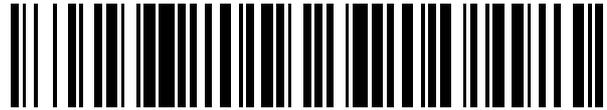


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 302**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2009 E 09763705 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 2300600**

54 Título: **Métodos para aumentar la viabilidad y productividad en cultivos celulares**

30 Prioridad:

13.06.2008 US 61235 P

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

25.01.2016

73 Titular/es:

**JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044, US**

72 Inventor/es:

**DORAI, HAIMANTI;
LY, CELIA y
SAUERWALD MCLAIN, TINA M.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 557 302 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).

Métodos para aumentar la viabilidad y productividad en cultivos celulares**Descripción****5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para aumentar la viabilidad y producción de proteínas secretadas en cultivos de células eucarióticas de lotes alimentados.

10 Antecedentes de la invención

Los cultivos de células de mamífero es el sistema de elección para muchos procesos de producción de proteínas recombinantes debido a su estabilidad para producir proteínas con modificaciones post-traslacionales apropiadas. Con la mayor demanda de fabricación, existe una fuerte motivación para mejorar la eficiencia del proceso aumentando el rendimiento del producto. Alcanzar los niveles de producción de gramos por litro de productos bioterapéuticos en procesos de producción comercial depende de la optimización del cultivo de células de mamíferos y de los métodos de ingeniería.

Inherente a los actuales cultivos de células de mamíferos libres de proteínas y de alta densidad, está el problema de muerte celular de la cual apoptosis puede representar hasta el 80% en un biorreactor típico de lote alimentado, inducido en respuesta a factores estresantes tales como privación de nutrientes o factores del crecimiento, disminución de oxígeno, acumulación de toxinas y cizallamiento (Goswami et al., *Biotechnol. Bioeng.* 62:632-640 (1999)). La apoptosis limita la densidad máxima de célula viabl, acelera la aparición de la fase mortal y reduce potencialmente el rendimiento de proteína heteróloga (Chiang y Sisk, *Biotechnol. Bioeng.* 91:779-792 (2005); Figueroa et al.; *Biotechnol. Bioeng.* 73:211-222 (2001), *Metab. Eng.* 5:230-245 (2003), *Biotechnol. Bioeng.* 85:589-600 (2004); Mercille y Massie, *Biotechnol. Bioeng.* 44:1140-1154 (1994)).

La apoptosis es el resultado de una red compleja de secuencias señalizadoras que inicia desde el interior y el exterior de la células, culminando en la activación de caspasas que ejecutan las fases finales de muerte celular. Se han usado varios métodos de prevención de apoptosis para mantener la viabilidad celular durante ciclos de producción extendida en cultivos de células de mamíferos (Arden y Betengaugh, *Trends Biotechnol.* 22:174-180 (2004); Vives et al., *Metab. Eng.* 5:124-132 (2003)). La alteración del medio extracelular a través de suplementar al medio con factores de crecimiento, hidrolisados y nutrientes limitadores ha llevado a aumentar la producción de proteínas y a reducir la apoptosis (Burteau et al, *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 39:291-296 (2003); Zhang y Robinson; *Cytotechnology* 48: 59-74 (2005)). Otros investigadores han vuelto a estrategias químicas y genéticas para inhibir la cascada señalizadora de apoptosis desde el interior de la células (Sauerwald et al.; *Biotechnol. Bioeng.* 77:704-716 (2002), *Biotechnol. Bioeng.* 81:329-340 (2003)). Los investigadores han descubierto que la sobreexpresión de genes que resultaron estar regulados por incremento en células cancerígenas puede prolongar la viabilidad en células cultivadas en biorreactores al prevenir apoptosis corriente debajo de activación de caspasa (Goswami et al., *supra*; Mastrangelo et al, *Trends Biotechnol.* 16:88-95 (1998); Meents et al., *Biotechnol. Bioeng.* 80:706-716 (2002); Tey et al., *J Biotechnol.* 79:147-159 (2000) y *Biotechnol. Bioeng.* 68:31-43 (2000)).

Los genes anti-apoptóticos que funcionan en la secuencia apoptótica mitocondrial pueden dividirse en tres grupos, concretamente 1) aquellos que actúan pronto en la secuencia, por ejemplo, miembros de la familia Bcl-2 de proteínas; 2) aquellos que actúan en la mitad de la secuencia para interrumpir o inhibir el complejo de apoptosoma, por ejemplo, Aven y 3) aquellos que actúan tarde en la secuencia, por ejemplo, inhibidores de caspasa, XIAP. La funcionalidad de la mayoría de estos genes se ha estudiado someténdolos a sobreexpresión en sistemas de expresión mamífera, y en algunos casos se ha determinado el efecto de sobreexpresión combinada de dos o más genes, cada uno derivado de una parte diferente de la secuencia. Los ejemplos incluyen 1) el efecto aditivo de Bcl-XL y una eliminación mutante de XIAP (XIAP Δ) en células de OHC (Figueroa et al., *Metab. Eng.* 5:230-245 (2003)); 2) E1B-19K y Aven en células BHK (Nivitchanyong et al., *Biotechnol. Bioeng.* 98:825-841 (2007) y 3) Bcl-XL, Aven y XIAP Δ (Sauerwald et al. *Biotechnol. Bioeng.* 81:329-340 (2003)).

Uno de los principales activadores de la cascada de apoptosis es la proteína p53. Un mecanismo por el que p53 activa la apoptosis es a través de la regulación por incremento de un subconjunto de proteínas pro-apoptosis que incluyen BNIP3 (Yasuda et al, *J. Biol. Chem.* 273:12415-21 (1998)). Por lo tanto, la regulación por incremento de p53 puede ser uno de los factores principales que desencadenan apoptosis. P53 puede degradar en células a través de secuencia de degradación mediada por ubiquitina por medio de MDM2 (gen doble minuto murino 2) (Bond et al., *Current Cancer Durg Target* 5:3-8 (2005)). Así, la sobreexpresión de MDM2 tiene el potencial de reducir los niveles de p53 y por extensión, inhibir apoptosis. Previamente, se ha demostrado que en presencia de señales estresantes, una línea celular de OHC que sobreexpresa MDM2 podría sobrevivir más tiempo en cultivo en comparación con OHC de tipo salvaje en cultivo de lotes (Arden et al., *Biotechnol. Bioeng.* 97:601-614 (2007)).

65

Las varias técnicas descritas anteriormente para aumentar la productividad de proteínas han tenido éxito en varios grados. Sin embargo, hay una continua necesidad de desarrollar métodos para aumentar la producción de proteínas, especialmente en producción comercial a gran escala.

5 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Perfiles de crecimiento de líneas celulares generadas a partir de co-transfección de Bcl-2Δ, MDM-2 y XIAPΔ.

10 Figura 2. Perfiles de crecimiento de líneas celulares generadas a partir de co-transfección de Bcl-XL, MDM-2 y XIAPΔ.

15 Figura 3. Perfiles de crecimiento de líneas celulares generadas a partir de co-transfección de E1B19K y XIAPΔ. A) Densidad de célula viable; B) Densidad de célula viable integrada; C) Regulación por disminución de Caspasa 3/7)

20 Figura 4. Perfiles de crecimiento de líneas celulares transfectadas con MDM2^{D300A} en cultivo de lotes en matraz con agitación.
A. Huésped transfectado fue 1013A.
B. Huésped transfectado fue C1835A.

Figura 5. Perfiles de crecimiento de línea celular 1013A transfectada con DM2^{D300A} en cultivo de lotes en matraz con agitación. A) Densidad de célula viable; B) % viabilidad.

25 Figura 6. Títulos de anticuerpo durante el cultivo de OHC en lote alimentado.

Resumen de la invención

30 La invención proporciona un método para aumentar la viabilidad celular en un cultivo de células de mamífero de lotes alimentados, que comprende cultivar una línea de célula de mamífero que sobreexpresa MDM2^{D300A}.

35 La invención también proporciona un método para aumentar la viabilidad celular en un cultivo de células de mamífero de lotes alimentados, que comprende cultivar una línea de célula de mamífero que sobreexpresa MDM2^{D300A} y E1B19K.

40 La invención también proporciona un método para aumentar la producción de una proteína secretada en un cultivo celular de lotes alimentados de ovario de hámster chino (OHC), que comprende cultivar una línea celular OHC que sobreexpresa MDM2^{D300A} y uno o más genes que codifiquen la proteína secretada.

La invención también proporciona un método para aumentar la producción de una proteína secretada en un cultivo celular de lotes alimentados de ovario de hámster chino (OHC), que comprende cultivar una línea celular OHC que sobreexpresa MDM2^{D300A} y E1B19K y uno o más genes que codifiquen la proteína secretada.

45 Descripción detallada

50 Como aquí se usan y en las reivindicaciones, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto claramente dicte lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia “un polipéptido” es una referencia a uno o más polipéptidos e incluye equivalentes del mismo conocidos por aquellos expertos en la técnica.

55 El término MDM2 como aquí se usa se refiere a MDM2 humano (homólogo de proteína que se enlaza con MDM2 p53) que tiene una secuencia de polipéptido en el número de acceso de GenBank NP_002383 (SEQ ID Nos: 1 y 2).

El término E1B19K como aquí se usa se refiere a proteína humana E1B19K, que tiene una secuencia de polipéptido mostrada en el número de acceso de GenBank NP_004322 (SEQ ID Nos: 5 y 6).

60 Los términos “genes apoptóticos^R” como aquí se usan se refieren a genes que codifican proteínas que, cuando se sobreexpresan en una célula, confieren una mayor resistencia a muerte celular en comparación con la célula no transfectada. Genes apoptóticos^R ejemplares son miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2, incluyendo Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w o E1B19K, inhibidores de caspasa, por ejemplo, la familia IAP (inhibidores de apoptosis), incluyendo XIAP y XIAPΔ, y otras proteínas incluidas en la regulación del ciclo celular, por ejemplo p27 y MDM2 (Arden et al., BioProcessing J. Marzo/Abril 23-28 (2004); Sauerwald et al., Bioprocessing J. Verano 2002, 61-68 (2002); Arden et al., Biotechnol. Bioengineer. 97:601-614, (2007). La muerte celular puede medirse mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, midiendo la densidad de célula viable (DCV) y la el porcentaje

(%) de viabilidad, y calculando la densidad de célula viable integrada (DCVI). La activación de apoptosis puede medirse midiendo la actividad de caspasa usando métodos bien conocidos.

5 El término "polipéptido" significa una molécula que comprende al menos dos residuos de aminoácido unidos por un enlace peptídico para formar un polipéptido. Polipéptidos pequeños de menos de 50 aminoácidos pueden referirse como "péptidos". Los polipéptidos también pueden referirse como "proteínas".

10 El término "polinucleótido" significa una molécula que comprende una cadena de nucleótidos covalentemente unidos por una columna vertebral de azúcar-fosfato u otros químicos covalentes equivalentes. ADN's y ARN's de doble o única hebra son ejemplos típicos de polinucleótidos.

15 Los términos "secuencia complementaria" significan una segunda secuencia aislada de polinucleótido que es anti-paralela a una primera secuencia aislada de polinucleótido y que comprende nucleótidos complementarios a los nucleótidos en la primera secuencia de polinucleótido. Típicamente, tales "secuencias complementarias" son capaces de formar una molécula de polinucleótido de doble hebra tal como ADN de doble hebra o ARN de doble hebra cuando se combinan bajo condiciones apropiadas con la primera secuencia aislada de polinucleótido.

20 El término "vector" significa un polinucleótido capaz de duplicarse en un sistema biológico o puede moverse entre tales sistemas. Los polinucleótidos de vector típicamente contienen elementos, tales como orígenes de replicación, señal de poliadenilación o marcadores de selección, que funcionan para facilitar la duplicación o mantenimiento de estos polinucleótidos en un sistema biológico. Ejemplos de tales sistemas biológicos pueden incluir una célula, virus, animal, planta, y sistemas biológicos reconstituidos que utilizan componentes biológicos capaces de duplicar un vector. Los polinucleótidos que comprenden un vector pueden ser moléculas de ADN o ARN o híbridos de estos.

