

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 412**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2011 PCT/US2011/038191**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2011 WO11150241**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2011 E 11787435 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2576580**

54 Título: **Disminución del nivel de lactato y aumento de la producción de polipéptidos regulando por disminución la expresión de la lactato deshidrogenasa y de la piruvato deshidrogenasa quinasa**

30 Prioridad:
28.05.2010 US 349727 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.02.2017

73 Titular/es:
**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:
**ZHOU, MEIXIA;
SNEDECOR, BRADLEY, RICHARD;
NG, CHI KIN, DOMINGOS y
SHEN, AMY**

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

ES 2 599 412 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Disminución del nivel de lactato y aumento de la producción de polipéptidos regulando por disminución la expresión de la lactato deshidrogenasa y de la piruvato deshidrogenasa quinasa

5

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad a la solicitud de patente provisional de EE.UU. N.º 61/349.727 presentada el 28 de mayo de 2010.

10

Campo de la invención

El campo de la presente invención se refiere generalmente a métodos y composiciones para reducir la producción de lactato y aumentar la producción de polipéptidos en células cultivadas.

15

Antecedentes de la invención

El mercado biofarmacéutico está creciendo rápidamente y la industria está proyectada para alcanzar 70 billones de dólares en el año 2010. Véase *Genetic Engineering in Livestock: New Applications and Interdisciplinary Perspectives* (Engelhard et al., 2009) Springer Berlin Heidelberg. Dado el aumento en la demanda de proteínas terapéuticas y el aumento de competidores en el reparto de mercados entre empresas, existe una necesidad de mejorar las tecnologías para lograr mejor productividad en proteínas terapéuticas. Hacia este objetivo se han explorado diferentes enfoques, tales como ingeniería de células huésped. Véase Kuystermans et al., *Cytotechnology* 53(1-3):3-22 (2007); y O'Callaghan and James, *Brief Funct. Genomic Proteomic* 7(2):95-110 (2008). Se usan ampliamente células cultivadas, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), para producir proteínas terapéuticas. Por ejemplo, se ha usado ampliamente cultivo en biorreactor de lotes alimentados de pH controlado para producir anticuerpos monoclonales recombinantes. Langheinrich y Nienow, *Biotechnol. Bioeng.* 66(3):171-9 (1999). El lactato es uno de los principales productos residuales acumulados durante los cultivos de lotes alimentados y se ha mostrado la inhibición del crecimiento celular y la producción de proteínas. Véase Glacken et al., *Biotechnol. Bioeng.* 32:491-506 (1988); y Lao y Toth, *Biotechnol. Prog.* 13:688-691 (1997). Esto conduce a su vez a un aumento en la cantidad de álcali que se necesita añadir al medio de cultivo para controlar el pH. Diel et al., *J. Immunol.* 184(3):1200-9 (2010); Langheinrich y Nienow, *Biotechnol. Bioeng.* 66(3):171-9 (1999). La elevada adición de álcali al medio de cultivo celular para mantener el pH puede producir un aumento en la osmolalidad y este aumento puede conducir a la inhibición del crecimiento celular y la disminución de la productividad de anticuerpos. Cruz et al., *Enzyme Microb. Technol.* 27(1-2):43-52 (2000); Iran et al., *Biotechnol. Bioeng.* 66:238-246 (1999). Por lo tanto, se desea reducir el nivel de lactato para el desarrollo de polipéptido o un proceso de producción de anticuerpos de título más alto.

20

25

30

35

40

Hay muchos factores que pueden influir en la producción de lactato en cultivo celular, tales como controlar el nivel de piruvato. Véase Liu et al., *J. Biol. Chem.*, 284(5):2811-22 (2009); y Samuvel et al., *J. de Immunol.* 182(4):2476-84 (2009). El piruvato es el sustrato para las enzimas piruvato deshidrogenasa (PDH) y lactato deshidrogenasa (LDH).

45

50

El complejo PDH es una unidad multi-enzimática que consiste en tres enzimas catalíticas, E1, E2 y E3. Patel y Korotchikina, *Exp. Mol. Med.* 33(4):191-7 (2001). Este complejo cataliza la reacción de conversión limitante de la velocidad en la conversión de piruvato a acetil-CoA, que es el punto de entrada del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA). La actividad de PDH está regulada por las enzimas piruvato deshidrogenasa quinasa (PDHK(s)) y piruvato deshidrogenasa fosfatasa (PDHPs). Las PDHK fosforilan PDH para suprimir su actividad enzimática, mientras que las PDHP desfosforilan y así activan PDH. Véanse Patel y Korotchikina, *Exp. Mol. Med.* 33(4):191-7 (2001); Roche y Hiromasa, *Cell Mol. Life Sci.* 64(7-8):830-49 (2007); Holness and Sugden, *Biochemical Society Transactions*, 31:1143-1151 (2003). Hay cuatro isotipos de PDHK en células de mamífero (PDHK1, PDHK2, PDHK3 y PDHK4) con distribuciones específicas de tejido. Véanse Harris et al., *Adv. Enzyme Regul.* 42:249-59 (2002); y Bowker-Kinley et al., *Biochem. J.* 329(1):191-6 (1998).

55

60

65

La LDH cataliza directamente la interconversión de piruvato y lactato con interconversión simultánea de NADH y NAD⁺. En células de mamífero, las LDH existen bien como homo- o bien como heterotetrámeros que consisten principalmente en subunidades A y B (o subunidades H y M, respectivamente) codificadas por genes LDHa y LDHb y algunas veces homotetrámeros de la subunidad C codificada por genes LDHc. Véase Baumgart et al., *J. Biol. Chem.* 271(7):3846-55 (1996); Li et al., *J. Biol. Chem.* 258(11):7029-32 (1983); Skory C.D., *Appl. Environ. Microbiol.* 66(6):2343-8 (2000); y Read et al., *Proteins* 43(2):175-185 (2001). Por ejemplo, en células CHO, se ha mostrado que los isotipos de LDH son productos intermedios del tetrámero A3B y A2B2. Jeong et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289(5):1141-9 (2001). Estudios previos han mostrado que regular por disminución LDHa en células CHO alterando el gen mediante recombinación homóloga (Chen et al., *Biotechnol. Bioeng.* 72(1):55-61 (2001)), tecnología antisentido (Jeong et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289(5):1141-9 (2001)) o ARN interferente pequeño o corto (ARNip) (Kim y Lee, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74(1):152-9 (2007)) puede reducir el nivel de lactato, pero no logró una mejora apreciable en la productividad de proteína. Por ejemplo, en el caso de ARNip específico de LDHa, aún cuando hubo una supuesta reducción del 45-79 % en el nivel de lactato, no hubo mejora significativa en la

productividad específica (Qp) y el título de producto (anticuerpo), sugiriendo que la inactivación de LDHa sola en células CHO no es suficiente para mejorar Qp y el rendimiento de producto eficazmente. Así, se necesitan métodos más eficientes para reducir la producción de lactato para lograr una mejor producción terapéutica de polipéptidos.

- 5 El documento WO 02/04598 desvela añadir inhibidores químicos de piruvato quinasas a medios de cultivo celular para reducir la producción de lactato.

Breve resumen de la invención

10 La presente invención proporciona métodos y composiciones para reducir la producción de lactato y aumentar la producción de polipéptidos en células cultivadas. Los inventores han descubierto que la regulación por disminución simultánea de una LDH y de las PDHK mediante los ARNip en células cultivadas que expresan polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) disminuyó el nivel de lactato, la velocidad de producción de lactato y la osmolalidad y aumentó la productividad específica de polipéptidos (por ejemplo, productividad específica) y la producción de polipéptidos
15 (por ejemplo, productividad). Además, estas células cultivadas con LDH y las PDHK reguladas por disminución no presentaron impacto negativo sobre el crecimiento celular, viabilidades celulares y la calidad de los polipéptidos producidos.

20 En un aspecto, la invención proporciona un método de reducción de la producción de lactato en células cultivadas, comprendiendo el método cultivar células que expresan a) un ARN interferente pequeño (ARNip) específico para una lactato deshidrogenasa (LDH) y b) un ARNip específico para una piruvato deshidrogenasa quinasa (PDHK).

25 En otro aspecto, la invención proporciona células en cultivo que comprenden a) un ARNip específico para una LDH y un ARNip específico para una PDHK.

30 En algunas realizaciones, las células cultivadas expresan adicionalmente un ARNip específico para una segunda PDHK. En algunas realizaciones, las células cultivadas expresan adicionalmente un ARNip específico para una tercera PDHK. En algunas realizaciones, las células cultivadas expresan adicionalmente un ARNip específico para una cuarta PDHK.

35 En otro aspecto, la invención proporciona un método de reducción de la producción de lactato en células cultivadas, comprendiendo el método cultivar células que comprenden una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARN interferente pequeño (ARNip) específico para una lactato deshidrogenasa (LDH) y una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una piruvato deshidrogenasa quinasa (PDHK), en el que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor y en el que la segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un segundo promotor.

40 En otro aspecto, la invención proporciona células en cultivo que comprenden una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un primer ARNip específico para una LDH y una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un segundo ARNip específico para una PDHK, en el que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor y en el que la segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un segundo promotor.

45 En algunas realizaciones, las células comprenden además una tercera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una segunda PDHK y en las que la tercera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un tercer promotor. En algunas realizaciones, las células comprenden además una cuarta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una tercera PDHK y en las que la cuarta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un cuarto promotor. En algunas realizaciones, las células comprenden además una quinta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una quinta PDHK y en las que la quinta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un quinto promotor.

55 En algunas realizaciones, la LDH es LDHa, LDHb, o LDHc.

60 En algunas realizaciones, la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK1, PDHK2, PDHK3 y PDHK4. En algunas realizaciones, la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK1, PDHK2 y PDHK3. En algunas realizaciones, la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK1 y PDHK2. En algunas realizaciones, la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK1 y PDHK3. En algunas realizaciones, la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK2 y PDHK3.

65 En algunas realizaciones, el método de reducción de la producción de lactato en células cultivadas comprende cultivar células que comprenden una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una lactato deshidrogenasa (LDH) y una segunda, tercera y cuarta secuencias de ácidos nucleicos heterólogos que codifican tres ARNip diferentes específicos para una primera, segunda y tercera PDHK, en el que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor y en el que la

segunda, tercera y cuarta secuencias de ácidos nucleicos heterólogas están unidas operativamente a un segundo, tercero y cuarto promotores, respectivamente. En algunas realizaciones, la LDH es LDHa, en la que la primera PDHK es PDHK1, la segunda PDHK es PDHK2 y la tercera PDHK es PDHK3.

5 En algunas realizaciones, las células en cultivo comprenden una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un primer ARNip específico para una LDH y una segunda, tercera y cuarta secuencias de ácidos nucleicos heterólogas que codifican tres ARNip diferentes específicos para una primera, segunda y tercera PDHK, en la que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor y en la que la segunda, tercera y cuarta secuencias de ácidos nucleicos heterólogas están unidas operativamente a un
10 segundo, tercero y cuarto promotores, respectivamente. En algunas realizaciones, la LDH es LDHa, en la que la primera PDHK es PDHK1, la segunda PDHK es PDHK2 y la tercera PDHK es PDHK3.

En algunas realizaciones, las células cultivadas producen un polipéptido heterólogo. En algunas realizaciones, el polipéptido heterólogo es un anticuerpo.

15 En algunas realizaciones, la velocidad de síntesis de lactato de las células cultivadas es inferior a la velocidad de consumo de lactato. En algunas realizaciones, la tasa promedio de producción de lactato es inferior a un valor negativo de aproximadamente 0,02 mg/10⁶ células/día.

20 En algunas realizaciones, las células cultivadas que contienen ARNip específicos para la LDH y las PDHK tienen una osmolalidad inferior a aproximadamente 300 mOsm.

En algunos aspectos de la divulgación, las células cultivadas tienen una productividad específica (Qp) de al menos aproximadamente el 75 % superior a las células cultivadas sin la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que comprende una o más PDHK y la LDH.

25 En algunas realizaciones, las células cultivadas tienen una productividad específica (Qp) de al menos aproximadamente el 75 % superior a las células cultivadas sin los ARNip específicos para la LDH y las PDHK.

30 En algunos aspectos de la divulgación, las células cultivadas tienen una productividad de polipéptidos (por ejemplo, productividad o título de anticuerpos en g/l) superior de aproximadamente 10 % a aproximadamente 800 % en comparación con las células cultivadas sin la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que comprende una o más PDHK y la LDH. En algunas realizaciones, las células cultivadas tienen una productividad de polipéptidos superior de aproximadamente 55 % en comparación con las células cultivadas sin la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que comprende una o más PDHK y la LDH. En algunas realizaciones, las células cultivadas tienen una
35 productividad de polipéptidos superior de al menos aproximadamente 68 % en comparación con las células cultivadas sin la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que comprende una o más PDHK y la LDH.

40 En algunas realizaciones, las células cultivadas tienen una productividad de polipéptidos superior de aproximadamente 10 % a aproximadamente 800 % en comparación con las células cultivadas sin los ARNip específicos para una o más PDHK y la LDH. En algunas realizaciones, las células cultivadas tienen una productividad de polipéptidos superior de aproximadamente 55 % en comparación con las células cultivadas sin los ARNip específicos para una o más PDHK y la LDH. En algunas realizaciones, las células cultivadas tienen una productividad de polipéptidos superior de al menos aproximadamente 68 % en comparación con las células cultivadas sin los ARNip específicos para una o más PDHK y la LDH.

45 En algunas realizaciones, las células cultivadas son células de mamífero. En algunas realizaciones, las células cultivadas son células no de mamífero.

50 En otro aspecto, la invención proporciona un método de silenciamiento o regulación por disminución de la transcripción de LDH y PDHK en una célula cultivada que comprende: introducir en la célula un vector que comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para la LDH y una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para la PDHK, en el que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor y en el que la
55 segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un segundo promotor, en la que los ARNip se expresan, silenciando o regulando así por disminución la transcripción génica de la LDH y la PDHK.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de producción de una célula que presenta producción de lactato reducida en cultivo, que comprende introducir en la célula un vector que comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para la LDH y una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para la PDHK, en el que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor y en el que la segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un segundo promotor.

60 En otro aspecto, la invención proporciona un vector que comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARN interferente pequeño (ARNip) específico para una lactato deshidrogenasa (LDH) y
65

una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una piruvato deshidrogenasa quinasa (PDHK), en el que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor y en el que la segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un segundo promotor.

5 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra construcción de ARNip que se dirige a LDHa/PDHK1, 2, 3. ARNip que se dirigen a LDHa, PDHK1, PDHK2 y PDHK3 se clonaron en un único vector de higromicina pSilencer 3.1. La secuencia de direccionamiento para LDHa estuvo bajo la regulación del promotor U6 mientras que los ARNip para PDHK1, 2 y 3 estuvieron bajo la regulación del promotor H1.

10 La Figura 2 muestra niveles de expresión relativa de ARNm de LDHa, PDHK1, 2 y 3 en 12 clones de ARNip seleccionados (como se muestra en color gris claro). Los niveles de expresión de LDHa y de las PDHK se normalizaron al gen de mantenimiento b-microglobulina. Se mostraron los niveles de expresión promedio de ARNm de 12 clones de control en color gris oscuro.

15 La Figura 3 muestra perfiles de lactato, velocidades promedio de producción de lactato y valores de pH del día 14 en la evaluación de matraz oscilante de lotes alimentados. Las concentraciones de lactato se midieron usando el analizador Nova en el día 3, 7, 10 y 14 durante una evaluación de matraz oscilante de 14 días. 3A). Perfil de lactato de clones de control (gris oscuro) y de ARNip (gris claro); 3B). Velocidad promedio de producción de lactato entre los días 3 y 14 ($\text{mg}/10^6$ células/día); y 3C). Valores de pH del día 14. Los experimentos en matraz oscilante de lotes alimentados se realizaron 3 veces y los datos mostrados son de 1 experimento.

20 La Figura 4 muestra los perfiles del título, productividad específica (Q_p) y crecimiento celular en la evaluación en matraz oscilante de lotes alimentados. 4A). Título del día 14 (productividad) en g/l; 4B). Productividad específica en $\text{pg}/\text{célula}/\text{día}$; y 4C). Medida del crecimiento celular por cifra de células viables integradas (IVCC) en 100 millones de células por día por litro. Los clones de control están en gris oscuro y los clones de ARNip están en gris claro.

25 La Figura 5 muestra el perfil de lactato, velocidad promedio de producción de lactato y perfil de osmolalidad en evaluaciones en biorreactor de 2 l. 5A). Perfil de lactato; 5B). Velocidades promedio de producción de lactato; y 5C). Perfil de osmolalidad.

30 La Figura 6 muestra el perfil de productividad de células cultivadas que contienen clones de ARNip, de control o parentales en la evaluación en biorreactor de 2 l.

