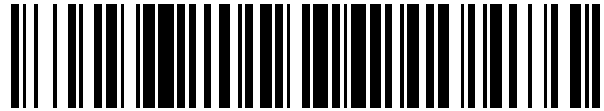


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 903**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12N 5/07** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2009 E 09763701 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 2331678**

54 Título: **Métodos para obtener una alta densidad celular viable en cultivos celulares de mamíferos**

30 Prioridad:

**13.06.2008 US 61233 P**

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

**29.01.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DORAI, HAIMANTI y  
KYUNG, YUN, SEUNG**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 557 903 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 obtener una alta densidad celular viable en cultivos celulares de mamíferos****Descripción****5 Campo de la invención**

**[0001]** La presente invención se refiere a métodos para lograr una alta densidad de células viables y la longevidad de cultivo prolongada en cultivo celular de alimentación en lotes mediante el uso de una alimentación de glucosa alta. Los métodos son útiles para aumentar la producción de proteínas secretadas de interés.

10

**Antecedentes de la invención**

**[0002]** El cultivo de células de mamíferos es el sistema elegido para muchos procesos de producción de proteínas recombinantes, debido a su capacidad para producir proteínas con modificaciones adecuadas posteriores a la traducción. Con la creciente demanda de fabricación, hay una fuerte motivación para mejorar la eficiencia del proceso mediante el aumento de rendimiento del producto. La consecución de niveles de producción de gramos por litro de productos bioterapéuticos u otras proteínas en los procesos comerciales de producción se basa en la optimización tanto de métodos de cultivo de células de mamíferos como de ingeniería. Inherente a cultivos de células de mamíferos actuales de alta densidad y libres de proteína es el problema de la muerte celular de la que la apoptosis puede representar hasta el 80% en un típico bioreactor de alimentación en lotes, inducida como respuesta a condiciones tales como privación de nutrientes y factor de crecimiento, agotamiento de oxígeno, acumulación de toxinas, y el estrés (Goswami et al, *Biotechnol Bioeng* 62:632 a 640 (1999)). La apoptosis limita la máxima densidad de células viables, acelera la aparición de la fase de muerte y potencialmente disminuye el rendimiento de proteína heteróloga (Chiang y Sisk, *Biotechnol Bioeng* 91: 779 a 792 (2005); Figueroa et al, *Biotechnol Bioeng* 73: 211 a 222.. (2001), *Metab Eng* 5: 230 a 245 (2003), *Biotechnol Bioeng* 85: 589 a 600 (2004); Mercille y Massie, *Biotechnol Bioeng* 44: desde 1140 a 1154 (1994)).

15

**[0003]** La apoptosis es el resultado de una compleja red de vías de señalización que se inician desde dentro y fuera de la célula, que culmina en la activación de proteasas de cisteína de aspartato (caspasas) que median en las etapas finales de la muerte celular. Ver Fig. 1. Varios métodos de prevención de la apoptosis se han utilizado para mantener la viabilidad celular durante la producción prolongada en el cultivo de células de mamíferos (Arden y Betenbaugh, *Trends Biotechnol* 22: 174 a 180 (2004); Vives et al, *Metab Esp* 5: 124 a 132 (2003)). La alteración del medio ambiente extracelular a través de la suplementación de los medios de comunicación de factores de crecimiento, hidrolizados y nutrientes limitantes ha llevado a un aumento en la producción de proteínas y a la disminución de la apoptosis (Burteau et al, *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 39: 291 a 296 (2003); Zhang y Robinson, *Cytotechnology* 48: 59 a 74 (2005)). Otros investigadores han recurrido a estrategias químicas y genéticas para inhibir la cascada de señalización apoptótica desde dentro de la célula (Sauerwald et al, *Biotechnol Bioeng* 77: 704 a 716 (2002), *Biotechnol Bioeng* 81: 329 a 340 (2003)).

20

25

**[0004]** Los investigadores han encontrado que la sobre expresión de genes que se encuentran sin regular en las células cancerosas puede prolongar la viabilidad en las células cultivadas en biorreactores mediante la prevención de la apoptosis por delante de la activación de caspasas (Goswami et al, supra; Mastrangelo et al, *Trends Biotechnol* 16:88 a 95 (1998); Meents et al, *Biotechnol Bioeng* 80: 706 a 716 (2002); Tey et al, *J Biotechnol* 79: 147 a 159 (2000) y *Biotechnol Bioeng* 68: 31 a 43 (2000) Regulación al alza de estas proteínas en líneas celulares de producción efectivamente suprimió la señalización apoptótica dentro de la célula, limitando de este modo la muerte celular con el fin de mantener la viabilidad y aumentar la producción bioterapéutica en algunos casos.

30

35

**[0005]** También inherente a cultivos de células de mamíferos de alta densidad libres de proteínas, es el problema de la acumulación de residuos y de su efecto perjudicial sobre el crecimiento celular. Los dos productos más comunes de residuos de cultivo de células son lactato y amoníaco. Numerosas estrategias se han desarrollado para hacer frente a la acumulación excesiva de lactato, incluyendo 1) el mantenimiento de concentraciones medianamente bajas de glucosa (Kurokawa et al, *BiotechnolBioeng.* 44: 95 a 103 (1994); Xie y Wang, *Biotechnol Bioeng* 43 : 1175 a 1189 (1993); Zhang et al, *J Chem Technol Biotechnol* 79: 171 a 181 (2004); Zhou et al, *Biotechnol Bioeng* 46: 579 a 587 (1995)); 2) alimentación de azúcares alternativos, incluyendo la fructosa (Martinelle et al, *Biotechnol Bioeng* 60: 508 a 517 (1998), Altamirano et al, *J Biotechnol.* 110: 171 a 179 (2004) y *J Biotechnol* 125: 547 a 556 (2006 ), Walschin y Wu, *J Biotechnol* 131: 168 a 176 (2007); 3) la eliminación parcial de la expresión de lactato de deshidrogenasa (LDH) por recombinación homóloga o tecnología siRNA; 4) la sobreexpresión de carboxilasa de piruvato; 5) el uso de dicloracetato (DCA), una activador de deshidrogenasa de piruvato (PDH) (a través de la inhibición de la quinasa PDH); 6) el ácido oxámico, un inhibidor competitivo LDH; y 7) la eliminación a través de la perfusión (US Pat. Appl. Publ. N° 2009/0042253 A1).

40

45

50

**[0006]** En un principio, se creía que la función exclusiva de muchas de las proteínas apópticas era la de unirse a la membrana mitocondrial y regular la apoptosis a través de la modulación de la permeabilidad mitocondrial. Resultados recientes han demostrado que las proteínas clave implicadas en la señalización de apoptosis interactúan con las proteínas y tienen efectos sobre ellas que controlan el metabolismo y la homeostasis energética en la célula. Ver Majors y otros, *Metab Ing.* 9: 317 a 326 (2007) para un resumen; y White et al, *Nat Cell Biol.* 7: 1021 a 1028

55

60

(2005). En un estudio reciente, el análisis de micromatriz de células CHO que sobreexpresan el Bcl-XL muestra que la deshidrogenasa de lactato, una enzima clave en la gluconeogénesis, está regulada.

**[0007]** Ciertas células y los virus producen genes anti-apoptóticos que funcionan en la ruta apoptótica mitocondrial. Éstos se pueden dividir en tres grupos, a saber, 1) los que actúan al principio de la vía, por ejemplo, los miembros de la familia Bcl-2 de proteínas; 2) los que actúan en mitad de la vía para interrumpir o inhibir el complejo de apoptosoma, por ejemplo, Aven y 3) los que actúan al final de la vía, por ejemplo, inhibidores de caspasas tales como XIAP. La funcionalidad de la mayoría de estos genes ha sido estudiada por la sobre-expresión en sistemas de expresión de mamíferos, y en algunos casos el efecto de la combinación del exceso de expresión de dos o más genes, cada uno derivadas de una parte diferente de la vía ha sido determinada. Los ejemplos incluyen 1) el efecto aditivo de Bcl-XL y un mutante de delección de XIAP (XIAP $\Delta$ ) en células CHO (Figuroa et al, *Metab Esp* 5: 230 a 245 (2003)); 2) E1B-19K y Aven y en células BHK (Nivitchanyong et al, *Biotechnol Bioeng* 98: 825 a 841 (2007).) y 3) Bcl-XL, Aven y XIAP $\Delta$  (Sauerwald et al., *supra*, (2003); Sauerwald et al, *Biotechnol Bioeng* 94: 362 a 369 (2006)). Sin embargo, en estos estudios, no se examinó el efecto de los genes anti-apoptóticos en el estado metabólico celular de la célula. En consecuencia, existe una necesidad en los sistemas de cultivo de células de mamífero para optimizar las condiciones de consumo y la acumulación de metabolitos de nutrientes para lograr una mayor densidad de células viables, la longevidad y la productividad.

**[0008]** Figuroa et al, *Biotechnol Bioeng* 97 (4): 877 a 892 (2007) describen un rendimiento mejorado de cultivo de células utilizando genes anti-apoptóticos inducibles. US 2007/0092947 divulga composiciones y métodos para aumentar la longevidad de un cultivo celular. US 2008/0015164 da a conocer métodos y composiciones para la inactivación de genes de la reductasa de dihidrofolato, el uso de proteínas de fusión que comprenden una proteína de dedos de cinc y un dominio de escisión o la medio dominio de escisión. US 5.672.502 divulga el cultivo por lote alimentado de células animales que comprende el cultivo de células en medio nutriente caracterizado porque durante el cultivo el medio se complementa con una alimentación combinada de una o más fuentes de energía y uno o más aminoácidos. Cory et al, *Oncogén* 22: 8590 a 8607 (2003) resume cómo las proteínas detectan el estrés, interactúan entre sí, perturban orgánulos, como la mitocondria y el retículo endoplasmático y gobiernan las vías a la activación de caspasas. Yang et al, *Science* 275: 1.129 a 1.132 (1997) divulga un posible papel de Bcl-2 en la prevención de la apoptosis, que consiste en impedir que se libere el citocromo c de la mitocondria. EEUU 2005/0089993 divulga una variedad de biorreactores de microescala (fermentadores micro) y matrices de biorreactor de microescala para su uso en el cultivo de células.

### **Breve descripción de los dibujos**

#### **[0009]**

Fig. 1 muestra los componentes de vía de la apoptosis mitocondrial.

Figs. 2A-2C muestran la caracterización de líneas celulares apoptotic<sup>R</sup>.

Fig. 3 muestra la confirmación de apoptotic<sup>R</sup> en EA167 y EAX197 por análisis por la citometría de flujo.

Figs. 4A-4C muestran perfiles de crecimiento de líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> generadas a partir de la transfección de E1B-19K, E1B 19K+Aven y E1B-19K + Aven + XIAP $\Delta$ . Cultivos de control por lotes de frasco agitado (●), E64 (◆), EA167 (■) y EAX197 (▼) fueron controlados por la densidad de células viables y viabilidad.

Figs. 5A-5C muestran perfiles de metabolitos de líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> generados a partir de la transfección de E1B-19K + AVEN  $\pm$  XIAP $\Delta$ . Cultivos de control por lotes de frasco agitado (●), líneas celulares de EA167 (■) y EAX197 (▼) fueron controlados por diversos metabolitos.

Figs. 6A y 6B muestran reposición diaria de lactato de líneas de células apoptóticas. A) (●), el control y EA167: □, no alimentados y ■, y alimentados a lactato) y B) EAX197 (Δ no alimentados y ▼, alimentados a lactato).

Figs. 7A-7G muestran crecimiento y perfiles metabólicos de control y líneas de células apoptotic<sup>R</sup> de EA167 y EAX197 en presencia o ausencia de alimentación de lactato. Control (●), EA167 (□, no alimentados y ■, alimentados), EAX197 (▲, no alimentados y ▼, alimentado a lactato).

Figs. 8A-8G muestran perfiles de aminoácidos agotados por líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> sobre la alimentación de lactato. Control (●) EA167 (□, no alimentados y ■, alimentados a lactato), EAX197 (▲, no alimentados y ▼, alimentado a lactato).

Figs. 9A 9D muestran perfiles espectáculos de crecimiento y perfiles de acumulación de lactato de control y líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> EAX 197 cultivadas en altas concentraciones de glucosa en una formulación del medio personalizada. La línea celular apoptotic<sup>R</sup> EAX197 (■); línea celular de control (◆).

Figs. 10A y 10B muestran los títulos de anticuerpos de líneas celulares generadas a partir de EAX197 y líneas de células de anfitrión de control cultivadas en la formulación de los medios de comunicación personalizados que contiene 30 mM o 60 mM de glucosa. La línea celular apoptotic<sup>R</sup> EAX197 (■); líneas celulares de control (□).

Figs. 11A y 11B muestran VCD y el título de una línea celular que contiene el gen apoptotic<sup>R</sup> Bcl-2 con densidades de siembra celulares altas y bajas y medios que contienen 30 mM o 60 mM de glucosa.

**Resumen de la invención**

5 [0010] La invención proporciona un método para la obtención de alta densidad de células viables de cultivo de células eucariotas de alimentación por lotes que comprende las etapas de: (a) cultivación de una línea celular eucariota que expresa uno o más genes heterólogos apoptóticos resistentes (apoptotic<sup>R</sup>), en el que los genes apoptotic<sup>R</sup> son E1B19K y AVEN, y uno o más genes de interés; y (b) el mantenimiento de un alto contenido de glucosa de alimentación de medios de alrededor de 60 mM de glucosa durante las fases exponencial y estacionaria del cultivo celular.

**Resumen de la divulgación**

10 [0011] Se divulga aquí un método para la obtención de alta densidad de células viables en un lote alimentado de cultivo de células eucariotas que comprende las etapas de:

- 15 a) el cultivo de una línea celular eucariota que expresa uno o más genes heterólogos apoptótica-resistentes (apoptotic<sup>R</sup>) y uno o más genes de interés; y  
 20 b) mantener una alimentación de medios de alta glucosa durante las fases exponencial y estacionaria del cultivo celular.

[0012] También se divulga aquí un método para aumentar la producción de proteínas secretadas en un lote alimentado de cultivo de células eucariotas que comprende las etapas de:

- 25 a) el cultivo de una línea celular eucariota que expresa uno o más genes heterólogos apoptótica-resistentes (apoptotic<sup>R</sup>) y uno o más genes de interés; y  
 b) mantener una alimentación de medios de alta glucosa durante las fases exponencial y estacionaria del cultivo celular.

**Descripción detallada**

30 [0013] Tal como se utiliza aquí, el término "cultivo celular de alimentación en lotes" significa un proceso de cultivo celular que se basa en la alimentación de un sustrato limitante del crecimiento de nutrientes al cultivo. La estrategia de alimentación por lotes se utiliza típicamente en los procesos bio-industriales para alcanzar una densidad celular elevada en un biorreactor. Sin embargo, la adición de un nutriente como por ejemplo los resultados de glucosa en la formación de productos metabólicos de desecho, tales como lactato y amoníaco. Las concentraciones de 18mm de lactato (Kurano et al., 1990) y amoníaco de 8mM (Hansen y Emborg, 1994) han sido identificados como inhibidores para el crecimiento celular eucariota.