25 Los términos "vector de expresión" significan un vector que puede utilizarse en un sistema biológico o un sistema biológico reconstituido para dirigir la traslación de un polipéptido codificado por una secuencia de polinucleótido presente en el vector de expresión.

30 Como aquí se usan, los términos "cultivo celular de lote alimentado" significan un proceso de cultivo celular que se basa en alimentar a un cultivo con un sustrato nutriente limitador de crecimiento. La estrategia de lote alimentado se usa típicamente en procesos bio-industriales para alcanzar una alta densidad celular en un bioreactor. Se han ideado numerosas estrategias para mejorar la viabilidad y finalmente la productividad de cultivos celulares de lotes alimentados. En la presente invención, se describe una técnica alternativa, por la que una combinación de genes apoptóticos^R se sobreexpresan en una célula huésped. Se demostró un inesperado alto incremento en la producción de proteínas secretadas por célula producidas para sobreexpresar MDM2 y E1B19K a la luz de resultados publicados que describen que la expresión de MDM-2 solo aumentó la productividad en un máximo de 2 veces (Arden et al., Biotechn. Bioengin. 97:601-614, 2007), y la expresión de E1B19K, aunque inhibió apoptosis y mejor los rendimientos celulares, no aumentó la producción de proteínas secretadas en una célula (WO2007/124106A2 de Betenbaugh). Además, las líneas celulares generadas durante los estudios descritos en los ejemplos más abajo que sobreexpresaron E1B19K solamente tuvieron menos de las propiedades óptimas de crecimiento y menores niveles de expresión. Así, la presente invención demostró un beneficio significativo para la producción de proteínas secretadas en células de mamífero co-expresando MDM2 y E1B19K.

45 La presente invención también describe MDM2 mutante que ocurre de manera no natural, que es útil en métodos de la invención.

50 Una realización de la divulgación es un método para aumentar la viabilidad celular en un cultivo de células de mamífero de lotes alimentados, que comprende cultivar una línea celular de mamífero que sobreexpresa uno o más genes apoptóticos^R y evalúa la viabilidad celular.

55 Los métodos de la invención son útiles para aumentar la viabilidad en un cultivo de células de mamífero de lote alimentado, tal como cultivo celular de ovario de hámster chino (OHC), cultivo celular de mieloma o hibridoma. En particular, los métodos de la invención son útiles para aumentar el total celular viable integrado (TCVI) de cultivos celulares de OHC. Las líneas celulares útiles en los métodos de la expresión expresan uno o más genes de apoptosis^R. En particular, pueden usarse los genes que codifican MDM2 (SEQ ID Nos: 1 y 2), MDM2^{D300A} (SEQ ID Nos: 3 y 4), E1B19IK (SEQ ID Nos: 5 y 6), Aven (SEQ ID Nos: 7 y 8), Bcl-LX (SEQ ID Nos: 9 y 10), Bcl-2Δ ((SEQ ID Nos: 11 y 12) y XIAPΔ (SEQ ID Nos: 13 y 14). La expresión de genes de apoptosis^R puede conseguirse mediante técnicas de transfección conocidas por aquellos expertos en la técnica. Las líneas celulares generadas son huéspedes superiores para el desarrollo de líneas celulares que expresan proteínas de interés tales como péptidos, fusiones de péptidos, factores de crecimiento, hormonas, anticuerpos, proteínas de repetición de anquirina diseñadas (DARPs) y otros polipéptidos útiles para fines terapéuticos, de diagnóstico o investigación. Las líneas celulares de OHC en los métodos de la invención incluyen OHC-K1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y OHC1SV (Lonza Biologicals, Slough, Reino Unido). Las líneas de mieloma útiles en el método de la invención incluyen NS0 y Sp2/0.

65

En la presente invención, el uso de líneas celulares que sobreexpresan genes de apoptosis^R permite que estas líneas celulares alcancen valores TCVI que aproximadamente doblan a los de la célula control, aumenta la longevidad de cultivos de lotes alimentados hasta 7 días y mejoran la producción de proteínas secretadas de 2 a 7 veces. Tal producción mejorada es significativa y puede dar como resultado menores costes de producción para productos biológicos complejos y al mismo tiempo, generar productos de calidad superior debido a la ausencia de lisis celular de las células no viables, ya que las células lisadas liberan proteasas que degradan el producto. Por consiguiente, estas líneas celulares son huéspedes superiores para el desarrollo de líneas celulares de producción que expresan una proteína o proteínas de interés. Por ejemplo, una línea celular OHC que sobreexpresa MDM2^{D300A} alcanzó valores TCVI dobles y sobrevivió 7 días más en cultivo en comparación con la línea celular control.

Otra realización de la divulgación es un método para aumentar la producción de una proteína secretada en un cultivo celular de lote alimentado de OHC, que comprende cultivar una línea celular OHC que sobreexpresa al menos un gen apoptótico^R y uno o más genes que codifican la proteína secretada, y medir el título de la proteína secretada. Las líneas celulares particularmente útiles en los métodos de la invención son las líneas celulares OHC que sobreexpresan MDM2 y E1B19K, y una línea celular que sobreexpresa MDM2^{D300A} solo. El uso de estas líneas celulares en los métodos de la invención dio como resultado títulos aumentados de 5 a 7 veces de proteínas secretadas en cultivo de lote alimentado hasta 21 días.

La sobreexpresión de proteínas en una célula puede conseguirse mediante métodos bien conocidos, bien de manera transitoria o mediante expresión estable (Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, 2^a ed., Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994; Sambrook et al., *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, 3^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001).

La presente divulgación también proporciona polinucleótidos mutantes MDM2 aislados, vectores que comprende estos polinucleótidos, células huéspedes aisladas, polipéptidos que se obtienen de expresión de estos polinucleótidos, métodos para expresar los polipéptidos de la invención y métodos para usar los polinucleótidos y polipéptidos de la invención. Las composiciones y métodos de la divulgación pueden usarse para una variedad de aplicaciones específicas. Los polinucleótidos y vectores de la divulgación son útiles porque codifican polipéptidos MDM2 y pueden usarse para expresar estos polipéptidos. Los polipéptidos MDM2 mutantes son útiles ya que mejoran la viabilidad celular y aumentan la producción de proteínas secretadas en la célula cuando se sobreexpresan de manera recombinante o se introducen mediante otros medios en un animal o tejido huésped.

Un aspecto de la divulgación es un polinucleótido aislado que comprende un polinucleótido que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 3 o una secuencia complementaria de la misma. La secuencia de polinucleótido mostrada en la SEQ ID NO: 3 codifica un polipéptido que comprende MDM2^{D300A} humano mutante. En MDM2^{D300A}, un sitio de división de caspasa putativa (AspValProAspCysLysLys) identificado en MDM2 de tipo salvaje se destruyó para hacer que MDM2 fuera más resistente a la degradación, y además aumentar los niveles de MDM2 en la célula durante el cultivo. Los polinucleótidos de la divulgación pueden producirse mediante síntesis química tal como síntesis de polinucleótido en fase sólida en un sintetizador de polinucleótido automatizado. Alternativamente, los polinucleótidos de la divulgación pueden producirse mediante otras técnicas tales como duplicación basada en PCR, duplicación basada en vector o técnicas de manipulación de ADN basadas en enzima de restricción. Las técnicas para la producción u obtención de polinucleótidos de una secuencias conocida dada son bien conocidas en la técnica.

Los polinucleótidos de la divulgación también pueden comprender al menos una secuencia no codificadora, tales como secuencias transcritas pero no trasladadas, señales de terminación, sitios de unión de ribosoma, secuencias estabilizadoras de mRNA, intrones y señales de poliadenilación. Las secuencias de polinucleótido pueden también comprender secuencias adicionales que codifican aminoácidos adicionales. Estas secuencias adicionales de polinucleótido pueden, por ejemplo, codificar una secuencia marcadora o etiqueta tal como péptido hexa-histidina (Gentz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 86:821-284 (1989) o la etiqueta de péptido HA (Wilson et al., *Cell* 37:767-778 (1984)) que facilitan la purificación de polipéptidos fusionados.

Otra realización de la divulgación es un vector que comprende un polinucleótido aislado que tiene una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 3. Los vectores de la divulgación son útiles para mantener polinucleótidos, duplicar polinucleótidos, o impulsar la expresión de un polipéptido codificado por un vector de la divulgación en sistemas biológicos, que incluyen sistemas biológicos reconstituidos. Los vectores pueden derivarse de cromosomas, episomas y virus tales como vectores derivados de plásmidos bactericidas, bacteriófagos, transposones, episomas de levadura, elementos de inserción, elementos del cromosoma de levadura, baculovirus, papovavirus tales como SV40, virus de vacunas, adenovirus, virus de viruela aviar, virus de pseudorrabia, picornavirus y retrovirus y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como cósmidos y fagémidos.

Los vectores de la divulgación pueden formularse en micropartículas, con adyuvantes, lípidos, tampones u otros excipientes como sea apropiado para una aplicación particular.

En una realización de la divulgación el vector es un vector de expresión. Los vectores de expresión típicamente comprenden elementos de secuencia de ácido nucleico que pueden controlar, regular, causar o permitir

la expresión de un polipéptido codificado por tal vector. Tales elementos pueden comprender sitios de enlace con potenciadores transcripcionales, sitios de iniciación de polimerasa ARN, sitios de enlace con ribosoma, y otros sitios que faciliten la expresión de polipéptidos codificados en un sistema de expresión dado. Tales sistemas de expresión pueden ser sistemas con base celular o libres de células bien conocidos en la técnica. Los elementos de secuencia de ácido nucleico y las secuencias de vector matriz adecuadas para su uso en la expresión de polipéptidos codificados son también bien conocidos en la técnica. Un vector de expresión derivado de plásmido ejemplar útil para la expresión de los polipéptidos de la divulgación comprenden un origen *E. coli* de replicación, un gen de resistencia a aph(3')-1a kanamicina, promotor temprano inmediato de CMVH con intrón A, una secuencia poliA sintética y un terminador de hormona de crecimiento bovino. Otro vector de expresión derivado de plásmido comprende un origen *E. coli* de replicación, un gen de resistencia a ant(4')-1a kanamicina, secuencias de repetición de terminal larga de virus del sarcoma de Rous, promotor temprano inmediato de CMVH y una secuencia tardía de poliA SV40.

Otra realización de la divulgación es una célula huésped aislada que comprende un vector de la divulgación. Ejemplos de células huéspedes representativas incluyen células Archae; células bacterianas tales como *Streptococci*, *Staphylococci*, *Enterococci*, *E. coli*, *Streptomyces*, cianobacterias, *B. subtilis* y *S. aureus*; célula fungicidas tales como *Kluveromyces*, *Saccharomyces*, *Basidiomycete*, *Candida albicans* o *Aspergillus*; células de insectos tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; célula de animales tales como OHC, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, 293, CV-1, melanoma y mieloma de Bowes; y células de plantas, tales como células de gimnosperma o angiosperma. Las células huéspedes en los métodos de la invención pueden proporcionarse como células individuales o poblaciones de células. Las poblaciones de células pueden comprender una población aislada o cultivada de células o células presentes en una matriz tal como un tejido.

La introducción de un polinucleótido, tal como un vector, en una célula huésped puede efectuarse mediante métodos bien conocidos para aquellos expertos en la técnica (Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, 2ª ed., Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001). Estos métodos incluyen transfección de fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-Dextrano, microinyección, transfección mediada por lípido catiónico, electroporación, transducción, raspadura de carga, introducción balística e infección.

Otra realización de la divulgación es un polipéptido aislado que comprende un polipéptido que tiene una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4. SEQ ID NO: 4 es un polipéptido que comprende una variante de proteína MDM2 humana con una sustitución de D300A. Los polipéptidos de la divulgación pueden producirse mediante síntesis química, tal como síntesis de péptido en fase sólida en un sintetizador de péptido automatizado. Alternativamente, los polipéptidos de la divulgación pueden obtenerse a partir de polinucleótidos que codifican estos polipéptidos con el uso de sistemas de expresión libres de células tales como sistemas de expresión basados en lisado de reticulocito, sistemas de expresión basados en germen de trigo y sistemas de expresión basados en extracto de *Escherichia coli*. Los polipéptidos de la divulgación pueden también obtenerse mediante expresión y aislamiento de células que esconden una secuencia de ácido nucleico de la divulgación mediante técnicas bien conocidas en la técnica, tales como expresión recombinante de polipéptidos etiquetados por afinidad fácilmente aislados. Aquellos expertos en la técnica reconocerán otras técnicas para obtener los polipéptidos de la divulgación. Los polipéptidos de la divulgación pueden comprender polipéptidos de fusión que comprenden un polipéptido de la divulgación fusionado con un segundo polipéptido. Tales segundos polipéptidos pueden ser secuencias señalizadoras líderes o secretoras, una secuencia prep-, o pro- o prepro-proteína, así como secuencias que ocurren naturalmente o parcialmente sintéticas derivadas en parte a partir de una secuencia que ocurre naturalmente o una secuencia enteramente sintética.