35 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona métodos y composiciones para reducir la producción de lactato y aumentar la producción de polipéptidos en células cultivadas. Los inventores han descubierto que la regulación por disminución simultánea de una LDH y de las PDHK mediante ARNip por un proceso conocido como interferencia por ARN (iARN) en células cultivadas que expresan polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos) disminuyó el nivel de lactato, la velocidad de producción de lactato y la osmolalidad celular y aumentó la productividad específica de polipéptidos (por ejemplo, productividad específica) y producción de polipéptidos (por ejemplo, productividad). Además, estas células cultivadas con LDH y con las PDHK reguladas por disminución no presentaron impacto negativo sobre el crecimiento celular, las viabilidades celulares y la calidad de polipéptidos producidos. Así, sin desear ceñirse a teoría alguna, la disminución de la conversión de piruvato-lactato por inactivación de la expresión de una LDH y la promoción de piruvato en el ciclo del ácido tricarbóxico (ciclo de TCA o de Krebs) por inactivación de la expresión de una o más PDHK puede crear un efecto sinérgico en la reducción de lactato y proporcionar células con más energía y productos intermedios metabólicos. Estos efectos pueden conducir a su vez al aumento de la producción de polipéptidos (por ejemplo, anticuerpo) en células cultivadas.

50 Por consiguiente, en un aspecto de la invención, se proporciona un método de reducción de la producción de lactato en células cultivadas, que comprende cultivar células que expresan a) un ARNip específico para una LDH y b) un ARNip específico para una PDHK.

55 En otro aspecto, se proporcionan células en cultivo que comprenden a) un ARNip específico para una LDH y un ARNip específico para una PDHK.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de reducción de la producción de lactato en células cultivadas, que comprende cultivar células que comprenden una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una LDH y una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una PDHK, en el que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor y en el que la segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un segundo promotor.

65 En otro aspecto más, la invención proporciona células en cultivo que comprenden una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un primer ARNip específico para una LDH y una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un segundo ARNip específico para una PDHK, en el que la primera secuencia de

ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor y en el que la segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un segundo promotor.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la experiencia de la materia. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, tales como, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practical approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies: a practical approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using antibodies: a laboratory manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).

Definiciones

Como se usa en el presente documento, el término "células en cultivo" o "células cultivadas" se refiere a dos o más células en una solución (por ejemplo, un medio celular) que permite que las células experimenten una o más divisiones celulares.

El término "polinucleótido" o "ácido nucleico", como se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero por ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación a la estructura del nucleótido puede conferirse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes de no nucleótido. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente de marca. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "tapas", sustitución de uno o más de los nucleótidos que existen de forma natural con un análogo, modificaciones de internucleótidos tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces sin carga (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellos que contienen restos laterales tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), aquellos con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa-anoméricos, etc.), además de formas sin modificar del (de los) polinucleótido(s). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo generalmente presente en los azúcares puede sustituirse, por ejemplo, con grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse por grupos protectores convencionales o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o pueden conjugarse con soportes sólidos. Los OH del extremo 5' y 3' pueden fosforilarse o sustituirse con aminas o restos de grupos de terminación orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que generalmente son conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa-anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales como metilribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden sustituirse con grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero no se limitan a, realizaciones en las que el fosfato está sustituido con P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en las que cada R o R' es independientemente H o alquilo (1-20 C) sustituido o sin sustituir que opcionalmente contiene un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos citados en el presente documento, que incluyen ARN y ADN.

El término "interferencia por ARN (iARN)" se refiere al proceso de silenciamiento génico transcripcional específico de secuencia (por ejemplo, silenciamiento génico post-transcripcional) mediado o iniciado por ARNiP. Sin desear ceñirse a teoría alguna, durante la iARN, en la práctica de los métodos de la invención, el ARNiP puede inducir la degradación de ARNm diana con la posterior inhibición específica de secuencia de la expresión génica de una LDH y una o más PDHK.

El término “ácido nucleico heterólogo” o “polipéptido heterólogo” se refiere a un ácido nucleico o un polipéptido cuya secuencia no es idéntica a la de otro ácido nucleico o polipéptido naturalmente encontrado en la misma célula huésped.

5 El término “ARN interferente pequeño”, “ARN interferente corto” o “ARNip” se refiere a un dúplex de ARN de nucleótidos, o, en algunos aspectos alternativos, una molécula de ARN individual que se dirige a un ácido nucleico de interés, por ejemplo, una LDH o PDHK(s). Los ARNip comprenden una hebra de ARN sentido y una hebra de ARN antisentido complementaria hibridadas juntas por interacciones de apareamiento de bases de Watson-Crick convencionales. El ARNip puede tanto transfectarse directamente como producirse de otro modo en una célula cultivada.

10 En una variación, la hebra de ARN sentido y la hebra de ARN antisentido complementaria se enlazan por un espaciador que conduce a la expresión de una estructura de tallo-bucle o de horquilla llamado ARN de horquilla pequeña (ARNhp). La horquilla se escinde entonces por una endonucleasa (por ejemplo, Dicer) para generar un ARNip. En otra variación, el ARNhp es un ARNhp bi-funcional que consiste en dos estructuras de tallo-bucle, con una estructura de tallo-bucle compuesta de secuencia completamente apareada que guía al dúplex de ARN para la degradación de ARNm mediante carga de RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN) dependiente de escisión y con la segunda estructura de tallo-bucle compuesta de hebra de desapareamiento del ARNm mediante secuestro de ARNm mediante carga de RISC independiente de escisión.

15 Como se usa en el presente documento, un ARNip “específico” para una LDH o PDHK se refiere a un ARNip que se dirige a un ácido nucleico de interés (por ejemplo, una LDH o PDHK(s)) y que la secuencia de nucleótidos de la porción de dúplex del ARNip es complementaria a una secuencia de nucleótidos del gen elegido como diana (por ejemplo, una LDH o PDHK(s)).

20 Como se usa en el presente documento, “unidas(os) operativamente”, como se usa en el presente documento, se refiere a una relación funcional entre dos o más segmentos de ácido nucleico (por ejemplo, ADN). Normalmente, se refiere a la relación funcional de la secuencia reguladora de la transcripción con una secuencia transcrita. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante, tal como un ácido nucleico de la invención, si estimula o modula la transcripción de la secuencia codificante en una célula huésped apropiada u otro sistema de expresión. Generalmente, las secuencias reguladoras de la transcripción del promotor que están unidas operativamente a una secuencia transcrita están físicamente contiguas a la secuencia transcrita, es decir, están actuando en *cis*. Sin embargo, algunas secuencias reguladoras de la transcripción, tales como potenciadores, no necesitan estar físicamente contiguas o localizadas en estrecha proximidad a las secuencias codificantes cuya transcripción potencian.

25 Como se usa en el presente documento, el término “promotor” incluye todas las secuencias capaces de conducir la transcripción de una secuencia codificante en una célula cultivada, por ejemplo, una célula de mamífero. Así, los promotores usados en las construcciones de la invención incluyen elementos de control de la transcripción que actúan en *cis* y secuencias reguladoras que participan en regular o modular el momento exacto y/o velocidad de transcripción de un gen (por ejemplo, una LDH o PDHK(s)). Por ejemplo, un promotor puede ser un elemento de control de la transcripción que actúa en *cis*, que incluye un potenciador, un promotor, un terminador de la transcripción, un origen de replicación, una secuencia de integración cromosómica, regiones no traducidas 5' y 3', o una secuencia intrónica, que participan en la regulación de la transcripción. Estas secuencias que actúan en *cis* normalmente interactúan con proteínas u otras biomoléculas para llevar a cabo (encender/apagar, regular, modular, etc.) la transcripción. Promotores “constitutivos” son aquellos que conducen la expresión continuamente en la mayoría de las condiciones medioambientales y estados de desarrollo o diferenciación celular. Los promotores “inducibles” o “regulables” dirigen la expresión del ácido nucleico de la invención bajo la influencia de condiciones medioambientales o condiciones de desarrollo. Ejemplos de condiciones medioambientales que pueden afectar la transcripción por promotores inducibles incluyen condiciones anaerobias, temperatura elevada, sequía, o la presencia de luz.

30 Como se usa en el presente documento, “vector” significa una construcción que es capaz de administrar y preferentemente expresar, uno o más gen(es) o secuencia(s) de interés (por ejemplo, LDHa y PDHK(s)) en una célula huésped. Ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores virales, vectores de expresión de ADN desnudo o ARN, vectores de plásmido, cósmido o fago, vectores de expresión de ADN o ARN asociados a agentes de condensación catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas y ciertas células eucariotas, tales como células productoras. Vectores adecuados son aquellos que son compatibles con la célula huésped empleada. Vectores adecuados pueden proceder, por ejemplo, de una bacteria, un virus (tal como bacteriófago T7 o un fago derivado de M-13), un cósmido, una levadura, o una planta. Protocolos para obtener y usar tales vectores son conocidos para aquellos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor, 1989).

35 Como se usa en el presente documento, la velocidad promedio de producción de lactato se calcula como la velocidad de síntesis de lactato menos la velocidad de consumo de lactato en mg/células/día.

Como se usa en el presente documento, “productividad específica” o “Qp” se refiere a la velocidad de producción de proteínas específicas, por ejemplo, anticuerpo, en pg/célula/día. La productividad específica se calcula como el título de proteína (pg/célula/día)/IVCC (calcular la cifra de células viables integrada; célula/día).

5 Los términos “polipéptido” y “proteína” se usan indistintamente en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por no aminoácidos. Los términos también engloban un polímero de aminoácido que ha sido modificado naturalmente o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación
10 con un componente de marca. También están incluidos dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), además de otras modificaciones conocidas en la técnica.

15 El término “anticuerpo” se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos.

20 “Fragmentos de anticuerpos” comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión al antígeno o región variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; moléculas de anticuerpo monocatenario; diacuerpos; anticuerpos lineales; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

25 El término “anticuerpo monoclonal”, como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que existen de forma natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un sitio antigénico único. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. El adjetivo
30 “monoclonal” indica que el carácter del anticuerpo es que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse como que requiera la producción del anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse según la presente invención pueden prepararse por el método de hibridoma descritos por primera vez por Kohler et al, Nature 256:495 (1975), o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 4.816.567). Los
35 “anticuerpos monoclonales” también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), por ejemplo.

40 Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico a u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, además de fragmentos de tales anticuerpos, mientras que presenten la actividad biológica deseada (la patente de EE.UU. N.º 4.816.567; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).
45

50 El término “región hipervariable”, cuando se usa en el presente documento, se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácidos de una “región determinante de la complementariedad” o “CDR” (es decir, los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o aquellos residuos de un “bucle hipervariable” (es decir, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chotia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Residuos de la “región estructural” o de “FR” son aquellos residuos del dominio variable distintos de los “residuos de la región hipervariable” como se ha definido en el presente documento.
55

60 Formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima procedente de inmunoglobulina no humana. En general, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo de receptor) en las que los residuos de la región hipervariable del receptor están sustituidos con “residuos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo de donante) tal como ratón, rata, conejo o humano no primate que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana están sustituidos con residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo del receptor o en el anticuerpo del donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá
65 sustancialmente todos de al menos uno y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente

5 todos los bucles hipervariables se corresponden con aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles véase Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

10 Como se usa en el presente documento, el término "inmuno adhesina" designa moléculas similares a anticuerpo que combinan el "dominio de unión" de una proteína "adhesina" heteróloga (por ejemplo, un receptor, ligando o enzima) con las funciones efectoras de un dominio constante de la inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de la secuencia de aminoácidos de la adhesina con la especificidad de unión deseada que es distinta del sitio de reconocimiento y de unión del antígeno (sitio de combinación del antígeno) de un anticuerpo (es decir, es "heterólogo") y una secuencia del dominio constante de inmunoglobulina. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmuno adhesina procede preferentemente de las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ ya que las inmuno adhesinas que comprenden estas regiones pueden purificarse por cromatografía en proteína A (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)).

20 El término "dominio de unión al ligando", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier receptor de la superficie celular nativo o a cualquier región o derivado del mismo que retenga al menos una unión a ligando cualitativa de un receptor nativo correspondiente. En una realización específica, el receptor es de un polipéptido de la superficie celular que tiene un dominio extracelular que es homólogo a un miembro de la familia de supergenes de la inmunoglobulina. Otros receptores, que no son miembros de la familia de supergenes de la inmunoglobulina, pero están sin embargo específicamente cubiertos por esta definición, son receptores para citocinas y en particular receptores con actividad de tirosina quinasas (tirosina quinasas de receptor), miembros de las superfamilias de la hematopoyetina y de receptores del factor de crecimiento nervioso y moléculas de adhesión a células, por ejemplo (E-, L- y P-) selectinas.

30 El término "dominio de unión al receptor" se usa para designar cualquier ligando nativo para un receptor, que incluye moléculas de adhesión a células, o cualquier región o derivado de tal ligando nativo que retiene al menos una capacidad de unión al receptor cualitativa de un ligando nativo correspondiente. Esta definición, entre otras, incluye específicamente secuencias de unión de ligandos para los receptores anteriormente mencionados.

35 Una "quimera anticuerpo-inmuno adhesina" comprende una molécula que combina al menos un dominio de unión de un anticuerpo (como se define en el presente documento) con al menos una inmuno adhesina (como se define en la presente solicitud). Quimeras anticuerpo-inmuno adhesina a modo de ejemplo son las quimeras CD4-IgG biespecíficas como se describen en Berg et al., PNAS (USA) 88:4723-4727 (1991) y Chamow et al., J. Immunol. 153:4268 (1994).

40 El término "osmolalidad" se refiere al número de partículas de soluto disueltas en 1 litro de solución. Los solutos que pueden añadirse al medio de cultivo para aumentar la osmolalidad del mismo incluyen proteínas, péptidos, aminoácidos, polímeros no metabolizados, vitaminas, iones, sales (por ejemplo, sales de sodio o de potasio), azúcares, metabolitos, ácidos orgánicos, lípidos, etc. Cuando se usa en el presente documento, la abreviatura "mOsm" significa "miliosmoles/litro de H₂O".

45 Como se usa en el presente documento, una "célula huésped" incluye una célula individual, células cultivadas, o célula en cultivo que puede ser o ha sido un receptor para vector(es) o ARNip(s) para la incorporación de insertos de polinucleótido para producir polipéptido. Las células huésped incluyen progenie de una célula cultivada individual y la progenie puede no necesariamente ser completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN genómico) a la célula parental original debido a mutación natural, accidental o deliberada.

50 Para su uso en el presente documento, a menos que se indique claramente de otro modo, el uso de los términos "un", "una" y similares se refiere a uno o más.

55 Referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) realizaciones que se refieren a ese valor o parámetro por sí mismo. Por ejemplo, descripción con referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X". Los intervalos numéricos son inclusivos de los números que definen el intervalo.

60 Se entiende que en cualquier parte donde se describen realizaciones en el presente documento con el lenguaje "que comprende", también se proporcionan realizaciones de otro modo análogas descritas en términos de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en".

65 Donde los aspectos o realizaciones de la invención se describen en términos de un grupo de Markush u otra agrupación de alternativas, la presente invención engloba no solo el grupo entero enumerado en conjunto, sino cada miembro del grupo individualmente y todos los posibles subgrupos del grupo principal, pero también el grupo principal ausente de uno o más de los miembros de grupo. La presente invención también prevé la exclusión explícita de uno o más de cualquiera de los miembros del grupo en la invención reivindicada.

Métodos de reducción de la producción de lactato

Los métodos en el presente documento implican cultivar células que expresan ARNip específicos para una LDH y al menos una o más PDHK para reducir la producción de lactato mediante interferencia por ARN (iARN). En un aspecto, el método comprende cultivar células que expresan a) un ARNip específico para LDH y b) un ARNip específico para una PDHK.

En algunas realizaciones, las células cultivadas expresan adicionalmente un ARNip específico para una segunda PDHK. En algunas realizaciones, las células cultivadas expresan adicionalmente un ARNip específico para una tercera PDHK. En algunas realizaciones, las células cultivadas expresan adicionalmente un ARNip específico para una cuarta PDHK.

En otro aspecto, el método comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una LDH y una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una PDHK, en el que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor y en el que la segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un segundo promotor.

En otro aspecto, se proporciona un método de silenciamiento o regulación por disminución de la transcripción de LDH y PDHK en una célula cultivada que comprende: introducir en la célula un vector que comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para la LDH y una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para la PDHK, en el que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor y en el que la segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un segundo promotor, en el que los ARNip se expresan, silenciando o regulando así por disminución la transcripción génica de la LDH y la PDHK.

En algunas realizaciones, las células cultivadas comprenden además una tercera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una segunda PDHK y en las que la tercera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un tercer promotor. En algunas realizaciones, las células cultivadas comprenden además una cuarta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una tercera PDHK y en las que la cuarta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un cuarto promotor. En algunas realizaciones, las células cultivadas comprenden además una quinta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una quinta PDHK y en las que la quinta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un quinto promotor.