40 [0014] Numerosas estrategias se han ideado para hacer frente a la acumulación excesiva de lactato en el cultivo celular alimentado por lotes y se ha discutido anteriormente. En la presente invención, se presenta un enfoque alternativo a la reducción de la concentración de lactato y el aumento de densidad de células viables y viabilidad. El método descrito en este documento implica la sobre-expresión de uno o más genes anti-apoptóticos en una línea de célula huésped. Las líneas de células apoptóticas resistentes resultantes estimulan la respiración mitocondrial y se acumula menos lactato. Por lo tanto, estas líneas celulares pueden prosperar cuando se alimenta con altas concentraciones de glucosa. En consecuencia, los cultivos de estas líneas celulares resistentes-apoptóticos pueden alcanzar una alta densidad celular viable. Estas líneas celulares también poseen longevidad extendida debido a su naturaleza apoptótica-resistente.

50 [0015] Los métodos de la invención son útiles para aumentar la densidad de células viables y la viabilidad en el cultivo celular de alimentación en lotes, tales como Ovario de Hámster Chino (CHO), mieloma o cultivos de células de hibridoma. En particular, los métodos de la invención son útiles para aumentar el recuento de células viables integradas (IVCC) de cultivos de células CHO. El método descrito en el presente documento comprende las etapas de cultivo de una línea celular que expresa uno o más genes heterólogos apoptótica-resistentes (apoptotic<sup>R</sup>) y uno o más genes de interés; y mantener una alimentación de medios de alta glucosa durante las fases exponencial y estacionaria del cultivo celular. Estas líneas son anfitriones superiores para el desarrollo de líneas celulares que expresan la producción de proteínas de interés tales como péptidos, fusiones peptídicas, factores de crecimiento, hormonas, anticuerpos, proteínas diseñadas de repetición de anquirina (DARPs) y otros polipéptidos útiles para fines terapéuticos, de diagnóstico o de investigación. Líneas celulares CHO útiles en el método de la invención incluyen CHO-K1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y CHOK1SV (Lonza Biologics, Slough, Reino Unido). Las líneas de mieloma útiles en el método de la invención incluyen NS0 y Sp2/0.

60 [0016] Las líneas de células útiles en el método de la invención expresan uno o más genes heterólogos anti-apoptosis. En particular, los genes que codifican E1B19K (SEQ ID NOS: 1 y 2) y Aven (SEQ ID NOS: 3 y 4) son útiles. El gen que codifica XIAPΔ (SEQ ID NOS: 5 y 6) también se puede utilizar. Estos genes anti-apoptóticos son representantes de las etapas tempranas, mediadas y finales de la vía de señalización de apoptosis,

respectivamente. Además, el gen que codifica Bcl-2Δ también se puede utilizar (SEQ ID NOs: 7 y 8). La expresión de los genes anti-apoptosis se puede lograr mediante técnicas de transfección conocidas por expertos experimentadas. Se contempla que otros genes anti-apoptosis de estas etapas de la vía de señalización de apoptosis, tales como MDM2 (SEQ ID NOs: 9 y 10) y Bcl-XL (SEQ ID NOs: 11 y 12), también serían útiles en el métodos de la invención.

**[0017]** En la presente invención, el uso de líneas celulares que expresan genes heterólogos anti-apoptóticos permite que estas líneas de células secreten menos lactato o, alternativamente, a consuman lactato acumulado, para llegar a un recuento de valores de células viables integradas (IVCC) de alrededor de dos veces mayor que el control de las líneas celulares mientras que una alimentación de alto contenido de glucosa se mantiene en el cultivo. Al aumentar las densidades de células viables de cultivo de líneas celulares de producción, los rendimientos de los productos obtenidos a partir de una carrera biorreactor se incrementan. Tales productividades mejoradas pueden dar lugar a menores costos 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. En consecuencia, estas líneas son anfitriones superiores para el desarrollo de líneas celulares que expresan la producción de una proteína o proteínas de interés.

**[0018]** En el método de la invención, la capacidad de las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> de consumir o producir menos lactato que de otro modo se acumularía como residuos permite que las estrategias de cultivo crezcan bajo condiciones de alto contenido de glucosa, así como tras el agotamiento de la glucosa. En diferentes realizaciones, los métodos de la invención proporcionan una mayor densidad de pico de células viables, un aumento de la longevidad, el recuento de células viables y un aumento de título de proteínas secretadas, un aumento del recuento de células viables integradas, la reducción del flujo de calcio celular y el aumento de potencial de membrana mitocondrial en cultivo celular de alimentación por lotes. Además, es improbable que las estrategias de cultivo de alimentación por lotes que se han utilizado para limitar altos niveles de lactato tóxico y amoníaco sean necesarias para una alta productividad a partir de estas líneas celulares.

**[0019]** Después de la transfección, el sitio de integración cromosómica de un transgén anti-apoptótico puede dictar el nivel de su expresión. Además, cuando se transfectan múltiples genes anti-apoptóticos, el nivel de expresión de un transgén anti-apoptótico en particular puede afectar a la actividad de otras proteínas anti-apoptóticas que la célula posee, ya que muchas de estas proteínas interactúan directamente o indirectamente para provocar cambios fisiológicos en la célula. Así, la contribución cuantitativa de cada gen anti-apoptótico hacia las características generales apoptotic<sup>R</sup> de una línea celular con múltiples genes puede ser difícil de determinar debido a los efectos sinérgicos de los genes apoptotic<sup>R</sup>. Además, existen importantes variaciones de clon a clon con respecto a las características apoptotic<sup>R</sup> a pesar de que todos ellos han sido transfectadas con un conjunto idéntico de transgenes. Lo que está claro a partir de los resultados presentados en los ejemplos siguientes es que cada gen anti-apoptótico ensayado ofreció un valor positivo incremental hacia la mejora de las características apoptosis<sup>R</sup> de la línea de células huésped en la que fueron transfectadas. Dentro de las limitaciones anteriores, transfectantes triples fueron generalmente superiores a los transfectantes dobles, que a su vez eran superiores a transfectantes que sobreexpresan un solo transgén anti-apoptótico.

**[0020]** En consecuencia, aplicando vectores de expresión apropiados tras la transfección, se obtuvieron clones con niveles variables de expresión de E1B-19K, Aven y XIAPΔ. El nivel de expresión de E1B-19K fue relativamente bajo y clones poco habituales que tenían un alto nivel de expresión de E1B-19K eran inestables o tenían perspectivas malas de crecimiento (datos no mostrados). En los Ejemplos siguientes, sólo se observó una protección limitada contra la muerte celular en las células CHO que expresan el E1B-19K (Fig. 4).

**[0021]** Contrariamente a los resultados obtenidos con las líneas celulares que expresan el E1B-19K solo, los datos presentados en los ejemplos a continuación demuestran que las líneas celulares CHO K1 que coexpresan Aven (EA167) o Aven y XIAPΔ (EAX197) mostraron mejoras en la viabilidad, la densidad celular y IVCC. Los resultados presentados en los ejemplos siguientes demuestran además que la expresión de dos genes anti-apoptosis en células CHO K1 conduce a una reducción significativa en la actividad de la caspasa y la mejora en el potencial de membrana mitocondrial en presencia de insultos, incluyéndose la estaurosporina y cultivos discontinuos prolongados.

**[0022]** En los Ejemplos a continuación, se examinó la expresión de una combinación de E1B-19K, que es un homólogo funcional de Bcl-XL, más Aven, y XIAPΔ por efectos en el retraso de la muerte celular. El nivel de expresión XIAPΔ en estas células transfectadas no era alta en relación con la proteína endógena de tipo silvestre XIAP ya presente en la célula, tal vez debido a la exigencia de la transfección de dos plásmidos en este sistema. Sin embargo, la adición de XIAPΔ en EAX197 (además de Aven y E1B-19K) proporcionó una mejora consistente en la densidad máxima de células viables en tanto no suplementada (Figs. 5 y 7) y los cultivos de lactato suplementados (Fig. 7). De hecho, la línea celular EAX197 alimentado con lactato fue capaz de mantener altas viabilidades en o por encima de un 60% durante 14 días, que era dos días más que las células EA167 y cuatro días más que el cultivo de control. Es probable que la inclusión de XIAPΔ aumente la resistencia de la célula para la activación de caspasas y esto se verifica en la Fig. 3 por la muy baja actividad de caspasa de EAX197 incluso después del tratamiento con estaurosporina. Además, el uso de un mutante de XIAP (XIAPΔ) proporciona una mayor resistencia a la apoptosis

en relación con la proteína XIAP de tipo silvestre. Por lo tanto, la capacidad protectora de la mutante de delección de XIAP (XIAPΔ) puede ser significativa incluso si la expresión de la proteína no es alta en estas líneas CHO.

**[0023]** En los siguientes Ejemplos, se investigó el papel de uno o más genes anti-apoptóticos en el metabolismo celular. El consumo y la producción de metabolitos de nutrientes se determinaron en las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> que expresan el E1B-19K en conjunto con Aven y/o XIAPΔ. En particular, la acumulación de los dos productos de desecho de cultivo de células más comunes (es decir, lactato y amoníaco) se compararon en las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> a la de la línea celular de control. En los datos que se presentan a continuación, se encontró que en frasco de agitación de cultivos discontinuos en el medio CD-CHO, en día 6 a día 7 después de la siembra, la línea celular de control acumulada de 2.8g/L (31mM) de lactato y amoniaco de 12 mM (Fig. 5), que son muy por encima de las concentraciones de 18 mM de lactato (Kurano et al., supra) y 8 mM de amoniaco (Hansen y Emborg, supra) informaron como inhibidor para el crecimiento celular. Estos niveles pueden ser parte de la razón de la pérdida de la viabilidad visto por día 8 después de la inoculación en la línea celular CHO de control (Fig. 4).

**[0024]** Mientras que los datos que se presentan a continuación muestran que las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> acumulan algunos lactato en un momento temprano, estas líneas celulares comenzaron a consumir lactato durante la fase exponencial y continuó aumentando en VCD mucho más allá de lo ocurrido en los cultivos de control. O bien la capacidad de consumir el lactato inmediatamente después del agotamiento de la glucosa o un aumento en la inhibición de la apoptosis o ambos factores contribuyeron al crecimiento celular continuo. Además, las células apoptotic<sup>R</sup> solamente entraron en la fase estacionaria cuando se agotó el lactato endógeno. Con el fin de determinar si el consumo de lactato fue una característica general de estas líneas celulares de ingeniería, se añadió el lactato exógeno a los cultivos apoptosis<sup>R</sup> para reponer el lactato empobrecido (Fig. 6). Los resultados presentados en los Ejemplos a continuación muestran que los cultivos apoptotic<sup>R</sup> consumieron el lactato añadido y mantuvieron alta VCD y viabilidades durante cuatro a siete días adicionales en comparación con cultivos de control (para cultivos no alimentados y lactato-alimentados, respectivamente; Fig. 7A y B). Un proceso de beneficio añadido es que los niveles más bajos de lactato en cultivos de líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> se traducirá en una menor osmolaridad y pH más alto, ambos de los cuales son altamente deseables para la calidad superior del producto.

**[0025]** Los investigadores anteriores han detectado el consumo de lactato en hibridoma, mieloma NS0 y culturas CHO (deZengotita et al., 2000; Zhou et al, 1995 y 1997; Burky et al, 2007;. Pascoe et al, 2007). Sin embargo, estas células exhiben típicamente la producción de lactato en la fase exponencial y la transición al consumo en las fases estacionarias para sugerir que el lactato puede representar tanto un sub-producto intermedio y una fuente de combustible de hidratos de carbono (Burky et al, 2007; Brooks et al, 1985). En los resultados que se presentan a continuación, los cultivos de CHO de control parecían consumir cierta cantidad de lactato en el fase estacionaria, en particular en el medio "alto" de glucosa (Fig. 9), como se ve en los estudios anteriores. En contraste, las células apoptotic<sup>R</sup> exhibieron un perfil dramáticamente diferente en el que se consumió lactato durante la fase exponencial y las células sólo entraron en la fase estacionaria cuando el lactato exógeno se agotó.

**[0026]** La conversión de piruvato a lactato, catalizada por la deshidrogenasa de lactato (LDH), es reversible pero favorece fuertemente la formación de lactato con una constante de equilibrio de  $3.6 \times 10^4/M$ . Sin embargo, cuando la glucólisis no es capaz de mantenerse en sintonía con la demanda del ácido tricarbóxico (TCA), el lactato se puede convertir de nuevo a piruvato por una de las varias isoenzimas de LDH que favorecen esa reacción. Es probable que el lactato consumido por las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> alimenta el ciclo de TCA para la energética celular y la producción de aminoácidos. Curiosamente, los perfiles de amoniaco de los cultivos apoptotic<sup>R</sup> difería de la de los cultivos de control, con una caída transitoria repetida en la producción de amoniaco, tanto para las líneas celulares de la ONU alimentados y alimentados de lactato, así como una disminución global de la producción de amoniaco. La utilización de aminoácidos como fuente de energía en el ciclo TCA es probable que conduzca a la acumulación de amoniaco. En consecuencia, una reducción en la producción de amoniaco sugiere que las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> pueden obtener una fracción relativa más baja de sus necesidades de energía de TCA de los aminoácidos en comparación con las células de control, lo cual es razonable si se considera que las células apoptotic<sup>R</sup> también están consumiendo más lactato como una fuente de carbono. Cabe señalar sin embargo, que la caída de amoniaco es transitoria y las células apoptotic<sup>R</sup> todavía pueden utilizar aminoácidos como fuente de energía. De hecho, tres aminoácidos, isoleucina, leucina y valina, todos los aminoácidos de cadena ramificada se consumieron más rápidamente por líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> y este consumo resultó exacerbado en cultivos de lactato alimentados (Fig. 8A-C). Dado que las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> experimentaron un crecimiento continuo en relación con las líneas celulares de control, estos tres aminoácidos pueden formar bloques de construcción para los ácidos grasos y otras proteínas necesarias por las células apoptotic<sup>R</sup> y también pueden ser catabolizados como fuente de energía para el ciclo de TCA. Un perfil de consumo similar se observa en el caso de la metionina (Fig. 8D).

**[0027]** En contraste con los aminoácidos que se disminuyen visiblemente, unos pocos aminoácidos se secretaron, entre ellos alanina de modo transitorio y aspartato de modo transitorio, en los cultivos de control. Una porción de la piruvato puede ser convertida a alanina por amino-transferasa de alanina. Esta vía puede ser más activa en células apoptotic<sup>R</sup> que conducen a un aumento más grande en la concentración de alanina relativa a las líneas celulares de control (Fig. 8B). Aspartato, por otro lado, es el primer miembro de la familia de aminoácidos de aspartato y se forma junto con alfa-ketoglurato por la conversión del ciclo TCA oxaloacetato intermedio y glutamato usando la

transaminasa de aspartato. Su nivel aumenta sólo en las células de control durante los primeros seis días mientras se agota de forma continua en las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup>. Dado que esta reacción es reversible, el agotamiento de aspartato en las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> temprano en la fase de crecimiento indica una posible limitación en el producto oxaloacetato reversible en el ciclo TCA de las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup>. Dado que el oxaloacetato también reacciona con Acetil-CoA durante la etapa inicial del ciclo TCA, un aumento del flujo de piruvato en Acetil-CoA a partir de lactato en las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> puede aumentar la demanda de oxaloacetato. Por el contrario, puede haber menos demanda de Acetil CoA en las líneas celulares de control, ya que no están consumiendo lactato y por lo tanto generan aspartato a partir de oxaloacetato. En efecto, esta falta de demanda de Acetil CoA podría estar conduciendo a la acumulación de lactato como un subproducto alternativo a Acetil CoA en las células de control durante los primeros siete días de cultivo celular. Alternativamente, la falta de consumo de lactato en las células de control podría conducir a una limitación en el suministro de Acetil-CoA y a un aumento concomitante en la producción de aspartato.