Otra realización de la divulgación es un método para expresar un polipéptido que comprende las etapas de proporcionar una célula huésped de la divulgación; cultivar la célula huésped bajo condiciones suficientes para la expresión de al menos un polipéptido que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4.

Las células huéspedes pueden cultivarse bajo cualquier condición adecuada para mantener o propagar un tipo dado de célula huésped y suficiente para expresar un polipéptido. Las condiciones de cultivo, medios y métodos relacionados suficientes para la expresión de polipéptidos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, muchos tipos de células de mamíferos pueden cultivarse aeróbicamente a 37 °C usando medio DMEM apropiadamente amortiguado mientras que tipos de células de bacterias, levaduras y otros pueden cultivarse a 37 °C bajo condiciones atmosféricas apropiadas en medio LB.

En los métodos de la invención la expresión de un polipéptido puede confirmarse usando una variedad de diferentes técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, la expresión de MDM2^{D300D} puede confirmarse mediante electrotransferencia o analizando la habilidad de MDM2^{D300D} para inhibir caspasas.

La presente invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos específicos no limitativos.

Ejemplos

En los siguientes ejemplos, se analizaron líneas celulares de OHC que sobreexpresan genes apoptóticos^R en cultivos en matraz con agitación para densidad celular viable en pico, longevidad, activación de caspasa 3/7 y mayor producción de proteínas secretadas.

5

Materiales y Métodos

Cultivo celular:

10 La línea celular OHCK1SV (Lonza Biologics, Slough, Reino Unido) designada como línea celular control C1013A, y OHCK1 (Colección americana de cultivos tipo, Manassas, Estados Unidos de América), designada como línea celular control C1835 se cultivaron en medio CD-OHC (Cat. N° 10743-011, Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenía 30 mM de glucosa y complementado con 6 mM L-Glutamina (Invitrogen Cat. N° 10313-021). En algunos casos, se usó otro medio libre de proteína animal que contenía varias concentraciones que incluían 60 mM glucosa (definido el medio de alta glucosa). Se compró suero fetal bovino en Hyclone Labs, Logan, UT (Cat. N° SH30071.3). Los cultivos celulares se controlaron con un instrumento de conteo celular automatizado Cedex (Innovatis, Alemania). El total celular viable integrado (TCVI, célula-día/ml), se calculó usando la siguiente fórmula:

15

$$20 \text{ TCVI (d1)} = [\text{DCV (d0)} + \text{DCV (d1)}] / 2 + \text{DCV (d0)}, \text{ donde DCV} = \text{densidad celular viable}$$

20

Vectores de expresión:

25 La secuencia codificadora de Bcl-2Δ (SEQ ID NO: 11) se clonó bajo el promotor CMV en el vector pCDNATM 3.1 (+) que tiene Neo®. La secuencia codificadora de Bcl-XL (SEQ ID NO: 9) se clonó bajo el promotor CMV en el vector pCDNATM 3.1 (+) que tiene Zeo®. La secuencia codificadora de MDM2 (SEQ ID NO: 3) se clonó bajo el promotor CMV en el vector pCDNATM 3.1 (+) que tiene Neo®. Se ha descrito el vector pBUDCE 4.1 diseñado para expresar constitutivamente E1B-19K (promotor EF-1^a) bien solo o en conjunto con Aven (promotor CMV) (Nivitchanyong et al., Biotechnol. Bioeng. 98:825-841 (2007)). Se ha descrito el vector que expresa XIAPΔ (promotor CMV) (Sauerwald et al., Biotechnol. Bioeng. 77:704-716 (2002)). El vector de expresión MDM2^{D300A} se generó mediante mutagénesis in vitro a partir del vector de expresión MDM2. Se construyó un vector de expresión de anticuerpo modelo (Ab #1) clonando ADN de cadena pesada y ligera en vector de expresión de glutamina sintetasa (GS) (obtenido de Lonza Biologics, Slough, Reino Unido, bajo una licencia de búsqueda).

25

30

Generación de líneas celulares apoptóticas^R

35

Un cultivo exponencial de línea celular OHCK1SV se transfectó con varias combinaciones de vectores de expresión como se muestra en la Tabla 1. Los transfectomas se seleccionaron usando una combinación de 400 µg/ml higromicina, 400 µg/ml genticina o 300 µg/ml Zeocina. Aproximadamente 200 transfectomas resultantes se expandieron en una placa con 24 pozos y la actividad de caspasa 3/7 se determinó mediante ensayo APO-ONE (Promega, Madison, WI). Se realizaron dos mediciones; a) temprano en la fase de crecimiento (~día 3 post-siembra) después del tratamiento con estaurosporina para inducir apoptosis; y b) tarde en la fase de crecimiento (~día 10 post-siembra), en cuyo momento, un subconjunto de célula de tipo salvaje ha progresado a apoptosis. Los transfectomas que habían reducido las actividades de caspasa 3/7 en ambos casos se expandieron más y de dos a cuatro clones se sometieron a estudios de perfil de crecimiento de lote en matraz con agitación.

40

45

Las líneas celulares prometedoras de criopreservaron. Los cultivos del matraz con agitación de las líneas seleccionadas se analizaron para actividad reducida de caspasa 3 mediante FLOW, usando anticuerpos etiquetados con fluorescente específicos para caspasa 3 (BD Bioscience; Cat. #68652X/550557). Las líneas celulares seleccionadas se codificaron con C y se entregaron al banco de células. Estas líneas celulares se sometieron a diez a 15 pruebas de estabilidad de paso en ausencia de antibióticos, que se usaron como agentes de selección. Las líneas celulares generadas se muestran en la Tabla 1. La expresión de cada transgen se confirmó en un conjunto de selección de líneas celulares mediante electrotransferencia.

50

55

60

Tabla 1

Línea celular	Gen sobreexpresado
B-31	Bcl-2 Δ
BX-61	Bcl-2 Δ y XIAP Δ
BMX-13 y BMX-39	Bcl-2 Δ , MDM2 y XIAP Δ
Bx-51	Bcl-XL
BxMX-01, BxMX-11 y BxMX-25	Bcl-XL, MDM2 y XIAP Δ
EM-15 y EM-70	E1B19K y MDM2
EAX-197	E1B19K, AVEN y XIAP Δ
EA-167	E1B19K y AVEN
C1013A	ninguno
BM	MDM2 y Bcl-2 Δ
BxM	MDM2, Bcl-XL
EMX-	MDM2, E1B19K y XIAP Δ

Cultivos en matraz con agitación de líneas celulares apoptóticas^R:

Las líneas celulares apoptóticas^R seleccionadas se cultivaron en modo de lotes en medio CD-OHC complementado con 6mM Glutamina y el agente (o agentes) de selección de antibióticos requeridos. El medio CD-OHC se formuló con 30 mM de glucosa. Además, las líneas celulares que expresan Ab de selección se cultivaron en un medio libre de proteína animal formulado a medida complementado con 6 mM de glutamina y 6 mM de glucosa.

Ensayo de actividad de caspasa 3/7:

Aproximadamente 3×10^5 células de cada clon se sembraron en un ml de medio de crecimiento en una placa con 24 pozos. El día 4 (d4) post-siembra, aproximadamente 1×10^5 células se transfirieron por triplicado a una placa con 96 pozos. Se añadió estaurosporina ($2 \mu\text{M}$ fc) y las células se incubaron durante 16 horas antes de analizar la actividad de caspasa 3/7 con el kit APO-ONE (BD Labs). El procedimiento se repitió el d10, excepto que se omitió estaurosporina. Los clones que tuvieron una actividad de caspasa 3/7 significativamente inferior en ambos días se expandieron a los matraces con agitación. La naturaleza apoptótica^R de los clones seleccionados se confirmó mediante análisis de citometría de flujo (véase más abajo).

Análisis de clones apoptóticos^R mediante citometría de flujo:

Aproximadamente 1×10^6 células de cultivos exponenciales se retiraron de cada matriz con agitación en placas de 24 pozos, se incubaron con estaurosporina ($2 \mu\text{M}$ fc) durante 16 horas, cosecharon y lavaron una vez en PBS. Las células después se incubaron con CytoPerm (Cat. N° 2975KK, BD BioScience) para fijarlas y permeabilizarlas. Después del lavado con PBS, las células se incubaron con anticuerpo anti-caspasa3 etiquetado con FITC (Cat. N° 68654, BD BioScience) antes de someterlas a análisis mediante citometría de flujo.

Ejemplo 1**Efecto de MDM2 en líneas celulares que expresan Bcl-2 Δ**

Se analizaron los perfiles de crecimiento (SF/Lote) de BMX-13 y BMX-39, que expresan Bcl-2 Δ , MDM2 y XIAP Δ , así como la línea celular transfectada doble BX-61 que expresa Bcl-2 Δ y XIAP Δ , B-31 que expresa Bcl-2 Δ solo, y el control C1013A. El total celular viable pico (DCV) de la línea celular control alcanzó 6×10^6 células/ml mientras que las de los clones BMX alcanzaron 11×10^6 células/ml. Las líneas celulares que expresaban Bcl-2 Δ y/o XIAP Δ tuvieron DCV intermedio (Figura 1A). Los clones BMX tuvieron un mayor total celular viable integrado (TCVI) en comparación con B-31 o BX-61. BMX-39 tuvo un 44% de incremento en TCVI sobre el control en comparación con 23% para B-31. XIAP Δ no tuvo ningún efecto incremental en TCVI cuando se usó junto con Bcl-2 Δ (Figura 1B). TCVI alto se correlaciona con alta viabilidad de células en cultivos a largo plazo en un biorreactor, dando como resultado mayores rendimientos de producto. Además, los productos biofarmacéuticos generados a partir de una línea celular de producción derivada de una célula huésped apoptótica^R pueden ser de calidad superior. Las líneas celulares BMX-13 y BMX-19 demostraron regulación por disminución de caspasa 3/7 10 veces y 16 veces, respectivamente, cuando se compararon con el control C1013A, confirmando el efecto anti-apoptótico de los genes en la línea celular OHC. B-31 y BX-61 habían tenido regulación por disminución de caspasas 12 y 16 veces.

Ejemplo 2**Efecto de MDM2 en líneas celulares que expresan Bcl-XL**

Se evaluaron los perfiles de crecimiento de BxMX-01, BxMX11 y BxMX-25 transfectadas triples, que expresan Bcl-XL, MDM2 y XIAPΔ en comparación con BX-51 que expresa Bcl-XL solo así como la línea celular control C1013. El total celular viable pico (DCV) de la línea celular control alcanzó 6x10⁶ células/ml mientras que las de los clones BMX alcanzaron 12x10⁶ células/ml (Figura 2A). Las líneas celulares que expresaban Bcl-XL solamente tuvieron DCV intermedia. Por ejemplo, la DCV pico de la línea celular Bx-51 fue 10x10⁶ células/ml. Los clones BMX tuvieron un mayor TCVI en comparación con BX-51 con un 34% de incremento en TCVI sobre el control en comparación con el 18% para BX-51 (Figura 2B). La co-transfección de Bcl-XL y MDM2 solamente (sin XIAPΔ) falló para generar líneas celulares con mayor DCV o una longevidad más extendida (datos no mostrados). Así, XIAPΔ y MDM2 tienen más posibilidades de funcionar sinérgicamente para conseguir el TCVI alto observado en líneas celulares BxMX-01, BxMX-11 y BxMX-25. La actividad de caspasa 3/7 se reguló por disminución 7, 5 y 8 veces en BxMX-01, BxMX-11 y BxMX-25, respectivamente, en comparación con el control C1013A.