En algunas realizaciones, la LDH es LDHa, LDHb o LDHc. En algunas realizaciones, la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK1, PDHK2, PDHK3 y PDHK4. En algunas realizaciones, la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK1, PDHK2 y PDHK3. En algunas realizaciones, la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK2, PDHK3 y PDHK4. En algunas realizaciones, la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK1, PDHK3 y PDHK4. En algunas realizaciones, la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK1 y PDHK2. En algunas realizaciones, la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK1 y PDHK3. En algunas realizaciones, la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK2 y PDHK3. En algunas realizaciones, la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK2 y PDHK4. En algunas realizaciones, la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK3 y PDHK4.

En algunas realizaciones, el método comprende cultivar células que expresan a) un ARNip específico para LDHa y b) un ARNip específico para PDHK1, PDHK2 y PDHK3, respectivamente. En algunas realizaciones, el método comprende cultivar células que expresan a) un ARNip específico para LDHb y b) un ARNip específico para PDHK1, PDHK2 y PDHK3, respectivamente. En algunas realizaciones, el método comprende cultivar células que expresan a) un ARNip específico para LDHc y b) un ARNip específico para PDHK1, PDHK2 y PDHK3, respectivamente.

En algunas realizaciones, el método comprende cultivar células que expresan a) un ARNip específico para LDHa, LDHb o LDHc y b) un ARNip específico para dos PDHK, en las que la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK1, PDHK2, PDHK3 y PDHK4. Por ejemplo, el método comprende cultivar células que expresan a) un ARNip específico para LDHa y b) un ARNip específico para PDHK1 y PDHK2, respectivamente.

En algunas realizaciones, el nivel de expresión de ARNm para una LDH se reduce al menos aproximadamente el 75 % y el nivel de expresión de ARNm para una PDHK se reduce al menos aproximadamente el 25 % en células cultivadas que expresan a) un ARNip específico para una LDH y b) un ARNip específico para una PDHK en comparación con células cultivadas sin los ARNip específicos para una LDH y una PDHK. En algunas realizaciones, la LDH es LDHa, LDHb o LDHc y el nivel de expresión de ARNm para la LDH se reduce al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 %. En algunas realizaciones, la PDHK es PDHK1, PDHK2 o PDHK3 y el nivel de expresión de ARNm para la PDHK se reduce al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos

aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 %.

5 En algunas realizaciones, en células cultivadas que expresan a) un ARNip específico para LDHa y b) un ARNip específico para PDHK1, PDHK2 y PDHK3, el nivel de expresión de ARNm para LDHa se reduce aproximadamente el 90 % y los niveles de expresión de ARNm para PDHK1, PDHK2 y PDHK3 se reducen aproximadamente el 32 %, 83 % y 70 %, respectivamente, en comparación con células cultivadas sin los ARNip específicos para la LDHa, PDHK1, PDHK2 y PDHK3.

10 En algunas realizaciones, el método comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para LDHa, LDHb, o LDHc, una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para PDHK1, una tercera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para PDHK2 y una cuarta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para PDHK3, en las que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor y en las que la segunda, tercera y cuarta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un segundo promotor.

15 En algunas realizaciones, el método comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para LDHa, LDHb o LDHc, una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una PDHK y una tercera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una PDHK, en las que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor, en las que la segunda y tercera secuencias de ácidos nucleicos heterólogas están unidas operativamente a un segundo promotor y en las que la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK1, PDHK2, PDHK3 y PDHK4.

20 En algunas realizaciones, el nivel de expresión de ARNm para una LDH se reduce al menos aproximadamente el 75 % y el nivel de expresión de ARNm para una PDHK se reduce al menos aproximadamente el 25 % en células cultivadas que comprenden una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una LDH y una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una PDHK en comparación con células cultivadas sin la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que comprende la LDH y una o más PDHK, en las que la primera secuencia de ácidos nucleicos heterólogo está unida operativamente a un primer promotor y en las que la segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un segundo promotor. En algunas realizaciones, la LDH es LDHa, LDHb o LDHc y el nivel de expresión de ARNm para la LDH se reduce al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 %. En algunas realizaciones, la PDHK es PDHK1, PDHK2 o PDHK3 y el nivel de expresión de ARNm para la PDHK se reduce al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 %.

45 En algunas realizaciones, en células cultivadas que comprenden una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para LDHa, una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para PDHK1, una tercera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para PDHK2 y una cuarta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para PDHK3, en las que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor y en las que la segunda, tercera y cuarta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un segundo promotor, el nivel de expresión de ARNm para LDHa se reduce aproximadamente el 90 % y los niveles de expresión de ARNm para PDHK1, PDHK2 y PDHK3 se reducen aproximadamente el 32 %, 83 % y el 70 %, respectivamente, en comparación con células cultivadas sin los ARNip específicos para la LDHa, PDHK1, PDHK2 y PDHK3.

55 El ARNip usado en la invención descrita en el presente documento puede obtenerse o prepararse a partir de una variedad de fuentes, por ejemplo, producirse *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el ARNip puede contener de aproximadamente 1 a aproximadamente 200 nucleótidos, de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos, o de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos. En algunas realizaciones, la longitud del ARNip es inferior a 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, la longitud de los ARNip es superior a 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, el ARNip puede ser 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9 o menos nucleótidos de longitud.

65 En algunas realizaciones, el ARNip puede generarse por síntesis química, por transcripción *in vitro* usando una polimerasa, o por una digestión con endorribonucleasa (por ejemplo, Dicer) de ARN bicatenario largo (ARNbc). En

algunas realizaciones, el ARNip puede estar completamente, o en parte, comprendido por nucleótidos sintéticos, bases naturales o bases modificadas.

En algunas realizaciones, el ARNip puede expresarse intracelularmente. El ARNip puede codificarse por una secuencia de ácidos nucleicos y la secuencia de ácidos nucleicos también puede incluir uno o más promotores. La secuencia de ácidos nucleicos también puede incluir una señal de poliadenilación. En algunas realizaciones, pueden producirse hebras codificantes y no codificantes del dúplex de ARN a partir de dos promotores independientes e hibridarse con la célula cultivada. En algunas realizaciones, las hebras codificantes y no codificantes del dúplex de ARN también pueden enlazarse por un espaciador de pares de bases (por ejemplo, un espaciador de pares de bases puede comprender un único par de bases o múltiples pares de bases) o un tallo-bucle para formar un ARNhp y expresarse por un único promotor. En algunas realizaciones, el ARNhp puede ser un ARNhp bi-funcional. La horquilla puede escindir-se por una endorribonucleasa (por ejemplo, Dicer) para generar moléculas de ARNip efectivas. El espaciador o tallo-bucle está situado entre las hebras codificantes y no codificantes que forman el dúplex. El tallo-bucle puede variar en longitud. En algunas realizaciones, el tallo-bucle tiene 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 o más nucleótidos de longitud. La estructura de horquilla también puede contener porciones de nucleótidos protuberantes 3' o 5'. En algunas realizaciones, el nucleótido protuberante es un nucleótido protuberante de 3' o 5' de 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos de longitud. Las composiciones y métodos para la regulación de genes mediada por ARN por ARNip, ARNhp o ARNhp bifuncional se describen, por ejemplo, en la solicitud de EE.UU. N.º 20090215860, Rutz and Scheffold, *Arthritis Research & Therapy*, 6(2):78-85 (2004) y Rao et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 61:746-759 (2009).

En algunas realizaciones, el ARNip usado en la presente invención pueden tener homología perfecta con secuencias diana para producir respuestas específicas de diana. En algunas realizaciones, el ARNip usado en la presente invención tiene aproximadamente cualquiera del 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 92 %, 91 %, 90 %, 88 %, 86 %, 84 %, 82 %, 80 %, 78 %, 76 %, 74 %, 72 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o el 5 % de homología con secuencias diana. En una variación, el ARNip usado en la presente invención puede hibridarse bajo condiciones fisiológicas con una secuencia diana de ácido nucleico, por ejemplo, puede hibridarse específicamente con una secuencia diana en una célula, por ejemplo, *in vivo*. En otra variación, el ARNip se dirige a más de una secuencia diana, marcador diana o gen indicador.

El grado de identidad de secuencias (homología) necesario para el direccionamiento *in vivo* de un ARNip a un ácido nucleico diana (por ejemplo, unión específica de un ARNip a una secuencia diana en una célula bajo condiciones fisiológicas) puede probarse bajo condiciones de selección rutinarias, por ejemplo, en cultivo celular y similares.

En algunas realizaciones, la secuencia diana para PDHK1 es GCAGTTCCTGGACTTCGGA (SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, la secuencia diana para PDHK2 es CATTTCAGTACTTCTTGAC (SEQ ID NO: 3). En algunas realizaciones, la secuencia diana para PDHK3 es TGTAGCTGATGTCGTGAAA (SEQ ID NO: 4).

La lactato deshidrogenasa (LDH) convierte el piruvato en lactato. El número de accesos de polipéptidos y ácidos nucleicos de LDH a modo de ejemplo (por ejemplo, LDHa, LDHb o LDHc) incluyen, pero no se limitan a, DQ912661 (LDHa en células CHO), BC067223 (LDHa humana), BC084698 (LDHa de rata), BC094428 (LDHa de ratón), BC002362 (LDHb humana), NM_012595 (LDHb de rata), NM_008492 (LDHb de ratón), BC090043 (LDHc humana), NM_017266 (LDHc de rata) y NM_013580 (LDHc de ratón). Pueden usarse métodos convencionales conocidos por personas expertas en la materia para determinar si un polipéptido de LDH tiene actividad de LDH midiendo la capacidad del polipéptido para convertir la piruvato en lactato *in vitro*, en un extracto de células, o *in vivo*.

La piruvato deshidrogenasa quinasa (PDHK) inhibe la conversión de piruvato en acetil-CoA. El número de accesos de polipéptidos y ácidos nucleicos de PDHK1 a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, L42450 (humano), BC089783 (rata) y NM_172665 (ratón). El número de accesos de polipéptidos y ácidos nucleicos de PDHK2 a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, NM_002611 (humano), NM_030872 (rata) y NM_133667 (ratón). El número de accesos de polipéptidos y ácidos nucleicos de PDHK3 a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, L42452 (humano), BC169078 (rata) y NM_145630 (ratón). El número de accesos de polipéptidos y ácidos nucleicos de PDHK4 a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, NM_002612 (humano), NM_053551 (rata) y NM_013743 (ratón). Pueden usarse métodos convencionales conocidos por el experto en la materia para determinar si un polipéptido de PDHK tiene actividad de PDHK midiendo la capacidad del polipéptido para inhibir la conversión de piruvato en acetil-CoA *in vitro*, en un extracto de células, o *in vivo*.

Los promotores son muy conocidos en la técnica. Cualquier promotor que funcione en la célula huésped puede usarse para la expresión de ARNip específicos para una LDH y una o más de PDHK en la célula huésped. Prácticamente cualquier promotor capaz de conducir estos ARNip es adecuado para la presente invención que incluyen, pero no se limitan a, U6, H1, CYC1, HIS3, GAL1, GAL4, GAL10, ADH1, PGK, PHO5 GAPDH, T7, CMV, SV40 y EF1a. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el método comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para LDHa, una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para PDHK1, una tercera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para PDHK2 y una cuarta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para PDHK3, en las que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida

operativamente a un primer promotor U6 y en las que la segunda, tercera y cuarta secuencias de ácidos nucleicos heterólogas están unidas operativamente a un segundo promotor H1. En una variación, la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip es específica para LDHb. En otra variación, la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip es específica para LDHc.

En otro aspecto, se proporciona un método de producción de una célula que presenta producción de lactato reducida en cultivo, que comprende introducir en la célula un vector que comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para la LDH y una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para la PDHK, en el que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor y en el que la segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un segundo promotor.

La primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para la LDH y la segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica el ARNip específico para la PDHK pueden insertarse en un vector mediante una variedad de procedimientos. Por ejemplo, las secuencias de ARNip de LDH y PDHK se enlazan a la posición deseada en el vector tras la digestión del inserto y el vector con endonucleasas de restricción apropiadas, tales como KasI, BamHI, HindIII o BhlII. En algunas realizaciones, un vector que contiene secuencias de ARNip específicas para LDHa y PDHK1, PDHK2 y PDHK3 se construye insertando la secuencia de ARNip de LDHa en el sitio KasI del vector (por ejemplo, vector de higromicina pSilencer 3.1-H1) con una adición de promotor U6 en su extremo 5' inmediato, insertando las secuencias de ARNip de PDHK1 y PDHK2 en sitios BamHI/HindIII y HindIII, respectivamente, e insertando la secuencia de ARNip de PDHK3 en BglII con una adición de promotor H1 en los extremos 5' inmediatos de PDHK1, PDHK2 y PDHK3. Células cultivadas que expresan la producción de lactato reducida pueden entonces generarse transfectando los vectores que contienen ARNip de LDHa y PDHK1, PDHK2 y PDHK3.

Composiciones

Las células cultivadas producidas por los métodos descritos en el presente documento también se proporcionan en la presente invención. Las composiciones de la presente invención pueden ponerse en práctica *in vivo*, *ex vivo*, o *in vitro*. En un aspecto, se proporcionan células en cultivo que expresan a) un ARNip específico para LDH y b) un ARNip específico para una PDHK. En algunas realizaciones, las células cultivadas expresan adicionalmente un ARNip específico para una segunda PDHK. En algunas realizaciones, las células cultivadas expresan adicionalmente un ARNip específico para una tercera PDHK. En algunas realizaciones, las células cultivadas expresan adicionalmente un ARNip específico para una cuarta PDHK.

En algunas realizaciones, células en cultivo expresan a) un ARNip específico para LDHa y b) un ARNip específico para PDHK1, PDHK2 y PDHK3, respectivamente. En algunas realizaciones, células en cultivo expresan a) un ARNip específico para LDHb y b) un ARNip específico para PDHK1, PDHK2 y PDHK3, respectivamente. En algunas realizaciones, células en cultivo expresan a) un ARNip específico para LDHc y b) un ARNip específico para PDHK1, PDHK2 y PDHK3, respectivamente.

En algunas realizaciones, células en cultivo expresan a) un ARNip específico para LDHa y b) un ARNip específico para dos PDHK, en las que la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK1, PDHK2, PDHK3 y PDHK4. En algunas realizaciones, células en cultivo expresan a) un ARNip específico para LDHb y b) un ARNip específico para dos PDHK, en las que la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK1, PDHK2, PDHK3 y PDHK4. En algunas realizaciones, células en cultivo expresan a) un ARNip específico para LDHc y b) un ARNip específico para dos PDHK, en las que la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK1, PDHK2, PDHK3 y PDHK4.

En otro aspecto, se proporcionan células en cultivo que comprenden una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una LDH y una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una PDHK, en las que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor y en las que la segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un segundo promotor. En algunas realizaciones, las células comprenden además una tercera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una segunda PDHK y en las que la tercera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un tercer promotor. En algunas realizaciones, las células comprenden además una cuarta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una tercera PDHK y en las que la cuarta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un cuarto promotor. En algunas realizaciones, las células comprenden además una quinta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una quinta PDHK y en las que la quinta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un quinto promotor.

En algunas realizaciones, células en cultivo comprenden una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para LDHa, una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para PDHK1, una tercera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para PDHK2 y una cuarta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico

para PDHK3, en las que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor (por ejemplo, U6) y en las que la segunda, tercera y cuarta secuencias de ácidos nucleicos heterólogas están unidas operativamente a un segundo promotor (por ejemplo, H1). En una variación, la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip es específica para LDHb. En otra variación, la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip es específica para LDHb.

En algunas realizaciones, células en cultivo comprenden una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para LDHa, una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una PDHK, una tercera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una PDHK, en las que la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK1, PDHK2, PDHK3 y PDHK4, en las que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor (por ejemplo, U6) y en las que la segunda y la tercera secuencias de ácidos nucleicos heterólogas están unidas operativamente a un segundo promotor (por ejemplo, H1). En una variación, la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip es específica para LDHb. En otra variación, la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip es específica para LDHc.

En algunas realizaciones, el cultivo celular incluye al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 50, 75, 100, 200, 500, 750, 1.000, 5.000, 7.500, 10.000, 15.000 o más células.

En otro aspecto, se desvelan células en cultivo que tienen una velocidad de la síntesis de lactato que es inferior a una velocidad de consumo de lactato. La divulgación también se refiere a las células en cultivo que tienen una velocidad promedio de producción de lactato inferior a un valor negativo de aproximadamente cualquiera de 0,2 mg/10⁶ células/día, 0,1 mg/10⁶ células/día, 0,08 mg/10⁶ células/día, 0,06 mg/10⁶ células/día, 0,04 mg/10⁶ células/día, 0,02 mg/10⁶ células/día, 0,01 mg/10⁶ células/día, 0,008 mg/10⁶ células/día, 0,006 mg/10⁶ células/día, 0,004 mg/10⁶ células/día, o 0,002 mg/10⁶ células/día.

