

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 644**

51 Int. Cl.:

C12P 21/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2009 E 09767320 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 2297331**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para la producción de proteína recombinante en células de mamífero que expresan HBx**

30 Prioridad:

28.05.2008 US 56634 P

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

27.05.2015

73 Titular/es:

**BAYER HEALTHCARE, LLC (100.0%)
100 Bayer Boulevard
Whippany, New Jersey 07981-0915, US**

72 Inventor/es:

**JIN, FANG;
HARKINS, RICHARD N.;
BAUZON, MAXINE y
HERMISTON, TERRY**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 536 644 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

Procedimientos y composiciones para la producción de proteína recombinante en células de mamífero que expresan HBx.

Referencia a solicitudes relacionadas

- 5 La presente solicitud reclama prioridad sobre la solicitud provisional de EE.UU. N° 61/056.634, presentada el 28 de mayo de 2008.

Listado de secuencias

- 10 La presente solicitud incluye una copia en papel y una copia electrónica de un listado de secuencias. Los solicitantes certifican que la materia sujeta contenida en la copia electrónica del listado de secuencias es la misma que la que se presenta en la copia en papel.

Campo de la invención

La invención se refiere generalmente a composiciones y procedimientos para la producción de una proteína heteróloga mediante células huésped de mamífero recombinantes que expresan la proteína X del virus de la hepatitis B (HBx).

Antecedentes de la invención

La necesidad de proteínas recombinantes, incluyendo proteínas terapéuticas, es aguda y existe una necesidad continua de mejorar la eficiencia de la producción de proteínas recombinantes. Aumentar el rendimiento de proteínas durante la producción comercial sigue siendo un reto significativo.

- 20 Se ha notificado que la transfección transitoria con el plásmido *HBx* puede producir la regulación por aumento de la expresión de la linfotoxina alfa heteróloga por las células de hepatoma Huh7 y Chang. Lee y col., *Biochim Biophys Acta* 1741, 75 - 84 (2005). Además, las células de hepatoma de Chang que se transfectan de forma estable con HBx pueden tener una expresión regulada por incremento de la linfotoxina alfa.

- 25 PARASHAR MISRA K Y COL., divulgan "The conserved amino-terminal region (amino acid 1 - 20) of the hepatitis B virus X protein shows a transrepression function", *VIRUS RESEARCH, AMSTERDAM, NL*, vol. 105, nº 2, (2004 - 10 - 01), páginas 157 - 165.

También se ha notificado que, en las células en suspensión de hepatocarcinoma de mamífero, la transfección con HBx puede reducir los niveles de expresión de E-cadherina de un modo dependiente de la dosis. Lee y col., *Oncogene* 24, 6617 - 6625 (2005).

- 30 Las proteínas secretadas y de membrana normalmente sufren plegamiento y otras modificaciones postraduccionales en el sistema retículo endoplasmático (RE)-aparato de Golgi de las células huésped. La función de la ruta de señalización de respuesta a la proteína no plegada (UPR) es detectar los niveles de proteína no plegada y ajustar el plegamiento proteico y la capacidad de secreción de las células a cambios ambientales, tales como el estrés del RE. Bernalles y col., *Annu. Rev. Cell Develop. Biology* 22, 487 - 506 (2006). El estrés del RE es una condición en la que la capacidad del RE para plegar proteínas se ha saturado. IRE1 (enzima 1 dependiente de inositol) y ATF6 (factor activador de la transcripción 6) son dos sensores principales de proteínas no plegadas dentro de las células y actualmente se sabe que son transductores clave de la UPR. Credle y col., *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 18773 - 18748 (2005); Nadanaka y col., *Mol. Cell. Biology* 27, 1027 - 1043 (2007).

- 40 Estas rutas metabólicas se activan mediante una serie de genes víricos, incluyendo: a) glicoproteína de membrana de tipo 1 residente en el RE de 27 kDa del citomegalovirus humano, dentro de la región única 11 corta (US 11), que está dirigida a las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) para el paso desde el RE al citosol; b) proteína no estructural NS4B CODIFICADA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC), que interacciona físicamente con CREB-RP/ATF6 β y activa las rutas del ATF6 y la IRE1 induciendo el corte y empalme de XBP1. Zheng y col., *J. Microbiology* 43, 529 - 536 (2005); y c) proteína de 17 kDa del virus de la hepatitis B dentro del gen X del marco de lectura abierto (HBx), que es un activador multifuncional de la transcripción que regula diversos acontecimientos celulares, tales como el ciclo celular, la supervivencia y la apoptosis.

- 45 IRE1, una exonucleasa endógena, puede modificar el ARNm de la proteína de unión a la caja X (*XBP1*) para formar ARNm de *XBP1* sometido a corte y empalme (*XBP1s*), que tiene como resultado un cambio de marco de la traducción, cuyo producto activa la secreción proteica aumentada a través de la vía UPR. Tigges y col., *Metab. Eng.* 8, 264 (2006). Tigges y col., divulgan adicionalmente la transfección de células con *XBP1* y *XBP1s* para aumentar la capacidad secretora de la fabricación biofarmacéutica de terapéuticas a base de proteínas secretadas. Tigges y col., también enseñan que la transfección transitoria con el plásmido *XBP1s* y los genes que codifican la fosfatasa alcalina embrionaria secretada (hSEAP), el VEGF hormonal secretado o la α -amilasa secretada puede dar lugar a la producción proteica de hSEAP, VEGF y α -amilasa, respectivamente.

Las proteínas recombinantes se producen mediante diversas técnicas, incluido el cultivo de las células huésped sobre sustratos sólidos, en microvehículos suspendidos y, para células independientes de anclaje, en cultivo de suspensión no adherentes. Los cultivos adherentes incluyen cultivos en microvehículos que pueden mantenerse en suspensión. En un cultivo de suspensión de células independientes de anclaje, las células no se fijan a un sustrato sino que, en su lugar, se mantienen en suspensión en un medio que contiene nutrientes dentro de un vaso de reacción adecuado.

Se usan varios procedimientos de suspensión para la producción y mantenimiento de células huésped concretas. Los procedimientos típicos de cultivos celulares en suspensión para microvehículos y para células independientes de anclaje usan agitadores, rodillos, agitadores o sistemas de elevación con aire que agitan un medio de cultivo celular y células en cultivo o en biorreactores. La aireación, la temperatura, la velocidad de agitación y condiciones similares se pueden controlar y ajustar para proporcionar condiciones favorables al crecimiento del cultivo y la elevada producción de proteínas recombinantes.

Sumario de la invención

La invención aprovecha determinados hallazgos inesperados con respecto al uso de HBx para aumentar la producción de proteínas heterólogas (Recombinantes) mediante cultivos celulares de células de mamífero. En sus diversas realizaciones, la invención proporciona procedimientos y composiciones para producir proteínas recombinantes mediante expresión de HBx en células huésped de mamífero que también expresan una proteína recombinante, de modo que la producción de la proteína recombinante se eleva en dichas células en relación con las células recombinantes comparables que no expresan HBx.

En una primera realización, la invención comprende un procedimiento de producción de una proteína heteróloga en células huésped de mamífero, que comprende cultivar células huésped de mamífero seleccionadas del grupo que consiste en células HKB 11, células CHO-S, células BHK21, células C2C12 y células HEK293, en el que dichas células huésped de mamífero contienen un ácido nucleico que codifica HBx y un ácido nucleico que codifica la proteína heteróloga, en condiciones tales que HBx y la proteína heteróloga se expresen en las células huésped de mamífero.

En una realización adicional, la invención comprende un procedimiento de producción de una proteína heteróloga en células huésped de mamífero que comprende cultivar células huésped de mamífero en cultivo de suspensión no adherente, en el que dichas células huésped de mamífero contienen un ácido nucleico que codifica HBx y un ácido nucleico que codifica la proteína heteróloga, en condiciones tales que HBx y la proteína heteróloga se expresen en las células huésped de mamífero.

En una realización adicional, la invención comprende un procedimiento para producir una proteína heteróloga en células huésped de mamífero, que comprende a) proporcionar células huésped de mamífero que contienen ácido nucleico que codifica HBx y que contienen ácido nucleico que proporciona XBP1s exógena; y b) cultivar dichas células de mamífero en condiciones tales que HBx, XBP1s exógena y la proteína heteróloga se expresen en las células de mamífero. El efecto de la coexpresión de ácidos nucleicos que codifican HBx y XBP1s heteróloga puede ser sinérgico.

En otra realización, la invención es una composición que comprende células huésped de mamífero que contienen un ácido nucleico que codifica una proteína heteróloga y un ácido nucleico que codifica HBx, en la que las células huésped de mamífero derivan de una línea celular seleccionada del grupo que consiste en células HKB11, células CHO-S, células BHK21 y células HEK293, y en la que las células expresan o se puede inducir para que expresen HBx y la proteína heteróloga.

En otra realización, la invención es una composición que comprende un cultivo en suspensión de células huésped de mamífero independientes de anclaje, en la que las células huésped de mamífero contienen ácido nucleico que codifica HBx y ácido nucleico que codifica una proteína heteróloga y en la que las células huésped de mamífero expresan o se pueden inducir para que expresen HBx y la proteína heteróloga.

En otra realización, la invención es una composición que comprende un cultivo en suspensión de células huésped de mamífero independientes de anclaje, en la que las células huésped de mamífero contienen ácido nucleico que codifica HBx que proporciona XBP1s exógena, y ácido nucleico que codifica una proteína heteróloga, y en la que las células huésped de mamífero expresan o se pueden inducir para que expresen HBx, XBP1s exógena y la proteína heteróloga.

En una realización adicional, la invención es una línea celular transfectada de forma estable obtenida de una de las composiciones mencionadas anteriormente, por ejemplo, un clon que se aísla de la composición de células de mamífero (por ejemplo, un clon de alta producción) y se usa para encontrar un cultivo nuevo u otra población de células de mamífero basadas en dicho clon.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra el efecto de la transfección transitoria mediante cantidades graduadas de tres genes virales, como se ha mostrado, sobre la producción del anticuerpo MF-J secretado en líneas de células huésped C2C12 y

BHK21.

La Figura 2 ilustra incrementos en el anticuerpo MF-J secretado o en la producción de luciferasa (Gluc) obtenida tras la transfección transitoria de células BHK21 y HBK11 recombinantes con cantidades graduadas de ácido nucleico que codifica HBx.

5 La Figura 3 ilustra la producción de fosfatasa alcalina embrionaria secretada, anticuerpo secretado o luciferasa en células de músculo esquelético C2C12 recombinantes transfectados de forma transitoria con cantidades graduadas de ácido nucleico que codifica HBx.

La Figura 4 ilustra la producción de anticuerpo secretado o de luciferasa en conjuntos de células BHK21 (panel A) y conjuntos de células HKB11 (panel B) transfectadas de forma estable con HBx.

10 La Figura 5 ilustra la expresión de HBx (panel A) y la producción de anticuerpo o luciferasa secretados (panel B) en cinco clones de BHK21 transfectados de forma estable con HBx: clones 21, 22, 18, 13 y 42.

La Figura 6 ilustra la producción de luciferasa en células de ovario (DG44) dependientes de anclaje transfectadas de forma transitoria y células de ovario (DG44sus) adaptadas al cultivo en suspensión independiente de anclaje transfectadas de forma transitoria en relación con las células no transfectadas.

15 La Figura 7 ilustra la expresión de XBP1s endógena y niveles de ARNm de Erdj4 en BHK21 parental (BHK21p), conjunto de HBx10, y cinco clones transfectados de forma estable con HBx: 13, 18, 22, 31 y 42.

La Figura 8 ilustra la producción de dos proteínas producto secretadas por las células del conjunto BHK21p, HBx10 y el clon 42 o el clon 22 de las células BHK21/HBx, cada una transfectada con en células de ovario (DG44) dependientes de anclaje transfectadas de forma transitoria con 0, 0,1 µg, 0,2 µg, 0,4 µg o 0,6 µg, de pCMV-XBP1s por pocillo. El panel A representa los niveles del anticuerpo de MF-J (ng/ml). El panel B representa la actividad de Gluc en unidades lumínicas relativas (RLU).

20

La Figura 9 ilustra el cambio de plegamiento de la producción de MF-J o Gluc tras XBP1s, HBx, expresión solo o XBP1s y coexpresión de HBx, respecto a las células BHK21p.

25 La Figura 10 ilustra la producción de luciferasa en la línea de células HEK293 transfectadas de forma transitoria y se transfectó de forma transitoria una línea de células 293F adaptadas al cultivo de suspensión independiente de anclaje en relación con las células no transfectadas.

Descripción de las formas realizaciones preferidas

Los términos “que comprende” y “que tiene” se usan de un modo abierto e inclusivo.

30 Las células cultivadas útiles para la producción a escala comercial de proteínas, tales como proteínas terapéuticas, generalmente tienen propiedades que incluyen un fenotipo estable, requisitos de nutrientes bien definidos, la capacidad para glicosilar proteínas adecuadamente y una falta de virus infecciosos. De este modo se han caracterizado varias células y líneas de células huésped de mamífero y son útiles en el contexto de la presente invención.

35 Los tipos de células huésped incluyen células HKB 11, una fusión de células somáticas entre células de riñón humano y células B humanas, células CHO-S, una línea de células de ovario de hámster chino, BHK21, una línea de células de riñón de hámster neonato, y células HEK293, una línea de células de riñón embrionario. Las células adaptadas para el crecimiento dependiente de anclaje (es decir, adherente a la superficie) y las adaptadas para el crecimiento en suspensión son útiles en varias realizaciones. En algunas realizaciones se usan células adaptadas a cultivo en suspensión independiente de anclaje. En otras realizaciones solo están incluidas determinadas células huésped de mamífero, es decir células HKB11, CHO-S, BHK21, y HEK293, y formas recombinantes de las mismas. En relación con diferentes realizaciones, también se pueden usar otras células de producción, incluidas células CHO, FRhL-2, fibroblastos diploides MRC-5, SP2/0, un mieloma murino, y NS0, también un mieloma murino.

40

En general, el cultivo celular de células huésped de mamífero recombinantes lo conocen los expertos en la técnica de la producción de proteínas recombinantes y, a menos que se especifique lo contrario en relación con una realización concreta de la invención, cualquier forma de cultivo celular se contempla en la invención.

45

En una realización concreta, la invención incluye dentro de su alcance el uso de células huésped en cultivo dependiente de anclaje, las células de cuyo cultivo se preparan mediante cualquier procedimiento de introducción de ácido nucleico en las células huésped en las que el ácido nucleico se expresa para producir una proteína recombinante dentro de dicho cultivo celular dependiente de anclajes.