Ejemplo 3

Efecto de MDM2 en líneas celulares que expresan E1B19K

En la Figura 3 se muestran perfiles de crecimiento de EM-15 y EM-79 que expresan E1B19K y MDM2. Para comparación, en un experimento separado, se incluyeron líneas celulares que expresaban E1B19K y AVEN (EA-167), o que expresaban E1B19K, AVEN y XIAPΔ (EAX-197) así como la línea celular huésped de transfección, C1013A. La densidad celular viable pico (DCV) de la línea celular control alcanzó 6x10⁶ células/ml mientras que las de los clones EM alcanzaron desde aproximadamente 12x10⁶ células/ml a 16x10⁶ células/ml. La DCV máxima para EA-167 y EAX-197 fue 13,6 – 13,9x10⁶ célula/ml. Los clones EM tuvieron mayor TCVI en comparación con EA-167 o EAX-197. EM-70 tuvo un 100% de incremento en TCVI sobre el control en comparación con el 23% de incremento sobre el control para EA-167. Estos datos, junto con el hecho de que las líneas celulares que expresan E1B19K solo no fueron suficientes para conseguir el TCVI alto observado en este experimento (Nivitchanyong et al., Biotechnol Bioeng 98:825-841 (2007)) sugiere que MDM2 contribuyó al aumento de TCVI observado en las líneas celulares EM-15 y EM-70. La co-transfección de E1B19K, MDM2 y XIAPΔ falló para generar líneas celulares con mayor DCV o TCVI en comparación (datos no mostrados). La actividad de caspasa 3/7 en las líneas celulares EM-15 y EM-70 fueron 13% y 30%, respectivamente, del control C1013A. Para comparación, EA-167 y EAX-197 tuvieron 37% y 20% de actividad de caspasa 3/7 como la del control C1013A. El 91% de células control fueron positivas para caspasa 3/7 mientras que 1-30% de las células dentro de las líneas celulares que expresaban genes apoptóticos^R fueron positivas para caspasa 3/7. Las líneas celulares con la menor actividad de caspasa 3/7 (por ejemplo, B-31) no tuvieron necesariamente el mayor TCVI.

Ejemplo 4

Clonación y expresión de MDM2 mutante

El vector que expresa cADN de longitud completa de MDM2 humano de tipo salvaje (Acceso al Genbank M92424.1) se obtuvo de la Universidad John Hopkins. El vector de expresión MDM2^{D300A} se generó mediante mutagénesis in vitro con un cebador de mutagénesis 5' gctgaagagggcctt gatgtgccggcctgt aaaaaactatagtg 3 (SEQ ID NO: 15) dando como resultado una sustitución de A en posición 899 por C, y en una sustitución de ácido aspártico por alanina en la proteína predicha MDM2^{D300A}. La mutagénesis se confirmó mediante secuenciación. La secuencia de ADN de MDM2^{D300A} se muestra en la SEQ ID NO: 3 y la secuencia de proteína predicha MDM2^{D300A} se muestra en la SEQ ID NO: 4. Este nuevo vector mutante así como su equivalente de tipo salvaje se usó para transfecciones temporales y estables.

Las proteínas MDM2^{D300A} y MDM2 de tipo salvaje se expresaron temporalmente en células Hek293. La electrotransferencia demostró la presencia de mayores niveles de MDM2^{D300A} en las células cuando se compararon con MDM2 de tipo salvaje, lo que sugiere que la proteína mutante fue más resistente a degradación proteolítica que MDM2 de tipo salvaje.

Ejemplo 5

Generación de líneas celulares que expresan MDM2^{D300A}

Se generaron líneas celulares estables que sobreexpresan MDM2^{D300A} o proteínas MDM2 de tipo salvaje como se describe en el Ejemplo 1. Se usaron dos líneas celulares huéspedes, C1013A y C1835A. La lista de líneas celulares usadas en estudios de perfil de crecimiento se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Línea celular	Huésped	Genes transfectados
A3	C1013A	MDM2 TS (tipo salvaje)
A4	C1013A	MDM2 TS
B1	C1013A	MDM2D300A
B5	C1013A	MDM2D300A
C7	C1835A	MDM2 TS
C8	C1835A	MDM2 TS
D6	C1835A	MDM2D300A
D7	C1835A	MDM2D300A
	C1013A	Grupo de células MDM2 de tipo salvaje
	C1013A	Grupo de células MDM2A300D
	C1013A	ninguno
	C1835A	ninguno
EM70	C1013A	E1B19K, MDM2
C1013H	C1013A	Bcl2d
C1013J	C1013A	Bcl-XL
C1013K	C1013A	E1B19K, Aven, XIAPd
BMX13	C1013A	Bcl-2d, MDM2, XIAPd

Ejemplo 6

Efecto de MDM2 en longevidad y viabilidad de líneas celulares huéspedes de OHCK1

Los perfiles de crecimiento y la viabilidad (matraz con agitación/lote) de líneas celulares D6, B1, y B5 derivadas de C1013A y C1835A que expresaban el gen MDM2D300A se muestran en la Figura 4. Usando el medio libre de proteína de propietario Centocor, la densidad celular viable pico (DCV) de la línea celular control C1013A fue 8×10^6 células/ml, y la de la línea celular control C1835A fue 5×10^6 células/ml. Las líneas celulares que sobreexpresaban MDM2^{D300A} tuvieron una mayor longevidad en comparación con las líneas celulares de control. En cultivos de lotes alimentados, las líneas B1 y B5 se mantuvieron en cultivo hasta 20 días, mientras que la célula huésped transfectada así como las células derivadas del grupo seleccionado por volumen después de la transfección con MDM2^{D300A} perdió viabilidad para el día 14 del cultivo (Figura 5).

Ejemplo 7

Estabilidad de las líneas celulares de OHC que sobreexpresan MDM2

Las líneas celulares de OHC D6, y B5 derivadas de C1013A y C1835A que expresaban el gen MDM2D300A se sometieron a un estudio de estabilidad de 15 pasos, con y sin la selección de agente, genética. Se realizó un estudio de curva de crecimiento al inicio y al final del estudio de estabilidad para cada línea celular y se señaló la densidad celular viable pico (indicativa de la estabilidad de la línea celular). Los cultivos sin selección de genética y en mayores pasos tuvieron DCV equivalentes o mayores y por lo tanto pueden considerarse como muy estables en ausencia del reactivo de selección (Tabla 3).

Tabla 3: DCV pico de líneas celulares que sobreexpresan MDM-2. M (estudio de estabilidad de 15 pasos)

	DCV pico (10^6 /mL)
MUT – B5 (-) genética (p1)	6,7
MUT – B5 (+) genética (p1)	6,4
MUT – B5 (-) genética (p15)	9,1
MUT – B5 (+) genética (p15)	7,3
MUT – D6 (-) genética (p1)	4,6
MUT – D6 (+) genética (p1)	4,5
MUT – D6 (-) genética (p15)	4,6
MUT – D6 (+) genética (p15)	5,4

Ejemplo 8

Estudios de productividad usando líneas celulares de huésped que sobreexpresan MDM2

5 La línea celular A4 que sobreexpresaba MDM2 y B1, que sobreexpresa MDM2^{D300A} se transfectó con un vector de expresión de cadena pesada y ligera de anticuerpo recombinante. La mezcla de transfección primero se seleccionó por volumen usando medio libre de glutamina que contenía suplementos de glutamina sintetasa y 25 µM MSX. Posteriormente, la mezcla se colocó en placas en Methocult para aislamiento de clones individuales. Aproximadamente 100 transfectomas resultantes por transfección se expandieron en la placa de 24 pozos y se midió un título de 14 días pasados mediante nefelometría. Los títulos medios para las líneas celulares MDM2 y MDM2D300A que expresaban cNT0328 fueron 90 mg/L, y significativamente superiores a los de los clones derivados de C1013A, que fue 21,3 mg/L.

15 En un experimento separado, las células OHCK1SV se transfectaron con MDM2 y E1B19K y un clon, EM70, que establemente expresaba E1B19K y MDM2 se transfectó con un vector de expresión de cadena pesada y ligera de anticuerpo recombinante (Dorai et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 103:592-608 (2009)). La mezcla de transfección primer se seleccionó por volumen usando un medio libre de glutamina que contenía suplementos de glutamina sintetasa y 25 µM MSX. Para comparación, varias otras líneas celulares que incluían C1013A (control), C1013M, C1013J, C1013K, A4, B5, BMX 13. Después de la selección por volumen durante 29 días, las células supervivientes se sometieron a un estudio de lotes alimentados en matraz con agitación. EM70 proporcionó títulos de anticuerpo >700 mg/L en d23 mientras que los títulos del resto de líneas celulares no excedieron 100 mg/L (Figura 6).

25 Un cultivo exponencial de OHCK1SV se transfectó con vectores que expresaban E1B19K y MDM2. Dos días más tarde se inició el protocolo de selección de antibiótico. Para el día 29, todas las células no transfectadas se eliminaron mientras que las células resistentes al antibiótico (grupo transfectado) había sobrevivido. Esas células se usaron para realizar un estudio de perfil de crecimiento de lotes alimentados en un matraz con agitación. Comenzando el día 2, a los cultivos se les alimentó diariamente con una mezcla nutriente de glucosa y aminoácidos. Los totales celulares y el título se midieron diariamente.

30

35

40

45

50

55

60

65

LISTADO SECUENCIAL

<110> CENTOCOR ORTHO BIOTECH INC.

5 <120> USO DEL GEN ANTI-APOPTÓTICO HUMANO-MURINO DOBLE MINUTO-2 (MDM2) EN EL DESARROLLO DE PRODUCCIÓN DE LÍNEAS CELULARES QUE EXPRESAN PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS

<130> CEN5223PCT

10 <140> A SER ASIGNADO
<141> 12-06-2012

<150> 61/061235 <151> 13-06-2008

15 <160> 15

<170> FastSEQ para Windows Versi'no 4.0

<210> 1

20 <211> 1476

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

25

30 atgtgcaata ccaacatgtc tgtacctact gatggtgctg taaccacctc acagattcca 60
 gcttcggaac aagagaccct ggtagacca aagccattgc ttttgaagt attaaagtct 120
 gttggtgcac aaaagacac ttatactatg aaagaggttc tttttatct tggccagtat 180
 attatgacta aacgattata tgatgagaag caacaacata ttgtatattg ttcaaatgat 240
 cttctaggag atttgtttgg cgtgccaagc ttctctgtga aagagcacag gaaaatata 300
 accatgatct acaggaactt ggtagtagtc aatcagcagg aatcatcgga ctcaggtaca 360
 tctgtgagtg agaacagtg tcaccttgaa ggtgggagtg atcaaagga cctgtgata 420
 35 gagcttcagg aagagaaaacc ttcatcttca catttggtt ctgaccatc tacctcatct 480
 agaaggagag caattagtga gacagaagaa aattcagatg aattatctgg tgaacgacaa 540
 agaaaacgcc acaaactctga tagtatttcc ctttcctttg atgaaagcct ggctctgtgt 600
 gtaataaggg agatagtgtg tgaagaagc agtagcagtg aatctacagg gacgccatcg 660
 aatccggatc ttgatgctgg tgtaagtga cattcaggtg attggttgga tcaggattca 720
 40 gtttcagatc agtttagtgt agaatttgaa gttgaatctc tcgactcaga agattatagc 780
 cttagtgaag aaggacaaga actctcagat gaagatgatg aggtatatca agttactgtg 840
 tatcaggcag gggagagtga tacagattca tttgaagaag atcctgaaat ttccttagct 900
 gactattgga aatgcactc atgcaatgaa atgaaatccc cccttccatc acattgcaac 960
 agatgttggg cccttcgtga gaattggcct cctgaagata aagggaaaaga taaaggggaa 1020
 atctctgaga aagccaaact ggaaaactca acacaagctg aagagggcct tgatgttcc 1080
 45 gattgtaaaa aaactatagt gaatgattcc agagagtcag gtgttgagga aaatgatgat 1140
 aaaattacac aagcttcaca atcacaagaa agtgaagact attctcagcc atcaacttct 1200
 agtagatta ttatagcag ccaagaagat gtgaaagagt ttgaaagga agaaacccaa 1260
 gacaaagaag agagtgtgga atctagtttg ccccttaatg ccattgaacc ttgtgtgatt 1320
 tgtcaaggtc gacctaaaaa tgggtgcatt gtccatggca aacaggaca tcttatggcc 1380
 50 tgctttacat gtgcaaaaga gctaaagaaa aggaataagc cctgcccagt atgtagacaa 1440
 ccaattcaaa tgattgtgct aacttatttc ccctag 1476