En algunas realizaciones, células en cultivo comprenden una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para LDHa, una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para PDHK1, una tercera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para PDHK2 y una cuarta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para PDHK3, en las que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor (por ejemplo, U6), en las que la segunda, tercera y cuarta secuencias de ácidos nucleicos heterólogas están unidas operativamente a un segundo promotor (por ejemplo, H1) y en las que las células en cultivo tienen una velocidad promedio de producción de lactato de un valor negativo de aproximadamente 0,02 mg/10⁶ células/día.

En otro aspecto, se desvelan células en cultivo que contienen ARNip específico para una LDH y PDHK(s) que tienen una osmolalidad reducida. En algunos aspectos de la divulgación, células en cultivo que contienen ARNip específico para una LDH y PDHK(s) tienen una osmolalidad inferior a aproximadamente cualquiera de 500 mOsm, 450 mOsm, 400 mOsm 350 mOsm, 300 mOsm, 250 mOsm, 200 mOsm o 150 mOsm.

En algunas realizaciones, células en cultivo comprenden una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para LDHa, una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para PDHK1, una tercera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para PDHK2 y una cuarta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para PDHK3, en las que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor (por ejemplo, U6), en las que la segunda, tercera y cuarta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un segundo promotor (por ejemplo, H1) y en las que las células en cultivo tienen una osmolalidad a aproximadamente 300 mOsm.

En otro aspecto, se desvelan células en cultivo que tienen una elevada productividad específica (Qp). En algunos aspectos de la divulgación, las células cultivadas tienen una productividad específica superior de al menos aproximadamente 60 %, de al menos aproximadamente 65 %, de al menos aproximadamente 70 %, de al menos aproximadamente 75 %, de al menos aproximadamente 80 %, de al menos aproximadamente 85 %, de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % en comparación con las células cultivadas sin la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que comprende una o más PDHK y la LDH. En algunos aspectos de la divulgación, las células cultivadas tienen una productividad específica superior de aproximadamente 67 %, de aproximadamente 69 %, de aproximadamente 71 %, de aproximadamente 72 %, de aproximadamente 73 %, de aproximadamente 74 %, de aproximadamente 75 %, de aproximadamente 76 %, de aproximadamente 77 %, de aproximadamente 78 %, de aproximadamente 79 %, de aproximadamente 81 %, de aproximadamente 83 %, de aproximadamente 85 %, de aproximadamente 87 %, de aproximadamente 89 %, de aproximadamente 91 %, de aproximadamente 93 %, de aproximadamente 95 %, de aproximadamente 97 % o de aproximadamente 99 % en comparación con las células cultivadas sin la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que comprende una o más PDHK y la LDH.

En algunas realizaciones, las células en cultivo comprenden una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para LDHa, una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un

ARNip específico para PDHK1, una tercera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para PDHK2 y una cuarta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para PDHK3, en las que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor (por ejemplo, U6), en las que la segunda, tercera y cuarta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un segundo promotor (por ejemplo, H1) y en las que las células en cultivo tienen una productividad específica de aproximadamente el 75 % superior.

En otro aspecto, se proporcionan las células cultivadas producidas por el método en el presente documento con una elevada productividad de polipéptidos (por ejemplo, productividad o título de anticuerpos en g/l). En algunas realizaciones, las células cultivadas tienen una productividad de polipéptidos superior de aproximadamente 10 % a aproximadamente 800 % en comparación con las células cultivadas sin la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que comprende una o más PDHK y la LDH. En algunas realizaciones, las células cultivadas tienen una productividad de polipéptidos superior de aproximadamente 10 %, de aproximadamente 15 %, de aproximadamente 20 %, de aproximadamente 25 %, de aproximadamente 30 %, de aproximadamente 35 %, de aproximadamente 40 %, de aproximadamente 45 %, de aproximadamente 50 %, de aproximadamente 55 %, de aproximadamente 58 %, de aproximadamente 60 %, de aproximadamente 65 %, de aproximadamente 70 %, de aproximadamente 71 %, de aproximadamente 75 %, de aproximadamente 80 %, de aproximadamente 85 %, de aproximadamente 90 %, de aproximadamente 95 %, de aproximadamente 100 %, de aproximadamente 125 %, de aproximadamente 150 %, de aproximadamente 200 %, de aproximadamente 250 %, de aproximadamente 300 %, de aproximadamente 350 %, de aproximadamente 400 %, de aproximadamente 450 %, de aproximadamente 500, de aproximadamente 550 %, de aproximadamente 600 %, de aproximadamente 650 %, de aproximadamente 700 %, de aproximadamente 750 % o de aproximadamente 800 % en comparación con las células cultivadas sin la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que comprende una o más PDHK y la LDH. En algunas realizaciones, las células cultivadas tienen una productividad de polipéptidos superior de al menos aproximadamente 55 %, de al menos aproximadamente 60 %, de al menos aproximadamente 65 %, de al menos aproximadamente 68 %, de al menos aproximadamente 70 %, de al menos aproximadamente 80 %, de al menos aproximadamente 85 % o de al menos aproximadamente 90 % en comparación con las células cultivadas sin la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que comprende una o más PDHK y la LDH.

En algunas realizaciones, células en cultivo comprenden una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para LDHa, una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para PDHK1, una tercera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para PDHK2 y una cuarta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para PDHK3, en las que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor (por ejemplo, U6), en la que la segunda, tercera y cuarta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un segundo promotor (por ejemplo, H1) y en las que las células cultivadas tienen una productividad de anticuerpos (por ejemplo, en g/l) de al menos aproximadamente el 68 % superior a las células cultivadas sin la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que comprende la PDHK1, PDHK2, PDHK3 y LDHa.

En algunas realizaciones, las células cultivadas tienen una productividad de polipéptidos superior de aproximadamente 10 % a aproximadamente 800 % en comparación con las células cultivadas sin los ARNip específicos para una o más PDHK y la LDH (en algunas realizaciones, un anticuerpo). En algunas realizaciones, las células cultivadas tienen una productividad de polipéptidos superior de aproximadamente 10 %, de aproximadamente 15 %, de aproximadamente 20 %, de aproximadamente 25 %, de aproximadamente 30 %, de aproximadamente 35 %, de aproximadamente 40 %, de aproximadamente 45 %, de aproximadamente 50 %, de aproximadamente 55 %, de aproximadamente 60 %, de aproximadamente 65 %, de aproximadamente 70 %, de aproximadamente 75 %, de aproximadamente 80 %, de aproximadamente 85 %, de aproximadamente 90 %, de aproximadamente 95 %, de aproximadamente 100 %, de aproximadamente 125 %, de aproximadamente 150 %, de aproximadamente 200 %, de aproximadamente 250 %, de aproximadamente 300 %, de aproximadamente 350 %, de aproximadamente 400 %, de aproximadamente 450 %, de aproximadamente 500 %, de aproximadamente 550 %, de aproximadamente 600 %, de aproximadamente 650 %, de aproximadamente 700 %, de aproximadamente 750 % o de aproximadamente 800 % en comparación con las células cultivadas sin los ARNip específicos para una o más PDHK y la LDH. En algunas realizaciones, las células cultivadas tienen una productividad de polipéptidos superior de al menos aproximadamente 65 %, de al menos aproximadamente 68 %, de al menos aproximadamente 70 %, de al menos aproximadamente 80 %, de al menos aproximadamente 85 % o de al menos aproximadamente 90 % en comparación con las células cultivadas sin los ARNip específicos para una o más PDHK y la LDH. En algunas realizaciones, los anticuerpos tienen una productividad superior de al menos aproximadamente 68 % en comparación con las células cultivadas sin los ARNip específicos para una o más PDHK y la LDH.

En otro aspecto, se proporciona un vector que comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una LDH y una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una PDHK, en el que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor y en el que la segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un segundo promotor.

En algunas realizaciones, el vector contiene un ácido nucleico bajo el control de una secuencia de control de la expresión. Como se usa en el presente documento, una "secuencia de control de la expresión" significa una secuencia de ácidos nucleicos que dirige la transcripción de un ácido nucleico de interés. Una secuencia de control de la expresión puede ser un promotor, tal como un promotor constitutivo o inducible, o un potenciador. Un "promotor inducible" es un promotor que es activo bajo regulación ambiental o de desarrollo. La secuencia de control de la expresión está unida operativamente al segmento de ácido nucleico que va a transcribirse.

En algunas realizaciones, el vector también incluye una secuencia de terminación. Las regiones de control de terminación también pueden proceder diversos genes nativos para la célula huésped. En algunas realizaciones, la secuencia de terminación y la secuencia promotora proceden de la misma fuente. En otra realización, la secuencia de terminación es endógena a la célula huésped. Opcionalmente, puede incluirse un sitio de terminación. Para la expresión eficaz de los polipéptidos, el ADN que codifica el polipéptido se une operativamente mediante codones de iniciación a regiones de control de la expresión seleccionadas de forma que la expresión produzca la formación del ARN mensajero apropiado.

En algunas realizaciones, el vector contiene un marcador selectivo. El término "marcador selectivo" se refiere a un ácido nucleico capaz de la expresión en una célula huésped que permite la facilidad de selección de aquellas células huésped que contienen un ácido nucleico o vector introducido. Ejemplos de marcadores de selección incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos de resistencia a antibióticos (por ejemplo, kanamicina, ampicilina, carbenicilina, gentamicina, higromicina, fleomicina, bleomicina, neomicina, o cloranfenicol) y/o ácidos nucleicos que confieren una ventaja metabólica, tal como una ventaja nutricional sobre la célula huésped. En algunas realizaciones, el marcador selectivo es el ácido nucleico de higromicina.

Polipéptidos

El polipéptido o proteína que va a producirse usando los métodos y células cultivadas descritos en el presente documento incluye, pero no se limita a, anticuerpo o inmunoadhesina. Las técnicas para generar tales moléculas se tratan a continuación.

Anticuerpos

Los anticuerpos dentro del alcance de la presente invención incluyen, pero no se limitan a: anticuerpos anti-CD20 tales como anti-CD20 quimérico "C2B8" como en la patente de EE.UU. N.º 5.736.137 (RITUXAN[®]); anticuerpos anti-VEGF, que incluyen anticuerpos anti-VEGF humanizados y/o madurados por afinidad tales como el anticuerpo anti-VEGF humanizado huA4.6.1 AVASTIN[®] (Kim et al., Growth Factors, 7:53-64 (1992), publicación internacional N.º WO 96/30046 y documento WO 98/45331, publicado el 15 de octubre de 1998) y V3LA; anticuerpo anti-MUC16; anticuerpos anti-CD4 tales como el anticuerpo cM-7412 (Choy et al. Arthritis Rheum. 39(1):52-56 (1996)) y el anticuerpo Ibalizumab (TNX355); anticuerpos anti-MET tales como el anticuerpo anti-C-Met 5D5 de un brazo; anticuerpos anti-HER2 Trastuzumab (HERCEPTIN[®]) (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285-4289 (1992), la patente de EE.UU. N.º 5.725.856) y 2C4 humanizado (documento WO01/00245, Adams et al.), una variante quimérica o humanizada del anticuerpo 2H7 como en la patente de EE.UU. N.º 5.721.108B1, o Tositumomab (BEXXAR[®]); anticuerpos anti-IL-8 (St John et al., Chest, 103:932 (1993) y la publicación internacional N.º WO 95/23865); anticuerpos anti-antígeno de células madres de próstata (PSCA) (documento WO01/40309); anticuerpos anti-CD40, que incluyen S2C6 y variantes humanizadas de los mismos (documento WO00/75348); anticuerpos anti-CD1 (patente de EE.UU. N.º 5.622.700, documento WO 98/23761, Steppe et al., Transplant Intl. 4:3-7 (1991) y Horamant et al., Transplantation 58:377-380 (1994)); anti-CD18 (patente de EE.UU. N.º 5.622.700, concedida el 22 de abril de 1997, o como en el documento WO 97/26912, publicado el 31 de julio de 1997); anticuerpos anti-IgE (incluyendo E25, E26 y E27; patente de EE.UU. N.º 5.714.338, concedida el 3 de febrero de 1998 o la patente de EE.UU. N.º 5.091.313, concedida el 25 de febrero de 1992, documento WO 93/04173 publicado el 4 de marzo de 1993, o la solicitud internacional No. PCT/US98/13410 presentada el 30 de junio de 1998, la patente de EE.UU. N.º 5.714.338, Presta et al., J. Immunol. 151:2623-2632 (1993) y la publicación internacional N.º WO 95/19181); anticuerpos anti-receptor de Apo-2 (documento WO 98/51793 publicado el 16 de noviembre de 1998); anticuerpos anti-TNF- α , que incluyen cA2 (REMICADE[®]), CDP571 y MAK-195 (véanse la patente de EE.UU. N.º 5.672.347 concedida el 30 de septiembre de 1997, Lorenz et al. J. Immunol. 156(4):1646-1653 (1996) y Dhainaut et al. Crit. Care Med. 23(9):1461-1469 (1995)); anticuerpos anti-factor tisular (TF) (patente europea N.º 0 420 937 B1 concedida el 9 de noviembre de 1994); anticuerpos anti-integrina α 3 β humana (documento WO 98/06248 publicado el 19 de febrero de 1998); anticuerpos anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, anticuerpo 225 quimerizado o humanizado como en el documento WO 96/40210 publicado el 19 de diciembre de 1996); anticuerpos anti-CD3 tales como OKT3 (patente de EE.UU. N.º 4.515.893 concedida el 7 de mayo de 1985); anticuerpos anti-CD25 o anti-Tac tales como CHI-621 (SIMULECT[®] y ZENAPAX[®]) (véase la patente de EE.UU. N.º 5.693.762 concedida el 2 de diciembre de 1997); anticuerpos anti-CD52 tales como CAMPATH-1H (Riechmann et al. Nature 332:323-337 (1988)); anticuerpos anti-receptor de Fc tales como el anticuerpo M22 dirigido contra Fc γ RI como en Graziano et al. J. Immunol. 155(10):4996-5002 (1995); anticuerpos anti-antígeno carcinoembrionario (CEA) tales como hMN-1 4 (Sharkey et al. Cancer Res. 55(23Suppl): 5935s-5945s (1995)); anticuerpos dirigidos contra células epiteliales de mama que incluyen huBrE-3, hu-Mc 3 y CHL6 (Ceriani et al. Cancer Res. 55(23): 5852s-5856s (1995); y Richman et al. Cancer Res. 55(23 Supp): 5916s-5920s (1995)); anticuerpos que se unen a células de

carcinoma de colon tales como C242 (Litton et al. Eur J Immunol. 26(1): 1-9 (1996)); anticuerpos anti-CD38, por ejemplo A 13/5 (Ellis et al. J. Immunol. 155(2):925-937 (1995)); anticuerpos anti-CD33 tales como Hu M195 (Jurcic et al. Cancer Res 55(23 Suppl):5908s-5910s (1995) y CMA-676 o CDP771; anticuerpos anti-CD22 tales como LL2 o LymphoCide (Juweid et al. Cancer Res 55(23 Suppl):5899s-5907s (1995)); anticuerpos anti-EpCAM tales como 17-1A (PANOREX[®]); anticuerpos anti-Gp11b/IIIa tales como abciximab o c7E3 Fab (REOPRO[®]); anticuerpos anti-RSV tales como MEDI-493 (SYNAGIS[®]); anticuerpos anti-CMV tales como PROTOVIR[®]; anticuerpos anti-VIH tales como PRO542; anticuerpos anti-hepatitis tales como el anticuerpo anti-Hep B OSTAVIR[®]; anticuerpos anti-CA 125, tales como OvaRex; anticuerpo anti-epítotope de GD3 idiopático BEC2; anticuerpos anti- $\alpha\beta$ 3, que incluyen VITAXIN[®]; anticuerpo anti-carcinoma de células renales humano tal como ch-G250; ING-1; anticuerpo anti-17-1A humano (3622W94); anticuerpo anti-tumor colorrectal humano (A33); anticuerpo anti-melanoma humano R24 dirigido contra gangliósido GD3; anticuerpos anti-carcinoma de células escamosas humano (SF-25); y anti-antígeno leucocitario humano (HLA) tales como Smart ID10 y el anticuerpo anti-HLA DR Oncolym (Lym-1).

Aparte de los anticuerpos específicamente identificados anteriormente, el médico habitual puede generar anticuerpos dirigidos contra un antígeno de interés, por ejemplo, usando las técnicas descritas a continuación.

(i) Selección y preparación de antígenos

El anticuerpo en el presente documento se dirige contra un antígeno de interés. Preferentemente, el antígeno es un polipéptido biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece una enfermedad o trastorno puede producir un beneficio terapéutico en ese mamífero. Sin embargo, también se contemplan anticuerpos dirigidos contra antígenos no de polipéptido (tales como antígenos de glicolípido asociados a tumor; véase la patente de EE.UU. N.º 5.091.178). Si el antígeno es un polipéptido, puede ser una molécula transmembranaria (por ejemplo, receptor) o ligando tal como un factor de crecimiento. Antígenos a modo de ejemplo incluyen aquellas proteínas descritas en la sección (3) más adelante. Dianas moleculares a modo de ejemplo para anticuerpos englobados por la presente invención incluyen proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22 y CD34; miembros de la familia de receptores de ErbB tales como el receptor EGFR, HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión a células tales como LFA-1, Mac1, p1 50,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina $\alpha\beta$ 3 que incluyen tanto subunidades α como β de las mismas (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento tales como VEGF; IgE; antígenos de grupo sanguíneo; receptor de flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor mpl; CTLA-4; proteína C, o cualquiera de los otros antígenos mencionados en el presente documento.