50 El cultivo celular en suspensión de las células huésped recombinantes también lo conocen los expertos en la técnica de producción de proteínas recombinantes y, en una realización, cualquier forma de cultivo en suspensión de células independientes de anclaje se contempla en la invención. En esta realización concreta, la invención incluye dentro de su alcance el uso de células huésped en cultivo en suspensión independiente de anclaje preparadas mediante

cualquier procedimiento de introducción de ácido nucleico en una célula huésped de modo que el ácido nucleico se expresa para producir una proteína recombinante dentro de dicho cultivo en suspensión independiente de anclaje.

Los procedimientos de introducción de ácido nucleico en las células incluyen, entre otros, transfección con virus o virus incompleto, incorporación de plásmidos y pistola génica.

5 Una "proteína heteróloga" generalmente significa una proteína distinta al producto de XBP1 o XBP1s, a menos que se indique lo contrario en el presente documento. Una proteína heteróloga es una que normalmente no está asociada con, o expresada de forma natural por, la célula huésped, incluyendo una que se introduce mediante la transferencia de ácido nucleico exógeno en la célula.

10 La notación XBP1/XBP1s denota XBP1, XBP1s, o ambos XBP1 y XBP1s. Aunque la invención no debe estar limitada por posibles mecanismos de acción, actualmente se entiende que XBP1 se expresa para formar un ARNm sometido a corte y empalme por la célula huésped para formar ARNm de XBP1s (es decir, XBP1 sometida a corte y empalme), que se traduce en una proteína que regula la función celular. Algunos autores designan a la XBP1 no sometida a corte y empalme XBP1u. La expresión "ácido nucleico que proporciona XBP1s" incluye específicamente
 15 XBP1s. Dicho ácido nucleico es exógeno de forma inherente. En una realización se prefiere el ácido nucleico que codifica XBP1s. En otras realizaciones se incluye el ácido nucleico que codifica XBP1 (no sometida a corte y empalme), con la condición de que IRE1 no sea limitante de la velocidad en la célula. Además, se abarca la combinación de ácidos nucleicos que codifican XBP1 y IRE1. También se incluye un ácido nucleico que tiene un elemento regulador que potencia la expresión de XBP1s. En las realizaciones de la invención que implican
 20 proporcionar XBP1s en las células huésped, la XBP1s puede proporcionarse en una forma que exprese un transcrito precursor que se somete a corte y empalme *in situ* o en una forma que exprese un transcrito de XBP1s que no requiere corte y empalme.

25 Los ácidos nucleicos transfectados en la célula huésped se puede expresar de forma transitoria o estable. En una realización, se produce la expresión estable por las células huésped de XBP1s heteróloga. En otra realización, se produce la expresión estable de HBx por las células huésped. En otra realización más, se produce la expresión estable de la proteína heteróloga por las células huésped, que también expresan de forma estable HBx y/o XBP1s.

Como alternativa, las células huésped pueden expresar de forma transitoria HBx y/o XBP1s, y/o la proteína heteróloga.

30 El ácido nucleico que codifica HBx y la proteína producto heteróloga se puede introducir en las células huésped en vectores separados o como casetes diferentes en el mismo vector, usando una metodología familiar para los expertos en la técnica, y se pueden identificar células transfectadas usando una selección adecuada.

El ácido nucleico que codifica HBx y el ácido nucleico que codifica la proteína producto heteróloga se pueden introducir en la célula huésped al mismo tiempo, a sustancialmente el mismo tiempo u, opcionalmente, en momentos diferentes y en cualquier secuencia.

35 El ácido nucleico que codifica HBx, XBP1 o XBP1s, y la proteína producto heteróloga se puede introducir en la célula huésped en vectores separados o como casetes diferentes en el mismo vector, usando una metodología familiar para los expertos en la técnica.

40 Los ácidos nucleicos que codifican HBx, XBP1/XBP1s y la proteína producto heteróloga se pueden introducir en la célula huésped sustancialmente al mismo tiempo u, opcionalmente, a tiempos sustancialmente diferentes y en cualquier secuencia. En una realización, la célula huésped se transfecta con ácido nucleico que codifica XBP1s. Se pueden ajustar elementos reguladores para optimizar condiciones para la producción a escala industrial. La expresión de HBx, XBP1s y la proteína heteróloga se puede producir de forma constitutiva o en condiciones inducibles. En condiciones inducibles, la expresión génica se puede inducir en respuesta a un agente exógeno. Dichos agentes pueden incluir, entre otros, tetraciclina (Baron y col., *Methods Enzymol.* 327:401 (2000)), edisona (Pollock y col., *Curr Opin Biotechnol.* 13:459 (2002)), rapamicina (No y col., *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3346 (1996)), y mifepristona (Nordstrom, *Curr Opin Biotechnol.* 13:453 (2002)).

En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica HBx y/o el ácido nucleico que codifica XBP1 o XBP1s se introducen en una célula precursora que expresa la proteína producto. En otras realizaciones, el ácido nucleico que codifica la proteína producto heteróloga se introduce en una célula precursora que expresa HBx y/o XBP1/XBP1s.

50 Además, el ácido nucleico que codifica HBx y el ácido nucleico que codifica XBP1 o XBP1s se pueden introducir en una célula precursora que es una célula de mamífero transgénico que expresa dicha proteína heteróloga.

La secuencia génica de HBx se puede obtener en Genebank, por ejemplo AM282986. Como alternativa, el gen de HBx se puede obtener de cualquier cepa, genotipo o subgenotipo del virus de la hepatitis B, siempre que el gen de HBx del mismo codifica una proteína X funcional y tiene, o se puede modificar para que contenga, cualquier sitio
 55 para enzima de restricción que pueda ser necesario para la manipulación en vectores de expresión, como se contempla en el presente documento. Las cepas, genotipos y subgenotipos del virus de la hepatitis B se describen en, por ejemplo, Hayashi y col., *J. Med. Virology* 79: 366 - 373 (2007).

El ácido nucleico de XBP1 y el ácido nucleico de XBP1s están disponibles para los trabajadores en la técnica y se identifican ejemplos con los números de acceso siguientes:

Especie	Número de acceso	
	XBP1	XBP1s (sometida a corte y empalme)
Mus musculus	AF027963	AF 443192
Homo sapiens	AB 076383	AB 076384
Rattus norvegicus	XM 214067	-
Gallus gallus	XM 415209	-
Drosophila melanogaster	NM 079983	NM 166427
Bos taurus	BC 102639	-

5 El ácido nucleico de XBP1 puede ser de cualquier origen, pero en algunas realizaciones es de origen humano o murino. En una realización, el ácido nucleico que codifica XBP1s puede codificar un precursor (XBP1, que contiene el intrón) que se procesa fácilmente *in situ* por la célula huésped para crear la forma de corte y empalme (XBP1s). La exonucleasa IRE1 presente en las células huésped elimina un intrón de 26 pb de los transcritos de XBP1, lo que tiene como resultado un cambio de marco de la traducción que hace que la proteína XBP1s sea transcripcionalmente activa. Por lo tanto, la XBP1s recombinante puede producirse mediante transfección de una
10 célula huésped con un ácido nucleico que codifica el precursor. Como alternativa, el ácido nucleico puede codificar un transcrito que carece del intrón y que codifica directamente la forma sometida a corte y empalme.

En algunas realizaciones, los procedimientos de la presente invención implican cultivar en suspensión las células huésped y en algunas formas de realización cultivar en suspensión las células independientes de anclaje. Por "cultivar en suspensión las células independientes de anclaje" o "cultivo en suspensión no adherente," se entiende el cultivo de un cultivo de células recombinantes en el que las células son sustancialmente no adherentes a cualquier sustrato dentro del cultivo. Por "sustancialmente no adherente" se quiere decir que menos del 10 %, y en algunas realizaciones menos del 5 %, de las células se adhieren a una superficie (por ejemplo, a paredes) del vaso de cultivo después de una hora, dos horas o más de cultivo. La adherencia se puede medir, por ejemplo, por comparación de las células no adherentes con el rendimiento celular total tras la agitación suave en medio libre de tripsina, libre de calcio y libre de magnesio, o, en otra realización, en medio que contenía tripsina. En un aspecto, el cultivo en suspensión de las células huésped se produce en un sistema de biorreactor en el que las células pueden mantenerse como células sustancialmente no adherentes durante la producción de proteína recombinante. Las células suspendidas se pueden agitar mediante métodos conocidos en la técnica, incluyendo elevación con aire y agitación, o por rotación o girando el recipiente biorreactor.

25 El equipo y los procedimientos para llevar a cabo el cultivo de células en suspensión independiente de anclaje son familiares para el experto en la técnica y se divulgan en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 7.294.484, 7.157.276, 6.660.501 y 6.627.426, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia. En general, los principios, protocolos, equipos y técnicas prácticas para el cultivo de células en suspensión independiente de anclaje se pueden encontrar en Chu y col., Industrial choices for protein production by large-scale cell culture, 2001, Curr Opin Biotechnol. 12, 180 - 7; Wamock y col., Bioreactor systems for the production of biopharmaceuticals from animal cells, 2006, Biotechnol Appl Biochem. 45, 1 - 12, que se incorporan en el presente documento por referencia.

35 Se contempla que cualquier célula huésped de mamífero que pueda adaptarse a, y mantenerse en, un cultivo de células en suspensión independiente de anclaje y transfectar con HBx para aumentar la producción de proteínas se puede utilizar de acuerdo con los procedimientos de la invención. Ejemplos específicos de células huésped son DG44, células de ovario de hámster chino (células CHO), células CV-1 de fibroblastos de simio transformados por SV40 deficiente en el origen de replicación (Células COS) y líneas celulares humanas (HEK 293, CEM). También se contemplan líneas de células de ratón, perro y madre. Actualmente, en algunas realizaciones, las líneas de células incluyen versiones adaptadas a la suspensión de las células DG44, CHO, CV-1, COS y HEK 293. Un tipo específico
40 de células DG44 puede ser las células DG44sus. Los medios para la adaptación de las células adherentes al crecimiento en cultivo en suspensión no adherente son familiares para el experto en la materia.

En algunos aspectos de la invención, las células huésped tienen un origen no hepatocítico. Por ejemplo, las células pueden ser, preferentemente, células de riñón, células de ovario, linfocitos, células de Kupffer, células de fusión somáticas, células madre, o cualquier otra célula de origen no hepatocítico.

45 Cualquier medio de cultivo celular compatible con, y capaz de sostener, células huésped de mamífero es adecuado.

5 La elección de los medios de cultivo celular depende del sistema recombinante particular y la determinación de medios adecuados no es crucial y la puede realizar con facilidad el experto en la técnica. Los medios de cultivo adecuados incluyen MEM, DME rico en glucosa, DME bajo en glucosa, MDME de Iscove, medio 199, McCoy's, Ham's F10, Ham's F12, RPMI 1640, NCTC-109 y L-15 (Leibovitz). Además, se pueden usar mezclas de medios de cultivo, por ejemplo DME/F12 o DME/M199. También se pueden usar medios especializados, no limitados a, AthenaES™ Cell Culture Media BRFF-BMZERO™, BRFF-EPM2™, BRFF-HPC1™ y BRFF-P4 - 8F™. El crecimiento celular se puede lograr sin suero. El crecimiento celular también se puede lograr sin productos animales. En el caso de las proteínas terapéuticas recombinantes destinadas a la administración humana, no se usan productos de origen animal en cualquier etapa de la preparación y uso de medios. Para la producción de proteínas terapéuticas, el medio puede estar libre de proteína de suero y / o de origen animal, ejemplos de los cuales se divulgan en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5.804.420 y 7.094.574; los documentos WO 97/05240 y EP0872487.

15 FreeStyle™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) es un medio de cultivo celular útil que no contiene componentes de origen animal y que, por lo tanto, es deseable para su uso en relación con la expresión de proteínas destinadas para su uso como agentes terapéuticos humanos.

En algunos aspectos, el medio de cultivo celular puede tener una concentración eficaz reducida de calcio. Es decir, la concentración de calcio libre puede ser menor que la del medio estándar correspondiente en aproximadamente un 50 %, en un 60 %, en un 70 %, en un 80 % o por lo menos en un 90 %. En una realización, los medios con calcio reducido se utilizan con cultivos en suspensión independientes de anclaje.

20 En otros aspectos, el medio de cultivo para el cultivo celular se puede utilizar con una atmósfera de aire o, preferentemente, aire que contiene CO₂, por ejemplo, 5-10 % (vol / vol) en el aire.

25 El cultivo de células independientes de anclaje en suspensión reduce el espacio físico requerido para producir productos proteicos biológicos. El cultivo en suspensión adherente también independiente del anclaje también tiene ventajas en la bioproducción. Las condiciones del cultivo en suspensión independiente de anclaje se pueden ajustar para optimizar la producción de proteína recombinante basándose en el tipo particular de células huésped y en la proteína recombinante que se esté produciendo.

30 El cultivo de células de mamífero es útil para la expresión de proteínas biológicas humanas para investigación y para uso clínico. En algunas realizaciones, las células BHK21 o HKBI 1 que expresan HBx tienen una mayor expresión de una proteína producto heteróloga. Las células huésped DG44sus son útiles como una célula huésped en relación con la realización del cultivo en suspensión de la presente invención en la que las células transfectadas con HBX demuestran una mayor producción de una proteína producto heteróloga en cultivo en suspensión independiente de anclaje de células de mamífero recombinantes. En aún otra realización, las células HKBI11 humanas que expresan HBx y XBP1s heteróloga permiten un aumento y, en algunas realizaciones, un aumento sinérgico, en la producción de una proteína producto heteróloga.

35 Generalmente, un vector de expresión adecuado para la introducción del gen heterólogo en las células huésped de mamífero es un vector que proporciona secuencias de control o reguladoras unidas operativamente con la secuencia de ácido nucleico que codifica el gen heterólogo. Las secuencias reguladoras son capaces de dirigir la expresión del gen heterólogo en la célula huésped, ya sea de forma constitutiva o inducible. Los vectores y las secuencias reguladoras adecuados son bien conocidos para los expertos en la técnica.

40 Por ejemplo, los vectores adecuados pueden ser, o contener, componentes de vectores virales seleccionados del virus SV40 de simio, retrovirus, virus del papiloma bovino, virus vaccinia y adenovirus, o vectores bacterianos de uso habitual o vectores de expresión en insectos y/o mamíferos de uso habitual o vectores de integración que conducen a una línea celular estable que expresa el producto de proteína recombinante.