**[0028]** Estos resultados son indicativos de la energética de ciclo TCA aumentada en líneas celulares que expresan genes anti-apoptóticos aunque una interpretación exacta de las reacciones celulares requiere de un análisis más detallado del flujo metabólico. Independientemente de la suerte del lactato consumido, en la presente invención se ha demostrado que las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> consumen lactato acumulado, que a su vez, ayuda en su mayor longevidad y IVCC.

**[0029]** Si las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> son únicas en que pueden extender su longevidad por el consumo del lactato acumulado, entonces hay una posibilidad de que estas líneas pueden ser cultivadas en un medio que contiene lactato o en un medio que contiene concentraciones de glucosa mayores que las normales. Si bien el crecimiento y la viabilidad no podían mantenerse en cualquier tipo de línea celular cuando se proporcionó lactato como única fuente de carbono, el consumo de lactato se observó en líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> cuando se proporciona como componente, además de la glucosa (datos no mostrados) o cuando el lactato se acumuló como producto de desecho. Esto sugiere que las células apoptotic<sup>R</sup> no pueden realizar la gluconeogénesis a partir de piruvato u obtener suficiente energía a partir de lactato, pero si la glucosa se suministra junto al lactato las células pueden consumir tanto la glucosa, así como lactato acumulado o complementado al cultivo. Por otra parte, en un medio que contiene niveles altos de glucosa (60 mM), el IVCC (y VCD y la viabilidad, Figs. 9A-C) de líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> fue significativamente mayor que la de las líneas celulares de control. Esto es debido al hecho de que, en el medio de alta glucosa, las líneas celulares de control acumularon más de 20 mM de lactato, que puede haber sido tóxico. Las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> por otro lado, consumían el lactato temprano en la fase de crecimiento y por lo tanto era capaz de mantener un mayor número de células viables que se convirtió en un aumento de IVCC de 170% respecto al control (Fig. 9C).

**[0030]** Desde las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> consumieron lactato y lograron mayor IVCC, las líneas celulares de producción que expresan proteínas de interés, tales como anticuerpos terapéuticos derivados de líneas de células huésped apoptotic<sup>R</sup> consiguieron títulos significativamente mayores en comparación con las líneas celulares de producción derivadas de las líneas celulares de control. Tales títulos más altos ilustran los potenciales beneficios comerciales de uso de los genes anti-apoptosis en líneas celulares de mamífero que producen proteínas terapéuticas u otros de interés.

**[0031]** La presente invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos específicos, no limitativos.

## **Ejemplos**

**[0032]** En los siguientes ejemplos, las líneas celulares CHO que sobre-expresan genes anti-apoptosis se analizaron en cultivos discontinuos en matraz para densidad óptima de células viables, longevidad, la activación de caspasa-3 y potencial de membrana mitocondrial (MMP). Además, el consumo de nutrientes y la producción de metabolitos en estas líneas celulares se compararon con la de las líneas celulares de control para determinar si la expresión de genes anti-apoptosis tuvo ningún efecto sobre el consumo de nutrientes y la acumulación de metabolito en sistemas de cultivo de células de mamíferos.

## **Materiales y métodos:**

### **Cultivo de células:**

**[0033]** La línea celular CHOK1SV (Lonza Biologicals, Slough, Reino Unido), designada como la línea celular de control C1013A, se cultivó en un medio CD-CHO (Cat. No. 10743-011, Invitrogen, Carlsbad, CA), que contiene 30 mM de glucosa y se completará con 6 mM L-glutamina (Invitrogen Cat. No. 10313-021). En algunos casos, se utilizó otro medio libre de proteínas animales que contiene diversas concentraciones de incluida glucosa 60 mM, (definida como el medio de alta glucosa). El suero bovino fetal se adquirió de Hyclone Labs, Logan, UT (Cat. No. SH30071.03). Los cultivos celulares fueron controlados por un instrumento de recuento celular Cedex automatizado (Innovatis, Alemania). El recuento integrado de células viables (IVCC, célula-día / ml) se calculó usando la siguiente fórmula:

$$IVCC (d1) = [VCD (d0) + VCD (d1)]/2 + VCD (d0)$$

donde VCD = densidad de células viable

5

**Construcción de plásmido:**

[0034] El vector pBudCE4.1 diseñado para expresar constitutivamente el E1B-19K (promotor EF-1a), ya sea solo o en conjunción con Aven (promotor CMV) y ha sido descrito (Nivitchanyong et. Al., 2007). El vector que expresa XIAPΔ (promotor CMV) era como se había descrito en Sauerwald et al., 2002. El vector blanco se refiere al vector pBudCE4.1 original.

[0035] Un vector de expresión anticuerpo modelo (Ab # 1) se construyó por clonación de una cadena pesada y ligera de cDNA en el vector de expresión de glutamina sintasa (GS) (obtenido de Lonza Biologics, Slough, Reino Unido, bajo una licencia de investigación).

**Generación de líneas celulares apoptotic<sup>R</sup>:**

[0036] Una cultura exponencial de la línea celular CHOK1SV se transfectaron con 1) pBudCE4.1; 2) pBudCE4.1-E1B-19K; 3) pBudCE4.1-E1B-19K-Aven; y 4) pBudCE4.1-E1B-19K-Aven y pCMV-XIAPΔ. Las transfecciones se realizaron utilizando Fugene (Roche, Cat. # 1815075, Basilea, Suiza) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Dos días después de la transfección, las células se sembraron en placas de 96 pocillos en medio de crecimiento que contiene 300 mg/ml de zeocina (para transfecciones 1, 2 y 3 arriba); 300 mg/ml de zeocina y 400 mg/ml de higromicina (para la transfección # 4), véase la Tabla 1. Aproximadamente 200 clones resistentes a los antibióticos de cada transfección se expandieron y se analizaron para actividad de caspasa3/7 como se describe a continuación. Clones prometedores se sometieron a pruebas de estabilidad en ausencia de los respectivos antibióticos durante diez pasajes.

**Tabla 1**

Línea celular	Vector transfectado	Genes sobreexpresados	Clones seleccionados por
Control	Ninguno	Ninguno	Ninguno
Blanco	pBUDCE4.1	Ninguno	Zeo
E64	pBUDCE4.1-E1B-19K		Zeo
E63	pBUDCE4.1-E1B-19K-Aven		Zeo
EA63			
EA112			
EA167			
EA190			
EAX64	pBUDCE4.1-E1B-19K-Aven and pCMV-XIAPΔ	E1B-19K, Aven, XIAPΔ	Zeo, Hygro
EAX99			
EAX148			
EAX197			

50

[0037] En un principio, una línea celular de control se desarrolló mediante la transfección del vector en blanco en la línea celular CHOK1SV y la selección de colonias resistente al zeocino. Estas líneas celulares tenían en promedio de IVCC en torno al 20% menor en comparación con el CHOK1SV de control no transfectado, por lo tanto el CHOK1SV se utilizó posteriormente como la línea celular de control en todos los experimentos. La línea celular más prometedora apoptotic<sup>R</sup>, el EAX197, así como la línea de células de control se utilizaron para desarrollar líneas celulares de producción que expresan un anticuerpo modelo utilizando el vector de expresión GS de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. El anticuerpo en el cultivo celular se midió por nefelometría (Beckman Array System).

**Cultivos de líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> de frasco de agitación:**

[0038] Líneas celulares seleccionadas de apoptotic<sup>R</sup> se cultivaron en modo por lotes no alimentados en un medio CD-CHO complementado con glutamina 6 mM y el agente de selección de antibióticos necesario. En algunos experimentos, se alimentaron los cultivos en modo por lotes de líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> con lactato para reponer el lactato que habían agotado. Además, líneas celulares selectas de expresión Ab se cultivaron en un medio formulado a medida libre de proteínas animales y suplementado con glutamina 6 mM y 60 mM de glucosa.

65



**Ensayo de actividad de caspasa 3/7:**

5 [0039] Cerca de  $3 \times 10^5$  células de cada clon se sembraron en un ml de medio de cultivo en una placa de 24 pocillos. El día 4 (d4) después de la siembra, alrededor de  $1 \times 10^5$  células se transfirieron por triplicado a una placa de 96 pocillos. Se añadió estaurosporina (fc 2 mM) y las células se incubaron durante 16 h antes de ensayar para actividad de caspasa3/7 por el equipo APO-ONE (BD Labs). El procedimiento se repitió en d10, excepto que se omitió la estaurosporina. Los clones que tenían significativamente menos actividad de caspasa3/7 en los dos días se ampliaron en SF. La naturaleza apoptotic<sup>R</sup> de los clones seleccionados fue confirmada por análisis de citometría de flujo (ver más abajo) y en algunos casos, mediante la medición del potencial de membrana mitocondrial.

**Análisis de clones apoptotic<sup>R</sup> por citometría de flujo:**

15 [0040] Cerca de  $1 \times 10^6$  células de cultivos exponenciales se retiraron de cada matraz de agitación en placas de 24 pocillos, se incubaron con estaurosporina ( $2 \mu\text{M}$  fc) durante 16 horas, se recogieron y se lavaron una vez en PBS. Las células fueron incubadas con CytoPerm (Cat. No. 2075KK, BD BioScience) para fijar y permeabilizarlos. Después de un lavado en PBS, las células fueron incubadas con anticuerpo marcado con FITC anti-caspasa3 (Cat. No. 68654, BD Bioscience) antes de someterlos a análisis por citometría de flujo.

**Ensayo de potencial de membrana mitocondrial (MMP):**

20 [0041] Las células de cultivos en matraces de agitación fueron retiradas en d6 post-siembra y se incubaron con estaurosporina ( $5 \mu\text{M}$  fc) durante 2 horas. Fueron lavadas posteriormente y procesadas con el tinte catiónico lipofílico, JC-1 (Caimán Labs, Ann Arbor, MI) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las placas se leyeron en FL535 y FL595 y se calculó la proporción.

**Western Blot:**

30 [0042] Cerca de  $1 \times 10^7$  células de las líneas celulares indicadas se cosecharon, se lavaron en PBS y se lisaron en tope de RIPA que contiene 1% NP-40, 120 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,2 mM PMSF y 1 mM EDTA. Cincuenta microgramos de proteína citosólica de cada muestra se cargó en un gel de gradiente de NuPAGE 4-12% y se separaron por SDS-PAGE en un sistema Novex (Invitrogen). Bandas de proteínas separadas se transfirieron a nitrocelulosa y se analizaron mediante el uso de: 1) un anticuerpo anti-ratón a humano E1B 19K-, dilución 1:40, (Cat No. DP-17, Calbiochem, Gibbstown, MD); 2) el anticuerpo anti-conejo de Aven humana, 1: 1000 dilución, (Cat No. 612 521, BD Bioscience, San Jose, CA); y 3) un anticuerpo anti-ratón para XIAP humana (Cat No. 616713, BD Bioscience). El protocolo anterior, incluyendo los anticuerpos utilizados, se optimizó y estandarizó el uso de cantidades conocidas (~10ng cada uno) de purificado E1B-19K, Aven y XIAP, adquiridos de fuentes comerciales. Las bandas de proteínas se visualizaron usando el equipo de detección ECL (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

**Determinación de las concentraciones de metabolitos en medio de cultivo:**

40 [0043] La concentración de todos los metabolitos principales y productos de desecho se determinó utilizando un analizador YSI 2700 automatizado. La concentración de iones de amonio se determinó por análisis de inyección de flujo (Campmajó et al, 1994). Los aminoácidos se midieron por HPLC (Waters, Milford, MA), utilizando una columna de fase inversa (Waters).

**Ejemplo 1****Generación y caracterización de líneas de células apoptóticas resistentes**

50 [0044] Una lista de líneas celulares utilizadas en este estudio, los plásmidos de expresión que se transfectaron en cada caso para generar las líneas celulares y el agente de selección utilizado para aislar los transfectomas se muestra en la Tabla 1 anterior. Las líneas celulares enumeradas son representativas de múltiples clones que se generaron a partir de cada transfección. El nombre de cada línea celular se deriva de los genes anti-apoptóticos que se transfectaron en la línea de la célula huésped. Por ejemplo, EAX197 es una línea celular que se transfecta con E1B-19K (E), Aven (A) y XIAP $\Delta$  (X). La notación, apoptotic<sup>R</sup>, se utiliza para referirse a una línea celular que ha sido transfectada por uno o más de estos genes anti-apoptóticos.

60 [0045] Todas las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> utilizados en este estudio se caracterizaron por Western Blot, la actividad de caspasa 3/7 y el potencial de membrana mitocondrial (datos no mostrados). El transfectante único E64, o transfectantes dobles EA63, EA112, EA167 y EA190, todos los niveles expresados de E1B-91K que estaban por encima de los niveles de referencia observados en el control, la línea de células no transfectada, C1013A. De los cuatro transfectantes dobles, las líneas celulares y EA112 EA167 expresaron tanto el E1B-19K (~19KDa) como el Aven (~55 kDa). Las líneas celulares EA63 y EA190 expresaron niveles significativos de E1B-19K pero sólo muy bajos niveles de Aven. De las cuatro líneas celulares que se generaron por transfección de la doble vector pBudCE4.1-E1B-19K-Aven, así como pCMV-XIAP $\Delta$ , a saber, EAX64, EAX99, EAX148 y EAX197, únicamente el

EAX197 expresó niveles detectables de las tres proteínas.

**[0046]** Una banda ~55kDa se observó en todos los carriles incluidos en el carril de control no transfectado, C1013A, encima de la banda Aven recombinante se cree que se encontraba la proteína Aven endógena, ya que se visualizó con suero post-inmune, pero no pre-inmune (Sauerwald et al., 2002, Chau et al., 2000). El gen Aven transfectado carece de los primeros seis aminoácidos, que han demostrado no perjudicar la actividad biológica de la proteína. En consecuencia, el Aven transfectado es ligeramente más pequeño que su homólogo endógeno. Una banda de 40 kDa, que puede representar un producto de degradación del Aven, se observó en todas las líneas celulares que sobre-expresan esta proteína en conjunto con el E1B-19K. Productos de degradación de tamaños similares se observaron previamente cuando Aven fue sobre-expresado con Bcl-XL (Sauerwald et al., 2005) o Bcl-2 (Figuroa, observaciones no publicadas). Además, la expresión de Aven fue significativamente menor en los transfectantes triples, llegando incluso el EAX197 a sobre-expresarse con respecto al E1B-19K, Aven y XIAPΔ.