Pueden usarse antígenos solubles o fragmentos de los mismos, opcionalmente conjugados con otras moléculas, como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembranarias, tales como receptores, los fragmentos de éstos (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor) pueden usarse como inmunógen. Alternativamente, las células que expresan la molécula transmembranaria pueden usarse como inmunógen. Tales células pueden proceder de una fuente natural (por ejemplo, líneas de células cancerosas) o pueden ser células que han sido transformadas por técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembranaria.

Otros antígenos y formas de los mismos útiles para preparar anticuerpos serán evidentes para aquellos en la materia.

(ii) Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se producen preferentemente en animales por múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno con una proteína que es inmunogénica en las especies a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzil-sulfosuccinimida (conjugación por restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (por restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl₂, o R¹N=C=NR en la que R y R¹ son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados combinando, por ejemplo, 100 μ g o 5 μ g de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes después, los animales se refuerzan con 1/5 a {fracción (1/10)} de la cantidad original de antígeno o conjugado en adyuvante completo de Freund por inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a 14 días después, los animales se sangran y el suero se ensaya para título de anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta la meseta del título. Preferentemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o mediante un reactivo de reticulación diferente. También pueden prepararse conjugados en cultivo celular recombinante como fusiones de proteínas. Por tanto, agentes agregantes tales como alumbre se usan adecuadamente para potenciar la respuesta inmunitaria.

(iii) Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), o resto no proteináceo mediante métodos de ADN recombinante (patente de EE.UU. N.º 4.816.567).

En el método de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado tal como un hámster o mono macaco se inmuniza como se ha descrito anteriormente para provocar que los linfocitos produzcan o puedan producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Los linfocitos se fusionan luego con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma así preparadas se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma sin fusionar parentales. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan producción de alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT. De entre éstas, líneas de células de mieloma preferidas son líneas de mieloma murino tales como las procedentes de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles de Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif., EE.UU. y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la Colección americana de cultivos tipo, Rockville, Md. EE.UU. Las líneas de células de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que las células de hibridoma están cultivándose se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA).

Después de identificarse las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante métodos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)). Medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad. Preferentemente, se usa el procedimiento de cromatografía de afinidad por proteína A usando un gradiente de pH descrito en el presente documento.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se aísla y se secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven de fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión que entonces se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otra forma proteína de inmunoglobulina para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes.

El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes de las cadenas pesadas y ligeras humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de EE.UU. N.º 4.816.567; Morrison, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)), o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no de inmunoglobulina.

Normalmente, tales polipéptidos no de inmunoglobulina están sustituidos con los dominios constantes de un anticuerpo, o están sustituidos con los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

Pueden aislarse anticuerpos monoclonales de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554(1990). Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597(1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo de nM) por barajado de cadenas (Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), además de infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.* 21:2265-2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridomas de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

10 (iv) Anticuerpos humanizados y humanos

Un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que es no humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente en lo sucesivo restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1968); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1998)) sustituyendo CDR de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. N.º 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR están sustituidos por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que van a usarse en la producción de anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad. Según el llamado método "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba contra la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humano conocido. La secuencia humana que está más próxima a la del roedor se acepta entonces como la FR humana para el anticuerpo humanizado (Sims et al. (1993)). Otro método usa una región estructural particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región estructural puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.* 151:2623 (1993)).

Es adicionalmente importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, según un método preferido, anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para aquellos expertos en la materia. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis de la probable función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, los residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias del receptor y de importación de manera que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como aumento de la afinidad por el (los) antígeno(s) diana. En general, los residuos de CDR están directamente y principalmente sustancialmente implicados en influir la unión a antígeno.

Alternativamente, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que tras la inmunización pueden producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones quiméricos y mutantes en la línea germinal produce la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de la línea germinal en tales ratones mutantes en la línea germinal producirá la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véanse, por ejemplo, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al. *year in Immuno.*, 7:33 (1993); y Duchosal et al. *Nature* 355:258 (1992). Los anticuerpos humanos también pueden proceder de bibliotecas de expresión en fago (Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Vaughan et al. *Nature Biotech* 14:309 (1996)).

60 (v) Fragmentos de anticuerpos

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtuvieron por digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden ahora ser directamente producidos por células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpos tratadas

anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). Según otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente de cultivo de células huésped recombinantes. También puede aislarse un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el médico experto.

(vi) Anticuerpos multiespecíficos

Los anticuerpos multiespecíficos tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. Mientras que tales moléculas normalmente solo se unirán a dos antígenos (es decir, anticuerpos biespecíficos, BsAbs), los anticuerpos con especificidades adicionales tales como anticuerpos trispecíficos están englobados por esta expresión cuando se usa en el presente documento.

Se conocen en la técnica métodos de producción de anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina en los que las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Milstein et al., Nature 305:537-539 (1983)). Debido al surgido aleatorio de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las que sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se hace normalmente por etapas de cromatografía de afinidad, es bastante embarazosa y los rendimientos de producto son bajos. Procedimientos similares se desvelan en el documento WO 93/08829 y en Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

Según otro enfoque descrito en el documento WO96/27011, la superficie de separación entre un par de moléculas de anticuerpos puede manipularse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La superficie de separación preferida comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la superficie de separación de la primera molécula de anticuerpo están sustituidas con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" de compensación de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) se crean sobre la superficie de separación de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las cadenas laterales de aminoácidos grandes por más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero con respecto a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para elegir como diana células del sistema inmunitario para células no deseadas (patente de EE.UU. n° 4.676.980) y para el tratamiento de infección por el VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/00373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden producirse usando cualquier método de reticulación conveniente. Agentes de reticulación adecuados son muy conocidos en la técnica y se desvelan en la patente de EE.UU. n° 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando enlace químico. Brennan et al., Science 229:81 (1985), describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditioi arsenito de sodio para estabilizar ditioles vecinos y prevenir la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten entonces en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte entonces en el Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro Fab'-TNB derivado para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El reciente progreso ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., J. Exp. Med., 175:217-225 (1992), describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizado F(ab')₂. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. Por tanto, el anticuerpo biespecífico formado podía unirse a células que expresan en exceso el receptor ErbB2 y linfocitos T humanos normales, además de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito diversas técnicas para producir y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se han producido usando cremalleras de leucina. Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se ligaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión de genes. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región de bisagra para formar monómeros y entonces se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger et al., Proc. Natl.

Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993), ha proporcionado un mecanismo alternativo para producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) por un conector que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento están obligados a aparearse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formándose así dos sitios de unión a antígeno. También se ha notificado otra estrategia para producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv (sFv). Véase, Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994). Alternativamente, los anticuerpos pueden ser "anticuerpos lineales" como se describen en Zapata et al. Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995). Brevemente, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos de Fd en tándem (V_H - C_{H1} - V_H y V_L) que forman un par de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

15 Inmunoadhesinas

El diseño más simple y más directo de inmunoadhesinas combina el (los) dominio(s) de unión de la adhesina (por ejemplo, el dominio extracelular (ECD) de un receptor) con las regiones bisagra y Fc de una cadena pesada de la inmunoglobulina. Generalmente, cuando se preparan las inmunoadhesinas de la presente invención, el ácido nucleico que codifica el dominio de unión de la adhesina se fusionará con el extremo C con el ácido nucleico que codifica el extremo N de una secuencia del dominio constante de inmunoglobulina; sin embargo, también son posibles fusiones del extremo N.

Normalmente, en tales fusiones el polipéptido quimérico codificado retendrá la bisagra al menos funcionalmente activa, dominios C_{H2} y C_{H3} de de la región constante de una cadena pesada de la inmunoglobulina. También se hacen fusiones al extremo C de la porción Fc de un dominio constante, o extremo N inmediatamente a la C_{H1} de la cadena pesada o la región correspondiente de la cadena ligera. El sitio preciso en el que se hace la fusión no es crítico; sitios particulares son muy conocidos y pueden seleccionarse con el fin de optimizar la actividad biológica, secreción, o características de unión de la inmunoadhesina.

En algunas realizaciones, la secuencia de adhesina está fusionada con el extremo N del dominio Fc de inmunoglobulina G_1 (Ig G_1). Es posible fusionar la región constante de la cadena pesada entera con la secuencia de adhesina. Sin embargo, preferentemente, una secuencia que empieza en la región bisagra justo en la dirección 5' del sitio de escisión por papaína que define Fc de IgG químicamente (es decir, resto 216, tomando el primer resto de la región constante de la cadena pesada para que sea 114), o sitios análogos de otras inmunoglobulinas, se usa en la fusión. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la adhesina está fusionada con (a) la región bisagra y o C_{H2} y C_{H3} o (b) C_{H1} , bisagra, dominios C_{H2} y C_{H3} , de una cadena pesada de IgG.

Para inmunoadhesinas biespecíficas, las inmunoadhesinas se ensamblan como multímeros y particularmente como heterodímeros o heterotetrámeros. Generalmente, estas inmunoglobulinas ensambladas tendrán estructuras unitarias conocidas. Una unidad estructural de cuatro cadenas básica es la forma en la que existen IgG, IgD e IgE. Una unidad de cuatro cadenas se repite en las inmunoglobulinas de peso molecular más alto; IgM generalmente existe como un pentámero de cuatro unidades básicas mantenidas juntas por enlaces disulfuro. La globulina IgA y ocasionalmente la globulina IgG, también pueden existir en forma multímera en el suero. En el caso de multímero, cada una de las cuatro unidades puede ser igual o diferente.

Diversas inmunoadhesinas ensambladas a modo de ejemplo dentro del alcance en el presente documento se representan esquemáticamente a continuación:

- (a) AC_L - AC_L ;
- (b) AC_H -(AC_H , AC_L - AC_H , AC_L - $V_H C_H$, o $V_L C_L$ - AC_H);
- (c) AC_L - AC_H -(AC_L - AC_H , AC_L - $V_H C_H$, $V_L C_L$ - AC_H , o $V_L C_L$ - $V_H C_H$);
- (d) AC_L - $V_H C_H$ -(AC_H , o AC_L - $V_H C_H$, o $V_L C_L$ - AC_H);
- (e) $V_L C_L$ - AC_H -(AC_L - $V_H C_H$, o $V_L C_L$ - AC_H); y
- (f) $(A-Y)_n$ -($V_L C_L$ - $V_H C_H$)₂,

en las que cada A representa secuencias de aminoácidos de adhesina idénticas o diferentes;

V_L es un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina;
 V_H es un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina;
 C_L es un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina;
 C_H es un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina;

n es un número entero superior a 1;

Y designa el resto de un agente de reticulación covalente.

Por brevedad, las estructuras anteriores solo muestran características clave; no indican dominios de unión (J) u otros de las inmunoglobulinas, ni se muestran enlaces disulfuro. Sin embargo, si tales dominios se requieren para la actividad de unión, deben construirse para estar presentes en las localizaciones habituales que ocupan en las moléculas de inmunoglobulina.

Alternativamente, las secuencias de adhesina pueden insertarse entre secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera de la inmunoglobulina, de forma que se obtenga una inmunoglobulina que comprende una cadena pesada quimérica. En esta realización, las secuencias de adhesina están fusionadas al extremo 3' de una cadena pesada de la inmunoglobulina en cada brazo de una inmunoglobulina, tanto entre la bisagra y el dominio C_H2, como entre los dominios C_H2 y C_H3. Se ha informado de construcciones similares por Hoogenboom, et al., Mol. Immunol. 28:1027-1037 (1991).

Aunque la presencia de una cadena ligera de la inmunoglobulina no es requerida en las inmunoadhesinas de la presente invención, una cadena ligera de la inmunoglobulina podría estar presente tanto covalentemente asociada a un polipéptido de fusión de adhesina-cadena pesada de la inmunoglobulina, como directamente fusionada con la adhesina. En el primer caso, el ADN que codifica una cadena ligera de la inmunoglobulina normalmente se co-expresa con el ADN que codifica la proteína de fusión adhesina-cadena pesada de la inmunoglobulina. Tras la secreción, la cadena pesada y la cadena ligera híbridas se asociarán covalentemente para proporcionar una estructura similar a inmunoglobulina que comprende dos pares de cadena pesada-cadena ligera de la inmunoglobulina unidas por disulfuro. Métodos adecuados para la preparación de tales estructuras se desvelan, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 4.816.567, concedida el 28 de marzo de 1989.

Las inmunoadhesinas se construyen lo más convenientemente fusionando la secuencia de ADNc que codifica la porción de adhesina en marco con una secuencia de ADNc de inmunoglobulina. Sin embargo, también puede usarse fusión con fragmentos de inmunoglobulina genómicos (véase, por ejemplo, Aruffo et al., Cell 61:1303-1313 (1990); y Stamenkovic et al., Cell 66:1133-1144 (1991)). El último tipo de fusión requiere la presencia de secuencias reguladoras de Ig para la expresión. Los ADNc que codifican regiones constantes de la cadena pesada de IgG pueden aislarse basándose en las secuencias publicadas de bibliotecas de ADNc procedentes de bazo o de linfocitos de sangre periférica, por técnicas de hibridación o por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los ADNc que codifican la "adhesina" y las partes de inmunoglobulina de la inmunoadhesina se insertan en tándem en un vector plasmídico que dirige la eficiente expresión en las células huésped elegidas.

Expresión de polipéptidos

El polipéptido (por ejemplo, anticuerpo) que va a producirse usando el método descrito en el presente documento se produce generalmente usando técnicas recombinantes.

Células huésped adecuadas para clonar o expresar los ARNip en los vectores en el presente documento son las células procariotas, de levadura, o eucariotas superiores. Procariotas adecuados para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens* y *Shigella*, además de bacilos tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, 41P de *B. licheniformis* desvelado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos en vez de limitantes.

Además de microbios procariotas, microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levadura son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican polipéptidos. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadero común, es el más comúnmente usado de entre los microorganismos huésped eucariotas inferiores. Sin embargo, varios otros géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilorum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, huéspedes de *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Células cultivadas adecuadas para la expresión del polipéptido glucosilado proceden de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovirales y variantes y células huésped de insecto permisivas correspondientes de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Una variedad de cepas virales para transfección está públicamente disponible, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV y tales virus pueden usarse como virus en el presente documento según la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También puede utilizarse cultivos de células de planta de algodón, trigo, patata, soja, petunia, tomate y tabaco como huéspedes.

Sin embargo, el mayor interés ha sido en células de vertebrados y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejido) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Ejemplos de líneas celulares de mamífero útiles incluyen, pero no se limitan a, células CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); células de riñón de embrión humano (células 293 ó 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de bebés de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y células de hepatoma humano (Hep G2).

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o de clonación anteriormente descritos para la producción de polipéptidos y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Las células huésped usadas para producir el polipéptido usado en los métodos de la presente invención pueden cultivarse en una variedad de medios. Para cultivar las células huésped son adecuados medios de cultivo comercialmente disponibles tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo ((MEM), (Sigma)), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), (Sigma)) o medio de Eagle modificado por Dulbecco GIBCO®: Mezcla nutriente F-12 (Invitrogen). Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem, 102:255 (1980), patentes de EE.UU. n.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o la patente de EE.UU. N.º Re. 30.985 puede usarse como medios de cultivo para las células huésped. También pueden usarse otros medios de crecimiento definidos o sintéticos y el medio apropiado para cultivar un tipo específico de células huésped es conocido por un experto en la materia de la biología molecular y celular. Cualquiera de estos medios puede complementarse según se necesite con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tal como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™, higromicina), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro componente necesario a concentraciones apropiadas que serían conocidas para aquellos expertos en la materia. Las condiciones de cultivo tales como temperatura, pH y similares son aquellas previamente usadas con la célula huésped seleccionada para expresión y serán evidentes para el experto general.

Pueden usarse condiciones de cultivo celular estándar para cultivar las células. Las células se cultivan y mantienen a una temperatura apropiada, mezcla de gases y pH (tal como a aproximadamente 20 °C a aproximadamente 37 °C, a aproximadamente el 6 % a aproximadamente el 84 % de CO₂ y a un pH entre aproximadamente 5 y aproximadamente 9). En algunas realizaciones, las células se cultivan en un medio de células apropiado a 37 °C durante las primeras 48 horas y se desplaza a 33 °C durante los 12 días siguientes. Pueden realizarse reacciones bajo condiciones aerobias o anóxicas basándose en los requisitos de las células huésped. En algunas realizaciones, las células se cultivan usando cualquier modo de fermentación conocido, que incluye, pero no se limita a, procesos discontinuos, de lotes alimentados, o continuos.