45 Los procedimientos para la introducción de un vector, tal como un plásmido, en células de mamífero son bien conocidos. Ejemplos de procedimientos adecuados incluyen, sin limitaciones, transfección mediada por dextrano, precipitación en fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del o los polinucleótido(s) en liposomas, transducción viral y microinyección directa del ADN en los núcleos. Adicionalmente, las referencias que proporcionan detalles de los procedimientos de transfección incluyen: Wigler y col., Cell 14:725, 1978; Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7:603, 1981; Graham y Van der Eb, Virology 52:456, 1973; Neumann y col., EMBO J. 1:841 - 5, 1982; Hawley-Nelson y col., Focus 15:73, 1993; Ciccarone y col., Focus 15:80, 1993; Miller y Rosman, BioTechniques 7:980 - 90, 1989; y Wang y Finer, Nature Med. 2:714 - 6, 1996, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia. La producción de polipéptidos recombinantes en células de mamífero cultivadas se divulga en las patentes de EE.UU. N° 4.713.339, 4.784.950, 4.579.821 y 4.656.134, entre otras, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia.

55 Los procedimientos de la presente invención abarcan, en algunas realizaciones, el uso de una construcción de expresión de ácido nucleico que codifica la proteína producto en un vector que comprende una o más secuencias promotoras. El promotor puede o no puede estar, en la naturaleza, asociado con la secuencia de codificación particular. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica HBx y el ácido nucleico que codifica la proteína

producto heteróloga están unidos operativamente a un promotor para provocar que la célula huésped exprese el producto de la proteína heteróloga y, en algunas realizaciones, secretar el producto proteico en el medio de cultivo. Los promotores adecuados son conocidos por el experto en la técnica e incluyen promotores constitutivos fuertes, tales como el promotor del CMV. También se contempla el uso de un promotor inducible conocido en la técnica.

5 Las secuencias que contienen marcadores seleccionables también pueden transfectarse en la línea celular. Estos marcadores pueden estar contenidos en el vector que contiene la proteína heteróloga, o pueden transfectarse por separado utilizando técnicas convencionales, tales como las descritas en el presente documento. Los marcadores seleccionables para células de mamíferos son conocidos en la técnica e incluyen por ejemplo, timidina quinasa, aminoglicósido fosfotransferasa, hidromicina B fosfotransferasa, asparagina sintetasa y adenosina desaminasa. Un
10 experto en la técnica puede seleccionar fácilmente otros marcadores, según lo deseado.

En algunas realizaciones, las células huésped son una línea celular de crecimiento rápido con mayor facilidad de transfección o transducción, u otra calidad deseada, que puede transfectarse con HBx y el ácido nucleico que codifica una proteína heteróloga.

15 Las proteínas producto de la invención pueden incluir proteínas de los alimentos, especialmente las proteínas de los alimentos que suministran nutrientes esenciales, proteínas para su uso en el desarrollo o análisis de medicamentos, proteínas para procesamiento de alimentos y proteínas terapéuticas. Las proteínas producto pueden ser secretoras o no secretoras. Las proteínas secretoras son adecuadas debido a su facilidad de recuperación. En algunas realizaciones, las proteínas terapéuticas producidas como productos secretados son particularmente adecuadas. Se pueden producir variantes de proteínas de productos (es decir, versiones mutantes de la proteína que retienen toda
20 o una parte de la función de la proteína de tipo salvaje, tal como, por ejemplo, las variantes con delección de dominio B del factor VIII de coagulación humano).

Las proteínas terapéuticas útiles en la presente invención incluyen, sin limitaciones, las proteínas que se encuentran normalmente en la sangre, tales como factores de la sangre; proteínas que se encuentran en la sangre en respuesta al estrés, infección o enfermedad; proteínas que se encuentran en la leche de los mamíferos; proteínas que
25 normalmente se encuentran en los ganglios; proteínas que se encuentran en los ganglios en respuesta al estrés, infección o enfermedad; proteínas que normalmente se encuentran en el líquido cefalorraquídeo en respuesta al estrés, infección o enfermedad; proteínas que normalmente se encuentran en el intestino; o proteínas de microorganismos; o muteínas de estas proteínas. Por otra parte, las proteínas terapéuticas pueden mutarse, tales como por truncamiento o delección de partes, tales como uno o más
30 dominios. Adicionalmente, las muteínas pueden comprender uno, dos, tres, o más sustituciones de aminoácidos. En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son conservadoras, tal como se entiende en la técnica.

Una "proteína terapéutica" o "polipéptido terapéutico" se refiere a un polipéptido que posee actividad biológica, o un precursor del mismo, que se puede utilizar para la prevención y / o tratamiento de la enfermedad. Los ejemplos de polipéptidos terapéuticos incluyen los capaces de prevenir, inhibir, estabilizar o invertir un defecto genético heredado
35 o no heredado en el metabolismo, regulación inmune, regulación hormonal, defecto enzimático, o función estructural asociada a la membrana. Por ejemplo, la proteína terapéutica puede sustituir una proteína o enzima ausente o defectuosa en la célula o la producción complementaria de una proteína o enzima celular defectuosa o de expresión baja. Las proteínas terapéuticas pueden incluir proteínas de fusión, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y miméticos de anticuerpos, y variantes de proteínas barajadas con actividades mejoradas.

40 Las proteínas terapéuticas pueden incluir factores de coagulación, anticuerpos, antígenos de virus, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos de protozoos y reguladores metabólicos. Los reguladores metabólicos pueden incluir hormonas peptídicas, quimiocinas, citocinas y factores de crecimiento. En ciertas realizaciones, las proteínas terapéuticas pueden ser supresores de tumores, citocinas, factores proapoptóticos o proteínas derivadas de microorganismos.

45 La expresión "proteína de la sangre" se refiere a una o más proteínas, o fragmentos biológicamente activos de las mismas, que se encuentran en la sangre humana normal, incluyendo, sin limitaciones, hemoglobina, α -1-antitripsina, fibrinógeno, seroalbúmina humana, protrombina/trombina, anticuerpos, factores de coagulación de la sangre y fragmentos biológicamente activos de los mismos. Las proteínas de la coagulación incluyen el Factor V, el Factor VI,
50 el Factor VII, el Factor VIII y sus derivados tales como el FVIII con delección del dominio B, el Factor IX, el Factor X, el Factor XI, el Factor XII, el Factor XIII, el Factor de Fletcher, el Factor de Fitzgerald, y el Factor de von Willebrand.

La expresión "proteína de leche" se refiere a una o más proteínas, o fragmentos biológicamente activos de las mismas, encontradas en la leche humana normal, incluyendo caseína, lactoferrina, lisozima, α -1 anti-tripsina, anticuerpos, factores proteicos, moléculas inmunológicas y fragmentos biológicamente activos de las mismas.

55 En algunas realizaciones, cuando la proteína terapéutica es un anticuerpo, se contempla cualquier ácido nucleico que codifica tal anticuerpo. Se incluyen los anticuerpos monoclonales, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, y otras moléculas variantes de anticuerpos que pueden producirse en cultivo de células en suspensión o adherente recombinante.

Los anticuerpos dentro del alcance de la presente invención incluyen, entre otros: cetuximab, rituximab,

trastuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, ibritumomab, tositumomab, bevacizumab, alemtuzumab, HuPAM4, 3F8, G250, HuHMFG1, Hu3S193, hA20, SGN-30, RAV12, daclizumab, basiliximab, abciximab, palivizumab, infliximab, eculizumab, omalizumab, efalizumab, panitumumab, anticuerpos anti-HER2 (Carter y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 - 4289 (1992), patente de EE.UU. N° 5.725.856); anticuerpos anti-CD20 tales como anti-CD20 quimérico "C2B8" como en la patente de EE.UU. N° 5.736.137; una variante quimérica o humanizada del anticuerpo 2H7 como en la patente de EE.UU. N° 5.721.108, B1; o anti-IL-8 (St John y col., Chest, 103:932 (1993), documento WO 95/23865); anticuerpos anti-VEGF incluyendo anticuerpos anti-VEGF humanizados y/o madurados por afinidad, tal como el anticuerpo anti-VEGF humanizado huA4.6.1 AVASTIN™ (Kim y col., Growth Factors, 7:53 - 64 (1992), documento WO 96/30046, y documento WO 98/45331); anticuerpos anti-PSCA (documento WO01/40309); anticuerpos anti-CD40, incluyendo iS2C6 y variantes humanizadas del mismo (documento WO00/75348); anti-CD11a (patente de EE.UU. N° 5.622.700, documento WO 98/23761, Steppe y col., Transplant Intl. 4:3 - 7 (1991), y Hourmant y col., Transplantation 58:377 - 380 (1994)); anti-IgE (Presta y col., J. Immunol. 151:2623 - 2632 (1993), documento WO 95/19181); anti-CD18 (patente de EE.UU. N° 5.622.700 o documento WO 97/26912); anti-IgE (incluyendo E25, E26 and E27; patente de EE.UU. N° 5.714.338 o patente de EE.UU. N° 5.091.313, documento WO 93/04173 o documento PCT/US98/13410, patente de EE.UU. N° 5.714.338); anticuerpo anti-receptor de Apo-2 (documento WO 98/51793); anticuerpos anti-TNF- α , incluyendo cA2 (REMICADE™), CDP571 y MAK-195 (véase la patente de EE.UU. N° 5.672.347, Lorenz y col., J. Immunol. 156(4):1646 - 1653 (1996), y Dhainaut y col., Crit. Care Med. 23(9):1461 - 1469 (1995)); factor anti-tisular (TF) (patente europea n° 0 420 937 B1); anti- $\alpha_4\beta_7$ integrina humana (documento WO 98/06248); anti-EGFR (anticuerpo 225 quimerizado o humanizado como en el documento WO 96/40210); anticuerpos anti-CD3 tales como OKT3 (patente de EE.UU. N° 4.515.893); anticuerpos anti-CD25 o anti-tac tales como CH1-621 (SIMULECT™) y (ZENAPAX™) (véase la patente de EE.UU. N° 5.693.762); anticuerpos anti-CD4 tales como el anticuerpo cM-7412 (Choy y col., Arthritis Rheum 39(1):52 - 56 (1996)); anticuerpos anti-CD52 tales como CAMPATH-1H (Riechmann y col., Nature 332:323 - 337 (1988)); anticuerpos anti-receptor Fc tal como el anticuerpo M22 dirigido contra Fc γ RI como en Graziano y col., J. Immunol. 155(10):4996 - 5002 (1995); anticuerpos frente al antígeno anti-carcinoembrionario (CEA) tal como hMN-14 (Sharkey y col., Cancer Res. 55(23Suppl): 5935s-5945s (1995); anticuerpos dirigidos contra células epiteliales de mama, incluyendo huBrE-3, hu-Mc 3 y CHL6 (Ceriani y col., Cancer Res. 55(23): 5852s-5856s (1995); y Richman y col., Cancer Res. 55 (23 Suppl): 5916s-5920s (1995)); anticuerpos que se unen a las células de carcinoma de colon, tales como C242 (Litton y col., Eur J. Immunol. 26(1):1 - 9 (1996)); anticuerpos anti-CD38, por ejemplo AT 13/5 (Ellis y col., J. Immunol. 155(2):925 - 937 (1995)); anticuerpos anti-CD33 tales como Hu M195 (Jurcic y col., Cancer Res 55(23 Suppl):5908s-5910s (1995) y CMA-676 o CDP771; anticuerpos anti-CD22 tales como LL2 o LymphoCide (Juweid y col., Cancer Res 55(23 Suppl):5899s-5907s (1995)); anticuerpos anti-EpCAM tales como 17 - 1A (PANOREX™); anticuerpos anti-GpIIb/IIIa tales como abciximab o c7E3 Fab (REOPRO™); anticuerpos anti-RSV tales como MEDI-493 (SYNAGIS™); anticuerpos anti-CMV tales como PROTOVIR™; anticuerpos anti-VIH tales como PRO542; anticuerpos anti-hepatitis tales como el anticuerpo anti-Hep B OSTAVIR™; anticuerpo anti-CA 125 OvaRex; anticuerpo anti-epítipo GD3 idiótipo BEC2; anticuerpo anti- $\nu\gamma$ 3 VITAXIN™; anticuerpo anti-carcinoma de células renales humano tal como ch-G250; ING-1; anticuerpo anti-17 - 1A humano (3622W94); anticuerpo anti-tumor colorrectal humano (A33); anticuerpo anti-melanoma humano R24 dirigido contra el gangliósido GD3; anticuerpos anti-carcinoma de células escamosas humano (SF-25); y anticuerpos anti-antígeno leucocitario humano (HLA) tales como Smart ID10; el anticuerpo anti-HLA DR Oncolym (Lym-1) o adalimumab, o fragmentos activos de los mismos. Los antígenos diana preferidos para el anticuerpo en el presente documento son: Receptor HER2, VEGF, IgE, CD20, CD11a, y CD40.

Cuando la proteína terapéutica es un regulador metabólico, se contempla cualquier regulador metabólico proteico o polipeptídico. Se entenderá que cualquier mutante o variante de una proteína terapéutica se pueden expresar utilizando el procedimiento de la presente invención.

A modo de un ejemplo no limitante, tales proteínas terapéuticas incluyen eritropoyetina, hormona de crecimiento humana, factor estimulante de colonias de granulocitos, interferones - α , - α 2b, - β , - β 1a, - β 1b y - γ , Factor IX, hormona estimulante del foliculo, interleucina-2, eritropoyetina, anti-TNF- α y una hidrolasa lisosomal. Las proteínas terapéuticas también pueden incluir el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF, FGF1, FGF2, y FGF5), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de las células nerviosas (NGF) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)).

Cuando la proteína terapéutica es una citocina, se contempla cualquier citocina. En realizaciones específicas, la citocina es GM-CSF, G-CSF, IL-1 α , IL-10, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32 IFN- α , IFN- β , IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , TNF- β , TNF- α , TNF- β , factor de crecimiento de queratinocitos, TGF- α , TGF- β , VEGF, o MDA-7.

Otras proteínas y polipéptidos en los que se pueden producir de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, insulina, motilina, gastrina, prolactina, hormona adrenocorticotrópica (ACTH), eritropoyetina, hormona del crecimiento (GH), factor de las células madre (SCF), trombopoyetina, la osteoprotegerina (OPG), y la proteína de la obesidad, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factores de crecimiento similares a la insulina (IGF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factores de crecimiento estimulante de colonias (CSF), hormona estimulante del tiroides

(TSH), hormona luteinizante (LH), hormona estimulante del folículo (FSH), gonadotropina coriónica humana (HCG), factor de crecimiento neurotrófico (NGF), Factor 3 neurotrófico (NT-3), factor neurotrófico 4 (NT4), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la línea de células gliales derivadas DEL factor neurotrófico (GDNF), la proteína morfogenética ósea (BMP), factor de diferenciación de crecimiento de megacariocitos (MGDF), superóxido dismutasa (SOD), activador del plasminógeno tisular (TPA), uroquinasa, estreptoquinasa, caliceína, α -galactosidasa, ARNasa pancreática, factor activador de plaquetas acetilhidrolasa, antagonista del receptor de la interleucina-1 (IL-1ra), REMICADE (Infliximab: un anticuerpo monoclonal que bloquea la actividad biológica del TNF α circulante), anti-tripsina α -1, agentes anti-angiogénesis, calcitonina y análogos, quimiocinas, encefalinas y otros péptidos opioides, glucagón, granisetrón, péptidos antagonistas de la hormona del crecimiento, supresores de IgE, insulintropina y análogos, hormona luteinizante, hormona liberadora de la hormona luteinizante y análogos, hormona paratiroidea y péptidos análogos, péptidos antagonistas de la hormona paratiroidea, receptores solubles recombinantes, activadores de plasminógeno tisular, antígenos terapéuticos, y ENBREL (etanercept: proteína de fusión dimérica que consiste en la porción de unión a ligando extracelular del receptor del factor de necrosis tumoral humano de 75 kilodalton (p 75) (TNFR) ligado a la porción Fc de la IgG1 humana).