**[0047]** Curiosamente, el nivel de expresión de XIAPΔ transfectado fue significativamente menor en comparación con los niveles endógenos de la proteína intacta de XIAP. Nótese que la diferencia aparente en el nivel de expresión entre el XIAP y el XIAPΔ podría explicarse en parte por la diferencia en la eficiencia de anticuerpos de estas dos formas de la proteína anti-apoptótica de unión. La diferencia aparente en el nivel de expresión entre el XIAP endógeno y el XIAPΔ transgénico pone en duda la contribución de esta proteína transfectada en la prevención de la apoptosis. De hecho, este estudio sugiere que no siempre existe una correlación directa entre el nivel de expresión de un gen anti-apoptótico dado y el nivel de inhibición de apoptosis puede que la proteína puede conferir a una línea celular.

**[0048]** Cada línea celular apoptotic<sup>R</sup> se examinó para la actividad de la caspasa 3/7 por APO-ONE ya que esta actividad proporciona una indicación del grado de resistencia de una línea celular a la apoptosis. Brevemente, en este ensayo, el sustrato profluorescente Z-DEVD-R110 es escindido por la caspasa 3/7 de una manera dependiente de la dosis. Cultivos exponenciales de EA167 y EAX197 así como la línea de células de control se trataron con estaurosporina durante 16 horas para inducir la apoptosis, tras lo cual se midió la caspasa 3/7. La actividad de caspasa 3/7 en las células de control de estaurosporina tratadas se fijó arbitrariamente en 100%. En estas condiciones, las actividades de caspasa de las células EA167 y EAX197 eran del 30% y del 35%, respectivamente, del control, lo que sugiere que estas líneas celulares eran por lo menos parcialmente resistentes a la inducción de la apoptosis (Fig. 2A). Como una prueba más de la naturaleza apoptotic<sup>R</sup> de EA167 y EAX197, cultivos de estaurosporina tratados de estas dos líneas celulares y la línea celular de control, se marcaron con el anticuerpo conjugado con FITC anti-caspasa 3 seguido de análisis por citometría de flujo. Como puede verse en la Fig. 3, las tres líneas celulares, ya sean sin tratar o tratados con vehículo (DMSO), tenían 1% o menos de la población caspasa 3-positiva. Sin embargo, 91% de la población de células de control dio positivo para la caspasa 3 después del tratamiento de estaurosporina. En contraste, sólo el 9% de la población derivada de la línea celular EAX197 y 30% de los procedentes de la línea celular EA167 dieron positivos para la caspasa 3, lo que confirma el fenotipo apoptotic<sup>R</sup> de estas dos líneas celulares.

**[0049]** Para examinar si la resistencia a la apoptosis conduce a un aumento de la longevidad, múltiples líneas celulares de EA se cultivaron en matraces de agitación (modo por lotes) y tanto la densidad de células viables (VCD) como el recuento de células viables integradas (IVCC) fueron controlados. Los aumentos en el recuento de células viables integradas mejoraron la productividad volumétrica de un cultivo, suponiendo que la productividad específica de la célula permanezca inalterada. Por lo tanto, el IVCC se puede utilizar como un parámetro para el cribado de líneas celulares superiores apoptotic<sup>R</sup> que pueden servir como anfitriones para el desarrollo de líneas celulares de producción. Como se muestra en la Fig. 2B, las líneas celulares con menor actividad relativa de caspasa 3/7 tendían a generar líneas celulares con mayor IVCC. Aunque cada una de las líneas de células de EA mostraron una reducción de la actividad de caspasa 3/7 relativa al control, no hubo correlación estricta entre IVCC y el nivel de la caspasa 3/7 que cada línea celular poseía. Además, algunas líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> eran más estables que sus clones hermanos con respecto al grado de fenotipo anti-apoptótica. El EA167 fue elegido para su estudio porque poseía tanto la actividad anti-apoptótica potente y robusto crecimiento en cultivos en matraz oscilante. Además, EA167 fue la línea celular más estable en este panel, expresando Aven en niveles altos como se detectó por Western Blot.

**[0050]** Muchas de las moléculas de señalización en la vía de la apoptosis interactúan con o residen dentro de las mitocondrias. Allí estas proteínas interactúan con la membrana mitocondrial y regulan la apoptosis a través de la modulación de la permeabilidad mitocondrial. Por lo tanto, el potencial de membrana mitocondrial (MMP) sirve como otro monitor de la fisiología celular en el que proceder a la comparación de las características de la naturaleza apoptotic<sup>R</sup> de EA167 y EAX197 respecto al control. Como se ve en los resultados del ensayo de la Fig. 2C, tanto EA167 como EAX197 tuvieron mayor MMP que la línea celular de control.

## **Ejemplo 2**

### **Efecto de E1B-19K sobre la densidad de células viables de CHOK1SV**

**[0051]** Los perfiles de crecimiento de los transfectantes dobles que sobre-expresan E1B-19K en conjunción con

Aven (EA167), transfectantes triples que sobre-expresan el E1B-19K en conjunción con Aven y XIAP $\Delta$  (EAX197), así como el transfectante que únicamente sobre-expresa el E1B-19K (E64) se comparan con la línea celular de control (anfitrión) en la Fig. 4. Mientras que el pico de VCD de la línea celular de control alcanzó  $7.7 \times 10^6$  de células/ml y el pico de VCD del E64 (expresando E1B-19K solamente) era  $8.9 \times 10^6$  células/ml, el de EA167 era de  $1.4 \times 10^7$  células/ml y el de EAX197 era de más que  $1.5 \times 10^7$  células/ml, con un incremento de más del 190% por encima de la línea celular de control. La viabilidad de EA167 y EAX197 mostró un fuerte descenso por el post-siembra d8 o d9, presumiblemente a causa del agotamiento de los nutrientes, mientras que el control y las líneas celulares viabilidad E64 disminuyeron más lentamente (Fig. 4B). El efecto neto sobre IVCC se muestra en la Fig. 4C. El IVCC de la línea celular de control era de  $4.9 \times 10^7$  células-día/ml, seguido por el de E64 ( $5.2 \times 10^7$  células-día/ml). Claramente, el IVCC de las dos líneas celulares apoptotic<sup>R</sup>, EA167 ( $6.3 \times 10^7$  células-día/ml) y EAX197 ( $6.6 \times 10^7$  células-día/ml) fueron significativamente mayores (136% y 140% para EA167 y EAX197, respectivamente) que la de las líneas celulares de control.

[0052] Además de EA167 y EAX197, varias otras líneas apoptotic<sup>R</sup> exhibieron un fenotipo de producción de lactato similarmente baja (datos no mostrados). Además, las líneas celulares de tipo silvestre con características de producción baja de lactato, aunque poco frecuentes, se han reportado (Pascoe et al, 2007).

### **Ejemplo 3**

#### **El perfil metabólico de las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup>**

[0053] Con el fin de comparar la fisiología de la líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> EA167 y EAX197 que podrían proteger contra la apoptosis en la línea celular de control en cultivos discontinuos, los niveles de nutrientes esenciales y aminoácidos que se proporcionaron al comienzo del cultivo por lotes, a saber, glucosa, glutamato y glutamina, fueron monitoreados. Además, también se monitorizaron la acumulación de los productos de desecho de amoníaco y lactato. Se muestra en la Fig. 5 son los niveles de estos metabolitos cuando EAX197 y EA167, así como la línea celular de control se cultivaron en modo por lotes en matraces de agitación en un medio CD-CHO comercial. Como se muestra en la Fig. 5A, la glucosa se agota rápidamente desde el medio de las tres líneas celulares llegado al día-6 o 7 de post-siembra. No hay diferencias significativas en el agotamiento de glutamina discernibles entre apoptotic<sup>R</sup> y las líneas celulares de control y los niveles de glutamato no variaron en gran medida para las tres líneas celulares a lo largo de los días (datos no mostrados). Las tres líneas celulares mostraron una acumulación de lactato durante la fase de crecimiento celular temprana hasta día-4 (Fig. 5B). En la línea celular de control, el lactato continuó aumentándose hasta el día-6 (momento en el que alcanzó 2,8 g/L) y luego se observó una ligera disminución y la concentración de lactato llegó finalmente a 1,8 g/L. Se espera que esta cantidad de lactato baje el pH del cultivo y en biorreactores, donde el pH es controlado por la adición de bicarbonato, la osmolaridad sería elevado. Todas estas características, además de otros factores de estrés, podrían dar lugar a un ambiente tóxico para las células animales. Por el contrario, los niveles de lactato en las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> aumentaron durante un período más corto y luego bajaron rápidamente desde el día 5 en adelante y el lactato se eliminó por completo llegado al día 7 (EA167) o al día 8 (EAX197). Curiosamente, el punto de tiempo en el que el lactato se redujo a cero fue inmediatamente anterior a la hora en que el VCD cayó precipitadamente en la Fig. 5A para estas dos líneas celulares, lo que sugiere que la pérdida de la viabilidad celular se debió a la ausencia de cualquier glucosa o lactato disponible en el medio.

[0054] Otra diferencia observada entre apoptotic<sup>R</sup> y las líneas celulares de control es el perfil de amoníaco (Fig. 5C). Los niveles de amoníaco en EA167 y EAX197 disminuyeron ligeramente en el día 6, momento en el que la disminución de lactato había comenzado, y en última instancia aumentó de nuevo. Sin embargo, los niveles globales de amoníaco de las líneas apoptotic<sup>R</sup> eran más bajos que el de las líneas de control, lo cual fue sorprendente, ya que las líneas apoptotic<sup>R</sup> alcanzaron mayor IVCC y por lo tanto alcanzaron un crecimiento celular mayor general en comparación con la línea celular de control (Fig. 4C).

[0055] De los datos anteriores, es evidente que las características de las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> son dramáticamente diferentes a las de las líneas celulares de control. Sin embargo, cuando múltiples clones se examinan bajo condiciones experimentales un tanto diferentes, un amplio espectro de fenotipos se observa entre los transfectantes apoptosis<sup>R</sup>. Ya que existe variabilidad fenotípica en los aislados clonales de la línea celular de control, así es posible seleccionar clones apoptotic<sup>R</sup> raras de la línea celular de control mediante la utilización de un régimen de selección adecuado. En este sentido, Mattanovich y Borth (2006) han revisado la aplicación de la clasificación celular para aislar variantes raras con propiedades deseables de tipo silvestre (control) de la línea celular.

### **Ejemplo 4**

#### **Efecto de la alimentación de lactato**

[0056] La cantidad de lactato presente en un cultivo celular en cualquier punto depende de la cantidad de lactato secretado por esa línea celular menos la cantidad consumida por el mismo. Con el fin de determinar si las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> en realidad consumían lactato o si la producción neta de lactato fue menor en estas líneas celulares. Cultivos de las tres líneas celulares se controlaron diariamente y cualquier diferencia importante en la

concentración de lactato entre apoptotic<sup>R</sup> y línea celular de control fue eliminada por la adición de lactato exógeno. Como se observó anteriormente, el nivel de lactato en el un-alimentado apoptotic<sup>R</sup> EA167 y EAX197 comenzó a caer en el día-5 (Fig. 6A y 6B) con agotamiento del lactato llegado al día-7 (EA67, no alimentado) o al día-8 (EAX197 no alimentado). El perfil de lactato de la línea celular de control siguió aumentándose hasta d6, momento en el que el nivel se redujo ligeramente durante los próximos tres días, pero nunca se redujo a cero. Tras un seguimiento diario del cultivo apoptosis<sup>R</sup>, se añadió lactato para separar los cultivos por lote alimentados hasta 2,5 g/L a día 7 (para EA167, Fig. 6A) y 2 g/L en el día 8 (para EAX197, Fig. 6B) a fin de que los niveles sean similares a la de la línea celular de control. Incluso con la adición de lactato suplementario, el nivel de lactato se redujo mucho más rápidamente en los cultivos apoptotic<sup>R</sup> en comparación con los controles de día 6 a día 12. De hecho, el nivel de lactato se redujo de 2,5 a 0,2 g/L en el cultivo alimentado EA167 del día 6 al día 7, mientras que la disminución de lactato fue sólo de 2,7 a 2,4 g/L en el cultivo de control durante el mismo período de tiempo. Así, el lactato parece haberse consumido en las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> a un ritmo acelerado en comparación con las líneas celulares de control durante al menos 7 días después de la adición del lactato suplementario.

**[0057]** El efecto de los suplementos de lactato en VCD y la viabilidad celular se muestra en las Figs. 7A y 7B, respectivamente. Como ya se observó (Fig. 5A), el VCD de las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> no alimentadas disminuyó rápidamente a partir del día 8 (EA167) y día 9 (EAX197). Esto es probablemente debido a que uno o más componentes esenciales de los medios, incluidos la glucosa y/o lactato, se han agotado en estos cultivos. La línea celular de control mostró un lento declive a partir del día 7. Sin embargo, los cultivos de lactato-suplementado (EA167, lactato-alimentado y EAX197, lactato alimentados) exhibieron un descenso mucho más lento en VCD, y en una línea celular (EAX197, lactato-alimentado), el VCD se estabilizó entre  $8 \times 10^6$  y  $10 \times 10^6$  células/ml hasta d14 antes de que este cultivo finalmente sucumbió. Las viabilidades de células mostradas en la Fig. 7B exhibieron una disminución más gradual similares para las dos culturas apoptotic<sup>R</sup> con un lactato complementado en los medios. Estos resultados sugieren que las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> son capaces de utilizar tanto el lactato endógeno como suplementario de manera eficiente para conservar su densidad de células viables y la viabilidad, mientras que la línea celular de control es incapaz de implementar una estrategia similar para el consumo de lactato eficiente. Esta diferencia se refleja en la IVCC de las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> alimentadas por lactato, que eran casi 180% a 220% mayores que las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> no alimentadas y aproximadamente 235% a 250% más altas que los cultivos de control.

**[0058]** La mayoría de los otros nutrientes y metabolitos mostrados en las Figs. 7D-F exhibieron perfiles similares a los observados previamente en los cultivos no alimentados de la Fig. 5. La glucosa y glutamina se consumieron rápidamente en puntos de tiempo tempranos en el cultivo. El perfil de amoníaco de las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> una vez más mostró un ligero descenso en el momento en el que empezó el consumo de lactato, tanto en los cultivos no suplementados y en los suplementados con lactato. Como en los experimentos anteriores, el nivel de amoníaco final de las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> estaba por debajo de los niveles de control a pesar de que la IVCC fue considerablemente mayor en todos los cuatro cultivos apoptotic<sup>R</sup>. Los niveles de glutamato diferían entre los cultivos de lactato alimentados y no alimentados y el agotamiento de glutamato se incrementó significativamente en el cultivo alimentado en comparación con las líneas celulares no alimentadas y de control.