<210> 2

<211> 491

55 <212> PRT

<213> Homo sapiens

60 <400> 2

Met Cys Asn Thr Asn Met Ser Val Pro Thr Asp Gly Ala Val Thr Thr
 1 5 10 15

65

ES 2 557 302 T3

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

ES 2 557 302 T3

<210> 3
 <211> 1292
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Mutante de gen humano MDM2 fabricado con sustitución de A899C

10

<400> 3

atgactaaac gattatatga tgagaagcaa caacatattg tatattgttc aaatgatctt 60
 ctaggagatt tgtttggcgt gccaaagcttc tctgtgaaag agcacaggaa aatatatacc 120
 15 atgatctaca ggaacttggg agtagtcaat cagcaggaat catcggactc aggtacatct 180
 gtgagtgaga acagggtgtca ccttgaaggt gggagtgtac aaaaggacct tgtacaagag 240
 cttcaggaag agaaaacctc atcttcacat ttggtttcta gaccatctac ctcatctaga 300
 aggagagcaa ttagtgagac agaagaaaat tcagatgaat tatctgggtga acgacaaaaga 360
 aaacgccaca aatctgatag tatttccctt tcctttgatg aaagcctggc tctgtgtgta 420
 20 ataagggaga tatgttgtga aagaagcagt agcagtgaat ctacaggac gccatcgaat 480
 ccggatcttg atgctggtgt aagtgaacat tcaggtgatt ggttggatca ggattcagtt 540
 tcagatcagt ttagtgtaga atttgaagtt gaatctctcg actcagaaga ttatagcctt 600
 agtgaagaag gacaagaact ctacagatgaa gatgatgagg tataatcaagt tactgtgtat 660
 caggcagggg agagtgtatc agattcattt gaagaagatc ctgaaatttc cttagctgac 720
 25 tattggaaat gcacttcatg caatgaaatg aatccccccc ttccatcaca ttgcaacaga 780
 tgttgggccc ttcgtgagaa ttggcttctc gaagataaag ggaaagataa aggggaaatc 840
 tctgagaaaag ccaaaactgga aaactcaaca caagctgaag agggctttga tgtgccggct 900
 tgtaaaaaac tatagtgaat gattccagag agtcatgtgt tgaggaaaat gatgataaaa 960
 ttacacaagc ttcacaatca caagaaagtg aagactattc tcagccatca acttctagta 1020
 gcattattta tagcagccaa gaagatgtga aagagtttga aagggaagaa acccaagaca 1080
 30 aagaagagag tgtggaatct agtttgcccc ttaatgccat tgaaccttgt gtgatttgtc 1140
 aaggctcgacc taaaaatggt tgcattgtcc atggcaaac aggacatctt atggcctgct 1200
 ttacatgtgc aaagaagcta aagaaaagga ataagccctg cccagtatgt agacaaccaa 1260
 ttcaaatgat tgtgctaact tatttccctt ag 1292

35

<210> 4
 <211> 430
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40

<220>
 <223> Mutante de gen humano MDM2 fabricado con sustitución de A899C

45

<400> 4

Met Thr Lys Arg Leu Tyr Asp Glu Lys Gln Gln His Ile Val Tyr Cys
 1 5 10 15
 Ser Asn Asp Leu Leu Gly Asp Leu Phe Gly Val Pro Ser Phe Ser Val
 20 25 30
 50 Lys Glu His Arg Lys Ile Tyr Thr Met Ile Tyr Arg Asn Leu Val Val
 35 40 45
 Val Asn Gln Gln Glu Ser Ser Asp Ser Gly Thr Ser Val Ser Glu Asn
 50 55 60
 Arg Cys His Leu Glu Gly Ser Asp Gln Lys Asp Leu Val Gln Glu
 65 70 75 80
 55 Leu Gln Glu Glu Lys Pro Ser Ser Ser His Leu Val Ser Arg Pro Ser
 85 90 95
 Thr Ser Ser Arg Arg Arg Ala Ile Ser Glu Thr Glu Glu Asn Ser Asp
 100 105 110
 60 Glu Leu Ser Gly Glu Arg Gln Arg Lys Arg His Lys Ser Asp Ser Ile

65

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

<210> 5
 <211> 660
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

50 <400> 5

	atgtcgtccc	acctagtcca	gccgcgcg	ccctgcaca	acaacaaca	caactgcgag	60
	gaaaatgagc	agtctctgcc	cccgcgcg	ggcctcaaca	gttcctgggt	ggagctaccc	120
55	atgaacagca	gcaatggcaa	tgataatggc	aatgggaaaa	atggggggct	ggaacacgta	180
	ccatcctcat	cctccatcca	caatggagac	atggagaaga	ttcttttga	tgcaacaat	240
	gaatcaggac	agagtagttc	cagaggcagt	tctcactgtg	acagcccttc	gccacaagaa	300
	gatgggcaga	tcatgtttga	tgtgaaatg	cacaccagca	gggaccatag	ctctcagtca	360
	gaagaagaag	ttgtagaagg	agagaaggaa	gtcgaggctt	tgaagaaaag	tgcggactgg	420
60	gtatcagact	ggtccagtag	acccgaaaac	attccaccca	aggagttcca	cttcagacac	480
	cctaaccggt	ctgtgtcttt	aagcatgagg	aaaagtggag	ccatgaagaa	agggggtatt	540
	ttctccgcag	aatttctgaa	ggtgttcatt	ccatctctct	tcctttctca	tgttttggct	600
	ttggggctag	gcattctatat	tggaaagcga	ctgagcacac	cctctgccag	cacctactga	660

65

ES 2 557 302 T3

<210> 6
 <211> 219
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 6

Met Ser Ser His Leu Val Glu Pro Pro Pro Pro Leu His Asn Asn Asn
 1 5 10
 Asn Asn Cys Glu Glu Asn Glu Gln Ser Leu Pro Pro Pro Ala Gly Leu
 20 25
 Asn Ser Ser Trp Val Glu Leu Pro Met Asn Ser Ser Asn Gly Asn Asp
 35 40 45
 15 Asn Gly Asn Gly Lys Asn Gly Gly Leu Glu His Val Pro Ser Ser Ser
 50 55 60
 Ser Ile His Asn Gly Asp Met Glu Lys Ile Leu Leu Asp Ala Gln His
 65 70 75 80
 Glu Ser Gly Gln Ser Ser Ser Arg Gly Ser Ser His Cys Asp Ser Pro
 85 90 95
 20 Ser Pro Gln Glu Asp Gly Gln Ile Met Phe Asp Val Glu Met His Thr
 100 105 110
 Ser Arg Asp His Ser Ser Gln Ser Glu Glu Glu Val Val Glu Gly Glu
 115 120 125
 25 Lys Glu Val Glu Ala Leu Lys Lys Ser Ala Asp Trp Val Ser Asp Trp
 130 135 140
 Ser Ser Arg Pro Glu Asn Ile Pro Pro Lys Glu Phe His Phe Arg His
 145 150 155 160

Pro Lys Arg Ser Val Ser Leu Ser Met Arg Lys Ser Gly Ala Met Lys
 165 170 175
 30 Lys Gly Gly Ile Phe Ser Ala Glu Phe Leu Lys Val Phe Ile Pro Ser
 180 185 190
 Leu Phe Leu Ser His Val Leu Ala Leu Gly Leu Gly Ile Tyr Ile Gly
 195 200 205
 35 Lys Arg Leu Ser Thr Pro Ser Ala Ser Thr Tyr
 210 215

<210> 7
 <211> 1089
 <212> ADN
 40 <213> Homo Sapiens
 <400> 7

atgcaggcgg agcgaggagc tcgggggaggc cgtggggcggc ggccaggccg cggccggcct 60
 45 ggcgagagatc gccacagcga gcggcccga gccgcagcgg cggtagccag agggcgcgcc 120
 ggagcgggcg gcggggacgg aggcggacgc cggggccgtg gccgtggccg gggcttccgc 180
 ggcgctcgcg gaggccgagg aggaggagc gccccgcgag gcagccgccc ggagccggga 240
 ggctggggcg caggggcccag cgcgcccgtt gaagatgaca gcgatgcaga gacctatgga 300
 gaagagaatg atgaacaggg aaattattct aaaagaaaga ttgtctctaa ctgggatcga 360
 50 tatcaagata ttgaaaaaga ggtcaataat gaaagtggag agtcacagag gggaacagat 420
 ttcagtgctc tccttagctc tgcaggggac tcattctcac agttccggtt tgcctgaggag 480
 aaagaatggg atagtgaagc ttcttgtcca aaacagaatt cagcatttta tgtggatagt 540
 gagttatttg ttcgagccct tcaagagctg cctctctgcc tccgactcaa cgttgctgcc 600
 gaactggctc agggtagagt tcctttagag gttcctcagg tgaacccaaa gagaactgat 660
 gatggcaagg gattagggat gcagttaaag gggcccttgg ggcttgagg aagggggccc 720
 atctttgagc tgaaatctgt ggctgctgac tgccctgtgt tgctgggcaa agacaaccca 780
 55 agccccgggtc cttcaaggga ttctcagaaa cccacttccc cactgcagtc agcaggagac 840
 catttggagc aagaactaga tctgttgctt aatttagatg cacctataaa agagggagat 900
 aacatcttac cagatcagac gtctcaggac ctgaaatcca aggaagatgg ggaggtggtc 960
 caagaggaag aagtttgtgc aaaaccatct gtgactgaag aaaaaaacat ggaacctgag 1020
 caaccaagta cctccaaaaa tgttaccgag gaagagctgg aagactgggt ggacagcatg 1080
 60 atttcctaa 1089

<210> 8
 <211> 362
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 65 <400> 8

ES 2 557 302 T3

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

55 <210> 9
 <211> 513
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

60 <400> 9

65

ES 2 557 302 T3

5 atgtctcaga gcaaccggga gctggtggtt gactttctct cctacaagct ttcccagaaa 60
 ggatacagct ggagtcagtt tagtgatgtg gaagagaaca ggactgaggc cccagaaggg 120
 actgaatcgg agatggagac ccccagtgcc atcaatggca acccatcctg gcacctggca 180
 gacagccccg cggatgaatgg agccactggc cacagcagca gtttggatgc ccgggagggtg 240
 atccccatgg cagcagtaaa gcaagcgctg agggaggcag gcgacgagtt tgaactgagg 300
 taccggcggg cattcagtga cctgacatcc cagctccaca tcaccccagg gacagcatat 360
 cagagctttg aacaggatac ttttgtggaa ctctatggga acaatgcagc agccgagagc 420
 cgaaagggcc aggaacgctt caaccgctgg ttcttgacgg gcatgactgt ggccggcgtg 480
 10 gttctgctgg gctcactctt cagtgggaaa tga 513

<210> 10
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 10

20 Met Ser Gln Ser Asn Arg Glu Leu Val Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys
 1 5 10 15
 Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser Trp Ser Gln Phe Ser Asp Val Glu Glu
 20 25 30
 Asn Arg Thr Glu Ala Pro Glu Gly Thr Glu Ser Glu Met Glu Thr Pro
 35 40 45
 Ser Ala Ile Asn Gly Asn Pro Ser Trp His Leu Ala Asp Ser Pro Ala
 50 55 60
 25 Val Asn Gly Ala Thr Gly His Ser Ser Ser Leu Asp Ala Arg Glu Val
 65 70 75 80
 Ile Pro Met Ala Ala Val Lys Gln Ala Leu Arg Glu Ala Gly Asp Glu
 85 90 95
 30 Phe Glu Leu Arg Tyr Arg Arg Ala Phe Ser Asp Leu Thr Ser Gln Leu
 100 105 110
 His Ile Thr Pro Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Phe Glu Gln Val Val Asn
 115 120 125
 Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe
 130 135 140
 35 Ser Phe Gly Gly Ala Leu Cys Val Glu Ser Val Asp Lys Glu Met Gln
 145 150 155 160
 Val Leu Val Ser Arg Ile Ala Ala Trp Met Ala Thr Tyr Leu Asn Asp
 165 170 175
 His Leu Glu Pro Trp Ile Gln Glu Asn Gly Gly Trp Asp Thr Phe Val
 180 185 190
 40 Glu Leu Tyr Gly Asn Asn Ala Ala Ala Glu Ser Arg Lys Gly Gln Glu
 195 200 205
 Arg Phe Asn Arg Trp Phe Leu Thr Gly Met Thr Val Ala Gly Val Val
 210 215 220
 45 Leu Leu Gly Ser Leu Phe Ser Arg Lys
 225 230