15 Cuando la proteína terapéutica es un supresor tumoral se contempla cualquier supresor tumoral. En realizaciones específicas, el ácido nucleico que codifica el supresor tumoral es APC, CYLD, HIN-1, KRAS2b, p16, p19, p21, p27, p27mt, p53, p57, p73, PTEN, MDA-7, Rb, Uteroglobina, Skp2, BRCA-1, BRCA-2, CHK2, CDKN2A, DCC, DPC4, MADR2/JV18, MEN1, MEN2, MTS 1, NF1, NF2, VHL, WRN, WT1, CFTR, C-CAM, CTS-1, zac1, ras, MMAC1, FCC, MCC, FUS1, Gen 26 (CACNA2D2), PL6, Beta* (BLU), Luca-1 (HYAL1), Luca-2 (HYAL2), 123F2 (RASSF1), 101F6, Gen 21 (NPRL2), o un gen que codifica un polipéptido SEM A3.

20 Se contemplan el anticuerpo antagonista del receptor de membrana de la glicoproteína IIb/IIIa de plaquetas, hirudina y trombina recombinante, inhibidores de trombina tales como Angiomax, angiopeptina, péptidos antagonistas del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y anticuerpos monoclonales tales como los específicos de los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), superóxido dismutasas, miméticos de superóxido dismutasas y combinaciones de los mismos.

25 Antígenos para vacunas adecuados incluyen los de (incluyendo, pero sin limitaciones, la proteína de la subunidad, péptido y toxoides), la difteria, el tétanos, HIB, la enfermedad de Lyme, meningococo, paperas, rubéola, varicela, fiebre amarilla, virus sincitial respiratorio, encefalitis japonesa transmitida por garrapatas, neumococo, estreptococo, fiebre tifoidea, gripe, hepatitis, incluyendo hepatitis A, B, C y E., otitis media, rabia, poliomielitis, parainfluenza, rotavirus, virus de Epstein Barr, CMV, clamidia, Haemophilus no tipificable, Moraxella catarrhalis, virus del papiloma humano, tuberculosis incluyendo BCG, gonorrea, asma, aterosclerosis, malaria, E. coli, enfermedad de Alzheimer, salmonella, diabetes, cáncer, herpes simple, papiloma humano, VIH-1, VIH-2, SIV, FIV, FeLV, adenovirus equino infeccioso, virus de la anemia, virus de la encefalitis equina del este, virus de la encefalitis equina occidental, virus de la encefalitis equina venezolana, virus de la fiebre del Valle del Rift, virus de la fiebre hemorrágica del Congo Crimea, coronavirus de SDRA, virus de la viruela del mono, adenovirus, viruela, encefalitis japonesa (transmitida por mosquitos), fiebre amarilla, dengue, encefalitis del Nilo occidental, *E. coli* enterotoxigénica, *Campylobacter H. pylori*, *C. difficile* y sarampión. La proteína puede ser la proteína de la muerte de adenovirus.

30 Cuando la proteína terapéutica es un factor proapoptótico, se contempla cualquier ácido nucleico que codifica tales factores. En algunas realizaciones, el ácido nucleico del factor proapoptótico es CD95, caspasa-3, Bax, Bag-1, CRADD, TSSC3, bax, hid, Bak, MKP-7, PARP, bad, bcl-2, MST1, bbc3, Sax, BIK, o BID.

35 En algunas realizaciones, la proteína terapéutica deriva de microorganismos. Aunque se contempla cualquier proteína de un microorganismo, en algunas realizaciones las proteínas son antígenos derivados de virus, bacterias, hongos o protozoos.

40 El antígeno también puede derivar seleccionado de Mycobacterium tuberculosis, Yersinia pestis, Rickettsia prowazekii, Rickettsia typhi, Rickettsia rickettsii, Ehrlichia chaffeensis, Francisella tularensis, Bacillus anthracis, Helicobacter pylori y Borrelia burgdorferi.

45 En algunas realizaciones, el microorganismo del que derivan los antígenos se seleccionan de la lista de Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium ovate, Plasmodium malariae, y Giadaria intestinalis.

50 En algunas realizaciones, el microorganismo del que derivan los antígenos se seleccionan de la lista de Histoplasma, Ciccidis, Immitis, Aspergillus, Actinomyces, Blastomyces, Candida y Streptomyces.

55 La familia de tripsina - quimotripsina (S1) incluye miembros tales como: tripsina (formas I, II, III, IV, Va y Vb); enzima similar a la tripsina; hepsina; TMPRSS2; venombina; elastasa cercarial; braquiurina; Factor C; enzima procoagulación; producto del gen Easter; producto del gen de serpiente; producto del gen stubble; endopeptidasa de degradación de vitelina; hipodermina C; serínproteasas 1 y 2; quelasa; quimotripsina (formas A, B, II, y 2); Proteinasa RVV-V (formas α y γ); flavoboxina; venombina A; crotalasa; enteropeptidasa; acrosina; ancrod; seminina; semenogelasa; caliceína tisular; caliceína renal; caliceína submandibular; factor del crecimiento neural 7S (cadenas α y γ); proteína de unión al factor de crecimiento epidérmico (formas 1, 2, y 3); tonina; arginina esterasa; elastasa pancreática I; elastasa pancreática II (formas A y B); endopeptidasa pancreática E (formas A y B); elastasa leucocitaria; medulasina; azurocidina; catepsina G; proteinasa 3 (mieloblastina); quimasa (formas I y II); γ -renina;

5 triptasa (formas 1, 2, y 3); granzima A; proteasa de las células asesinas naturales 1; gilatoxina; granzimas B, C, D, E, F, G e Y; componente III del complejo de la carboxipeptidasa A; factores del complemento D, B, I; componentes del complemento C1r, C1s, y C2; serín proteasa dependiente de calcio; hipodermina A, B, y C; haptoglobina (formas 1 y 2); proteína relacionada con la haptoglobina; plasmina; apolipoproteína (a); factor de crecimiento de los hepatocitos; medulasina; trombina; activador del plasminógeno t; activador del plasminógeno u; activador del plasminógeno salival; calicreína plasmática; factores de coagulación VII, IX, X, XI, y XII; y proteínas C y Z, así como miembros todavía no identificados. Todas las proteínas miembros de la familia de tripsina-quimotripsina pueden ser productos proteicos de la invención.

10 Otras proteínas producto de la presente invención incluyen, sin limitación, ligandos de receptores, enzimas, péptidos de adhesión, inhibidores de la coagulación o agentes disolventes de coágulos, tales como estreptoquinasa y activador del plasminógeno tisular, inhibidores de metaloproteínasa de la matriz e inhibidores tisulares de metaloproteínasa, y combinaciones de cualquiera de los anteriores.

15 Las hidrolasas lisosomales útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, β-glucosidasa, α-galactosidasa-A, β-hexosaminidasa, β-galactosidasa, α-galactosidasa, α-manosidasa, β-manosidasa, α - L-fucosidasa, β-glucuronidasa, α - glucosidasa, α -N-acetilgalactosaminidasa, y fosfatasa ácida.

Los antígenos terapéuticos, incluyendo todos los principales agentes polipeptídicos terapéuticos tales como los agentes del resfriado común son también proteínas terapéuticas.

Los procedimientos y cultivos de células recombinantes de la invención también pueden comprender proteínas comerciales, por ejemplo las enumerados en la Tabla 1.

20 TABLA 1

Indicación(es)	Proteína comercial [nombre genérico]
Trastornos renales, trastornos cardiológicos, trastornos arteriales vasculares	Activase [Alteplasa] Cathflo Activasa [Alteplasa] ReoPro [Abciximab] Retavase [Reteplasa] Estreptase [estreptoquinasa] TNKasa [Tenecteplase]
Neuropatía periférica neurológica (no neuropatías dolorosas intrínsecamente)	Avonex [Interferón beta-1a] Betaseron [Interferón beta-1b] Botox [toxina botulínica de tipo A] Myobloc [toxina botulínica de tipo B] Rebif [Interferón beta-1a] Tysabri [Natalizumab]
Alergia, pulmonar	Pulmozyme [Dornasa alfa] Xolair [Omalizumab]
Reumatología, tratamiento del dolor (incluidas neuropatías periféricas que son intrínsecamente dolorosas)	Enbrel [Etanercept] Humira TM [Adalimumab] Kineret [Anakinra] Orencia [Abatacept] Remicade [Infliximab]
Gastrointestinal (incluye trastornos hepáticos no virales), trastornos metabólicos genéticos (congénitos), parenterales de alto volumen	Aldurazyme [Laronidasa] Fabrazyme [Agalsidasa beta] Naglazyme [Galsulfasa]
Dental, dermatología	Alferon N Injection [Interferón alfa-n3] Amevive [Alefacept] Raptiva [Efalizumab] Regranex [Becaplermina] Santyl [Colagenasa]
Enfermedad infecciosa bacteriana, septicemia, oftalmología	Xigris [Drotrecogina alfa (activada)]

Indicación(es)	Proteína comercial [nombre genérico]
Transplante de órganos sólidos, trastornos de inmunodeficiencia de glóbulos blancos, patógenos especiales (por ejemplo, fúngicos TB, ántrax)	Actimmune [Interferón gamma-1b] Orthoclone [Muromonab-CD3] Simulect [Basiliximab] Zenapax [Daclizumab]
Infecciones víricas (incluyendo hepatitis viral)	Copasys Copegus [Peginterferón alfa-2a] Inferaen [Interferón alfacon-1] Intron A [Interferón alfa-2b] Pegasys [Peginterferón alfa-2a] Peg-Intron [Peginterferón alfa-2b] Roferon-A [Interferón alfa-2a] Synagis [Palivizumab]
Tratamientos biológicos para cáncer, tratamientos biológicos adyuvantes para el cáncer, enfermedad del injerto contra el huésped	Avastin [Bevacizumab] Bexxar [Tositumomab] Campath [Alemtuzumab] Elitek [Rasburicasa] Elspar [Asparaginasa] Eribitux [Cetuximab] Herceptin [Trastuzumab] Kepivance [Palifermin] Leukine [Sargramostim] Neulasta [Pegfilgrastim] Neumega [Oprelvekin] Neupogen [Filgrastim] Oncaspar [Pegaspargasa] Ontak [Denileukina diftitox] Proleukin [Aldesleukina] Rituxan [Rituximab] Zevalin [Ibritumomab tiuxetan]
Diagnóstico por imagen, hematología, trastornos vasculares venosos	Abbokinase [Urokinasa] Aranesp [Darbepoetina alfa] CEA-Scan TM [Arcitumomab] Epogen [Epoetina alfa] NeutroSpec [Tecnecio fanolesomab] Procrit [Epoetina alfa] ProstaScint [Capromab Pendetida] Verluma [Nofetumomab]

El ácido nucleico, que codifica las proteínas mencionadas anteriormente, o bien se conoce en la técnica o se puede obtener utilizando procedimientos familiares para el experto en la materia. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos de alta afinidad se pueden obtener mediante el cribado de bibliotecas de fagos.

- 5 La proteína heteróloga producida por el procedimiento de la invención puede incluir un polipéptido PRO. El polipéptido PRO puede carecer de una secuencia señal N-terminal y / o la metionina de iniciación y puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos. El procedimiento de la invención también abarca la producción de polipéptidos PRE PRO, es decir, precursores de los polipéptidos PRO.

- 10 La proteína heteróloga producida por el procedimiento de la invención puede recuperarse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, incluyendo la lisis de células para recuperar las proteínas no secretadas o aislamiento del medio de cultivo para obtener las proteínas secretadas. Adicionalmente, las proteínas pueden purificarse por cualquier medio útil, incluyendo, pero sin limitaciones, precipitación, unión a resinas o membranas de intercambio iónico o de afinidad, y cromatografía de exclusión por tamaño. Procedimientos generales para expresar y recuperar proteínas recombinantes producidas por un sistema de células de mamífero se divulgan en, por ejemplo, Etcheverry, Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture, in Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland y col. (eds.), página 163 (Wiley-Liss, Inc. 1996).

En algunas realizaciones, el nivel de producción de proteínas terapéutica puede ser de aproximadamente 1,1x, 1,2x,

1,4x, 1,6x, 1,8x, 2x, 2,2x, 2,4x, 2,6x, 2,8x, 3x, 3,2x, 3,4x, 3,6x, 3,8x, 4x, 4,2x, 4,4x, 4,6x, 4,8x, 5x, o más, o cualquier intervalo derivable en el mismo, no en comparación con el nivel de producción en otras células no transfectadas con HBx o con HBx y XBP1s.

- Los procedimientos de la invención pueden comprender una cantidad específica de proteína heteróloga producida.
- 5 En algunas realizaciones, la cantidad de proteína terapéutica producida por litro de cultivo de células en suspensión no adherente puede ser de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, o 20 mg o potencialmente mayor, o cualquier intervalo o combinación derivable en el mismo. Por tanto, las composiciones de la invención incluyen tal cantidad de proteína terapéutica, que puede o no purificarse adicionalmente. La proteína o
- 10 proteínas heterólogas cosechadas recuperadas del cultivo en suspensión no adherente puede purificarse adicionalmente por medios conocidos en la técnica. La purificación puede implicar cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitaciones, concentración, diafiltración por ultrafiltración tangencial de flujo, cromatografía o purificación de resolución por tamaño, purificación por afinidad y cromatografía de intercambio iónico. En algunas realizaciones, la cromatografía se puede emplear en la purificación de la proteína heteróloga. En algunas realizaciones, la cromatografía puede ser cromatografía de afinidad o cromatografía de intercambio iónico.
- 15 En todavía otras realizaciones, la proteína heteróloga purificada por cromatografía de afinidad puede someterse además a cromatografía de intercambio iónico. En algunas realizaciones de la presente invención, la proteína heteróloga cosechada puede someterse a purificación de resolución por tamaño. En algunas realizaciones, la purificación de resolución por tamaño puede implicar un gel de proteína o columna de exclusión por tamaño. La proteína heteróloga fabricada de acuerdo con la invención puede formularse farmacéuticamente con uno o más
- 20 vehículos, excipientes o similares y dichas formulaciones pueden administrarse utilizando procedimientos habituales.