## **Ejemplo 5**

### **Perfil de aminoácidos de líneas celulares de apoptotic<sup>R</sup> y de control**

**[0059]** Las concentraciones de cada uno de los veinte aminoácidos fueron monitorizados periódicamente en líneas celulares de control, así como en cultivos de líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> no alimentados y alimentados de lactato (Tabla II y la Fig. 8). Con respecto al consumo o producción de aminoácidos, distintos de glutamina y glutamato, debe indicarse primero que ninguno de los nueve aminoácidos esenciales (fenilalanina, treonina, metionina, lisina, triptófano, leucina, isoleucina, valina e histidina) estaban agotados, como se indica en la Tabla II. En cultivos de líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> (no alimentados) y de control, asparagina, serina, triptófano y cisteína (resaltado en cursiva) se agotaron casi por completo. Curiosamente, todos los tres aminoácidos de cadena ramificada, a saber, isoleucina, leucina y valina (gris claro sombreada en la Tabla II) se agotaron más rápidamente del medio de cultivo por líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> en comparación con el control, y este agotamiento es más pronunciado en cultivos alimentados de lactato (Figs. 8A-D). Además de glutamato, los niveles finales de estos tres aminoácidos eran mucho más bajos a partir del medio de lactato en cultivos alimentados. Otros aminoácidos con un alto porcentaje consumido (concentración final por debajo del 50% de su concentración inicial en el medio) incluyen tirosina, fenilalanina, metionina (Figura 8D) y ácido aspártico (Fig. 8E).

**[0060]** Una comparación de los aminoácidos que se excretan al medio de cultivo entre el control y las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> también es interesante. Como se muestra en la Fig. 8E, las líneas celulares de control acumularon ácido aspártico en el medio de cultivo durante los primeros seis días, mientras que hubo una disminución en los niveles de ácido aspártico durante ese mismo período de tiempo para las cuatro cultivos apoptotic<sup>R</sup>. Además, las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> secretan significativamente más alanina (Fig. 8F) durante los primeros 6 días, en comparación con la línea celular de control, mientras que todas las líneas celulares la consumen en momentos posteriores. Es más, las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> producen más homocisteína sobre todo el cultivo de células en comparación con las líneas celulares de control (Fig. 8G).

**Ejemplo 6****Cultivo por lotes en presencia de glucosa alta**

5 [0061] Si las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> pueden utilizar lactato, entonces hay una posibilidad de que estas líneas pueden potencialmente desarrollarse en concentraciones de glucosa que podrían tener efectos inhibidores para las células de control debido a la acumulación de niveles tóxicos de lactato. Además, es posible que el crecimiento de estas líneas podría apoyarse por un medio de cultivo que contenga lactato como única fuente de carbono. No fue posible usar el medio CD-CHO utilizado en los experimentos anteriores porque una glucosa tan alta llevaría a una osmolaridad insostenible y por lo tanto un nuevo medio tuvo que ser utilizado para estos experimentos. Por lo tanto, se comparó la cinética de crecimiento de EAX197, que exhibe el mayor crecimiento sostenido en los experimentos anteriores, a la de las líneas celulares de control en un medio de encargo libre de proteína animal que contiene 60 mM de glucosa (glucosa alta) o lactato 30 mM. Ni el apoptotic<sup>R</sup> ni las líneas celulares de control exhibieron un crecimiento sostenido en ausencia completa de la glucosa, es decir, en presencia de sólo el lactato (datos no mostrados). Cuando ambas líneas celulares se cultivaron en el mismo medio de encargo que contiene concentraciones "altas" (60 mM) de glucosa, el EAX197 exhibió una mayor VCD, viabilidad e IVCC (Figs. 9A-C) que la línea celular de control, especialmente en los momentos posteriores en el cultivo celular. La línea celular EAX197 exhibió un menor aumento general de IVCC (130%) sobre el control que en el medio CD-CHO anterior, pero la diferencia era aún significativa debido al aumento de la viabilidad en momentos posteriores. Los perfiles de lactato de estas dos líneas de células cultivadas en "alta" glucosa se muestran en la Fig. 9D. Como en el caso con IVCC, los perfiles de lactato de ambas líneas difieren un tanto de lo observado en medio CD-CHO (Fig. 5D). En consonancia con los resultados anteriores con el medio CD-CHO, la línea celular apoptotic<sup>R</sup> en el medio de encargo inició el consumo neto de lactato antes (antes del día 2, como se muestra en la Fig. 9D) que el control y el nivel máximo de lactato fue mucho más bajo (1,2 g/L en comparación con 2,4 g/L para la línea celular de control). La célula de control exhibió una producción neta de lactato hasta el día 5, momento en el que las células de control también comenzaron a consumir el lactato en el medio. Ya que el medio CD-CHO es una formulación comercial con una composición de circunspección, no fue posible comparar exactamente el componente de medio en las dos formulaciones con el fin de entender la causa de los diferentes perfiles de consumo de lactato en las diferentes formulaciones.

**Ejemplo 7****La productividad de una línea celular apoptotic<sup>R</sup> en un medio rico en glucosa**

35 [0062] La línea celular apoptotic<sup>R</sup>, el EAX197 junto con la línea celular de control se utilizaron posteriormente como anfitriones para el desarrollo de líneas celulares de producción que expresan un anticuerpo modelo. Un número igual de clones fue investigado para cada línea celular y el mejor clon generado a partir de cada anfitrión se comparó en el modo por lotes de frasco de agitación para la productividad Ab. Un medio de encargo que contiene 60 mM de ("alta") glucosa como una fuente de carbono se utilizó con el fin de comparar su rendimiento en un entorno de alta glucosa. En el medio estándar (Fig. 10A), la línea celular de producción derivada de EAX197 tenía títulos de 489mg/L, que es un aumento de 145% sobre la línea celular de control, que tenía un título de 337 mg/L. La misma línea de células en un medio rico en glucosa (Fig. 10B) tuvo títulos de 687mg/L, que es un aumento de 178 % sobre el de la línea celular de control (384 mg/L). La producción mejorada se debió al menos en parte a un aumento del 188% en IVCC para el EAX197 frente a la línea celular de control (datos no mostrados).

**Ejemplo 8****Efecto de la sobre-expresión de E1B19K + AVEN +/- XIAPΔ en el bloqueo de apoptosis**

50 [0063] Los principales activadores de la cascada de apoptosis en las mitocondrias se muestran en la Fig. 1. En nuestro intento de desarrollar una línea de células CHO-apoptótica resistentes, se seleccionaron tres genes anti-apoptóticos que actúan en la etapa temprana, mediada y final de la apoptosis. Estos genes eran E1B19K (E), AVEN (A) y XIAPΔ (X). El CHOK1SV, la línea de células de transfección de anfitrión utilizada fue transfectada con E1B19K + AVEN con/sin XIAPΔ. Se escrutaron un gran número de transfectomas y unos pocos clones de cada transfección se seleccionaron para su posterior estudio. El estudio de crecimiento del perfil de estas líneas celulares muestran que llegan a una VCD muy alta y, en general, su IVCC fue aproximadamente dos veces mayor que la de control. Las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> perdieron viabilidad antes del día 8 después de la siembra, pero la recuperó llegado al día 10 en adelante por el consumo de lactato. El fluido de cultivo de líneas apoptotic<sup>R</sup> que expresan E1B19K+AVEN+XIAPΔ había reducido a niveles indetectables el amoníaco y lactato y glutamato empobrecido del medio de cultivo.

**Ejemplo 9****El uso de Bcl-2d para aumentar el título de anticuerpos**

65

5 **[0064]** Los resultados anteriores demuestran que las líneas celulares apoptotic<sup>R</sup> acumulan menos lactato en comparación con las células de control y la viabilidad de los cultivos apoptotic<sup>R</sup> se puede mantener en un medio de glucosa alta. En el siguiente experimento de lotes de frasco de agitación, una línea celular apoptotic<sup>R</sup> que expresa el Bcl-2d y cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos (C2088B) se sembró en diferentes densidades de siembra en glucosa estándar (4,8 g/L) y de alta concentración (9,5 g/L). Los resultados muestran que la línea celular apoptotic<sup>R</sup>, cuando se siembra a 1e6cells/ml en un medio que contiene 9,5 g/L de glucosa, alcanzó el pico de VCD de 14e6cells/ml en el día 7 post-siembra (Fig. 11A), y el título de anticuerpos de 2 g/L. En comparación, el C2088B cultivado bajo condiciones estándar (0.3e5cells/ml y 4,8 g/L de la inoculación) tenían su pico de VCD de 7e6cells/ml y el título de anticuerpos de 1 g/L (Fig. 11B). Esto se traduce en un aumento de títulos de anticuerpos de 200 % para condiciones de glucosa alta en comparación a las condiciones estándar (es decir, densidad de siembra de 0,3e6c/ml en un medio que contiene 4,8g/L de glucosa).

LISTA DE SECUENCIAS

15 **[0065]**  
 <110> DORAI, HAIMANTI KYUNG, YUN SEUNG  
 <120> Métodos para obtener densidad alta viable de cultivos celulares de mamíferos

20 <130> CEN5222USNP

<140> A ser asignado  
 <141> 2009-06-12

25 <150> 61/061233  
 <151> 2008-06-13

<160> 12

<170> FastSEQ para Versión de Windows 4.0

30 <210> 1  
 <211> 660  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

35 <400> 1

atgtcgtccc acctagtcga gccgccgccg ccctgcaca acaacaaca caactgcgag 60  
 gaaaatgagc agtctctgcc cccgccggcc ggctcaaca gttcctgggt ggagctaccc 120  
 40 atgaacagca gcaatggcaa tgataatggc aatgggaaa atggggggct ggaacacgta 180  
 ccacctcat cctccatcca caatggagac atggagaaga ttcttttggga tgcacaacat 240  
 gaatcaggac agagtagttc cagaggcagt tctcactgtg acagcccttc gccacaagaa 300  
 gatgggcaga tcatgtttga tgtggaaatg cacaccagca gggaccatag ctctcagtca 360  
 45 gaagaagaag ttgtagaagg agagaaggaa gtcgaggctt tgaagaaaag tgcggactgg 420  
 gtatcagact ggtccagtag acccgaaaac attccacca aggagttcca cttcagacac 480  
 cctaaacggt ctgtgtcttt aagcatgagg aaaagtggag ccatgaagaa aggggggtatt 540  
 ttctccgcag aatttctgaa ggtgttcatt ccattctctt tccttttctca tgttttggct 600  
 ttgggggctag gcatctatat tggaaagcga ctgagcacac cctctgcccag cacctactga 660

50 <210> 2  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

55 <400> 2

60

65

ES 2 557 903 T3

Met Ser Ser His Leu Val Glu Pro Pro Pro Pro Leu His Asn Asn Asn  
 1 5 10 15  
 Asn Asn Cys Glu Glu Asn Glu Gln Ser Leu Pro Pro Pro Ala Gly Leu  
 20 25 30  
 5 Asn Ser Ser Trp Val Glu Leu Pro Met Asn Ser Ser Asn Gly Asn Asp  
 35 40 45  
 Asn Gly Asn Gly Lys Asn Gly Gly Leu Glu His Val Pro Ser Ser Ser  
 50 55 60  
 10 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  
 15 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  
 20 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  
 25 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  
 30 Lys Arg Leu Ser Thr Pro Ser Ala Ser Thr Tyr  
 210 215

<210> 3  
 <211> 1089  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 3

40 atgcaggcgg agcgaggagc tcgggggaggc cgtggggcggc ggccaggccg cggccggcct 60  
 ggcggagatc gccacagcga gcgggcccggg gccgcagcgg cggtagccag aggcggcggc 120  
 ggaggcggcg gcggggacgg aggcggacgc cggggccgtg gccgtggccg gggcttccgc 180  
 45 ggcgctcgcg gaggccgagg aggaggaggc gccccgcgag gcagccgccg ggagccggga 240  
 ggctggggcg caggggcccag cgcgcccgtt gaagatgaca gcgatgcaga gacctatgga 300  
 gaagagaatg atgaacaggg aaattattct aaaagaaaga ttgtctctaa ctgggatcga 360  
 tatcaagata ttgaaaaaga ggtcaataat gaaagtggag agtcacagag ggaacagat 420  
 ttcagtgtcc tccttagctc tgcaggggac tcattctcac agttccggtt tgctgaggag 480  
 50 aaagaatggg atagtgaagc ttcttgtcca aaacagaatt cagcatttta tgtggatagt 540  
 gagttattgg ttcgagccct tcaagagctg cctctctgcc tccgactcaa cgttgctgcc 600  
 gaactggctc aggttacagt tccttagag gttcctcagg tgaaccaa gagaactgat 660  
 gatggcaagg gattaggat gcagttaaag gggcccttgg ggcctggag aagggggccc 720  
 atctttgagc tgaaatctgt ggctgctggc tgccctgtgt tgctgggcaa agacaacca 780  
 55 agcccgggtc cttcaaggga ttctcagaaa ccacttccc cactgcagtc agcaggagac 840  
 catttggaag aagaactaga tctgttgctt aatttagatg cacctataaa agagggagat 900  
 aacatcttac cagatcagac gtctcaggac ctgaaatcca aggaagatgg ggaggtggtc 960  
 caagaggaag aagtttgtgc aaaaccatct gtgactgaag aaaaaaacat ggaacctgag 1020  
 60 caaccaagta cctccaaaaa tgttaccgag gaagagctgg aagactggtt ggacagcatg 1080  
 atttctaa 1089

65

ES 2 557 903 T3

<210> 4  
 <211> 362  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5  
 <400> 4

	Met	Gln	Ala	Glu	Arg	Gly	Ala	Arg	Gly	Gly	Arg	Gly	Arg	Arg	Pro	Gly
	1				5					10					15	
10	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	Gly	Asp	Gly	Gly
			35					40					45			
15	Gly	Arg	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Phe	Arg	Gly	Ala	Arg	Gly
	50						55					60				
	Gly	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Pro	Arg	Gly	Ser	Arg	Arg	Glu	Pro	Gly
	65						70				75					80
20	Gly	Trp	Gly	Ala	Gly	Ala	Ser	Ala	Pro	Val	Glu	Asp	Asp	Ser	Asp	Ala
				85						90					95	
	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Glu	Asn	Asp	Glu	Gln	Gly	Asn	Tyr	Ser	Lys	Arg
				100					105						110	
25	Lys	Ile	Val	Ser	Asn	Trp	Asp	Arg	Tyr	Gln	Asp	Ile	Glu	Lys	Glu	Val
			115					120					125			
	Asn	Asn	Glu	Ser	Gly	Glu	Ser	Gln	Arg	Gly	Thr	Asp	Phe	Ser	Val	Leu
	130							135					140			
30	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	
	Tyr	Val	Asp	Ser	Glu	Leu	Leu	Val	Arg	Ala	Leu	Gln	Glu	Leu	Pro	Leu
			180						185					190		
35	Cys	Leu	Arg	Leu	Asn	Val	Ala	Ala	Glu	Leu	Val	Gln	Gly	Thr	Val	Pro
	195							200					205			
	Leu	Glu	Val	Pro	Gln	Val	Lys	Pro	Lys	Arg	Thr	Asp	Asp	Gly	Lys	Gly
	210						215					220				
40	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	
45	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			
	Leu	Leu	Asn	Leu	Asp	Ala	Pro	Ile	Lys	Glu	Gly	Asp	Asn	Ile	Leu	Pro
			290				295					300				
50	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	
55	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								