50 <210> 11
 <211> 573
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

55 <400> 11

60

65

ES 2 557 302 T3

5 atggcgcacg ctgggagaaac agggtagcat aaccgggaga tagtgatgaa gtacatccat 60
 tataagctgt cgcagagggg ctacgagtgg gatgccgagg ggcttgcgct cagcccgggtg 120
 ccacctgtgg tccacctgac cctccgccag gccggcgacg acttctcccg ccgctaccgc 180
 cgcgacttcc ccgagatgtc cagccagctg cacctgacgc ccttcaccgc gcgggggacgc 240
 ttgcccacgg tgggtggagga gctcttcagg gacgggggtga actggggggag gattgtggcc 300
 ttctttgagt tcgggtgggt catgtgtgtg gagagcgtca accggggagat gtcgcccctg 360
 gtggacaaca tcgccctgtg gatgactgag tacctgaacc ggcacctgca cacctggatc 420

10 caggataacg gaggctggga tgcctttgtg gaactgtacg gccccagcat ggggcctctg 480
 tttgatttct cctggctgtc tctgaagact ctgctcagtt tggccctggt gggagcttgc 540
 atcaccctgg gtgcctatct gagccacaag tga 573

15 <210> 12
 <211> 190
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 12

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

50 <210> 13
 <211> 1356
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

55 <400> 13

60

65

70

ES 2 557 302 T3

atgactttta acagttttga aggatctaaa acttgtgtac ctgcagacat caataaggaa 60
 gaagaatttg tagaagagtt taatagatta aaaacttttg ctaattttcc aagtggtagt 120
 cctgtttcag catcaacact ggcacgagca gggtttcttt atactgggta aggagatacc 180
 5 gtgCGGTgct ttagttgtca tgcagctgta gatagatggc aatatggaga ctCagcagtt 240
 ggaagacaca ggaagatc cccaaattgc agatttatca acggctttta tcttgaaaat 300
 agtgccacgc agtctacaaa ttctgggtatc cagaatggtc agtacaaagt tgaaaactat 360
 ctgggaagca gagatcattt tgccttagac aggccatctg agacacatgc agactatctt 420
 ttgagaactg ggcaggttgt agatatatca gacaccatat acccgaggaa ccctgccatg 480
 10 tatagtgaag aagctagatt aaagtccttt cagaactggc cagactatgc tcacctaacc 540
 ccaagagagt tagcaagtgc tggactctac tacacaggta ttggtgacca agtgcagtgc 600
 ttttgttgtg gtggaaaact gaaaaattgg gaaccttgtg atcgtgcctg gtcagaacac 660
 agggcagact ttCctaattg cttctttgtt ttgggcccga atcttaatat tcgaagtgaa 720
 tctgatgctg tgagttctga taggaatttc ccaaatccaa caaatcttcc aagaaatcca 780
 tccatggcag attatgaagc acggatcttt acttttggga catggatata ctCagttaac 840
 aaggagcagc ttgcaagagc tggattttat gctttaggtg aaggtgataa agtaaagtgc 900
 15 tttcactgtg gaggagggct aactgattgg aagcccagtg aagacccttg ggaacaacat 960
 gctaaatggg atccagggtg caaatatctg ttagaacaga agggacaaga atataataac 1020
 aatattcatt taactcattc acttgaggag tgtctggtaa gaactactga gaaaacacca 1080
 tcactaacta gaagaattga tgataccatc ttccaaaatc ctatggtaca agaagctata 1140

 20 cgaatggggg tcagtttcaa ggacattaag aaaataatgg aggaaaaaat tcagatatct 1200
 gggagcaact ataaatcact tgaggttctg gttgcagatc tagtgaatgc tcagaaagac 1260
 agtatgccag atgagtcaag tcagacttca ttacagaaag agattagtac tgaagagcag 1320
 ctaaggcgcc tgcaagagga gaagcttatc gattga 1356

 25 <210> 14
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 30 <400> 14

 35

 40

 45

 50

 55

 60

 65

ES 2 557 302 T3

5 Met Thr Phe Asn Ser Phe Glu Gly Ser Lys Thr Cys Val Pro Ala Asp
 1 5 10
 Ile Asn Lys Glu Glu Glu Phe Val Glu Glu Phe Asn Arg Leu Lys Thr
 20 25 30
 Phe Ala Asn Phe Pro Ser Gly Ser Val Ser Ala Ser Thr Leu Ala
 35 40 45
 Arg Ala Gly Phe Leu Tyr Thr Gly Glu Gly Asp Thr Val Arg Cys Phe
 50 55 60
 Ser Cys His Ala Ala Val Asp Arg Trp Gln Tyr Gly Asp Ser Ala Val
 65 70 75 80
 10 Gly Arg His Arg Lys Val Ser Pro Asn Cys Arg Phe Ile Asn Gly Phe
 85 90 95
 Tyr Leu Glu Asn Ser Ala Thr Gln Ser Thr Asn Ser Gly Ile Gln Asn
 100 105 110
 Gly Gln Tyr Lys Val Glu Asn Tyr Leu Gly Ser Arg Asp His Phe Ala
 115 120 125
 15 Leu Asp Arg Pro Ser Glu Thr His Ala Asp Tyr Leu Leu Arg Thr Gly
 130 135 140
 Gln Val Val Asp Ile Ser Asp Thr Ile Tyr Pro Arg Asn Pro Ala Met
 145 150 155 160
 Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Ser Phe Gln Asn Trp Pro Asp Tyr
 165 170 175
 20 Ala His Leu Thr Pro Arg Glu Leu Ala Ser Ala Gly Leu Tyr Tyr Thr
 180 185 190
 Gly Ile Gly Asp Gln Val Gln Cys Phe Cys Cys Gly Gly Lys Leu Lys
 195 200 205
 Asn Trp Glu Pro Cys Asp Arg Ala Trp Ser Glu His Arg Arg His Phe
 210 215 220
 25 Pro Asn Cys Phe Phe Val Leu Gly Arg Asn Leu Asn Ile Arg Ser Glu
 225 230 235 240
 Ser Asp Ala Val Ser Ser Asp Arg Asn Phe Pro Asn Ser Thr Asn Leu
 245 250 255
 Pro Arg Asn Pro Ser Met Ala Asp Tyr Glu Ala Arg Ile Phe Thr Phe
 260 265 270
 30 Gly Thr Trp Ile Tyr Ser Val Asn Lys Glu Gln Leu Ala Arg Ala Gly
 275 280 285
 Phe Tyr Ala Leu Gly Glu Gly Asp Lys Val Lys Cys Phe His Cys Gly
 290 295 300
 Gly Gly Leu Thr Asp Trp Lys Pro Ser Glu Asp Pro Trp Glu Gln His
 305 310 315 320
 35 Ala Lys Trp Tyr Pro Gly Cys Lys Tyr Leu Leu Glu Gln Lys Gly Gln
 325 330 335
 Glu Tyr Ile Asn Asn Ile His Leu Thr His Ser Leu Glu Glu Cys Leu
 340 345 350
 Val Arg Thr Thr Glu Lys Thr Pro Ser Leu Thr Arg Arg Ile Asp Asp
 355 360 365
 40 Thr Ile Phe Gln Asn Pro Met Val Gln Glu Ala Ile Arg Met Gly Phe
 370 375 380
 Ser Phe Lys Asp Ile Lys Lys Ile Met Glu Glu Lys Ile Gln Ile Ser
 385 390 395 400
 45 Gly Ser Asn Tyr Lys Ser Leu Glu Val Leu Val Ala Asp Leu Val Asn
 405 410 415
 Ala Gln Lys Asp Ser Met Pro Asp Glu Ser Ser Gln Thr Ser Leu Gln
 420 425 430
 Lys Glu Ile Ser Thr Glu Glu Gln Leu Arg Arg Leu Gln Glu Glu Lys
 435 440 445
 50 Leu Ile Asp
 450

<210> 15
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

<400> 15

gctgaagagg gctttgatgt gccggcttgt aaaaaaacta tagtg 45

65

Reivindicaciones

- 5 **1.** Un método para aumentar la viabilidad celular en un cultivo celular de mamífero de lote alimentado, que comprende cultivar una línea celular de mamífero que sobreexpresa MDM2^{D300A}.
- 10 **2.** Un método para aumentar la viabilidad celular en un cultivo celular de mamífero de lote alimentado, que comprende cultivar una línea celular de mamífero que sobreexpresa MDM2^{D300A} y E1B19K.
- 10 **3.** El método de la reivindicación 1 ó 2 donde la línea celular de mamífero es una línea celular de un ovario de hámster chino (OHC) o una línea celular de mieloma.
- 15 **4.** El método de la reivindicación 3 donde la línea celular de OHC es OHC-K1 u OHC-K1SV.
- 15 **5.** El método de la reivindicación 3 donde la línea celular de mieloma es NS20 o Sp2/0.
- 20 **6.** El método de la reivindicación 1 ó 2 donde la línea celular de mamífero es una línea celular de hibridoma.
- 20 **7.** El método de la reivindicación 1 ó 2 donde la viabilidad celular es al menos:
a) 50% a los 14 días del cultivo celular de lote alimentado; o
b) 40% a los 20 días del cultivo celular de lote alimentado.
- 25 **8.** El método de la reivindicación 1 ó 2 donde la densidad celular viable es al menos 4 x 10⁶ células/mL a los 15 días del cultivo celular de lote alimentado.
- 25 **9.** Un método para aumentar la producción de una proteína secretada en un cultivo celular de lote alimentado de ovario de hámster chino (OHC), que comprende cultivar una línea celular de OHC que sobreexpresa MDM2^{D300A} y uno o más genes que codifican la proteína secretada.
- 30 **10.** Un método para aumentar la producción de una proteína secretada en un cultivo celular de lote alimentado de ovario de hámster chino (OHC), que comprende cultivar una línea celular de OHC que sobreexpresa MDM2^{D300A} y E1B19K y uno o más genes que codifican la proteína secretada.
- 35 **11.** El método de las reivindicaciones 9 a 10 donde el título de la proteína secretada es al menos 600 mg/L.
- 35 **12.** El método de las reivindicaciones 9 a 10 donde la línea celular de OHC es OHC-K1 u OHC-K1SV.
- 40 **13.** El método de las reivindicaciones 9 a 10 donde la proteína secretada es una cadena pesada de anticuerpo o una cadena ligera de anticuerpo.
- 40 **14.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 donde MDM2^{D300A} es un polipéptido que comprende o consiste en la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 4.