Ejemplos

Ejemplo 1. HBx pero no US11 y NS4B aumenta la producción de proteínas en células BHK21

Construcción plasmídica

25 Todos los transgenes usados para la transfección transitoria se clonaron en el vector de expresión pZac2.1 (Gene Therapy Program, Penn Vector core, University of Pennsylvania) que contiene un promotor de CMV humano de longitud completa, un intrón quimérico de Promega, MSC (sitio de clonación múltiple) y una poliA de SV40 (Gene Therapy Program).

El gen HBx se obtuvo a partir del genoma ADW2 de una cepa del VHB contenido en un plásmido pBS. En el plásmido, HBx estaba flanqueado por sitios de restricción MluI y XbaI y se amplificó por PCR usando dos cebadores

30 (cebador directo GER270: GATCACGCGTGCCACCATGGCTGCTAGGCTG, SEC ID N° 1 y cebador inverso GER271: GTCGACTCTAGATTAGGCAGAGGTGAAAAAGTTG, SEC ID N° 2). El HBx amplificado se insertó en el vector de expresión pZac2.1 para generar el plásmido pHBx.

El gen US 11 del CMV humano como se describe en Gretch y Stinski Virology, 174 (2) 522 - 532 (1990) se amplificó por PCR usando dos cebadores (cebador directo GER275: GATCACGCGTGCCACCATGAACCTTGTAATG, SEC ID

35 N° 3 y cebador inverso GER276: GTCGACTCTAGATCACCCTGTCGAAAAC, SEC ID N° 4) y se insertó en pZac2.1 para generar el plásmido pUS11.

El gen NS4B de VHC (Genebank: M588335) se sintetizó a través Invitrogene (BlueHeron Biotechnology). El gen estaba flanqueado por MluI y XbaI y se clonó en pZac2.1 para crear el plásmido pNS4B.

Un anticuerpo MF-J humano de longitud completa (que se une específicamente a la mesotelina humana) se utilizó

40 como proteína heteróloga representativa. En MF-J, la cadena pesada y la cadena ligera están unidas por un sitio de escisión furina/2A. Con el fin de fabricar el producto final de pMF-J / FU / 2A para transfecciones transitorias, se creó un plásmido molde pMorphH.Fur2A.kappanlight (pGT149). Para construir pGT149, se eliminó un sitio BlnI de la región constante kappa humana en pMORPH h Ig kappa 1 (tecnología HuCal de MorphoSys AG, Alemania) digiriendo con BbvC1 y BlnI y ligando con oligos hibridados GER212 (5' - TCAGCAGCACCTGACCC - 3') SEC ID

45 N° 5 y GER213 (5' - TCAGGGTCAGGGTGCTGC - 3') SEC ID N° 6. Después, pGT149 se fabricó mediante una unión de tres fragmentos. Un fragmento fue pZac2.1 que había sido la columna vertebral abierta con NheI+NotI. El segundo fragmento fue un producto de PCR con los oligos GER204 (5' - GGAGACCCAAGCTGGCTAGC - 3', SEC ID N° 7) y GER205 (5'-ACGTCGCCGCGCCAGCTTCAGCAGGTCGAAGTTCAGGGTCTGCTTCACGGGGG CTCTCTTGCCCGTTTACCCGGAGACAGGGAGAG - 3', SEC ID N° 8) del plásmido pMORPH h laGI-1 (que

50 contiene la parte del sitio NheI- líder de la VH EcoRI/BlnI Stuffer-constante de hH- en N-terminal de la secuencia de fur2A que termina en Ngo MIV) y se digirió con NheI y Ngo MIV. El tercer fragmento también era un producto de PCR con los oligos GER206 (5' - GAAGCTGGCCGCGACGTGGAGTCCAACCCCGGCCCCATGGTGTTCAGACC CAGGTC - 3', SEC ID N° 9) y GER 207 (5' - ATCAGTGCGCCGCGCTAACACTCTCCCTGTTGAAGC - 3', SEC ID N° 10) del plásmido pMORPH h Ig kappa 1 (que carece del sitio BlnI) (que contiene el nuevo extremo en C NgoMIV del fragmento Fur2A seq-Vkappa líder-EcoRV/BsiWI stuffer-región constante kappa humana-NotI) y se digirió con NgoMIV y NotI.

Para construir pMF-J/fu/2A, la cadena variable (VH) y las cadenas ligeras (VL) del anticuerpo MF-J se insertaron en el molde de pGT149 por una unión de cuatro vías, dado que el anticuerpo tiene cadenas ligera kappa. Los

fragmentos VH y VL de MF-J se obtuvieron de pMORPH9 MF-J mediante digestión con MfeI- BlnI o EcoRV- BsiWI, respectivamente. El pGT149 se abrió con EcoRI y BlnI como armazón. pGT149 también se digirió con BlnI y EcoRV para obtener el fragmento central que une VH y VL.

5 Un gen de la luciferasa secretada Gaucissa ("Gluc" en las figuras) se obtuvo del plásmido pCMV-Gluc (Sigma, St. Louis, MO), y se subclonó en pZac2.1 mediante digestión con enzimas de restricción de KpnI + NotI para generar pGluc.

El gen murino de SEAP (fosfatasa alcalina secretada) se escindió mediante las enzimas de restricción Sal I y NotI del plásmido pGT36 (descrito en Szymanski y col., Molecular Therapy 15 (7) 1340-1347 (2007) y luego se subclonó en pZac2.1abierto con NotI y Sal I para crear el plásmido pmuSEAP.

10 **Cultivo celular**

Las células BHK21 se mantuvieron en un medio de crecimiento suplementado con suero bovino fetal al 5 %, aminoácidos no esenciales, y piruvato Na. Las células HKB11 se mantuvieron en un medio de crecimiento suplementado con suero bovino fetal al 5 % para cultivo adherente.

Transfecciones transitorias

15 Para la cotransfección de pHbX con pMF-J / FU / 2A o pGluc, las células BHK21 y HKB 11 se transfectaron transitoriamente mediante el procedimiento Fugene6 (Roche, Indianapolis, IN). Las células se sembraron en placas de 12 pocillos 24 horas antes de la transfección a una densidad celular de aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células / pocillo para BHK21 y de aproximadamente 2×10^5 células / pocillo para HKB1. Para cada transgén, se transfectaron seis pocillos con diferentes cantidades del plásmido como se muestra en la Tabla 2. La cantidad de plásmido gen
20 diana se mantuvo constante, mientras que la cantidad de pHbX se varió. Se usó pBlueScript (pBS) para equilibrar la cantidad total de ADN por pocillo de modo que las condiciones de la transfección eran consistentes entre los pocillos. La cantidad deseada de ADN se mezcló en 50 µl de opti-MEM con 4,8 µl de Fugene6. Los sobrenadantes del cultivo celular o las células se recogieron 96 horas más tarde. Cada experimento se repitió al menos tres veces.

TABLA 2

Nº de pocillo	1	2	3	4	5	6
pTransgén (ug)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
pHBx (ug)	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
pBS (ug)	0,8	0,7	0,6	0,4	0,2	0

25 Para las transfecciones plásmido único con Fugene6, la relación Fugene6:ADN se mantuvo a aproximadamente 1: 6 (0,8 µg de ADN: 4,8 µl de Fugene6 por 12 pocillos). Si solamente se transfectó pMF-J / FU / 2A o pGluc en las células, el plásmido era de aproximadamente 0,8 µg/pocillo. Cada transfección se realizó por duplicado o triplicado y el grupo de transfecciones se repitió 2-3 veces. Si pHbX se transfectó en las células, las cantidades de pHbX
30 variaron de aproximadamente 0 µg - 0,8 µg y se usó PBS para controlar la cantidad total de ADN transfectado por célula. El procedimiento de transfección fue el mismo que el descrito anteriormente.

Detección del anticuerpo de longitud completa MF-J/fu/2A mediante ELISA

35 Placas Immulon 4 HBX se recubrieron con 25ng/50µl/pocillo de mesotelina (marcador en c-terminal, conjunto SEC, concentración de reserva 1,41 mg / ml) en tampón bicarbonato durante la noche a 4 °C. Las placas se bloquearon durante 1 hora con 200 µl/pocillo de tampón de bloqueo (3 % de BSA en PBS) en agitación. El anticuerpo estándar MF-J (1,66 mg / ml) y las muestras se prepararon como 50 µl/ pocillo dentro de porcentaje deseado del medio de cultivo y se incubaron 2 horas a TA. El punto de partida de la curva estándar del anticuerpo MF-J fue de 1 µg/ml y luego una dilución en serie a 1: 3 hasta un total de 11 puntos. Para el sobrenadante del cultivo celular, se realizaron
40 de dos a cuatro puntos de dilución para cada muestra de manera que al menos dos puntos cayeron dentro del intervalo lineal de la curva estándar. Después, las placas se lavaron 4 veces con PBST al 0,05 % (0,05 % de TWEEN 20 en tampón PBS) lavando con tampón usando un lavador de placas (Bio-tek). Se incubaron 50 µl/pocillo de la IgG anti-humana de cabra conjugada con HRP (Pierce, dilución a 1:5000) se incubaron a TA durante 1 hora tras cuatro lavados con PBST (0,05 % de TWEEN). La absorbancia a 405 nm se midió después de la adición de 100 µl / pocillo de ABTS (Sigma). La concentración de anticuerpo de cada muestra se calculó mediante el software
45 Softmax Pro 4.3.1.

Ensayo de luciferasa Gaussia (Gluc) secretada

La actividad de Gluc secretada se ensayó mediante un kit de luciferasa Renilla (Promega, Madison, WI). Los sobrenadantes celulares se diluyeron entre 10^4 y 10^5 en 1x tampón de lisis pasiva (Promega). Se usaron 20 µl de la muestra diluida para la medición. Los resultados se expresaron como unidades relativas de luz (URL).

Ensayo de actividad muSEAP

Las actividades de muSEAP se determinaron mediante un kit de ensayo de actividad quimioluminiscente (Applied Biosystems, Bedford, MA).

Transferencia de tipo western

5 Las células se lisaron en tampón RIPA (Sigma, St. Louis, MO) o Tampón 1xLDS (Invitrogen, Carlsbad, CA). Después, el material de lisis se cargó y se separó en 12 % de gel Bis-Tris (Invitrogen, Carlsbad, CA). El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa a través de iBlot (Invitrogen, Carlsbad, CA) e inmediatamente se bloqueó en 5 % de leche en PBS a 4 °C durante la noche. La membrana se incubó después con el anticuerpo policlonal frente a HBx anti-humano de conejo (Abcam, Cambridge, MA. A 1:2000 en 0,05 % DE PBST) a temperatura ambiente 2 horas, seguido de IgG anti-conejo de cabra conjugada con HRP (Jackson Labs, 1: 5000 en 0,05 % de PBST) durante otra hora. Las bandas se detectaron utilizando ECL Plus (Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA).

10 El efecto de tres genes virales sobre la producción de proteínas se cribó de forma de transfección transitoria en un serie de diferentes líneas celulares. Cantidades crecientes de pUS11, pNS4B y plásmidos que expresan pHbX se cotransfectaron con una cantidad constante de pMF-J / fu / 2A (0,5 µg) en C2C12 y BHK21 (Figura 1). Los sobrenadantes se recogieron después de 96 horas de cultivo. El nivel de expresión del anticuerpo MF-J de longitud completa funcional se detectó mediante ELISA. Los cambios se calcularon como la proporción de la expresión proteica y un pocillo control que tiene 0,5 µg del plásmido del gen diana pero sin adición de genes virales. Los resultados presentados en la Figura 1 ilustran que la expresión de HBx, pero no la expresión de US11 o NS4B, aumenta la producción de las proteínas aproximadamente 2-3 veces en las células C2C12 y BHK21. El gen US11 en las células CHO-K1 y el gen NS4B en las células CHO-S y HKB11 se analizaron con la coexpresión del anticuerpo MF-J o Gluc secretada. Se observó que ni US 11 ni NS4B aumentaban la producción de proteínas en estas líneas celulares.

Ejemplo 2. La cotransfección transitoria de genes diana con HBx mejora la producción de proteínas en las líneas celulares de producción BHK21 y HKB11

25 El efecto de HBx sobre la producción de proteínas se evaluó adicionalmente en un formato de transfección transitoria en ciertas líneas de células huésped de mamíferos. Cantidades crecientes del plásmido que expresan pHbX se cotransfectaron con una cantidad constante de pMF-J/fu/2A o pGluc en células BHK21 y HKB11 (Figura 2). Las células se lisaron a las 96 horas de la transfección y se realizó un análisis de tipo Western para confirmar que HBx se expresaba de forma dependiente de la dosis. La Figura 2 muestra el resultado con células BHK21. Se observaron resultados similares en células HUB11. Se observaron resultados similares en células HKB11.

30 Se realizó un análisis de tipo Western de la expresión de HBx en células BHK21 cotransfectadas de forma transitoria con pMF-J/fu/A. Un extracto de células enteras se separó en un gel de 12 % de Bis-Tris y se sondó con el anticuerpo anti-humano HBx. Una cantidad igual de proteína se cargó en cada calle. Se observó una banda de 17,5 kDa en todos los pocillos transfectados, pero no en el pocillo control. La cantidad de HBx expresada aumentó de una manera aproximadamente monotónica de 0,1 a 0,8 µg de pHbX utilizados para la transfección.

Ejemplo 3. La coinfección transitoria con HBx aumenta la producción de proteínas.

Los sobrenadantes también se recogieron a las 96 horas de las mismas muestras, tal como se utiliza para el análisis de transferencia de tipo Western en el Ejemplo 2. Los resultados revelaron que la cotransfección de HBx con el anticuerpo MF-J tuvo como resultado un aumento de 2.5 a 3.5 veces la expresión del anticuerpo MF-J sobre una amplia gama de proporciones de pHbX:pMF-J (de 0,2:1 a 1,6:1) en las células BHK21 y HKB 11 (Figura 2A y 2C). La cotransfección de HBx con el gen indicador Gluc causó un incremento de 1,5 -2,5 veces de la expresión de Gluc en las células BHK21 y HKB11.