60 <210> 5  
 <211> 1356  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

65 <400> 5



ES 2 557 903 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	ggaaagtatc	cccaaattgc	agattttatca	acggctttta	tcttgaaaaat	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	tcaccctaacc	540
	ccaagagagt	tagcaagtgc	tggactctac	tacacaggta	ttggtgacca	agtgcagtgc	600
	ttttgtttg	gtggaaaact	gaaaaattgg	gaaccttgtg	atcgtgcctg	gtcagaacac	660
	aggcgacact	ttcctaattg	cttctttgtt	ttggggccgga	atcttaatat	tcgaagtgaa	720
	tctgatgctg	tgagttctga	taggaatttc	ccaaattcaa	caaactctcc	aagaaatcca	780
15	tccatggcag	attatgaagc	acggatcttt	acttttggga	catggatata	ctcagttaac	840
	aaggagcagc	ttgcaagagc	tggattttat	gcttttaggtg	aaggtgataa	agtaaagtgc	900
	tttactgtg	gaggagggct	aactgattgg	aagcccagtg	aagacccttg	ggaacaacat	960
	gctaaatggt	atccaggggtg	caaatatctg	ttagaacaga	agggacaaga	atatataaac	1020
20	aatattcatt	taactcattc	acttgaggag	tgtctggtaa	gaactactga	gaaaacacca	1080
	tcactaacta	gaagaattga	tgataccatc	ttccaaaatc	ctatggtaca	agaagctata	1140
	cgaatggggt	tcagtttcaa	ggacattaag	aaaataatgg	aggaaaaaat	tcagatatct	1200
	gggagcaact	ataaatcact	tgaggttctg	gttgcagatc	tagtgaatgc	tcagaaagac	1260
	agtatgccag	atgagtcaag	tcagacttca	ttacagaaag	agatttagtac	tgaagagcag	1320
25	ctaaggcgcc	tgcaagagga	gaagcttatac	gattga			1356

30 <210> 6  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 6

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 557 903 T3

Met Thr Phe Asn Ser Phe Glu Gly Ser Lys Thr Cys Val Pro Ala Asp  
 1 5 10 15  
 Ile Asn Lys Glu Glu Glu Phe Val Glu Glu Phe Asn Arg Leu Lys Thr  
 20 25 30  
 5 Phe Ala Asn Phe Pro Ser Gly Ser Pro 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  
 10 Ser Cys His Ala Ala Val Asp Arg Trp Gln Tyr Gly Asp Ser Ala Val  
 65 70 75 80  
 Gly Arg His Arg Lys Val Ser Pro Asn Cys Arg Phe Ile Asn Gly Phe  
 85 90 95  
 15 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  
 20 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  
 25 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  
 30 Asn Trp Glu Pro Cys Asp Arg Ala Trp Ser Glu His Arg Arg His Phe  
 210 215 220  
 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  
 35 Pro Arg Asn Pro Ser Met Ala Asp Tyr Glu Ala Arg Ile Phe Thr Phe  
 260 265 270  
 Gly Thr Trp Ile Tyr Ser Val Asn Lys Glu Gln Leu Ala Arg Ala Gly  
 275 280 285  
 40 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  
 45 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  
 50 Val Arg Thr Thr Glu Lys Thr Pro Ser Leu Thr Arg Arg Ile Asp Asp  
 355 360 365  
 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  
 55 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  
 60 Lys Glu Ile Ser Thr Glu Glu Gln Leu Arg Arg Leu Gln Glu Glu Lys  
 435 440 445  
 Leu Ile Asp  
 450  
 65

ES 2 557 903 T3

<210> 7  
 <211> 573  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 7

10 atggcgcacg ctgggagaac agggtagcat aaccgggaga tagtgatgaa gtacatccat 60  
 tataagctgt cgcagagggg ctacgagtgg gatgccgcgg ggcctgcgct cagcccgggtg 120  
 ccacctgtgg tccacctgac cctccgccag gccggcgacg acttctcccg ccgctaccgc 180  
 cgcgacttcg ccgagatgtc cagccagctg cacctgacgc ctttcaccgc gcggggacgc 240  
 tttgccacgg tgggtggagga gctcttcagg gacgggggtga actgggggag gattgtggcc 300  
 15 ttctttgagt tcggtggggg catgtgtgtg gagagcgtca accgggagat gtcgcccctg 360  
 gtggacaaca tcgccctgtg gatgactgag tacctgaacc ggcacctgca cacctggatc 420  
 caggataacg gaggctggga tgcctttgtg gaactgtacg gccccagcat gcggcctctg 480  
 tttgatttct cctggctgtc tctgaagact ctgctcagtt tggccctggt gggagcttgc 540  
 atcacccctgg gtgcctatct gagccacaag tga 573

<210> 8  
 <211> 190  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 8

30 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  
 40 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  
 45 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  
 50 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

<210> 9  
 <211> 1476  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 9

65

# ES 2 557 903 T3

```

atgtgcaata ccaacatgtc tgtacctact gatggtgctg taaccacctc acagattcca 60

gcttcggaac aagagaccct ggtagacca aagccattgc ttttgaagtt attaaagtct 120
gttgggtcac aaaaagacac ttatactatg aaagagggtc ttttttatct tggccagtat 180
5 attatgacta aacgattata tgatgagaag caacaacata ttgtatattg ttcaaatgat 240
cttctaggag atttgtttgg cgtgccaaagc ttctctgtga aagagcacag gaaaatatat 300
accatgatct acaggaactt ggtagtagtc aatcagcagg aatcatcgga ctcaggtaca 360
tctgtgagtg agaacagggtg tcaccttgaa ggtgggagtg atcaaaaagga ccttgtacaa 420
10 gagcttcagg aagagaaacc ttcatcttca catttggttt ctagaccatc tacctcatct 480
agaaggagag caattagtga gacagaagaa aattcagatg aattatctgg tgaacgacaa 540
agaaaacgcc acaaactctga tagtatttcc ctttcctttg atgaaagcct ggctctgtgt 600
gtaataaggg agatatgttg tgaaagaagc agtagcagtg aatctacagg gacgccatcg 660
aatccggatc ttgatgctgg tgtaagtga cttcagggtg attggttga tcaggattca 720
15 gtttcagatc agtttagtgt agaatttgaa gttgaatctc tcgactcaga agattatagc 780
cttagtgaag aaggacaaga actctcagat gaagatgatg aggtatatca agttactgtg 840
tatcaggcag gggagagtga tacagattca tttgaagaag atcctgaaat ttccttagct 900
gactattgga aatgcacttc atgcaatgaa atgaatcccc cccttccatc acattgcaac 960
20 agatgttggg cccttcgtga gaattggctt cctgaagata aagggaaaga taaaggggaa 1020
atctctgaga aagccaaact ggaaaactca acacaagctg aagagggtt tgatgttcct 1080
gattgtaaaa aaactatagt gaatgattcc agagagtcat gtggtgagga aaatgatgat 1140
aaaattacac aagcttcaca atcacaagaa agtgaagact attctcagcc atcaacttct 1200
agtagcatta tttatagcag ccaagaagat gtgaaagagt ttgaaagggg agaaacccaa 1260
25 gacaaagaag agagtgtgga atctagtttg ccccttaatg ccattgaacc ttgtgtgatt 1320
tgtcaaggtc gacctaaaaa tggttgcatt gtccatggca aaacaggaca tcttatggcc 1380
tgctttacat gtgcaaagaa gctaaagaaa aggaataagc cctgcccagt atgtagacaa 1440
ccaattcaaa tgattgtgct aacttatttc ccctag 1476

30 <210> 10
    <211> 491
    <212> PRT
    <213> Mus musculus

35 <400> 2

40

45

50

55

60

65

```

ES 2 557 903 T3

	Met	Cys	Asn	Thr	Asn	Met	Ser	Val	Pro	Thr	Asp	Gly	Ala	Val	Thr	Thr
	1				5					10					15	
	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				
10	Arg	Leu	Tyr	Asp	Glu	Lys	Gln	Gln	His	Ile	Val	Tyr	Cys	Ser	Asn	Asp
	65					70					75					80
	Leu	Leu	Gly	Asp	Leu	Phe	Gly	Val	Pro	Ser	Phe	Ser	Val	Lys	Glu	His
				85						90					95	
15	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			
20	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
	Arg	Arg	Arg	Ala	Ile	Ser	Glu	Thr	Glu	Glu	Asn	Ser	Asp	Glu	Leu	Ser
				165						170					175	
25	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			
30	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

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 557 903 T3

Val Ser Asp Gln Phe Ser Val Glu Phe Glu Val Glu Ser Leu Asp Ser  
 245 250 255  
 Glu Asp Tyr Ser Leu Ser Glu Glu Gly Gln Glu Leu Ser Asp Glu Asp  
 260 265 270  
 5 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  
 10 Cys Thr Ser Cys Asn Glu Met Asn Pro Pro Leu Pro Ser His Cys Asn  
 305 310 315  
 Arg Cys Trp Ala Leu Arg Glu Asn Trp Leu Pro Glu Asp Lys Gly Lys  
 325 330 335  
 15 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  
 20 Asp Ser Arg Glu Ser Cys Val Glu Glu Asn Asp Asp Lys Ile Thr Gln  
 370 375 380  
 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  
 25 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  
 30 Cys Ile Val His Gly Lys Thr Gly His Leu Met Ala Cys Phe Thr Cys  
 450 455 460  
 Ala Lys Lys Leu Lys Lys Arg Asn Lys Pro Cys Pro Val Cys Arg Gln  
 465 470 475 480  
 35 Pro Ile Gln Met Ile Val Leu Thr Tyr Phe Pro  
 485 490

<210> 11  
 <211> 513  
 <212> DNA  
 40 <213> Homo sapiens

<400> 11

45 atgtctcaga gcaaccggga gctggtggtt gacttttctct cctacaagct ttcccagaaa 60  
 ggatacagct ggagtcagtt tagtgatgtg gaagagaaca ggactgaggc cccagaaggg 120  
 actgaatcgg agatggagac cccagtgcc atcaatggca acccatcctg gcacctggca 180  
 gacagccccg cggatgaatgg agccactggc cacagcagca gtttgatgc cggggaggtg 240  
 atccccatgg cagcagtaaa gcaagcgtg agggaggcag gcgacgagtt tgaactgcgg 300  
 50 taccggcggg cattcagtga cctgacatcc cagctccaca tcaccccagg gacagcatat 360  
 cagagctttg aacaggatac ttttgtggaa ctctatggga acaatgcagc agccgagagc 420  
 cgaaagggcc aggaacgctt caaccgctgg ttctgacgg gcatgactgt ggccggcgtg 480  
 gttctgctgg gctcactctt cagtcggaaa tga 513

55 <210> 12  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

60 <400> 12

65

ES 2 557 903 T3

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  
 5 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  
 10 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  
 15 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  
 20 Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe  
 130 135 140  
 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  
 25 His Leu Glu Pro Trp Ile Gln Glu Asn Gly Gly Trp Asp Thr Phe Val  
 180 185 190  
 Glu Leu Tyr Gly Asn Asn Ala Ala Ala Glu Ser Arg Lys Gly Gln Glu  
 195 200 205  
 30 Arg Phe Asn Arg Trp Phe Leu Thr Gly Met Thr Val Ala Gly Val Val  
 210 215 220  
 Leu Leu Gly Ser Leu Phe Ser Arg Lys  
 225 230

35

40

45

50

55

60

65

**Reivindicaciones**

- 5
1. Un método para la obtención de alta densidad de células viables en cultivo de células eucariotas de lote alimentado que comprende las etapas de:
- 10
- a) el cultivo de una línea celular eucariota que expresa uno o más genes heterólogos-apoptóticos resistentes (apoptotic<sup>R</sup>, donde los genes apoptotic<sup>R</sup> son E1B19K y AVEN, y uno o más genes de interés; y
- 15
- b) el mantenimiento de una alimentación de medios de alto contenido de glucosa de alrededor de 60 mM de glucosa durante las fases exponencial y estacionaria del cultivo celular.
2. El método de la reivindicación 1 donde la línea celular eucariota es:
- 15
- a) una línea celular de ovario de hámster chino (CHO), donde la línea celular CHO es opcionalmente CHO-K1 o CHO-K1SV;
- 20
- b) una línea de células de mieloma, en la que la línea celular de mieloma es opcionalmente NSO o Sp2/0; o
- c) un hibridoma.
3. El método de la reivindicación 1 en el que los genes apoptotic<sup>R</sup> comprenden además XIAPΔ.
- 20
4. El método de la reivindicación 2a) donde la línea celular CHO consume lactato acumulo durante la fase de cultivo celular exponencial.
- 25
5. El método de la reivindicación 2a) donde la línea celular CHO secreta menos lactato durante la fase exponencial de cultivo de células que una línea celular CHO que no contenga uno o más genes apoptotic<sup>R</sup>.
6. El método de la reivindicación 1 en el que el pico de densidad de células viables (VCD) se incrementa.
7. El método de la reivindicación 1 en el que la longevidad del cultivo celular se extiende.
- 30
8. El método de la reivindicación 1 en el que el título del cultivo de células se incrementa.
9. El método de la reivindicación 1 en el que el recuento viable de células integrado (IVCC) del cultivo celular se incrementa.
- 35
10. El método de la reivindicación 1 en el que el flujo de calcio celular se reduce.
11. El método de la reivindicación 1 en el que el potencial de membrana mitocondrial se incrementa.
- 40
12. El método de la reivindicación 1 en el que los genes de interés codifican una cadena pesada de anticuerpo y una cadena ligera de anticuerpo.