45

50

55

60

65

FIG. 1A

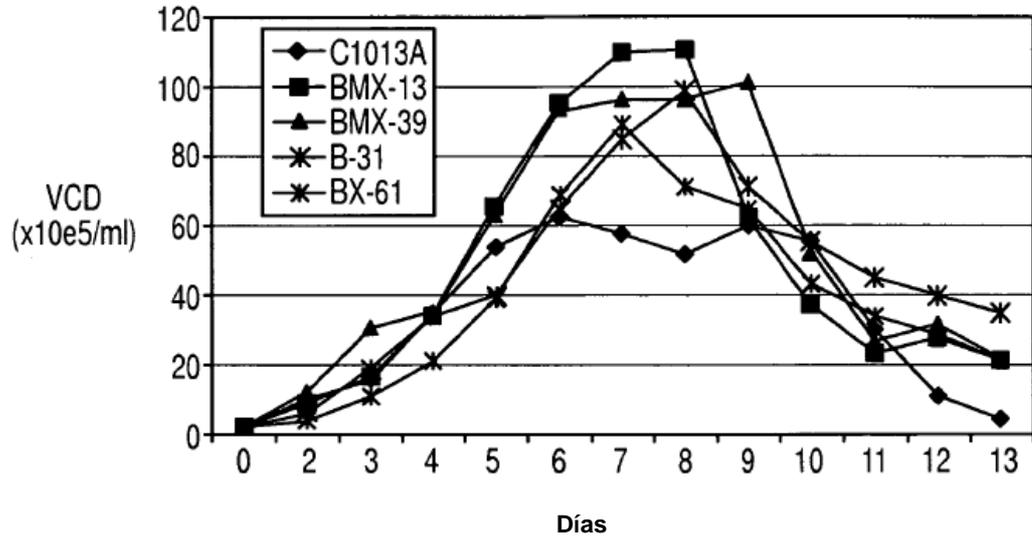


FIG. 1B

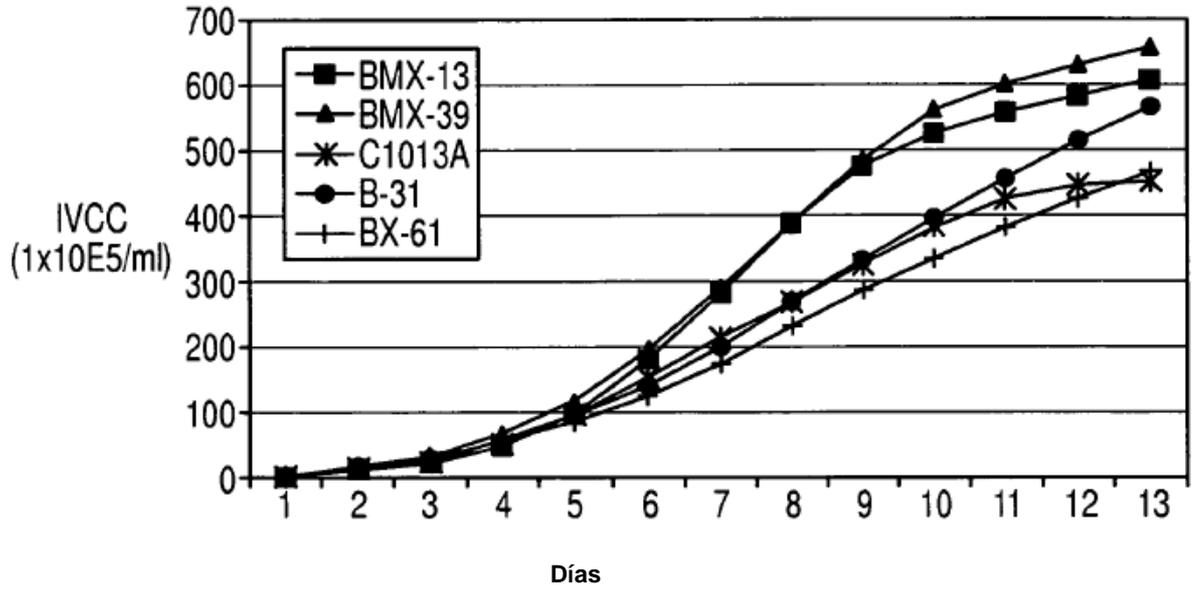


FIG. 2A

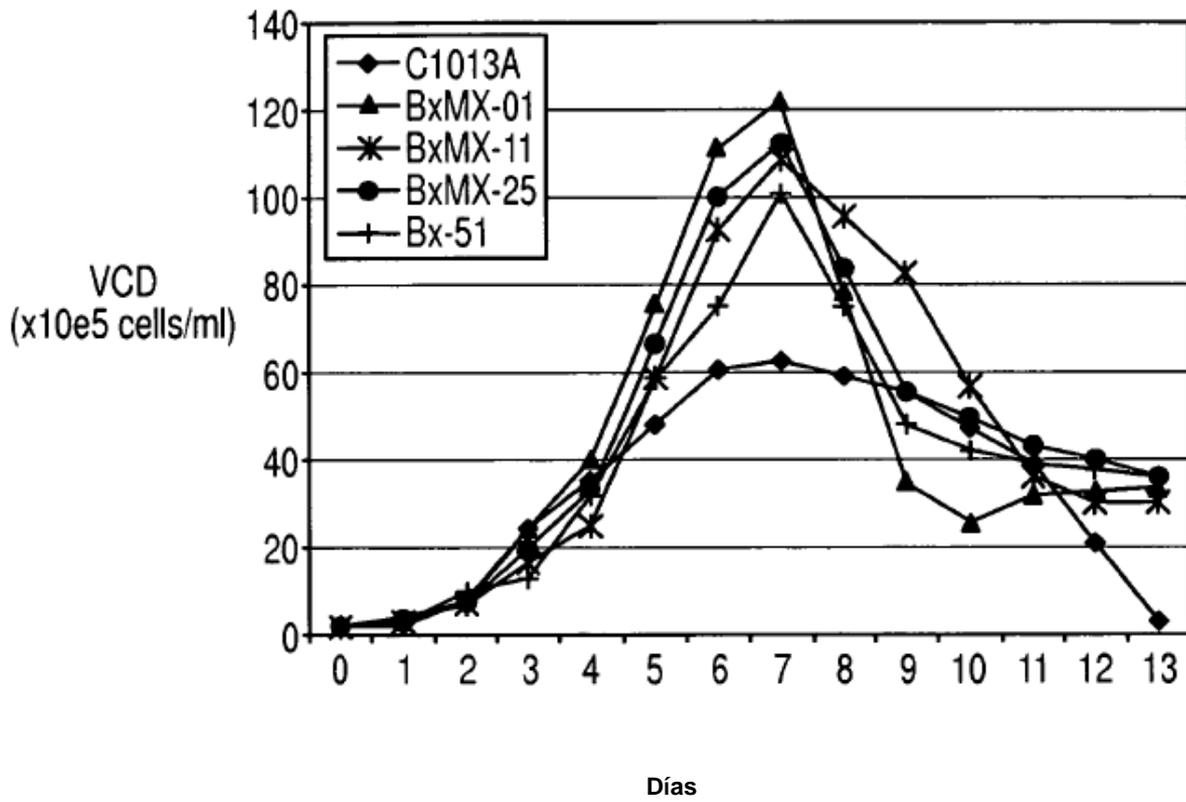


FIG. 2B

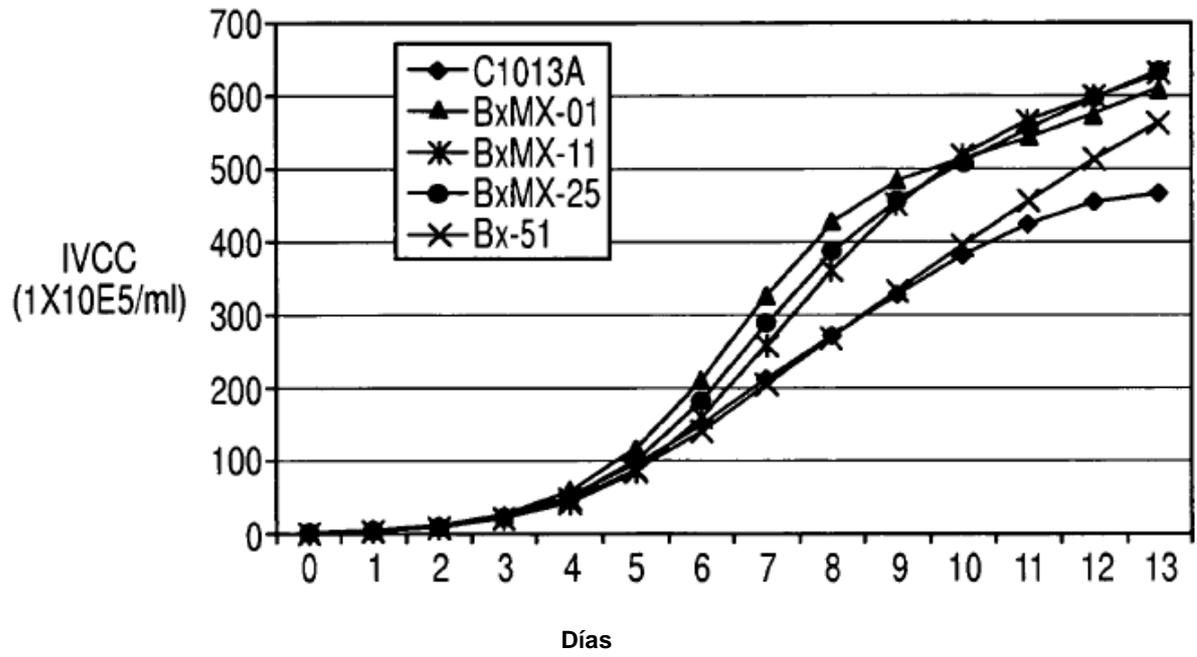


FIG. 3

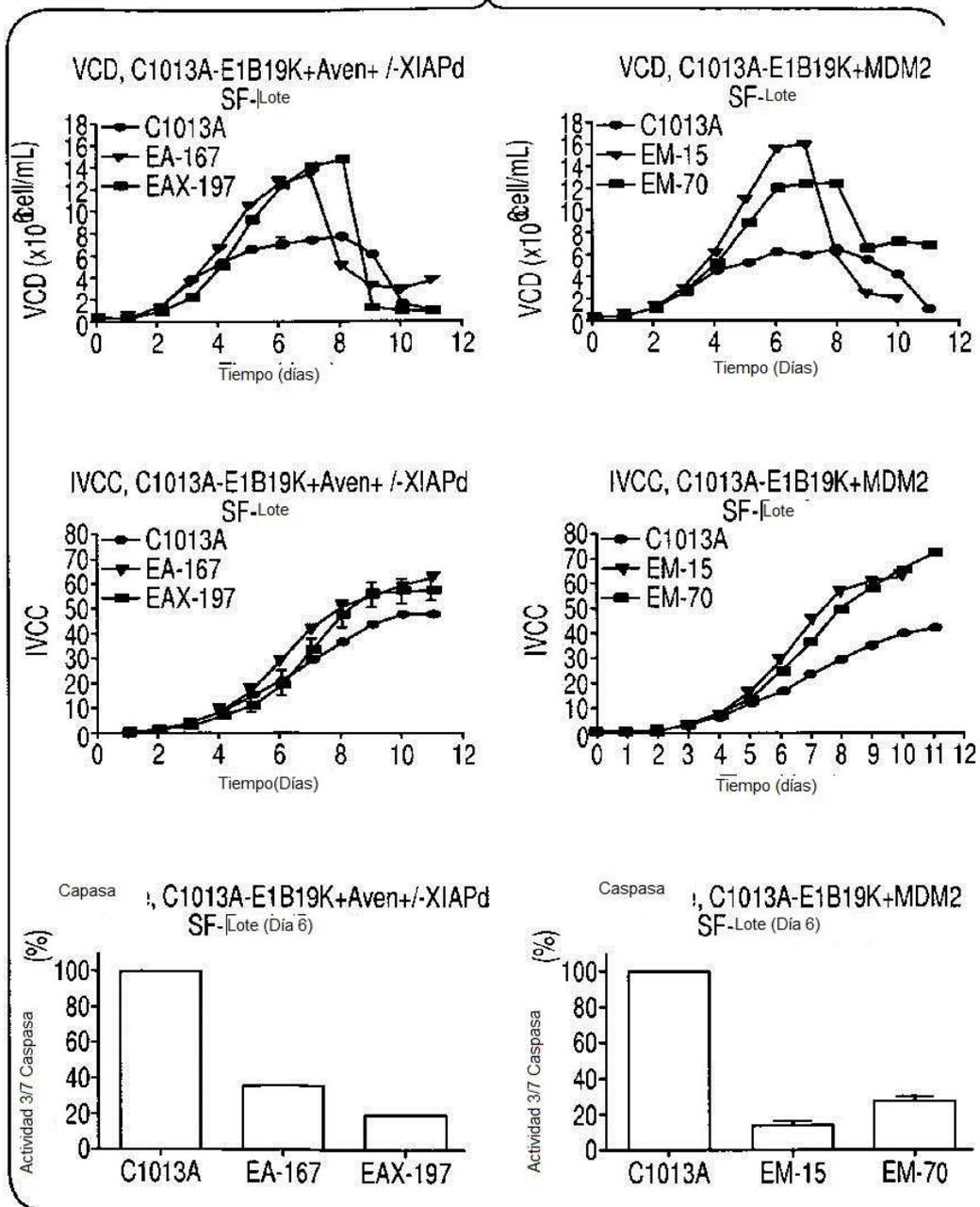


FIG. 4A

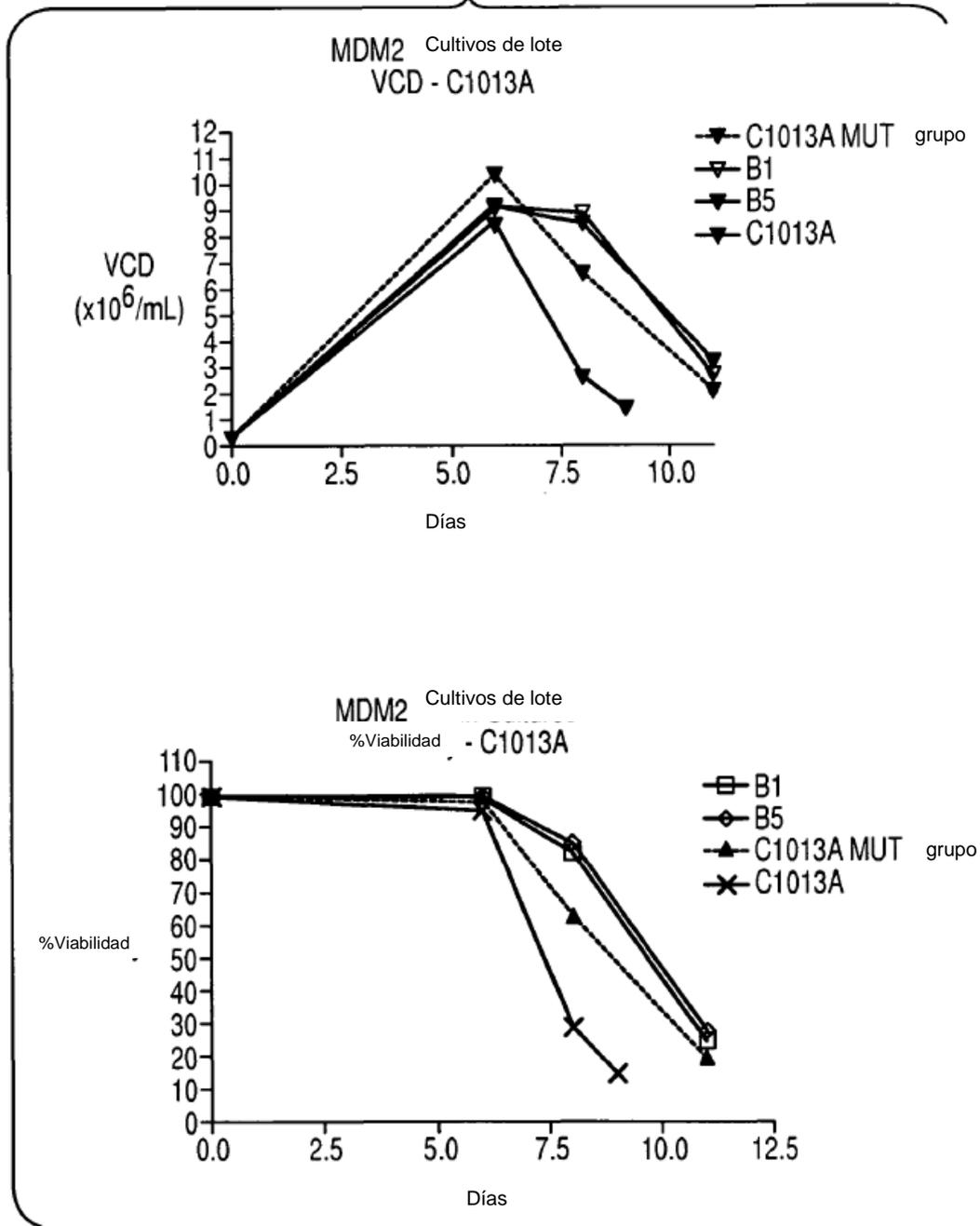


FIG. 4B

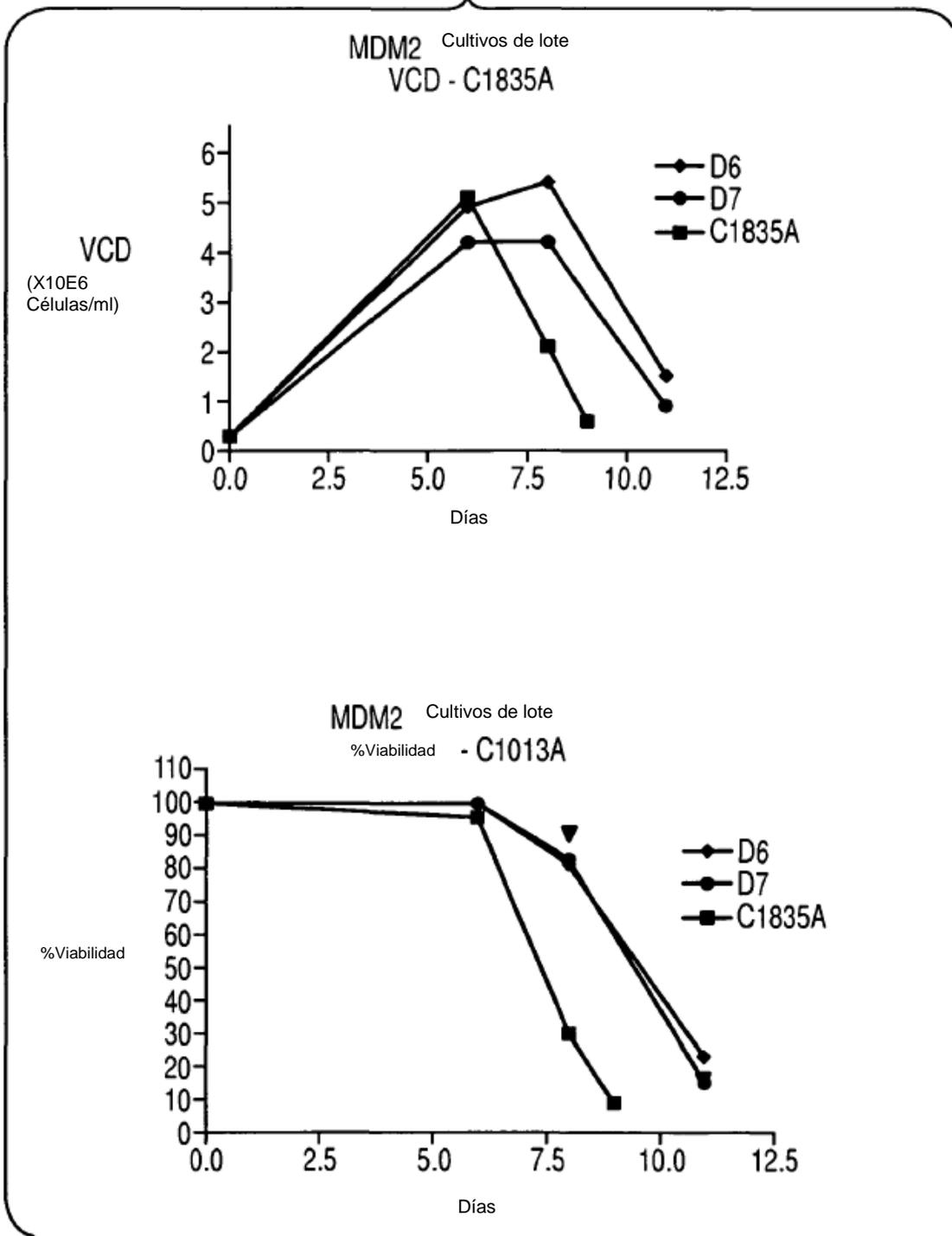


FIG. 5A