40 La Figura 2 ilustra que HBx aumenta la producción de proteína en cotransfección transitoria. Las células BHK21 (2A and 2B) and HKB 11 (2C and 2D) se cotransfectaron con una cantidad creciente de pHbX y una dosis fija (0,5 µg) del anticuerpo pMF-J/fu/2A de longitud completa (2A y 2C) o un gen indicador, pGluc (2B y 2D). La producción de proteínas secretadas en el medio sobrenadante se midió 96 horas más tarde mediante ELISA para el anticuerpo MF-J (2A y 2C) o un kit de luciferasa de Renilla para Gluc (2B y 2D). Los cambios se calcularon como la proporción de la expresión proteica y un pocillo control que tiene 0,5 µg del plásmido del gen diana pero sin la adición de HBx. Los gráficos representan la media de tres experimentos.

Ejemplo 4. La cotransfección transitoria de los genes diana con HBx aumentó la producción de proteínas en células C2C12

50 El efecto de HBx sobre la expresión de proteínas también se evaluó en células C2C12 de músculo esquelético de ratón. Una vez más, una gama de plásmido pHbX (cantidades 0-0,8 µg) se cotransfectó con 0,5 µg de pMF-J/fu/2A, pGluc o pmuSEAP. Los datos presentados en la Figura 3 muestran que HBx aumenta la expresión de proteínas en células C2C12 con una amplia gama de relaciones pHbX: pTransgén (de 0,05:1 a 1,6:1).

La Figura 3 ilustra que HBx aumenta la producción de proteína en cotransfección transitoria en células C2C12. Las

células C2C12 se cotransfectaron con HBx expresado constitutivamente y el anticuerpo de longitud completa MF-J o genes indicadores Gluc o muSEAP. La producción de proteínas a partir del sobrenadante se midió 96 horas más tarde por ELISA para el anticuerpo MF-J, kit de luciferasa de Renilla para la actividad Gluc secretada, o kit para la actividad de muSEAP secretada. Los cambios se calcularon como la proporción de la expresión proteica y un pocillo control que tiene 0,5 µg del plásmido del gen diana pero sin la adición de HBx. Los gráficos en la Figura 3 representan la media de tres experimentos.

Por lo tanto, la co-expresión de HBx con ácido nucleico heterólogo puede mejorar significativamente el rendimiento de la proteína producto en ciertas células huésped y líneas de células huésped.

Ejemplo 5. Expresión de HBx en conjuntos estables de células BHK21 y HKB11

Producción de Lentivirus

Para fabricar lentivirus de HBx, el gen HBx se escindió con NheI y NotI de pHBx y se subclonó en el vector lentiviral pCDHI-MCS1-EF1-Puro (System Biosciences, Mountain View, CA) para formar el plásmido pCDHI-HBx. Este plásmido tiene un promotor mínimo de CMV. Las células 293 T se sembraron a una densidad de 6×10^6 células en medio de crecimiento (DMEM + 10 % de FBS + 1X de L-glutamina) en una placa de 15 cm incubada a 37 °C y 5 % de CO₂. Al día siguiente, se aspira el medio y se reemplaza con los medios de transfección que contienen plásmidos pLP1 Opti-MEM (Invitrogen) (que codifican gag-pol; Invitrogen), PLP2 (que codifican rev; Invitrogen) y pLP (que codifican VSV-G; Invitrogen), el plásmido de transferencia de genes (que codifica la proteína HBX) y el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen). medio de transfección se sustituye después de 24 horas con el medio de mantenimiento (DMEM + 5 % de FBS + 1X de L-glutamina). Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se recogieron los medios, filtraron usando filtros Millex-HV filtros de PVDF de 0,45 micrómetros (Millipore) y las partículas de virus se concentran mediante ultracentrifugación.

Establecimiento de conjuntos estables y clones

Para generar conjuntos y clones portadores de HBx, las células BHK21 y HKB 11 se sembraron en placas de 6 pocillos con 1×10^6 células / pocillo el día antes de la transducción lentiviral. Se añadieron a las células 200 µl de lentivirus con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1, 1 y 10. Después de 4 horas de incubación, el medio que contiene lentivirus se retiró y las células se lavaron con medio fresco 2-3 veces antes de añadir los 2 ml finales del medio de cultivo. Se añadió puromicina a las células 48 horas más tarde a una concentración de 2 µg/ / ml para BHK21 y de 2,5 a 5 µg/ ml para HKB11.

Para los clones individuales, las células agrupadas se sembraron a 1 célula / pocillo y 0,1 célula / pocillo en placas de e96 pocillos usando 100 µl de medio que contiene el fármaco de selección en cada pocillo. Después de aproximadamente 1-2 semanas de incubación, las células se expanden en placas de 24 pocillos, en las que se llegó a un 80-90 % de confluencia. Los clones se congelaron o se cultivaron para su posterior análisis.

Las células BHK21 y HKB 11 se transdujeron con Lenti-HBx (lentivirus que expresa HBx de longitud completa) a un MOI de 0,1, 1 y 10. Los grupos estables fueron la mezcla de células tras la selección de puromicina de su MOI correspondiente. Los niveles de expresión de HBX en los grupos de BHK21 y HKB 11 se pusieron de manifiesto mediante transferencia de tpo western. Los niveles de expresión HBX aumentaron cuando los MOI de virus se incrementaron.

El extracto de células enteras se separó en un gel de 12 % de Bis-Tris y se sondó con el anticuerpo anti-humano HBx. Una cantidad igual de proteína se cargó en cada calle. El análisis de transferencia de tipo Western de la expresión de HBx en conjuntos estables de BHK21y HKB11 reveló una ausencia de expresión en las transfecciones control y una expresión creciente graduada de HBx de 17,5 kDa con un MOI de 0,1, 1,0, y 10 MOI de Lenti-HBx.

Ejemplo 6. La producción de proteína aumenta los conjuntos estables de expresión de HBx

Los conjuntos estables de HBX se utilizaron en el experimento piloto para evaluar una representación general y el efecto promedio de HBx sobre la productividad celular. pMF-J / fu / 2A y pGluc se transfectaron de forma transitoria en conjuntos estables de BHK21 y HKB11 que expresan diferentes niveles de HBx. Como se muestra en la Figura 4, los conjuntos de BHK21 / HBX y HKB1 1 / HBX dan más que un aumento de 2 veces de la producción de proteínas.

La Figura 4 ilustra que la producción de proteínas aumentó en los conjuntos estables de BHK21 y HKB11 que expresan de forma constitutiva HBx. Los conjuntos estables de BHK21/HBx y HKB11/HBx se transfectaron con pMF-J/fu/2A o pGluc en placas de 12 pocillos. Los sobrenadantes se recogieron 96 horas más tarde. El nivel del anticuerpo MF-J y la actividad de Gluc se midieron mediante ELISA y el kit de luciferasa de Renilla, respectivamente. Los cambios se calcularon como la relación con las células de control parental.

Ejemplo 7. Creación de clones estables de BHK21/HBx y HKB11/HBx

A partir de tres conjuntos estables (MOI de 0,1, 1, y 10), las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración celular de 0,1 célula/pocillo y 1 célula/pocillo con 100 µl de medio de crecimiento con selección de puromicina. Se aisló un total de 42 clones. Veinticuatro (24) clones se evaluaron después para determinar el nivel de

expresión HBx y la productividad de la proteína. No se observó una correlación evidente entre el nivel de expresión HBx y la productividad de la proteína. Por consiguiente, se seleccionaron cinco clones basándose en diferentes niveles de expresión de HBx (baja, media y alta) y niveles comparables de MF-J y expresión de Gluc. Los clones tenían la siguiente expresión aparente de HBx: clon 31, baja; clon 22, media; clon 18, alta; clon 13, alta; y clon 42, alta. Como se muestra en la Figura 5, estos clones BHK21 / HBX pueden aumentar el anticuerpo MF-J y la producción proteica del gen indicador Gluc en aproximadamente 2 a 5 veces.

La Figura 5 ilustra que la producción de proteínas aumentó en los clones estables de BHK21 que expresan de forma constitutiva HBx. Para una transferencia de tipo Western de proteína HBx de varios clones, 3×10^6 células de cada clon se lisaron en 300 μ l de 1xLDS tampón de muestra, se calentaron y se sometieron a ultrasonidos. 30 μ l (3×10^5 células) se cargaron en cada calle, se separaron en un gel de 12 % de Bis-Tris y se sondaron con el anticuerpo anti-humano HBx. La Figura 5 muestra clones estables de BHK21/HBx que se transfectaron con pMF-J/fu/2A o pGluc en placas de 12 pocillos. Los sobrenadantes se recogieron 96 horas más tarde. El nivel del anticuerpo MF-J y la actividad de Gluc se midieron mediante ELISA y el kit de luciferasa de Renilla, respectivamente. Los cambios se calcularon como la relación con las células de control parental.

Por tanto, ciertas líneas celulares de ingeniería genética para expresar de forma estable HBx puede aumentar el rendimiento de la proteína heteróloga producto.

Ejemplo 8. El efecto de la suspensión DG44sus no adherente frente a células DG44 adherentes sobre la producción de proteínas en la cotransfección transitoria de los genes diana con HBx

La línea celular DG44 es una línea celular deficiente en dihidrofolato reductasa (DHFR) derivada de células CHO pro3-. Urlaub y col., 1983, Cell, 33:405 - 12 (1983). La línea de células DG44 se adaptó al cultivo en suspensión no adherente para hacer la línea DG44sus. El efecto de HBx sobre la expresión de proteínas se evaluó en ambas líneas celulares. Las células DG44 y DG44sus se cotransfectaron con una serie de plásmidos pHBx gama de 0 a 0,8 μ g y con 0,5 μ g de pGluc. La producción de proteínas a partir del sobrenadante se midió 72 horas más tarde con el kit de luciferasa de Renilla para la actividad Gluc secretada. Los cambios se calcularon como la proporción de la expresión proteica y un pocillo control que tiene 0,5 μ g del plásmido del gen diana pero sin la adición de HBx. Los gráficos representan la media de tres experimentos.

La Figura 6 muestra que HBx puede aumentar la expresión de Gluc 2-2,5 veces en las células DG44sus ("DG44s" marcadas) pero no en las células adherentes DG44. Este aumento indica que incluso en las líneas de células del mismo origen, la situación de cultivo celular (suspensión no adherente frente a adherente) puede tener un efecto sobre la producción de proteínas.

Ejemplo 9. El efecto de la suspensión 293F frente a células HEK293 no adherentes sobre la producción de proteínas en la cotransfección transitoria de los genes diana con HBx

El efecto de HBx sobre la expresión de proteínas también se evaluó en una línea celular HEK293 y una línea celular 293F (Invitrogen). Una serie del plásmido pHBx de 0-0,8 μ g se cotransfectó con 0,5 μ g de pGluc o pMF-J. La producción de proteínas a partir del sobrenadante se midió 72 horas más tarde con el kit de luciferasa de Renilla para determinar la actividad de Gluc y mediante ELISA para determinar el anticuerpo MF-J secretado. Los cambios se calcularon como la proporción de la expresión proteica y un pocillo control que tiene 0,5 μ g del plásmido del gen diana pero sin la adición de HBx. Los gráficos representan la media de dos-tres experimentos.

La Figura 10 muestra que HBx puede aumentar la expresión de Gluc o MF-J 2-6 veces en las células en suspensión 293F, pero aproximadamente 2 veces en las células HEK293 adherentes. De nuevo, esto indica que incluso en las líneas de células del mismo origen, la situación de cultivo celular (suspensión no adherente frente a adherente) puede tener un efecto sobre la producción de proteínas.

Ejemplo 10: El incremento de la producción mediada por HBx depende de la activación de XBP1

El efecto del incremento de la producción de proteínas mediada por HBx sobre la activación de XBP1s se examinó mediante la medición de XBP1s y su diana putativa ARNm de Erdj4 mediante PCR cuantitativa (QRT-PCR). Los datos indican que HBx no induce XBP1s o su diana de nivel de ARNm de Erdj4 en este sistema. Véase la Figura 7. El ARN total se extrajo y la misma cantidad de ARN total se sometió a cada reacción. Se usó GAPDH como control interno. El cambio en los niveles ARNm se calculó como la relación de las células parentales BHK21 (BHK21p). Además, el nivel de expresión de la proteína XBP1s en las líneas de células BHK21 / HBX tampoco mostró aumento alguno en comparación con las células parentales BHK21.

Ejemplo 10: La adición de XBP1s a las líneas celulares estables BHK21 / HBX aumenta la producción de proteínas

Los datos presentados en el presente documento muestran que el aumento de la expresión de XBP1s sola puede aumentar la expresión de la proteína heteróloga en las células parentales BHK21 mediante cotransfección transitoria (Figura 8 A y 8B). Se realizaron experimentos de ingeniería combinatoria de HBx con de la misma manera que se muestra en las Figuras 3. Una cantidad fija de pMF-J / FU / 2A o pGLuc, y cantidades graduadas de pXBPIs se cotransfectaron de forma transitoria en células parentales BHK21, conjuntos estables de BHK21 / HBX y clones

BHK21 / HBX en placas de 12 pocillos. Los niveles de expresión de proteínas en el medio sobrenadante se midió a las 120 horas y se muestran en las Figuras 8A (MF-J) y 8B (Gluc). Con la adición de XBP1s en células estables BHK21 / HBX, las células BHK21/HBx/XBP1s produjeron un incremento de más de 2,6 a 4,7 veces de MF-J y un incremento de 1,9 a 3,4 veces de Gluc en comparación con su correspondiente conjunto de BHK21/HBx y clones sin la adición de XBP1s. Al utilizar células parentales BHK21 transfectadas transitoriamente con XBP1s como control, las células BHK21/HBx/XBP1s produjeron un aumento de más de 2,5 a 6 veces de la producción de anticuerpos MF-J y un incremento de 1,4 a 3,6 veces de la producción de Gluc. Estos resultados demuestran que XBP1 puede potenciar adicionalmente la producción de proteínas en células BHK21 / HBX estables transfectantes en comparación con las células transfectadas con HBx o XBP1s de forma individual.

Ejemplo 11: La cotransfección de HBx y XBP1s tener un efecto sinérgico sobre la producción de proteínas

Las células parentales BHK21f se transfectaron transitoriamente con MF- J o Gluc en ausencia de HBx o XBP1s para servir como controles para el experimento mostrado en la Figura 8. Las células parentales BHK21 y el clon BHK21/HBx#22 se cotransfectaron con 0,2 µg de pXBP1s y 0,5 µg del anticuerpo de longitud completa pMF-J/fu/2A o el gen indicador de pGluc en placas de 12 pocillos. La producción de proteínas a partir de sobrenadante se midió 120 horas después de la transfección para MF-J mediante ELISA y 96 horas para determinar la actividad de Gluc con el kit Renilla. Los cambios se calcularon como la proporción de la expresión proteica y la célula parental BHK21 con 0,5 µg del plásmido del gen diana pero sin la adición de HBx o XBP1s. Los gráficos ilustran las medias y los intervalos de de 2-4 experimentos. Estos resultados ilustran que la cotransfección con ácido nucleico que codifica HBx y XBP1s puede elevar la producción de proteínas de una manera sinérgica en células BHK21.