45

50

55

60

65



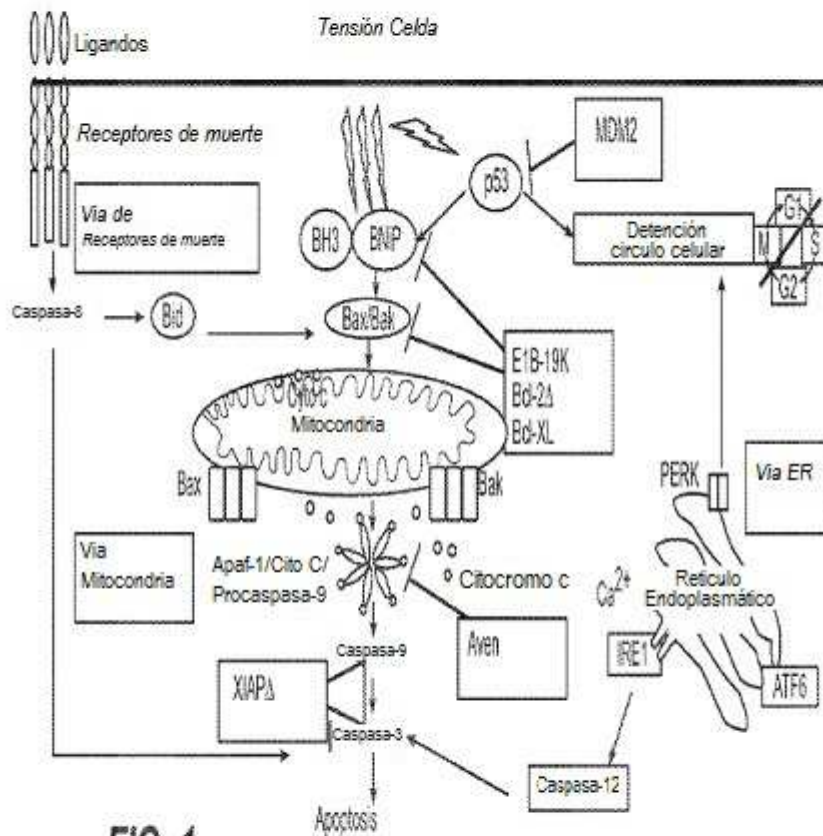
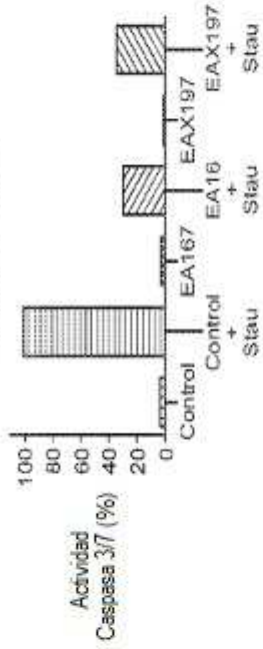
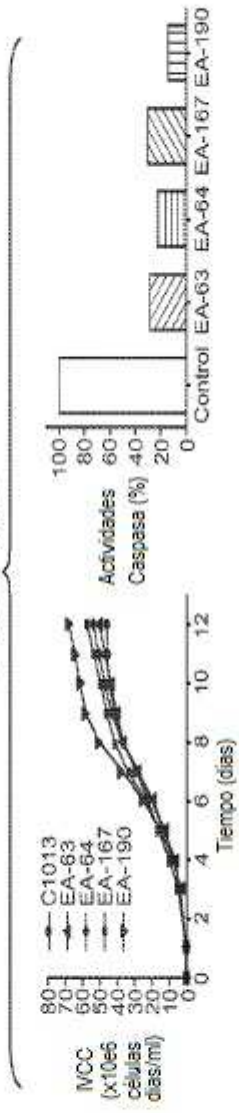


FIG. 1

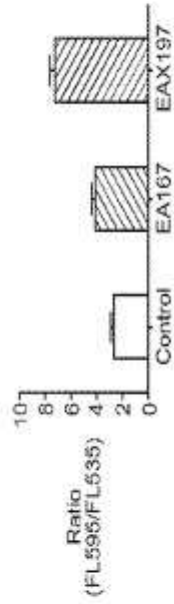
**FIG. 2A**



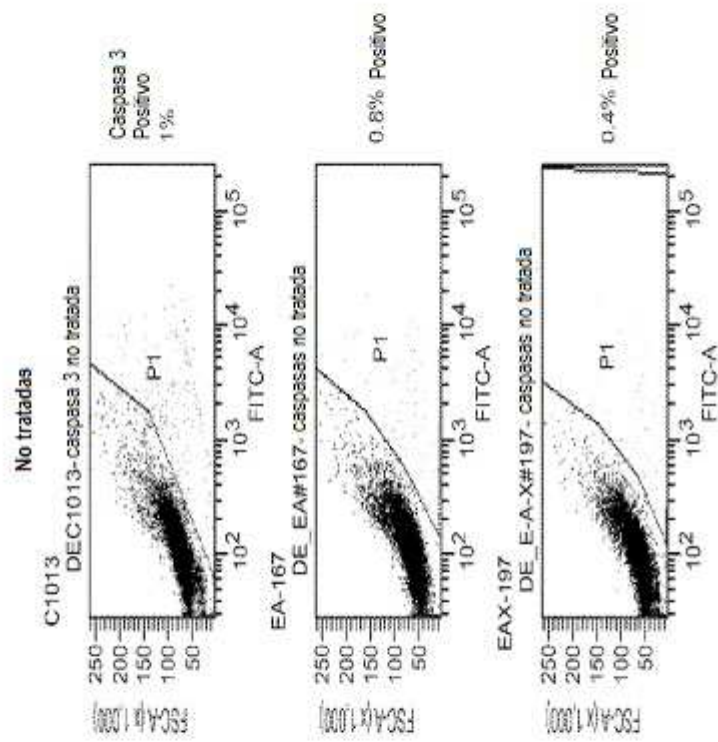
**FIG. 2B**



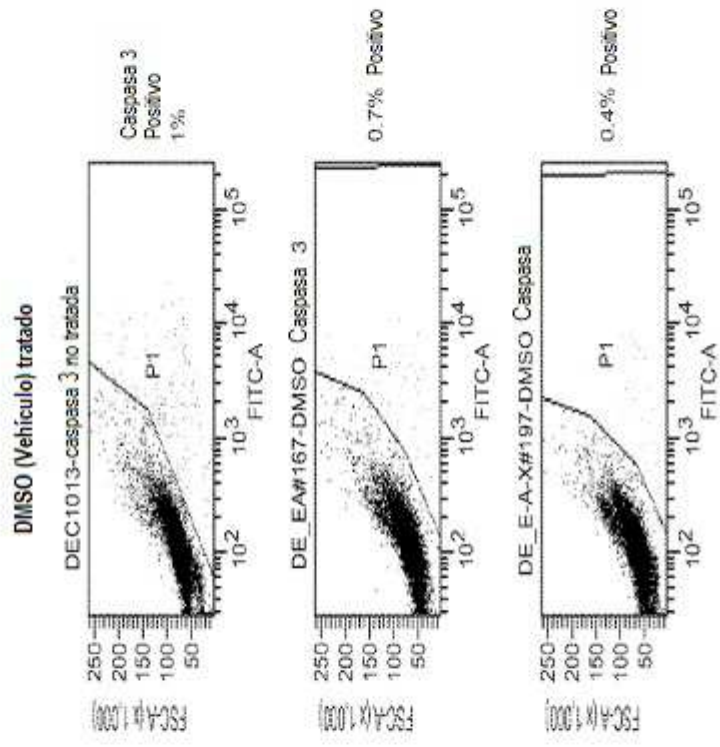
**FIG. 2C**



**FIG. 3A**

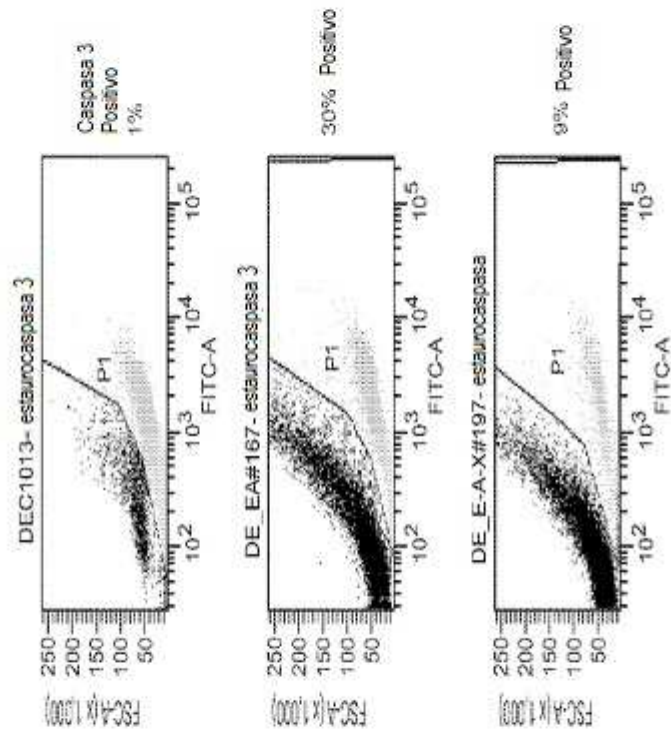


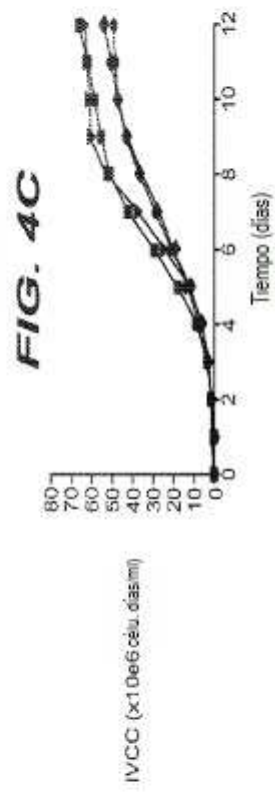
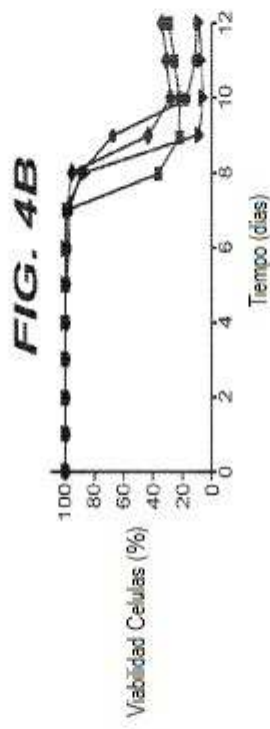
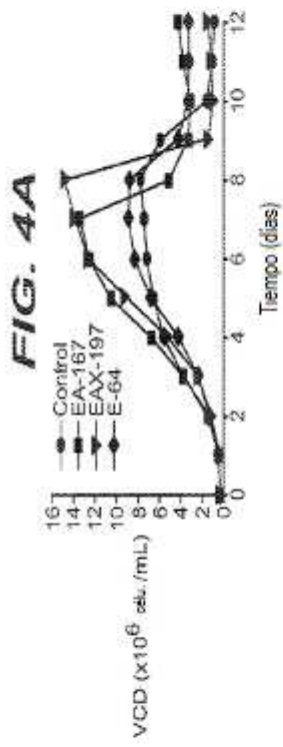
**FIG. 3B**

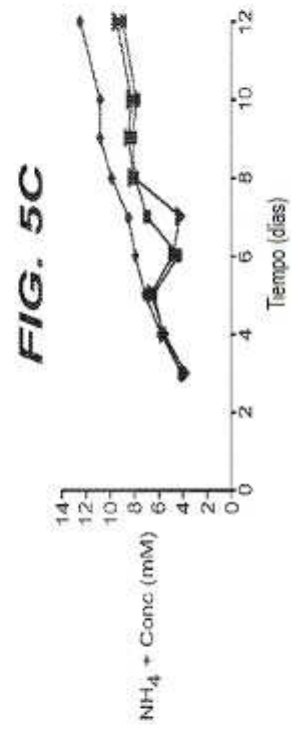
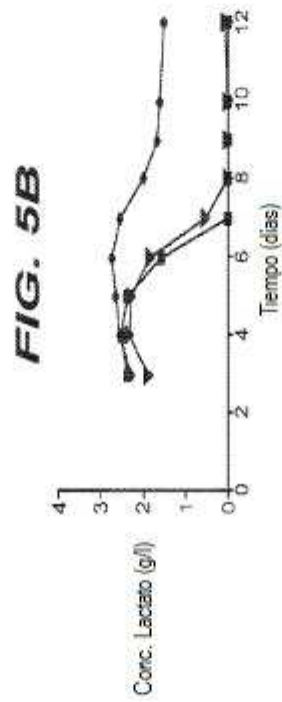
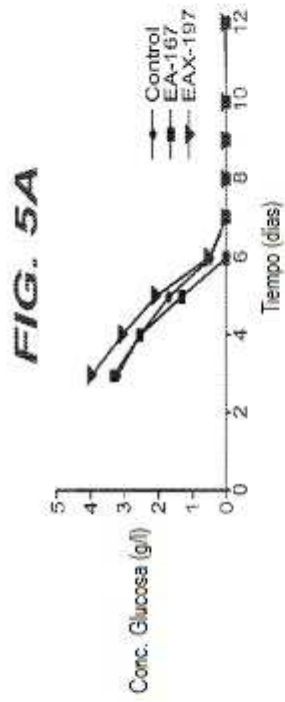


**FIG. 3C**

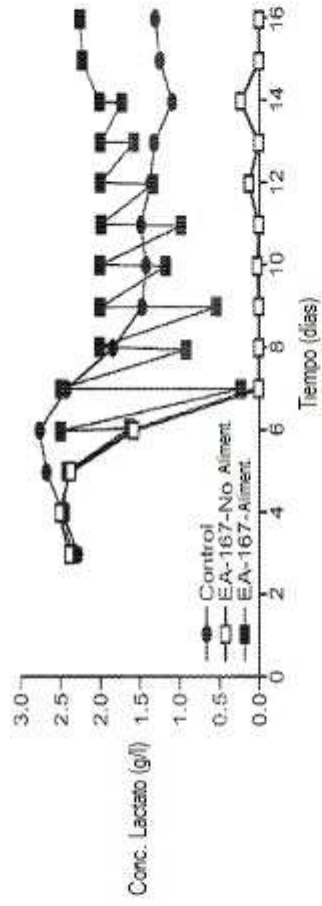
Estauoresporina tratada



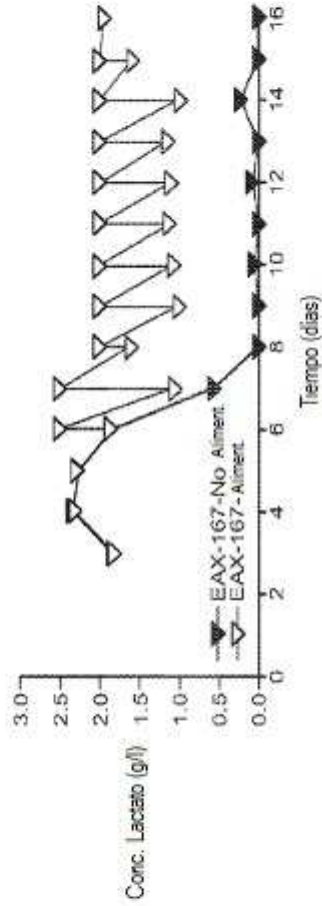




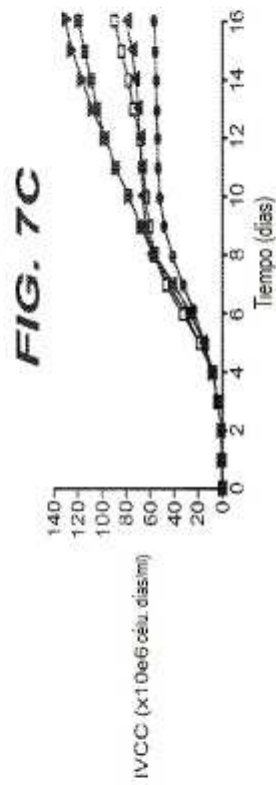
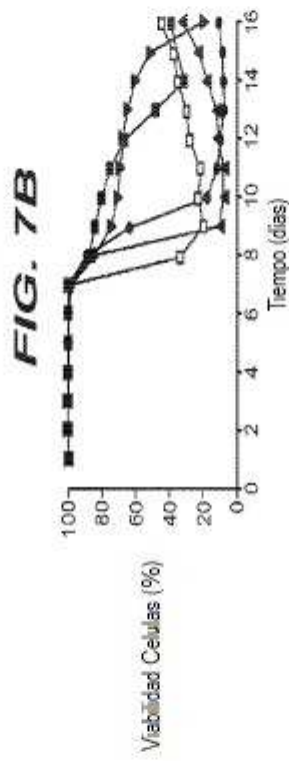
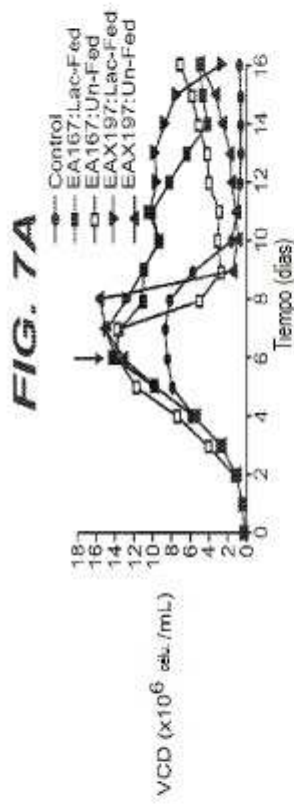
**FIG. 6A**