Si se usan técnicas recombinantes, el polipéptido puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o directamente secretarse en el medio. Si el polipéptido se produce intracelularmente, como una primera etapa, el residuo particulado, tanto células huésped como células lisadas (por ejemplo, resultantes de la homogeneización), se eliminan, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Si el polipéptido es secretado en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión se concentran primero usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon.

Kits

La presente invención también proporciona kits que comprenden composiciones e instrucciones para su uso que comprenden la descripción de los métodos de la invención. Los kits pueden comprender células cultivadas, ARNip, secuencias diana, agentes de transfección, instrucciones para los métodos de la presente invención, o cualquier combinación de los mismos.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar, pero no para limitar, la invención.

Ejemplos

Se entiende que los ejemplos y realizaciones en el presente documento se describen para fines ilustrativos solo y que diversas modificaciones o cambios en luz de los mismos se sugerirán a personas expertas en la materia y deben incluirse dentro del espíritu y alcance de la presente solicitud.

Ejemplo 1: La inactivación de PDHK1, PDHK2, PDHK3 y LDHa reduce la producción de lactato y aumenta el título/productividad de anticuerpos

Materiales y métodos

Construcción del vector que se dirige a LDHa/PDHK1, 2, 3

Se seleccionó la secuencia de direccionamiento para LDHa como se describe previamente por Kim y Lee et al, Appl. Microbiol. Biotechnol. 74(1):152-159 (2007) y la secuencia de ARNip de LDHa es CTCGATTCCGTTATCTGAT (SEQ ID NO: 1). Para diseñar la secuencia dirigida a ARNip para la PDHK, se clonaron secuencias de ADNc parciales para CHO PDHK1, 2 y 3 por reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa de (RT-PCR) con cebadores localizados en las regiones altamente conservadas de las PDHK. Se usaron secuencias parcialmente clonadas para el diseño de la secuencia de ARNip según el método descrito por Elbashier et al. (Methods 26:199-213 (2002)).

Secuencia de direccionamiento de PDHK1 (ARNip): GCAGTTCCTGGACTTCGGA (SEQ ID NO: 2)

Secuencia de direccionamiento de PDHK2 (ARNip) : CATTTCAGTACTTCTTGAC (SEQ ID NO: 3)

Secuencia de direccionamiento de PDHK3 (ARNip): TGTAGCTGATGTCGTGAAA (SEQ ID NO: 4)

Se construyó la construcción individual que contiene secuencias de direccionamiento para LDHa y las PDHK usando el vector de higromicina pSilencer 3.1-H1 (Cat. N.º AM5766, Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX). Se insertó ARNip de LDHa en el sitio KasI de pSilencer 3.1, con una adición del promotor U6 de pSilencer 2.1 en su extremo 5' inmediato. Se insertaron secuencias de ARNip para ARNip de PDHK1 y 2 en los sitios BamHI/HindIII y HindIII, respectivamente. Se introdujo un sitio BglII al lado 3' del ARNip de PDHK2 y se usó para la inserción de ARNip de PDHK3. Para el control negativo, se utilizó el vector pSilencer 3.1 que contiene una secuencia de ARNip reordenada.

Cultivo celular

Se cultivaron células CHO deficientes en dihidrofolato reductasa (DHFR) en un medio basado en DMEM/F12 patentado en recipientes de matraz oscilante a 37 °C y 5 % de CO₂. Las células se sometieron a pases cada tres a cuatro días.

Desarrollo de la línea celular de ARNip estable (clon de ARNip)

Se transfectó una línea celular CHO resistente a metotrexato (MTX) 25 nM y que expresaba un anticuerpo monoclonal recombinante usando Lipofectamine 2000 CD (Cat. N.º 12566-014, Invitrogen, Carlsbad, CA) según la recomendación del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células transfectadas se centrifugaron y se sembraron en medio selectivo (libre de glicina, hipoxantina y timidina) basado en DMEM/F-12 que contenía MTX 25 nM y 400 ug/ml de higromicina (Cat N.º 10687010, Invitrogen, Carlsbad, CA). Se sembraron células resuspendidas en placas de 96 pocillos para generar clones individuales. Se obtuvieron clones de transfección de plásmido de ARNip que contenían secuencias de direccionamiento para los genes de LDHa y de las PDHK, mientras que los clones de control se obtuvieron por transfección de plásmido de control (Cat N.º AM5766, Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX) que contenía una secuencia reordenada diseñada por fabricación sin homología apreciable por genes conocidos.

Análisis de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR o Taqman)

Se aislaron ARN total de clones individuales usando el kit RNeasy 96 (Cat N.º 74181, Qiagen) y se trataron con digestión por DNasa (Cat N.º 79254, set de DNasa libre de RNasa, Qiagen) para eliminar el ADN residual posiblemente presente en muestras de ARN aisladas. Se realizó Taqman usando mezcla maestra universal de qRT-PCR según las instrucciones del fabricante (Cat N.º 4309169, Applied Biosystems) y los niveles de expresión de las PDHK y LDHa se normalizaron al gen de mantenimiento β -microglobulina.

Los cebadores y las secuencias de las sondas usadas para el análisis Taqman fueron del siguiente modo:

cebador directo de PDHK1: GCCCATCTCATCGAAAACA (SEQ ID NO: 5)

cebador inverso de PDHK1: AGCCATCTTTAATGACTTCGACTAC (SEQ ID NO: 6)

sonda de PDHK1: TCGCAGTTTGGATTATGCTTCCAATG (SEQ ID NO: 7)

cebador directo de PDHK2: GATCTGTCCATCAAATGAGTGA (SEQ ID NO: 8)

cebador inverso de PDHK2: TGTGGAGTACATGTAGCTGAAGAG (SEQ ID NO: 9)

sonda de PDHK2: CTCTCAATCTTCTCAAGGGGACACC (SEQ ID NO: 10)

cebador directo de PDHK3: CAGCCTGGAGCCTACAAGA (SEQ ID NO: 11)

cebador inverso de PDHK3: GGCATACAGTCGAGAAATTGG (SEQ ID NO: 12)

sonda de PDHK3: AAGCCATAACCAAATCCAGCCAAGG (SEQ ID NO: 13)
 cebador directo de LDHa: GCCGAGAGCATAATGAAGAA (SEQ ID NO: 14)
 cebador inverso de LDHa: CCATAGAGACCCTTAATCATGGTA (SEQ ID NO: 15)
 sonda de LDHa: CTTAGGCGGGTGCATCCCATT (SEQ ID NO: 16)
 cebador directo de β -microglobulina: TCCTCTCAGTGGTCT GCT TGG (SEQ ID NO: 17)
 cebador inverso de β -microglobulina: TGGCGTGTGTAGACTTGCACTT (SEQ ID NO: 18)
 sonda de β -microglobulina: TGCCATCCAGCGTCCCCCA (SEQ ID NO: 19)

Evaluación de clones en matraz oscilante de lotes alimentados

Se sembraron doce clones de ARNip y doce clones de control en el medio de producción patentado con un pH de 7,15 empleando un proceso de cultivo de lotes alimentados de 14 días con una alimentación en bolo en el día 3 y un desplazamiento de la temperatura de 37 °C a 33 °C en el día 2. La viabilidad celular y las cifras de células viables se monitorizaron por exclusión con colorante azul de tripano usando Vicell (Beckman Coulter). Las concentraciones de lactato se midieron en el día 3, 7, 10 y 14 usando un analizador Nova Bioprofile (Nova biomedical). La velocidad promedio de producción de lactato específica de célula, q_s se calcula como la pendiente del gráfico del número de células total integrado y el lactato acumulado producido, $[S_t S_0]$, basado en la ecuación de equilibrio de masa de lactato formulada con respecto al volumen de cultivo completo:

$$S_t - S_0 = q_s \int_0^t X dt$$

en la que S_t es la cantidad total de lactato en el volumen de cultivo (mg) en el tiempo t , S_0 es la cantidad total de lactato en el volumen de cultivo (mg) en el tiempo $t=0$, X es el número total de células en el volumen de cultivo en cualquier momento dado t y q_s es la velocidad de producción de lactato específica en $mg/célula/día$. Como la ecuación anterior se escribe para el intervalo de tiempo entre $t=0$ y $t=t$, q_s es la velocidad promedio de producción de lactato durante este intervalo de tiempo. Por la convención usada en este trabajo, si se produce más lactato del que es consumido por la célula, entonces el valor de q_s es positivo.

Operación de lotes alimentados en biorreactor

Se realizaron experimentos en biorreactor en biorreactores de tanque con agitación de 2 l (Applikon, Foster City, CA) operados a 1,5 l de volumen de trabajo. Después de una alimentación de nutriente concentrado a las 72 horas después de la inoculación, se añadió glucosa según se necesitara durante los cultivos de lotes alimentados de 14 días. El oxígeno disuelto y la agitación se mantuvieron en los cultivos de biorreactor a los puntos de consigna de 30 % de saturación de aire y 275 rpm, respectivamente. Se controló el pH del cultivo a 7,0 mediante la adición de gas CO_2 o Na_2CO_3 1 M. La temperatura del cultivo se mantuvo a 37 °C durante las primeras 48 horas y se desplazó a 33 °C a partir de aquí. El control del proceso en cada biorreactor se logró usando una unidad de control digital de B. Braun Biotech (Allentown, PA).

Análisis de muestras

Se determinó el título de anticuerpos usando cromatografía de afinidad por proteína A convencional con detección de UV. Véase Fahrner et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 30:121-128 (1999). Se analizaron muestras de cultivo para la concentración y viabilidad de células viables por el contador de células ViCell AS (Beckman Coulter, Fullerton, CA), pH y lactato por el bioanalizador Bioperfil 400 (Nova Biomedical, Waltham, MA) y osmolalidad por un osmómetro de múltiples muestras (Advanced Instruments, Norwood, MA).

Análisis estadístico

Se llevó a cabo la prueba de de la t de Student bilateral usando el software JMP.

Resultados

Construcción de un vector de ARNip que se dirige a las PDHK y a LDHa

Hay cuatro genes PDHK informados por Harris et al. (Adv. Enzyme Regul. 42:249-59 (2002) en células de mamífero. Para evaluar si los cuatro genes PDHK están presentes en células CHO, se diseñaron cuatro conjuntos de cebadores de RT-PCR basados en las regiones conservadas entre secuencias de PDHK humana y de ratón. Los resultados de PCR revelaron que aún cuando los cuatro ARNm de PDHK pueden detectarse en células CHO, el nivel de ARNm de PDHK4 es mínimo y mucho más bajo que de los otros 3 PDHK en células CHO deficientes en DHFR (deficiente en dihidrofolato reductasa). Por lo tanto, solo la expresión de genes PDHK1, 2 y 3 se inactivó junto con el gen LDHa. Para LDHa y cada PDHK, se diseñaron tres secuencias de ARNip y se probaron en células CHO para elegir la secuencia de ARNip que presentaba la mejor regulación por disminución del gen diana. Se seleccionó la mejor secuencia de ARNip para LDHa basándose en los hallazgos por Kim y Lee. Appl. Microbiol. Biotechnol.

74(1):152-9 (2007). Se construyeron la secuencia de ARNip para LDHa y PDHK en un único vector en el que el ARNip para LDHa estaba bajo el control del promotor U6, mientras que los ARNip para cada PDHK fueron conducidos por promotores H1 (Figura 1).

5 Generación de clones estables con expresión reducida de PDHK1, 2, 3 y LDHa

La construcción de ARNip de las PDHK y LDHa se transfirió en células CHO que expresaban un anticuerpo monoclonal para conseguir clones individuales llamados clones de ARNip. Se ensayaron clones de ARNip individuales para la expresión de ARNm de cuatro genes, PDHK1, 2, 3 y LDHa, usando análisis Taqman. Se identificaron doce clones de ARNip que presentaron la expresión más reducida de los cuatro genes anteriores (Figura 2) para análisis adicional. El vector de control que contenía la secuencia reordenada también se transfirió en las mismas células que expresan anticuerpo que para conseguir clones individuales llamados clones de control. Se eligieron aleatoriamente doce clones de control como control y también se analizaron sus niveles de expresión de ARNm de genes LDHa y PDHK1, 2 y 3 por Taqman. En promedio, los niveles de expresión de ARNm para LDHa, PDHK1, 2 y 3 en los doce clones de ARNip seleccionados se redujeron el 90 %, 32 %, 83 % y el 70 %, respectivamente, en comparación con los clones de control (Figura 2).

Evaluación en matraz oscilante de lotes alimentados de clones de ARNip y de control

20 (a) Niveles de lactato reducidos y pH superiores en medios de cultivo observados en clones de ARNip

Para evaluar el efecto de la regulación por disminución mediada por ARNip de LDHa y PDHK sobre la producción de lactato, se evaluaron 12 clones de ARNip y 12 de control en recipientes de matraz oscilante en el medio patentado de los presentes inventores empleando un proceso de lotes alimentados de 14 días y de desplazamiento de la temperatura. El experimento se ha repetido durante tres veces y se observaron resultados similares. Los resultados de un conjunto de experimento se muestran como representativos en las figuras. Los resultados mostraron que, en comparación con los clones de control, los clones de ARNip tuvieron niveles de lactato reducidos (Figura 3) en general. En el día 14, los clones de ARNip mostraron un 91 % menos de lactato en promedio que los clones de control ($p < 0,0001$) (Figura 3A). De acuerdo con el nivel de lactato más bajo en los clones de ARNip con respecto al periodo de producción de 14 días, la velocidad promedio de producción de lactato para los clones de ARNip fue un valor negativo de $0,02 \text{ mg}/10^6 \text{ células/día}$, sugiriendo que la velocidad de la síntesis de lactato es inferior a la velocidad de consumo. A diferencia, la velocidad promedio de producción de lactato fue de $0,01 \text{ mg}/10^6 \text{ células/día}$ para los clones de control, que indica que la velocidad global de la síntesis de lactato es superior a la velocidad de consumo. Esta diferencia en la velocidad de producción de lactato entre clones de ARNip y de control fue estadísticamente significativa ($p < 0,002$) (Figura 3B). Como el nivel de lactato en los medios afecta al pH, en el día 14, el pH promedio para los clones de control disminuyó a 6,54, mientras que el pH promedio para los clones de ARNip fue 7,04 (Figura 3C). El pH promedio más bajo observado está de acuerdo con el nivel promedio más alto de lactato para los clones de control.

40 b) Elevado título de anticuerpos y productividad específica (Op) observada en clones de ARNip

Para investigar si la inactivación de la expresión génica de PDHK y LDHa afecta la producción de anticuerpos, se recogieron muestras de experimentos en matraz oscilante de lotes alimentados en el día 3, 7, 10 y 14 para medir los títulos de anticuerpos por cromatografía de proteína A. Los datos mostraron que, en promedio, los clones de ARNip produjeron un 68 % más de anticuerpo que los clones de control (Figura 4A, $p < 0,022$) y la productividad específica de células promedio (Qp) medida en pg/célula-d para los clones de ARNip fue el 75 % superior a aquella para los clones de control (Figura 4B, $p < 0,006$). Para evaluar el crecimiento celular, se recogieron muestras de matraces oscilantes en el día 3, 7, 10 y 14 para medir las cifras de células viables y las viabilidades para calcular la cifra de células viables integradas (IVCC). A diferencia de los títulos de anticuerpos y Qps, no se observaron diferencias del crecimiento celular apreciables entre los dos grupos (Figura 4C). Los atributos de calidad del producto de anticuerpo que incluyen perfil de glicanos, variantes de carga y porcentaje de agregación fueron comparables entre los clones de ARNip y de control.

Evaluación de cultivos de lotes alimentados en biorreactor de clones de control de ARNip

Como el cultivo en biorreactor de lotes alimentados de pH controlado es el modelo de reducción de escala estándar para la fabricación a gran escala, se investigó adicionalmente el rendimiento de algunos clones de ARNip y de control en biorreactores de 2 l. Dada la limitación en la disponibilidad de biorreactores y la complejidad experimental, no se ejecutaron 12 clones de ARNip y 12 de control por duplicado debido a impracticabilidad. Se seleccionaron dos clones de ARNip representativos y dos clones de control representativos cuyos perfiles metabólicos representaron mejor el rendimiento promedio para cada grupo para minimizar el sesgo de selección, junto con la línea parental usada para las transfecciones de plásmido de ARNip y de control durante la evaluación en biorreactores de 2 l. Se recogieron muestras de cultivo celular diariamente (excepto en los días 6 y 13) para lactato, glucosa, osmolalidad y análisis de títulos. Los niveles de lactato para los clones de ARNip siguieron generalmente planos, mientras que los niveles de lactato para clones de control y parentales continuaron aumentaron durante el periodo de producción de 14 días. En el día 14, los dos clones de ARNip tuvieron un 86 % de nivel de lactato más bajo en promedio en medios

que los clones de control o el clon parental (Figura 5A) y tuvieron velocidad de producción de lactato específica más baja que los clones de control y la línea parental (Figura 5B). Similarmente, las osmolaridades para los clones de ARNip permanecieron a aproximadamente 300 mOsm, mientras que las osmolaridades para los clones de control o el clon parental continuaron aumentando durante el periodo de producción de 14 días. En el día 14, las osmolaridades promedio para 2 clones de ARNip fueron un 60 % más bajas que aquellas de clones de control y parental (Figura 5C). Y, lo que es más importante, en el día 14, los clones de ARNip produjeron en promedio el 125 % más de anticuerpo que los clones de control (Figura 6). Como se observa en la evaluación de matraces oscilantes de lotes alimentados, los clones de ARNip y de control tienen viabilidades y crecimiento celular comparables en biorreactores de 2 l.