Apoptosis CNTO: Experimento BT5

Lote alimentado C1013A MDM2h: Perfil de crecimiento

VCD vs Tiempo

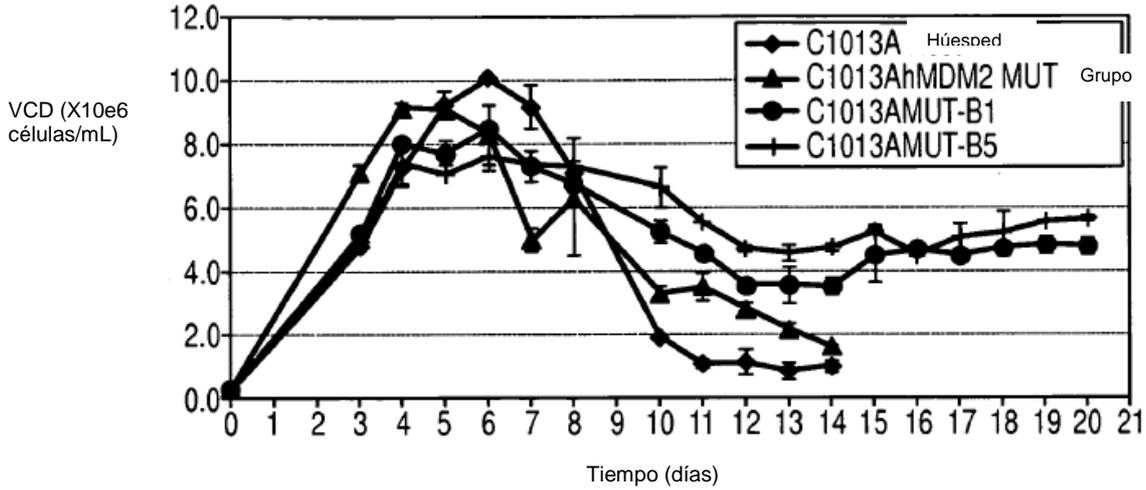


FIG. 5B

Apoptosis CNTO: Experimento BT5

Lote alimentado C1013A MDM2h: Perfil de crecimiento

Viabilidad vs Tiempo

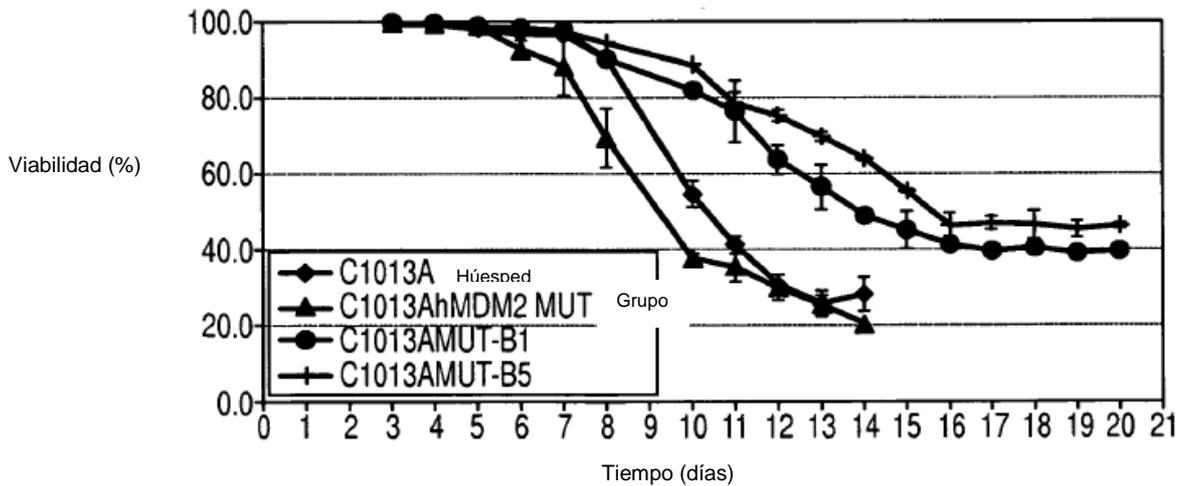


FIG. 6

CNTO 328: Experimento CM7

Apoptosis: Perfil Crecimiento

Título vs Tiempo

