lectura abiertos no adaptados (Sec Id 10 y 11; CAI:HC 0,809, LC 0,761) 31) Huésped CHO-K1 Vectores: pEE14.4/6.4 Vectors Selección/Mantenimiento/Amplificación: retirada de glutamina más MSX Medios: CD-CHO (Invitrogen) Aliment: hidrolizado no animal (Día 4) Un clon (elegido en el título) es el único clon para el que se generó datos de NGHC:	Clon 1 Matraz de agitación	1	
	Clon 15-Litros	2,3	
	Clon 180-Litros (1)	14,5	
	Clon 180-Litros (2)	5,5	
	Clon 180-Litros (3)	6,1	
	Clon 180-Litros (4)	4,6	
	Clon 1 1000-Litros (1)	12,4	
	Clon 1 1000-Litros (2)	8,3	
			6,8
Proyecto 5(a): marcos de lectura abiertos no adaptados (CAI:HC 0,809, LC 0,761) Huésped CHO-DG44 Vectores RI N/R1.D Selección/Mantenimiento/Amplificación: G, retirada de nucleósidos más MTX Medios: G70 (GSK) Aliment: Ninguna Clon 1, 2, 3 y 4 (elegidos en el título) son los únicos clones para los que se generaron datos de NGHC	Clon 1 Matraz de agitación	4,7	
	Clon 2 Matraz de agitación	10,9	
	Clon 3 Matraz de agitación	2,3	
	Clon 4 Matraz de agitación	7,7	
Proyecto 5(c): Adaptado de los marcos de lectura abiertos (CAI:HC 0,872, CL 0,894) Mismas estructuras de os vectores, protocolos de desarrollo de líneas celulares y medios que el proyecto 5A Clones 1, 2 y 3 (elegidos en el título) son los clones para los que se generaron datos de NGHC	Clon 1 Matraz de agitación	1,5	
	Clon 2 Matraz de agitación	0,8	
	Clon 3 Matraz de agitación	2,3	
	Clon 3 Matraz de agit. (rep.)	7,7	
	Clon. 3 2-Litros Reactor	1,6	
Proyecto 5(d): Adaptado de los marcos de lectura (CAI:HC 0,982, LC 0,976) Mismas estructuras de os vectores, protocolos de desarrollo de líneas celulares A y medios que el proyecto 5A Clon 1, 2, 3 y 4 (elegidos en el título) son los únicos clones para los que se generaron datos de NGHC Mejor clon (clon 1 (O97-7) escalado a 1000 litros para suministrar material de ensayo clínico	Clon 1 Matraz de agitación	1,4	
	Clon 1 Shake Flask (Repeat)	1,3	
	Clon 2 Matraz de agitación	1,1	
	Clon 3 Matraz de agitación	1,1	
	Clon 4 Matraz de agitación	1	
	Clon 12-Litros	1,8	
	Clon 180-Litros	1,9	
	Clon 1 1000-Litros	1,3	
			1,4

*Promedio para cada proceso. Obsérvense los diferentes procesos tienen niveles diferentes de clones y/o de datos de escalas.

(B)

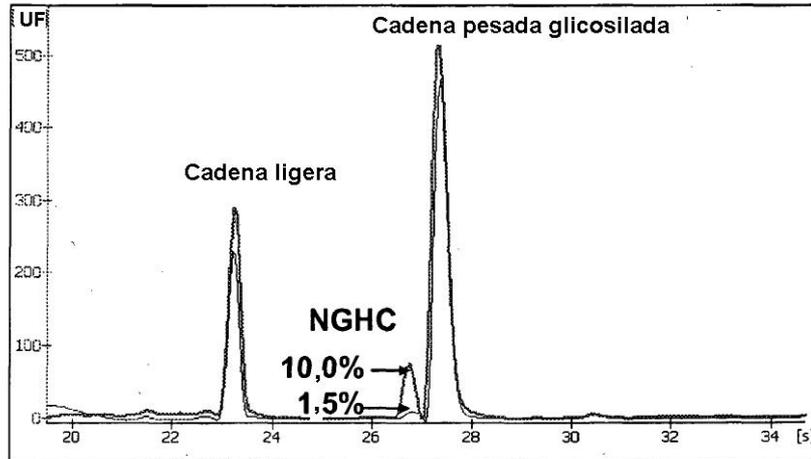


Figura 13.

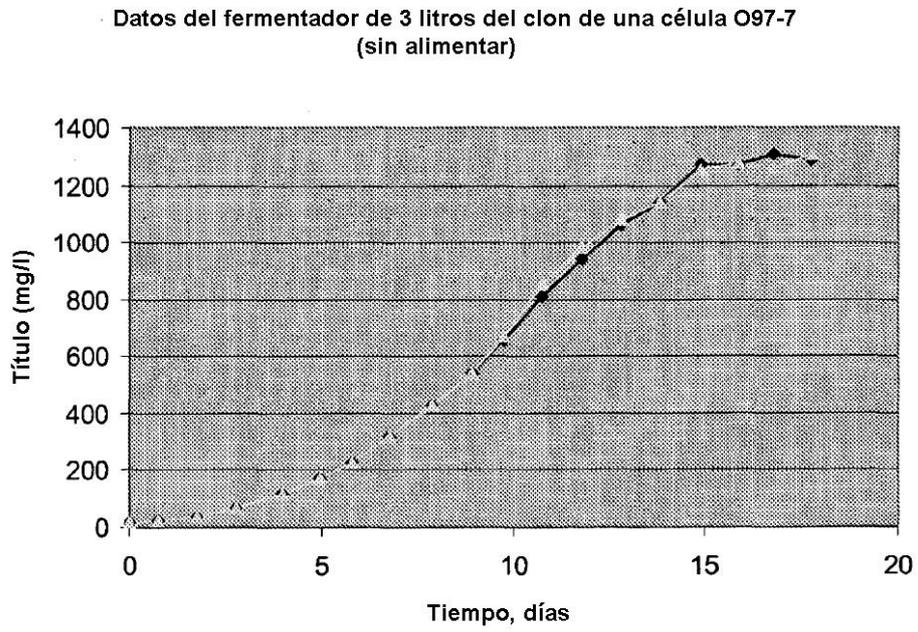
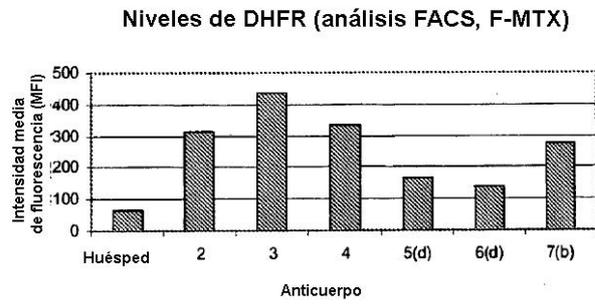


Figura 14.

(A)



(B)