Como se muestra en la Figura 9 para la expresión de anticuerpos MF-J, la adición de XBP1s de forma individual a una dosis de pXBP1s de 0,2 µg produjo un aumento de 3,76 veces y la adición de HBx solo dio un aumento de 4,3 veces. Cuando las células BHK21 se transfectaron con HBx y XBP1s, se observó una secreción de anticuerpos 15 MF-J por 15 veces. La expresión de Gluc mejoró 2,84 veces por la transfección de XBP1s, 4,37 veces por la transfección de HBx y 10,53 veces por la cotransfección.

La Tabla 3 muestra, con mayor detalle, una comparación de los efectos de los ácidos nucleicos de HBx y XBP1s de forma independiente y juntos usando células parentales BHK21 como control. El aumento de la producción de proteínas del producto es válido tanto para los conjuntos estables de BHK21/HBx y los clones (Tabla 3). Los conjuntos estables de células muestran que el efecto no es el resultado de la clonación. De acuerdo con estas mediciones, la coexpresión de HBx y XBP1s tiene un efecto sinérgico sobre la producción de proteínas en células BHK21. Véase la Tabla 3. Por ejemplo, las células BHK21/ HBx#22/XBP1s alcanzaron su máximo en la producción de proteínas Gluc a una dosis de pXBP1s de 0,4 µg a 0,6 µg, mientras que las células BHK21/HBx#42 alcanzaron su máximo de la producción de proteínas Gluc una dosis de pXBP1s de 0,1 µg.

TABLA 3

Líneas celulares	pXBP1s	0 µg	0,1 µg	0,2 µg	0,4 µg	0,6 µg
BKH21 parental	MF-J	1,00	2,32 ± 0,08	3,76 ± 0,14	4,78 ± 0,14	5,86 ± 0,05
Conjunto BKH21/HBx10		5,39 ± 0,05	14,25 ± 1,62	21,22 ± 3,07	18,70 ± 3,99	14,94 ± 2,21
BKH21/HBx#22		4,30 ± 0,84	11,36 ± 3,13	15,79 ± 3,54	16,39 ± 2,70	19,39 ± 0,32
BKH21/HBx#42		4,48 ± 1,26	11,41 ± 2,38	14,87 ± 2,77	19,39 ± 1,53	19,38 ± 1,19
BKH21 parental	Gluc	1,00	2,60 ± 0,16	2,84 ± 0,16	3,36 ± 0,34	3,74 ± 0,49
Conjunto BKH21/HBx10		2,98 ± 0,71	5,92 ± 1,65	6,5 ± 1,43	6,47 ± 1,24	5,64 ± 1,19
BKH21/HBx#22		3,47 ± 0,94	8,95 ± 2,39	10,53 ± 2,94	10,29 ± 3,23	9,47 ± 3,27
BKH21/HBx#42		4,62 ± 1,25	9,74 ± 2,76	8,42 ± 2,54	8,25 ± 1,88	7,42 ± 1,63

Por lo tanto, la coexpresión transitoria de XBP1s con genes diana en líneas celulares estables BHK21/HBx potencia la producción de proteínas en comparación con las células parentales y las células transfectadas con HBx o XBP1s de forma individual. Además, la cotransfección con HBx y XBP1s tiene un efecto sinérgico sobre la producción de proteínas.

Todas las referencias divulgadas en el presente documento se incorporan en el presente documento en la medida en que son relevantes para describir, fabricar o usar la invención tal como se reivindica.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bayer HealthCare LLC Jin, Fang Harkins, Richard Bauzon, Maxine Hermiston, Terry

<120> Procedimientos y composiciones para la producción de proteína recombinante

ES 2 536 644 T3

<130> MSB-7320

<150> US 61/056.634
5 <151> 2008 - 05 - 28

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1
<211> 31
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> Cebador directo GER270

<400> 1
20 gatcacgct gccacatgg ctgctaggct g 31

<210> 2
<211> 34
<212> ADN
25 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso GER271

30 <400> 2
gtcgactcta gattaggcag aggtgaaaaa gttg 34

<210> 3
<211> 31
35 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo GER275

40 <400> 3
gatcacgct gccacatga acctgtaat g 31

<210> 4
45 <211> 31
<212> ADN
<213> Artificial

<220> b <223> Cebador inverso GER276

50 <400> 4
gtcgactcta gatcaccact ggtccgaaaa c 31

<210> 5
55 <211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

ES 2 536 644 T3

<220>
 <223> Cebador directo GER212

5 <400> 5
 tcagcagcac cctgacct 18

<210> 6
 <211> 18
 10 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso GER213

15 <400> 6
 tcagggtcag ggtgctgc 18

<210> 7
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador directo GER204

25 <400> 7
 ggagacccaa gctggctagc 20

<210> 8
 30 <211> 86
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 35 <223> Cebador GER205

<400> 8
 acgtcgccgg ccagcttcag caggtcgaag ttcagggtct gcttcacggg ggctctcttg 60

40 gcccgtttac ccggagacag ggagag 86

<210> 9
 <211> 58
 <212> ADN
 45 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador GER206

50 <400> 9
 gaagctggcc ggcgacgtgg agtccaacct cggcccatg gtgtgcaga cccaggtc 58

<210> 10
 <211> 37
 55 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 536 644 T3

<220>

<223> Cebador GER207

<400> 10

5 atcagtgcg cgcctaaca ctctccctg ttgaagc 37

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de producción de una proteína heteróloga en células huésped de mamífero en cultivo, que comprende cultivar las células huésped de mamífero seleccionadas del grupo que consiste en células BHK21, en el que dichas células huésped de mamífero contienen un ácido nucleico que codifica HBx, un ácido nucleico que proporciona XBP1s exógena y un ácido nucleico que codifica la proteína heteróloga, en condiciones tales que HBx y la proteína heteróloga se expresan por las células huésped de mamífero.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico que codifica HBx y el ácido nucleico que proporciona XBP1s se transfectan en las células huésped de mamífero y se expresan de forma transitoria.
- 10 3. El procedimiento de una de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el cultivo comprende un medio de cultivo y la proteína heteróloga se secreta al medio de cultivo.
4. El procedimiento de una de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende recuperar y purificar adicionalmente la proteína heteróloga.
- 15 5. El procedimiento de una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el ácido nucleico que codifica la proteína heteróloga se expresa de forma estable o transitoria por las células huésped de mamífero.

Figura 1

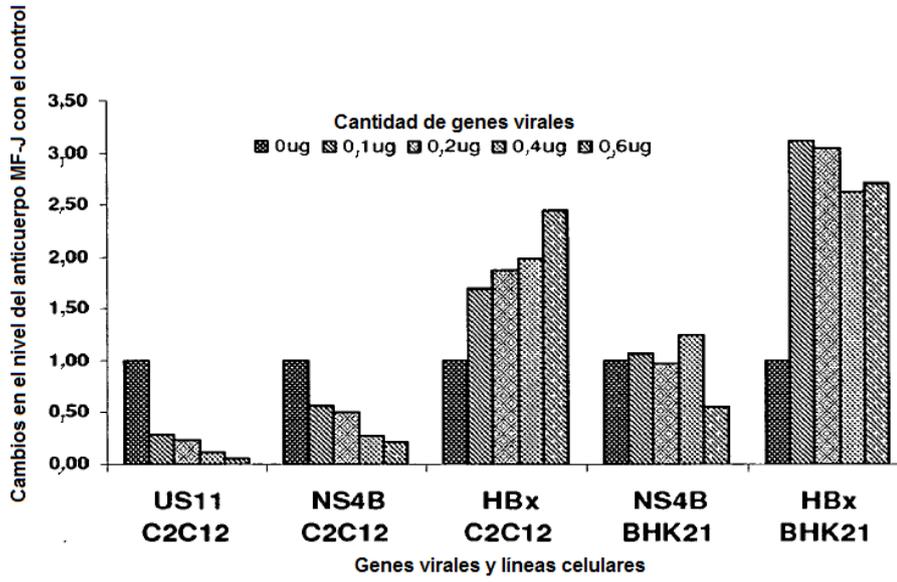
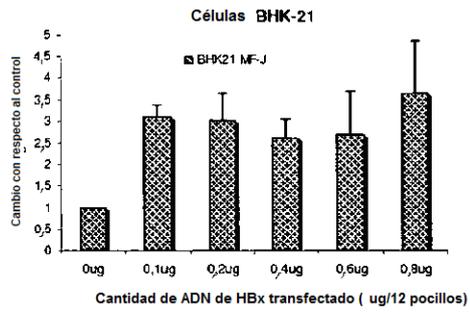
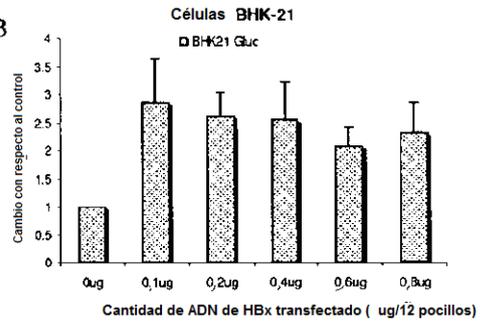