Discusión

El estudio previo demostró que regular por disminución la expresión del gen LDHa solo fue capaz de reducir la producción de lactato. Kim y Lee, Appl. Microbiol. Biotechnol. 74(1):152-9 (2007). Sin embargo, en su estudio, a pesar del 45-79 % de reducción en el nivel de lactato, no hubo mejora significativa en Qp y título de producto, sugiriendo que la inactivación de LDHa sola en células CHO no es suficiente para mejorar Qp y el rendimiento de producto eficientemente. Además, el regular simultáneamente por disminución PDHK1, 2 y 3 en células CHO nunca fue suficiente para reducir el nivel de lactato ni para aumentar la productividad de anticuerpos. Como la única forma de las células de generar lactato es mediante la reducción de piruvato y el piruvato no solo puede convertirse en lactato por LDH, sino también convertirse en acetil-CoA por PDH entrando en el ciclo de TCA para ser oxidado, la reducción de la producción de lactato por inactivación de la expresión de LDHa y la promoción de piruvato en el ciclo de TCA por inactivación de PDHK puede sinergizar para reducir el nivel de lactato y para proporcionar células con más energía y posiblemente productos intermedios metabólicos que conducen a elevada producción de anticuerpos.

Se redujo sustancialmente la expresión de LDHa, PDHK2 y PDHK3 y la expresión de PDHK1 se redujo moderadamente en todos los clones probados. Es probable la reducción moderada en la expresión de PDHK1 debido a secuencia de direccionamiento de ARNip no óptima ya que se observó reducción moderada con tres secuencias de ARNip de PDHK1 probadas. Se observaron las variaciones en la producción de lactato y la producción de anticuerpos en clones de control y de ARNip ya que cada clon tuvo diferentes niveles de expresión de LDHa y PDHK. Sin embargo, en el día 14, el nivel promedio de lactato en el grupo de ARNip fue más bajo que en el grupo de control que condujo al pH promedio más bajo para clones de control que en los clones de ARNip en el cultivo de matraces oscilantes de lotes alimentados. Y, lo que es más importante, además de velocidad de producción de lactato específica más bajo, el título promedio y Qp para los clones de ARNip aumentó el 68 % y el 75 %, respectivamente, en comparación con aquellos de clones de control sin diferencias perceptibles en el crecimiento celular y la calidad de producto entre los clones de ARNip y de control. De forma interesante, para los títulos del día 14 frente a los niveles de lactato del día 14, hubo una buena relación inversa entre títulos y niveles de lactato entre los clones de control, pero no entre los clones de ARNip. Las diferencias observadas en los títulos y niveles de lactato entre los clones de control puede ser probablemente que el clon parental es heterogéneo en la productividad de anticuerpos y el metabolismo celular aún cuando la línea celular se derivó de un único clon. Se evaluaron un total de 12 clones de control para tener en cuenta la variación clonal. Los datos indican que la inactivación de LDHa y PDHK reduce simultáneamente el nivel de lactato y mejora la producción de anticuerpos en células CHO. Por lo tanto, para el desarrollo de procesos de producción de anticuerpos robustos y productivos, la regulación por disminución simultánea de tanto LDHa como PDHK proporciona un enfoque eficiente.

Se investigó además el rendimiento de 2 clones de control y 2 de ARNip en biorreactores de 2 l con duplicados. Se seleccionaron aquellos 4 clones para representar mejor la productividad promedio en cada grupo basándose en evaluaciones de matraces oscilantes de lotes alimentados. Similar a las observaciones del experimento en matraz oscilante, los clones de ARNip tuvieron niveles de lactato más bajos y títulos más altos que los clones de control en la evaluación en biorreactor de 2 l. Dado que el pH está controlado en los biorreactores de 2 l de lotes alimentados, los cultivos de control presentaron osmolalidad más elevada que los cultivos de ARNip ya que se necesitaron niveles de lactato más altos en clones de control más adición de álcali para mantener el pH de consigna.

En resumen, los datos de las evaluaciones en matraz oscilante de 2 l y en biorreactor de 2 l demostraron que la inactivación simultánea de LDHa, PDHK1, 2 y 3 en células CHO es eficaz en reducir el nivel de lactato y en aumentar el título de anticuerpos sin afectar el crecimiento celular y la calidad del producto.

REIVINDICACIONES

1. Un método de reducción de la producción de lactato en células cultivadas, comprendiendo el método cultivar células que comprenden una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARN interferente pequeño (ARNip) específico para una lactato deshidrogenasa (LDH) y una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una piruvato deshidrogenasa quinasa (PDHK), en el que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor y en el que la segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un segundo promotor, en el que los ARNip silencian o regulan por disminución la transcripción génica de la LDH y la PDHK.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la LDH es LDHa.
3. El método de la reivindicación 1, en el que las células cultivadas comprenden además una tercera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una segunda PDHK y en el que la tercera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un tercer promotor.
4. El método de la reivindicación 3, en el que las células cultivadas comprenden además una cuarta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una tercera PDHK y en el que la cuarta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un cuarto promotor.
5. El método de la reivindicación 4, en el que las células cultivadas comprenden además una quinta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una quinta PDHK y en el que la quinta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un quinto promotor.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4 y 5, en el que la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK1, PDHK2, PDHK3 y PDHK4.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 4, en el que la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK1, PDHK2 y PDHK3.
8. El método de la reivindicación 1 o 3, en el que la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK1 y PDHK2.
9. El método de la reivindicación 1 o 3, en el que la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK1 y PDHK3.
10. El método de la reivindicación 1 o 3, en el que la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK2 y PDHK3.
11. El método de la reivindicación 4, en el que la LDH es LDHa, en el que la primera PDHK es PDHK1, en el que la segunda PDHK es PDHK2 y en el que la tercera PDHK es PDHK3.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4 y 5, en el que las células cultivadas producen un polipéptido heterólogo.
13. El método de la reivindicación 12, en el que el polipéptido heterólogo es un anticuerpo.
14. El método de la reivindicación 4, en el que una velocidad promedio de producción de lactato de las células cultivadas es inferior a un valor negativo de $0,02 \text{ mg}/10^6 \text{ células/día}$.
15. El método de la reivindicación 4, en el que las células cultivadas tienen una productividad específica superior de al menos 75 % en comparación con las células cultivadas sin la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para las PDHK y la LDH.
16. El método de la reivindicación 4, en el que las células cultivadas tienen una osmolalidad inferior a 300 mOsm.
17. El método de la reivindicación 4, en el que las células cultivadas tienen una productividad de polipéptidos superior de al menos 68 % en comparación con las células cultivadas sin la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que comprende que codifica un ARNip específico para las PDHK y la LDH.
18. El método de la reivindicación 12 o 13, en el que las células cultivadas son células de mamífero.
19. Un método de silenciamiento o regulación por disminución de la transcripción de lactato deshidrogenasa (LDH) y piruvato deshidrogenasa quinasa (PDHK) en una célula cultivada que comprende:

- introducir en la célula un vector que comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARN interferente pequeño (ARNip) específico para la LDH y una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para la PDHK, en el que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor y en el que la segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un segundo promotor, en el que los ARNip se expresan, silenciando o regulando así por disminución la transcripción génica de la LDH y la PDHK.
20. Un método de producción de una célula que presenta producción de lactato reducida en cultivo, que comprende introducir en la célula un vector que comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARN interferente pequeño (ARNip) específico para la LDH y una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para la PDHK, en el que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor y en el que la segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un segundo promotor, en el que los ARNip se expresan, silenciando o regulando así por disminución la transcripción génica de la LDH y la PDHK.
21. Células en cultivo que comprenden una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un primer ARN interferente pequeño (ARNip) específico para una lactato deshidrogenasa (LDH) y una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un segundo ARNip específico para una piruvato deshidrogenasa quinasa (PDHK), en las que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor y en las que la segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un segundo promotor, en las que los ARNip silencian o regulan por disminución la transcripción génica de la LDH y la PDHK.
22. Las células de la reivindicación 21, en las que las células comprenden además una tercera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una segunda PDHK y en las que la tercera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un tercer promotor.
23. Las células de la reivindicación 22, en las que las células comprenden además una cuarta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una tercera PDHK y en las que la cuarta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un cuarto promotor.
24. Las células de la reivindicación 23, en las que las células comprenden además una quinta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una quinta PDHK y en las que la quinta secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un quinto promotor.
25. Las células de una cualquiera de las reivindicaciones 21, 22, 23 y 24, en las que la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK1, PDHK2, PDHK3 y PDHK4.
26. Las células de una cualquiera de las reivindicaciones 21, 22 y 23 en las que la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK1, PDHK2 y PDHK3.
27. Las células de la reivindicación 21 o 22, en las que la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK1 y PDHK2.
28. Las células de la reivindicación 21 o 22, en las que la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK1 y PDHK3.
29. Las células de la reivindicación 21 o 22, en las que la PDHK se selecciona del grupo que consiste en PDHK2 y PDHK3.
30. Las células de la reivindicación 23, en las que la LDH es LDHa, en las que la primera PDHK es PDHK1, en las que la segunda PDHK es PDHK2 y en las que la tercera PDHK es PDHK3.
31. Las células de la reivindicación 21, en las que las células producen un polipéptido heterólogo.
32. Las células de la reivindicación 31, en las que el polipéptido heterólogo es un anticuerpo.
33. Las células de la reivindicación 23, en las que las células tienen una velocidad promedio de producción de lactato inferior a un valor negativo de $0,02 \text{ mg}/10^6 \text{ células}/\text{día}$.
34. Las células de la reivindicación 23, en las que las células tienen una productividad específica superior de al menos 75 % en comparación con las células sin la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que comprende la LDH y las PDHK.
35. Las células de la reivindicación 23, en las que las células tienen una osmolalidad inferior a 300 mOsm.

36. Las células de la reivindicación 23, en las que las células tienen una productividad de polipéptidos superior de al menos 68 % en comparación con las células sin la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que comprende la LDH y las PDHK.
- 5 37. Las células de la reivindicación 31 o 32, en las que las células son células de mamífero.
38. Un vector que comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARN interferente pequeño (ARNip) específico para una lactato deshidrogenasa (LDH) y una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica un ARNip específico para una piruvato deshidrogenasa quinasa (PDHK), en el que la primera secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un primer promotor y en el que la segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está unida operativamente a un segundo promotor.
- 10
39. Un método de reducción de la producción de lactato en células cultivadas, comprendiendo el método cultivar células que expresan a) un ARN interferente pequeño (ARNip) específico para una lactato deshidrogenasa (LDH) y b) un ARNip específico para una piruvato deshidrogenasa quinasa (PDHK), en el que los ARNip se expresan, silenciando o regulando así por disminución la transcripción génica de la LDH y la PDHK.
- 15
40. El método de la reivindicación 39, en el que las células cultivadas expresan adicionalmente un ARNip específico para una segunda PDHK.
- 20
41. El método de la reivindicación 40, en el que las células cultivadas expresan adicionalmente un ARNip específico para una tercera PDHK.
42. El método de la reivindicación 40, en el que las células cultivadas expresan adicionalmente un ARNip específico para una cuarta PDHK.
- 25
43. El método de la reivindicación 41, en el que las células cultivadas tienen una productividad de polipéptidos superior de al menos 68 % en comparación con las células cultivadas sin los ARNip específicos para la LDH y las PDHK.
- 30