**FIG. 6B**



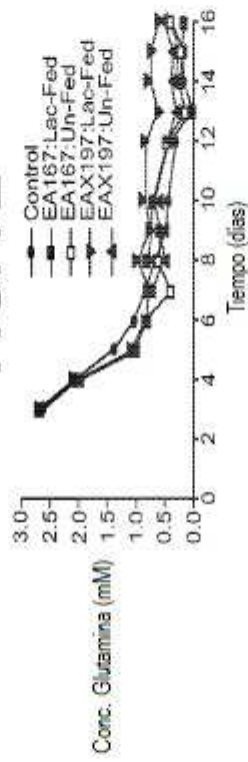




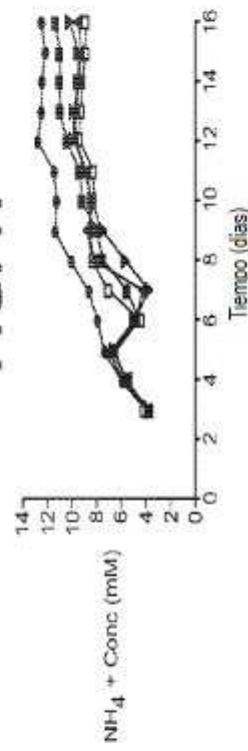
**FIG. 7D**



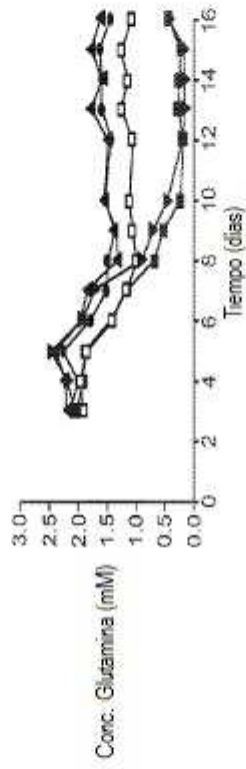
**FIG. 7E**

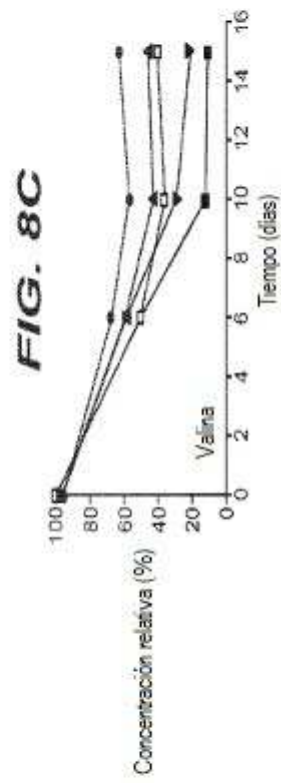
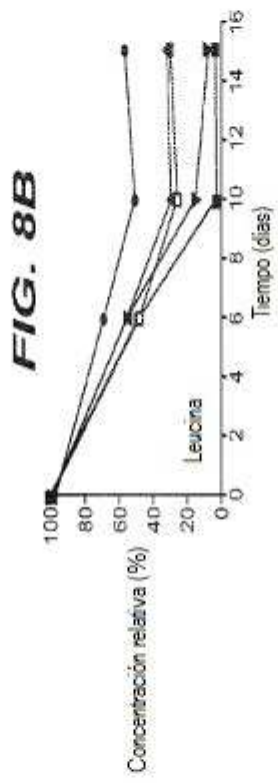
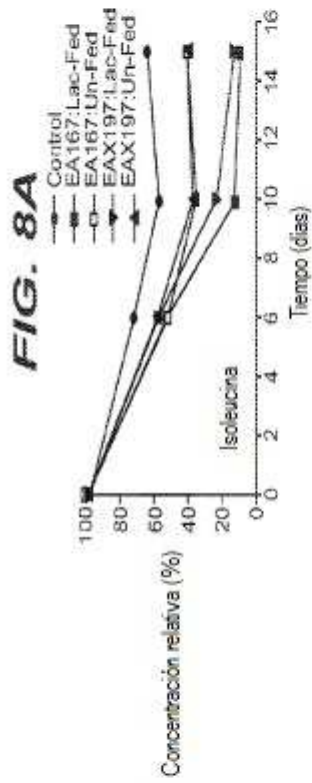


**FIG. 7F**

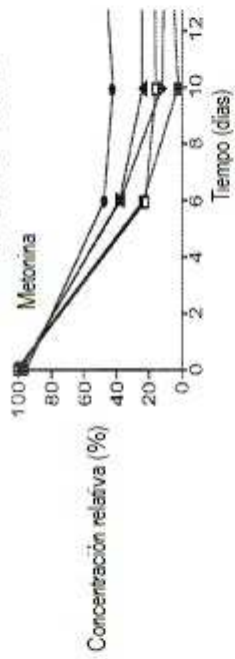


**FIG. 7G**

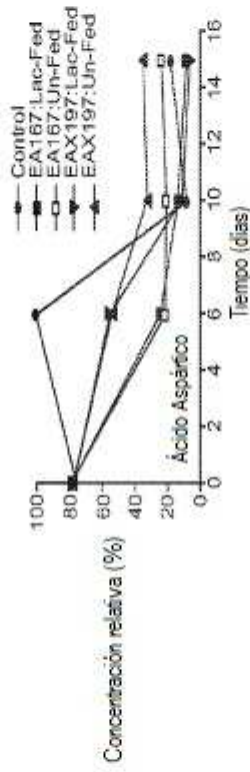




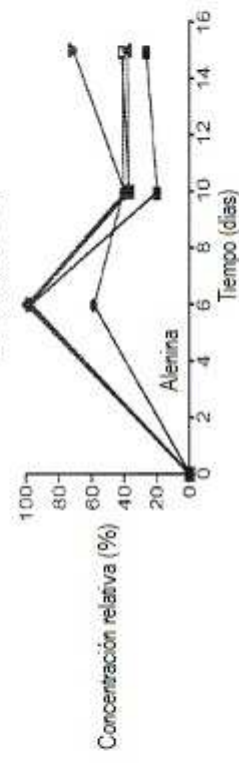
**FIG. 8D**



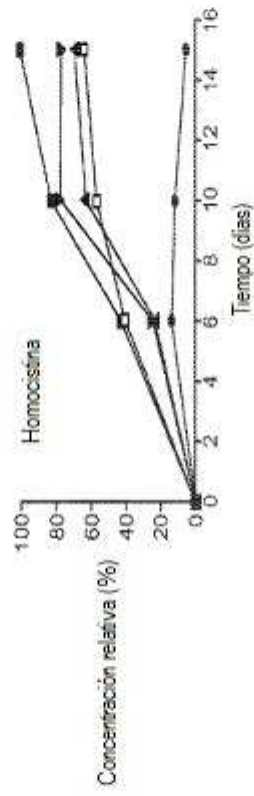
**FIG. 8E**

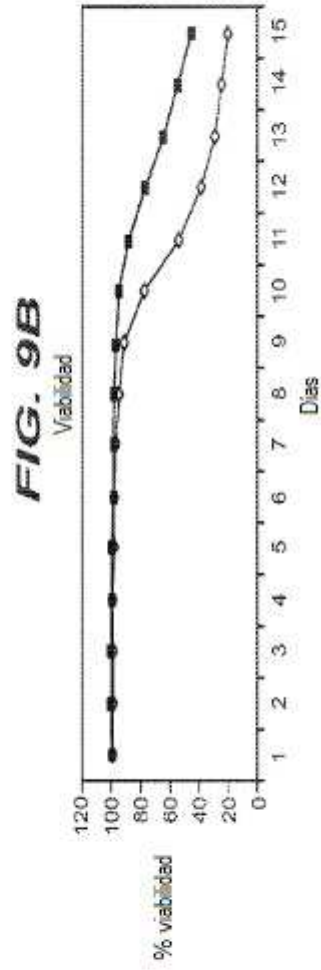
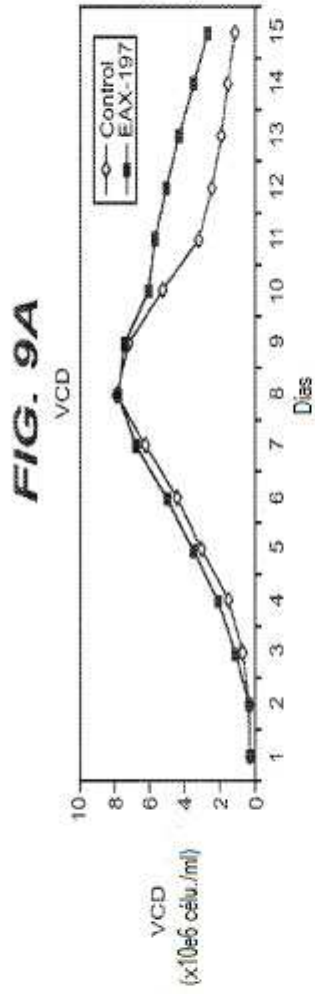


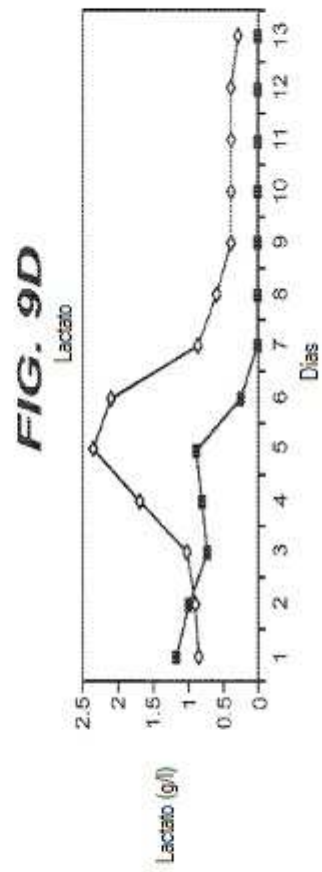
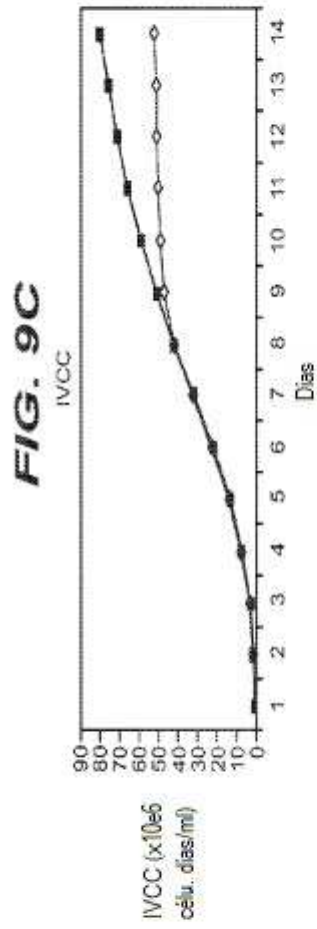
**FIG. 8F**



**FIG. 8G**

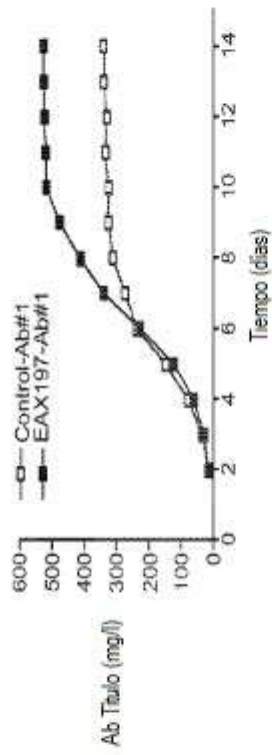




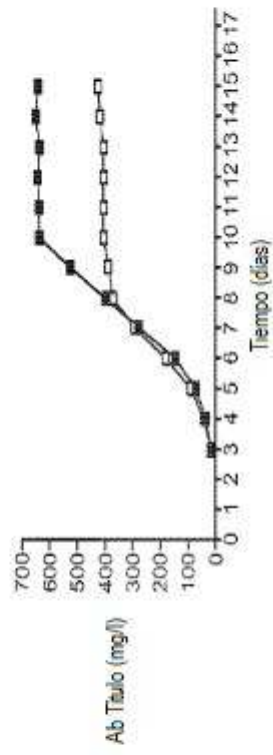




**FIG. 10A**

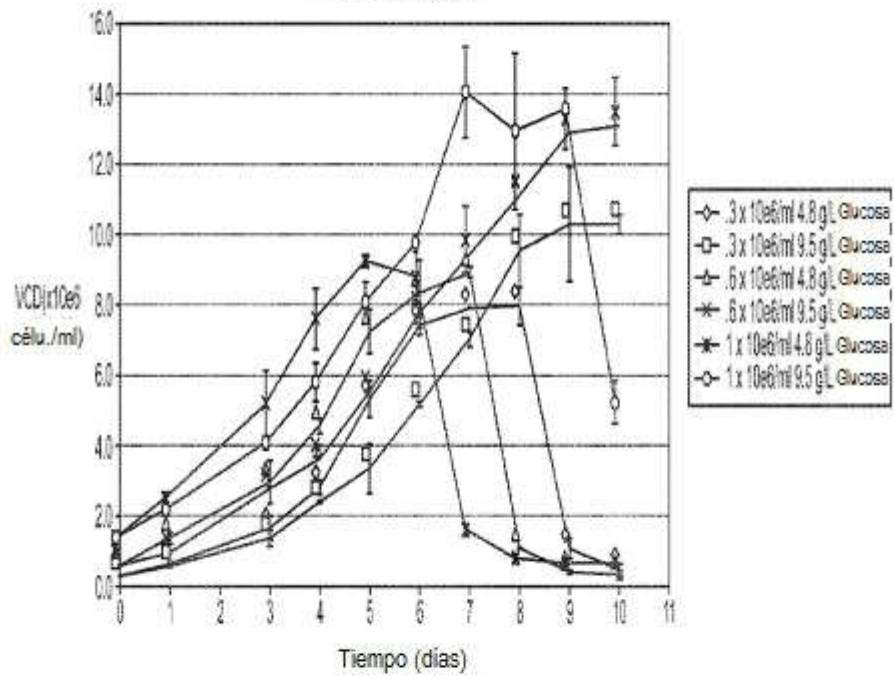


**FIG. 10B**



**FIG. 11A**

VCD vs Tiempo



**FIG. 11B**

Titulo vs Tiempo