Figura 2

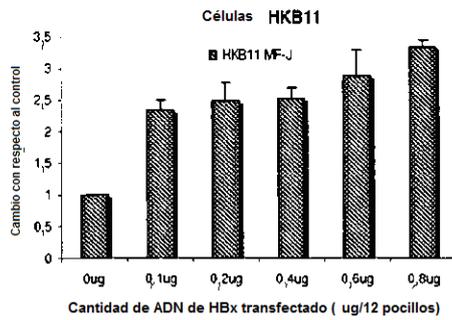
2A



2B



2C



2D

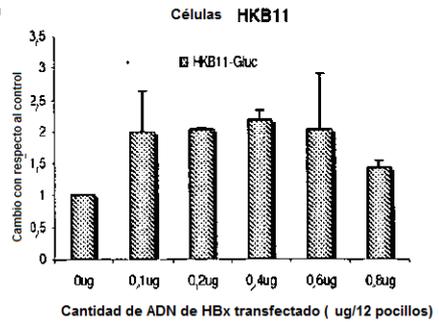


Figura 3

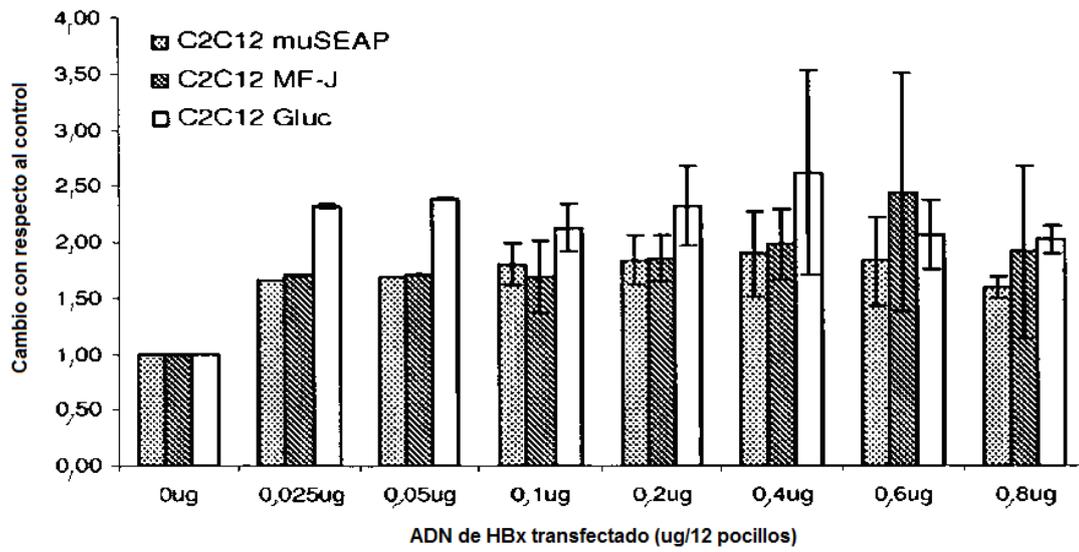


Figura 4

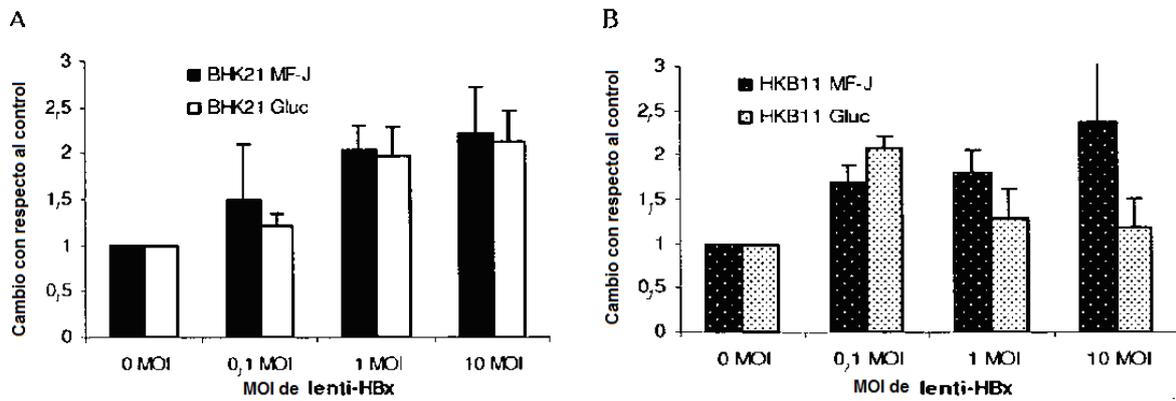


Figura 5

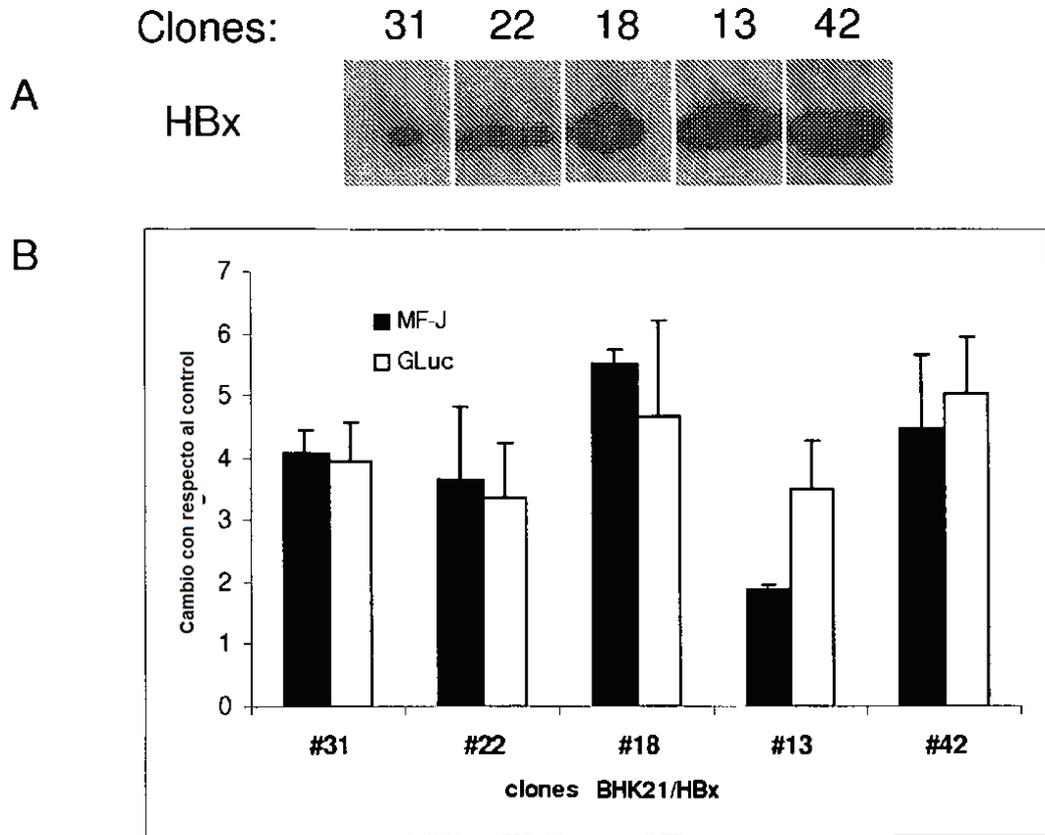


Figura 6

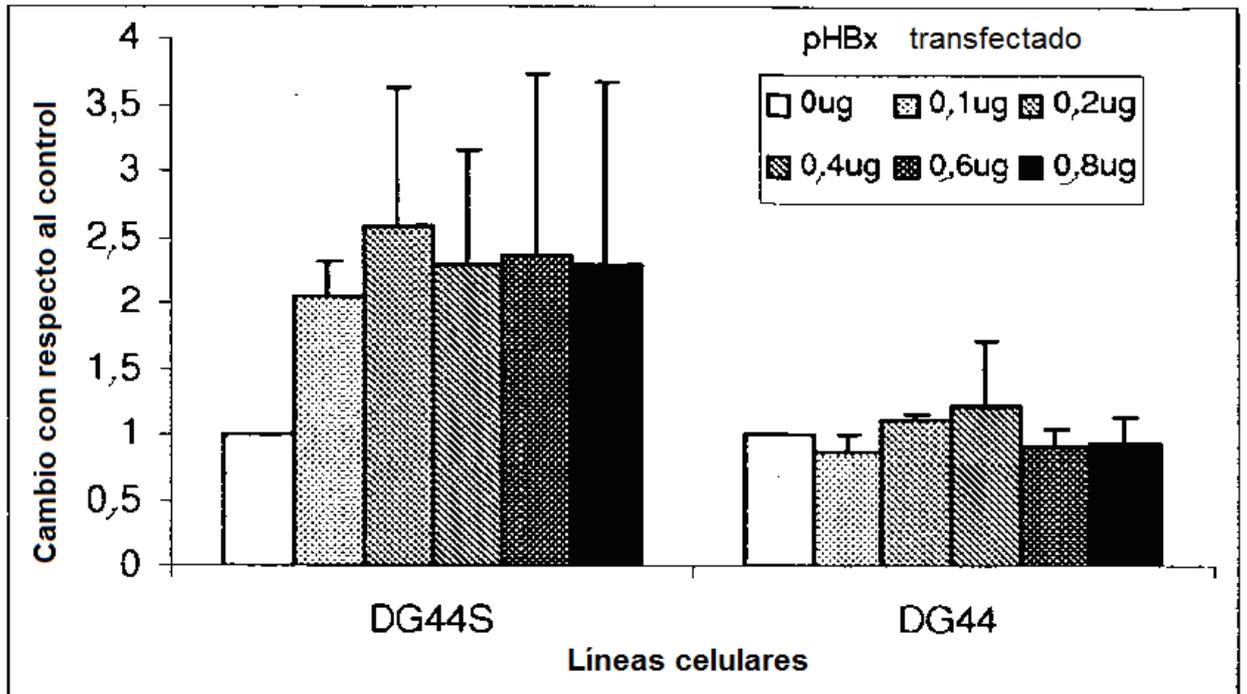


Figura 7

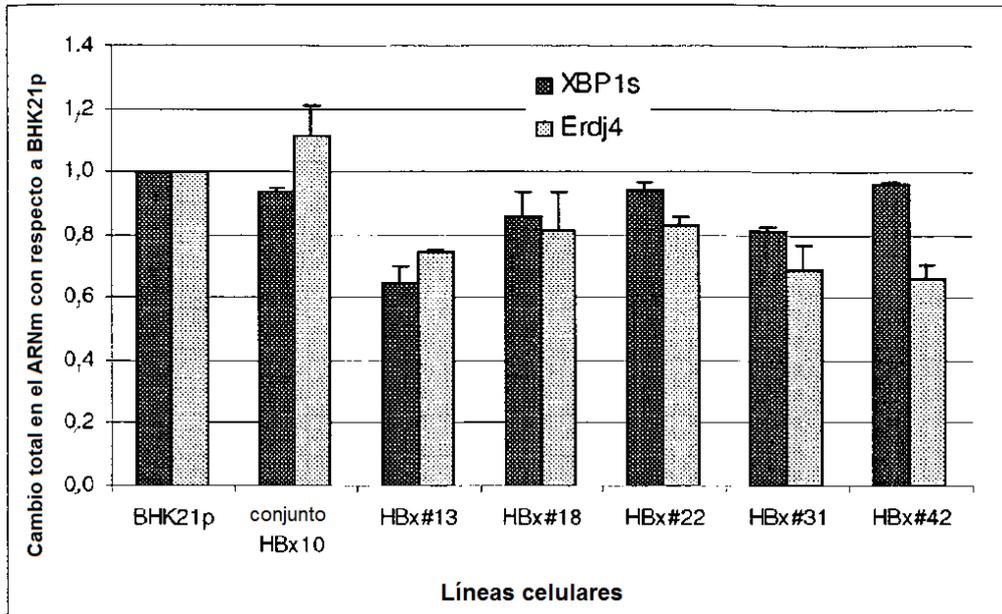
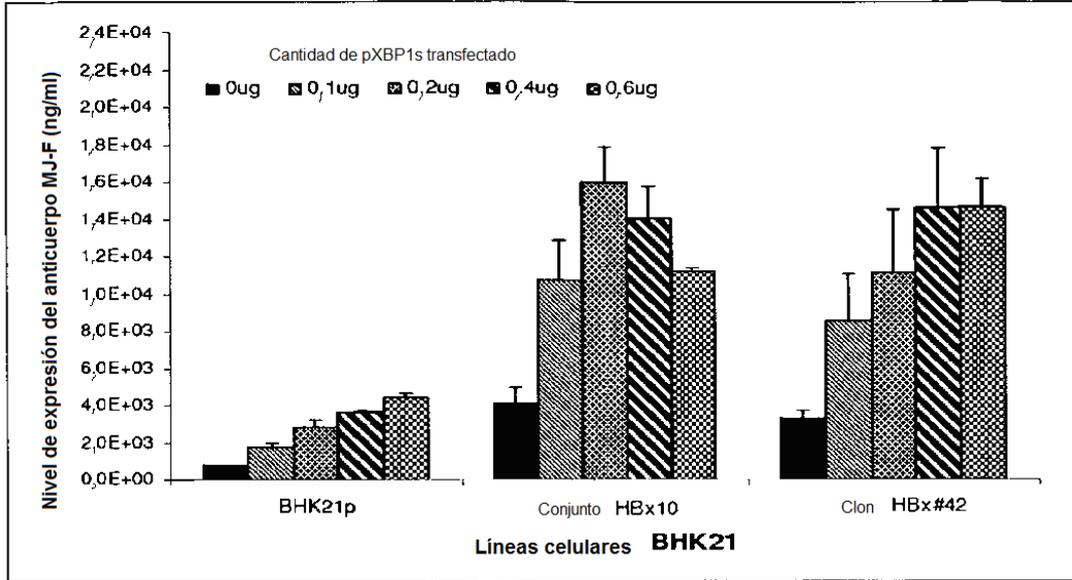


Figura 8

A



B

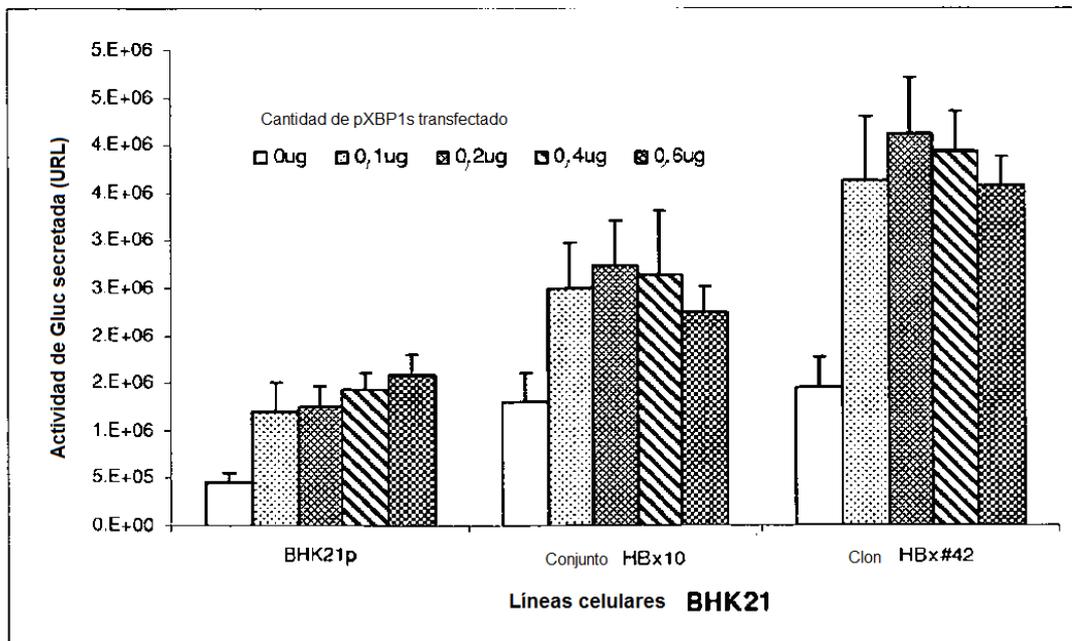


Figura 9

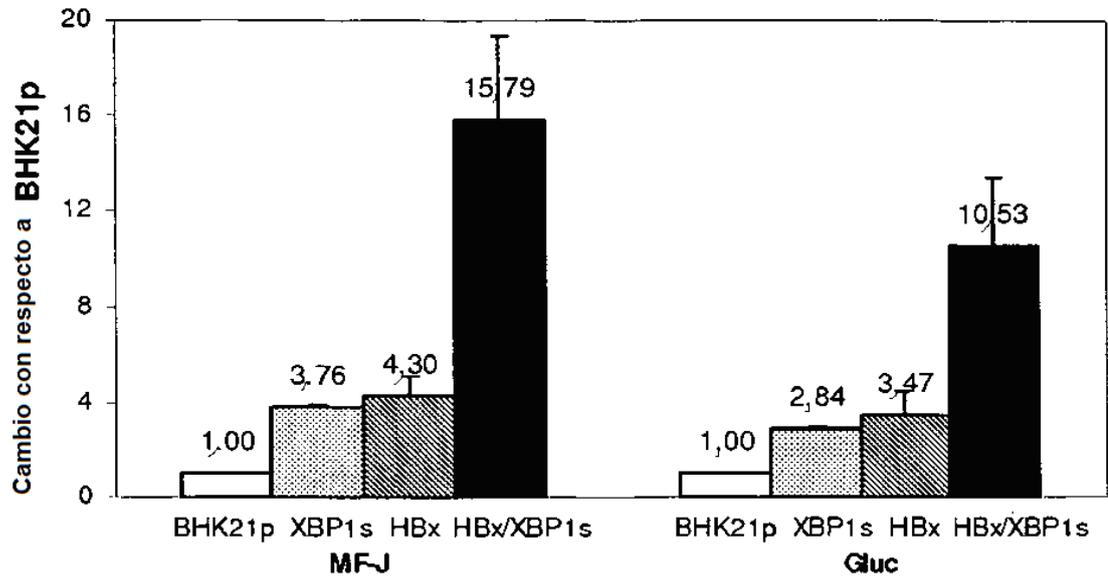
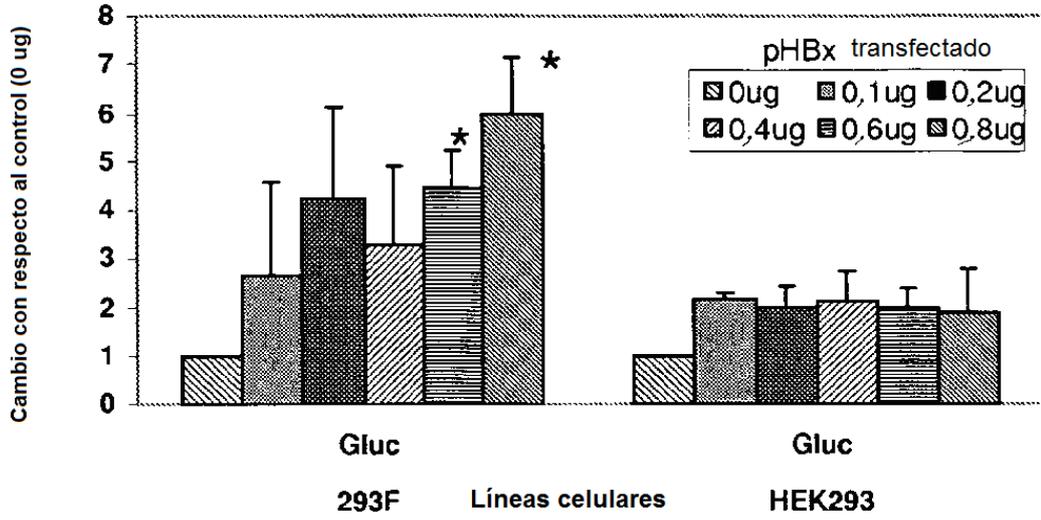


Figura 10

A



B