Figura 1

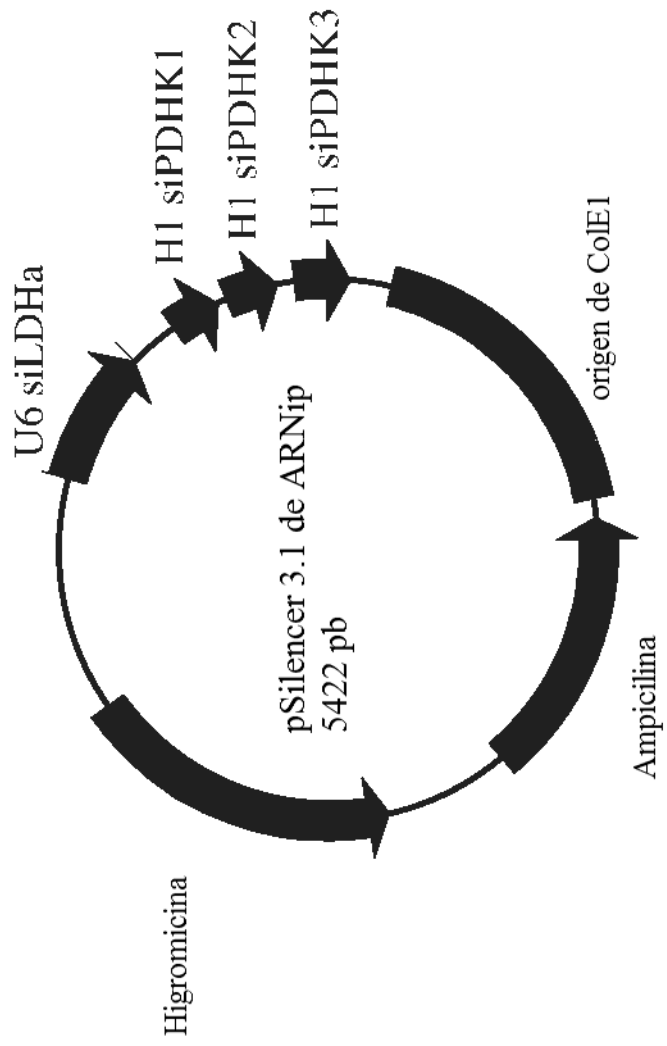


Figura 2

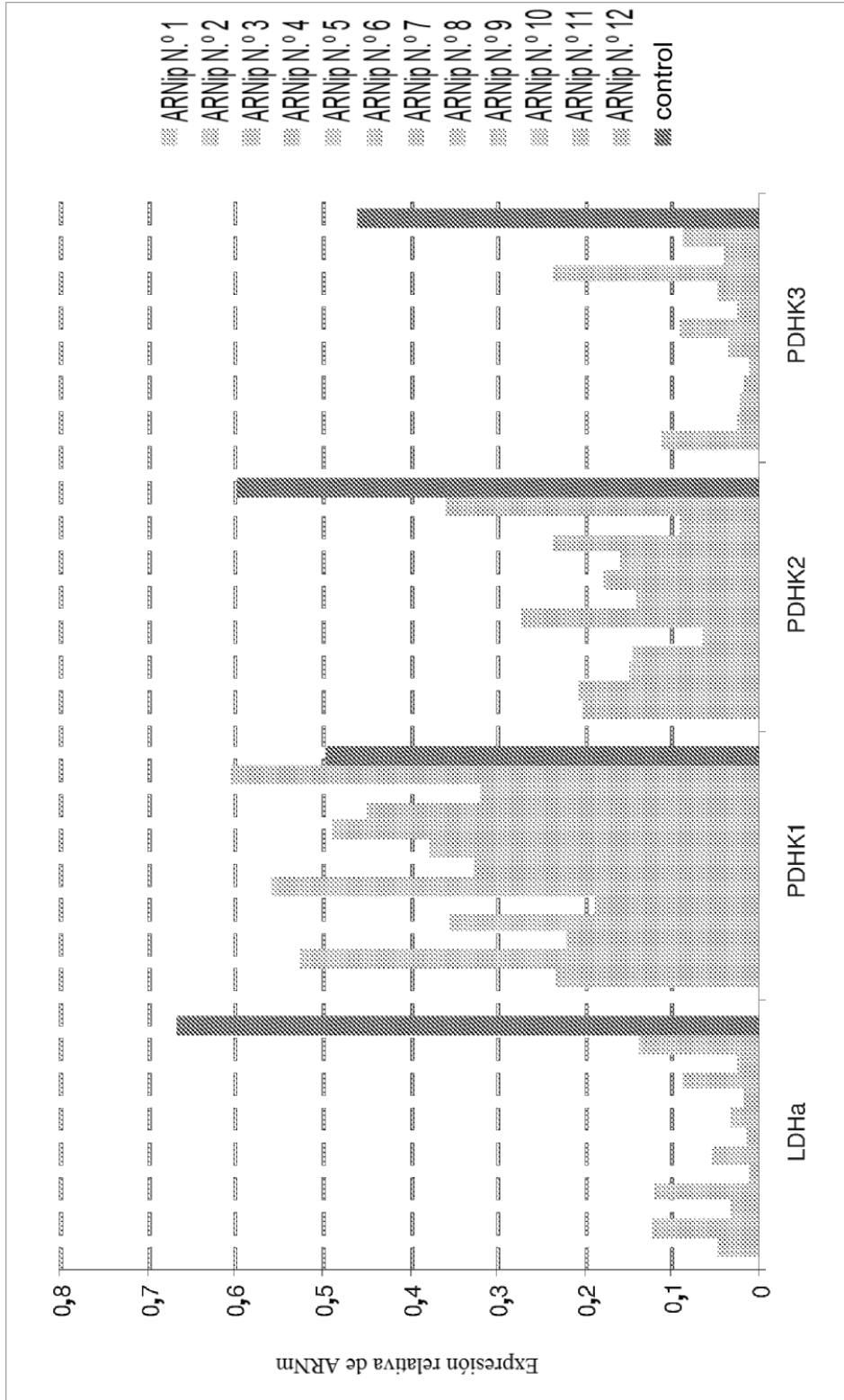


Figura 3A

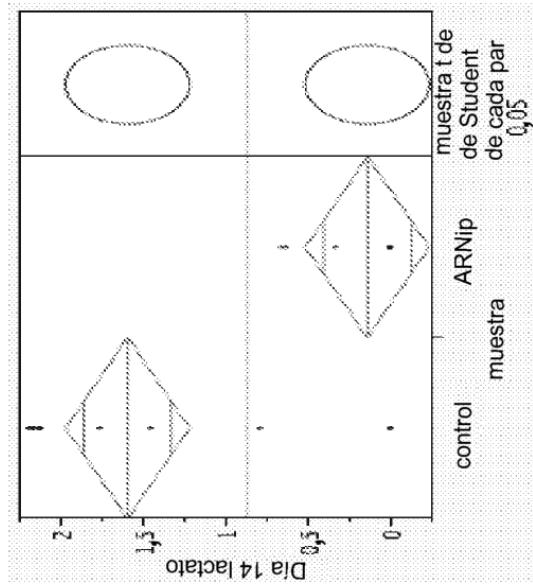
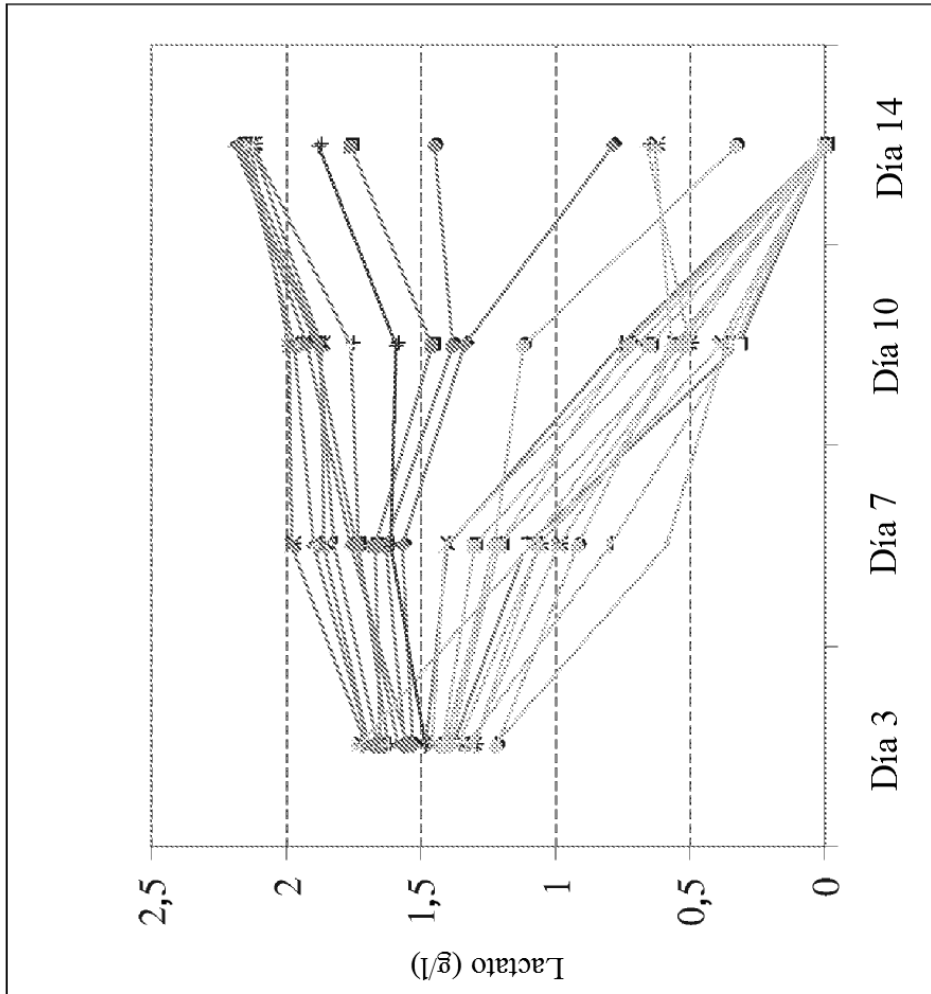


Figura 3B

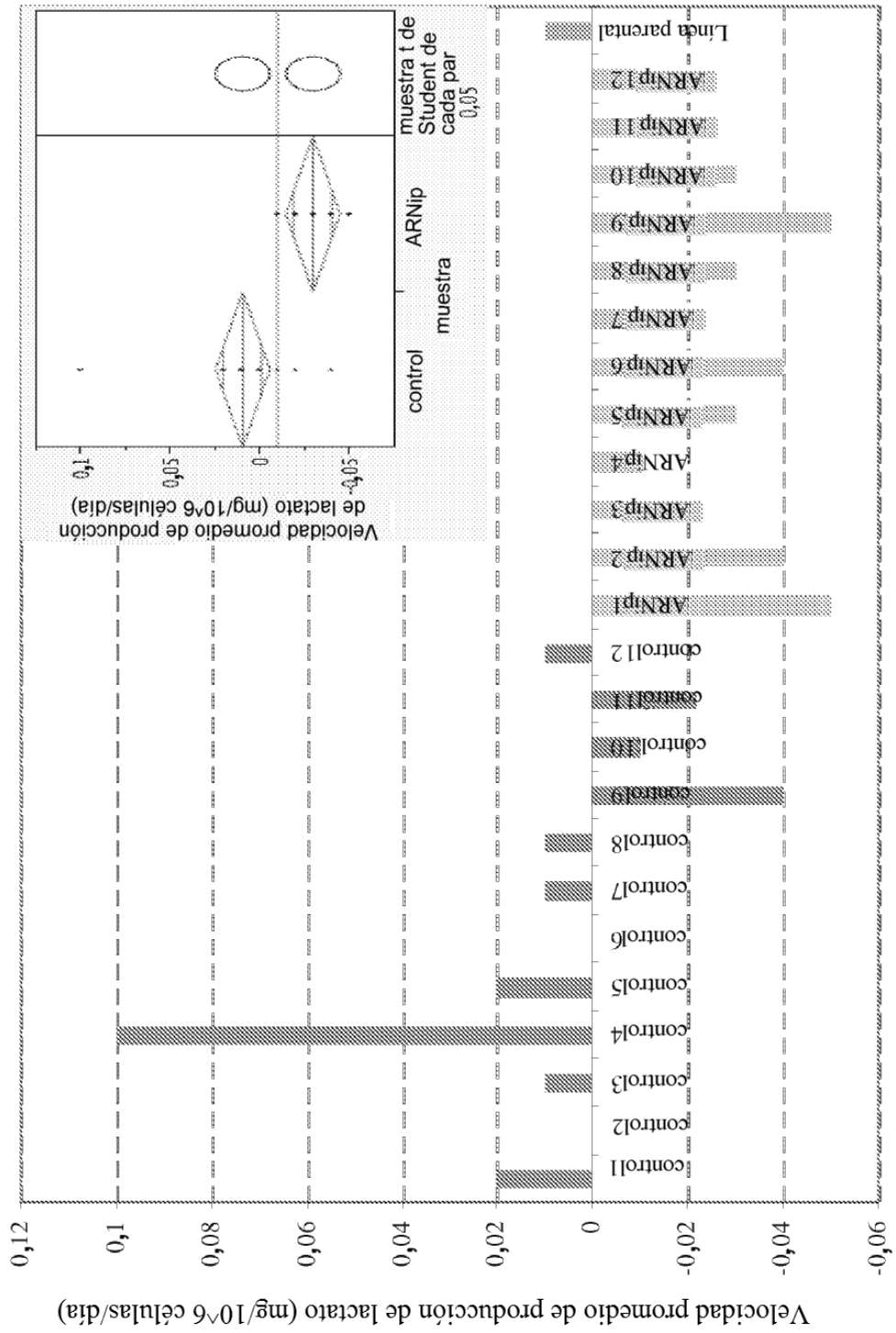


Figura 3C

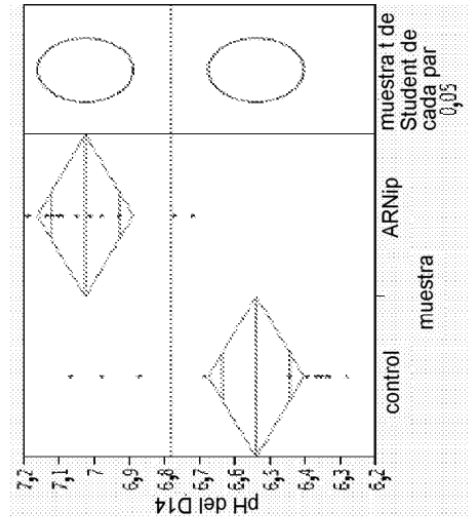
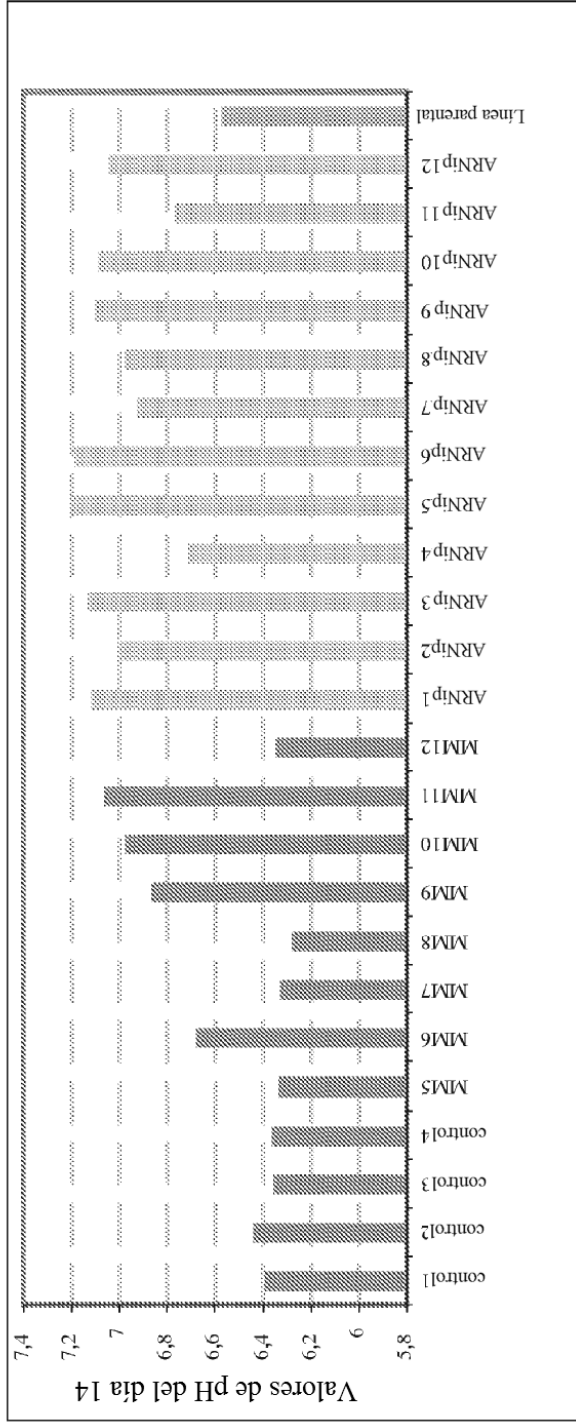


Figura 4A

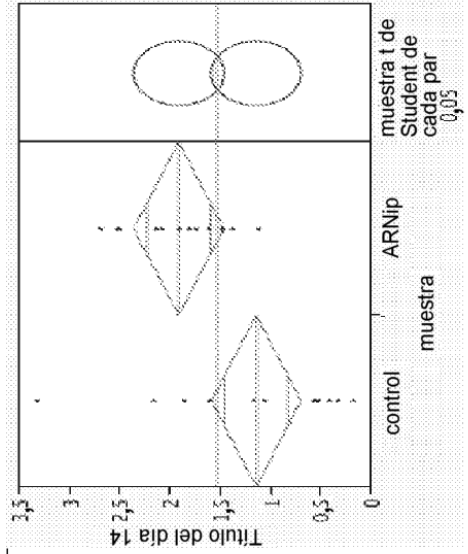
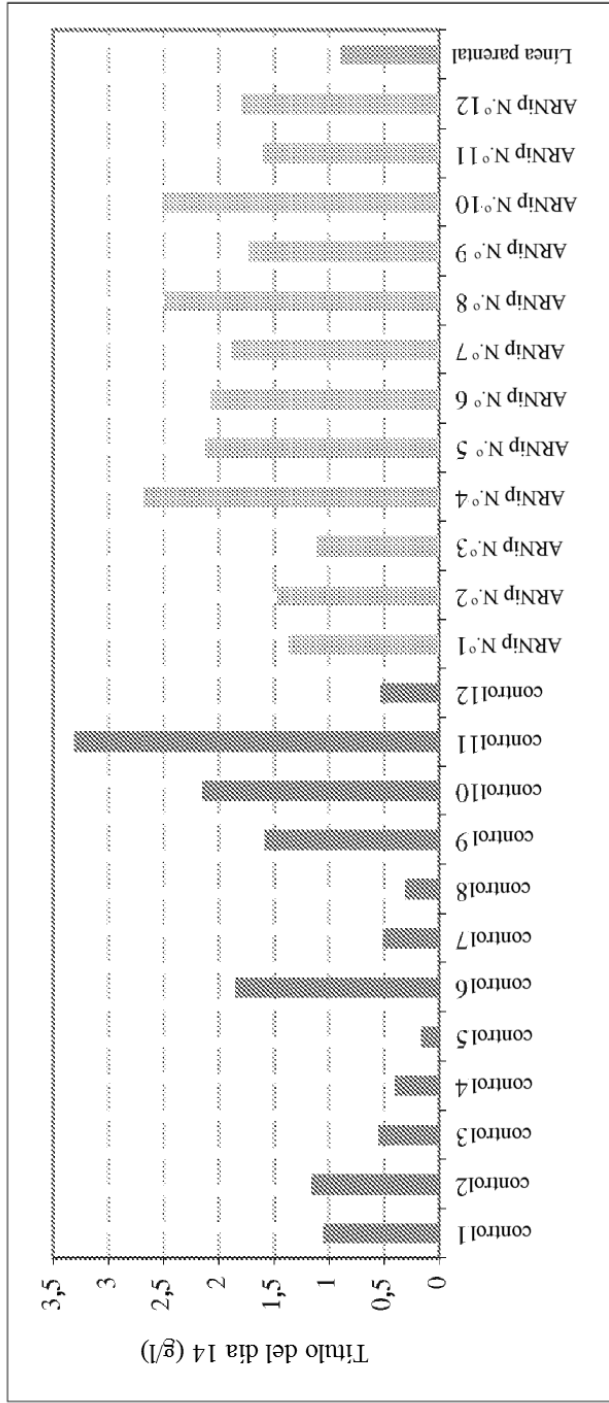


Figura 4B

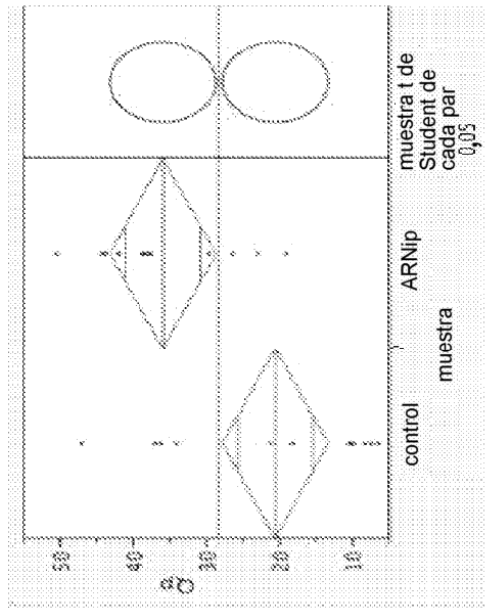
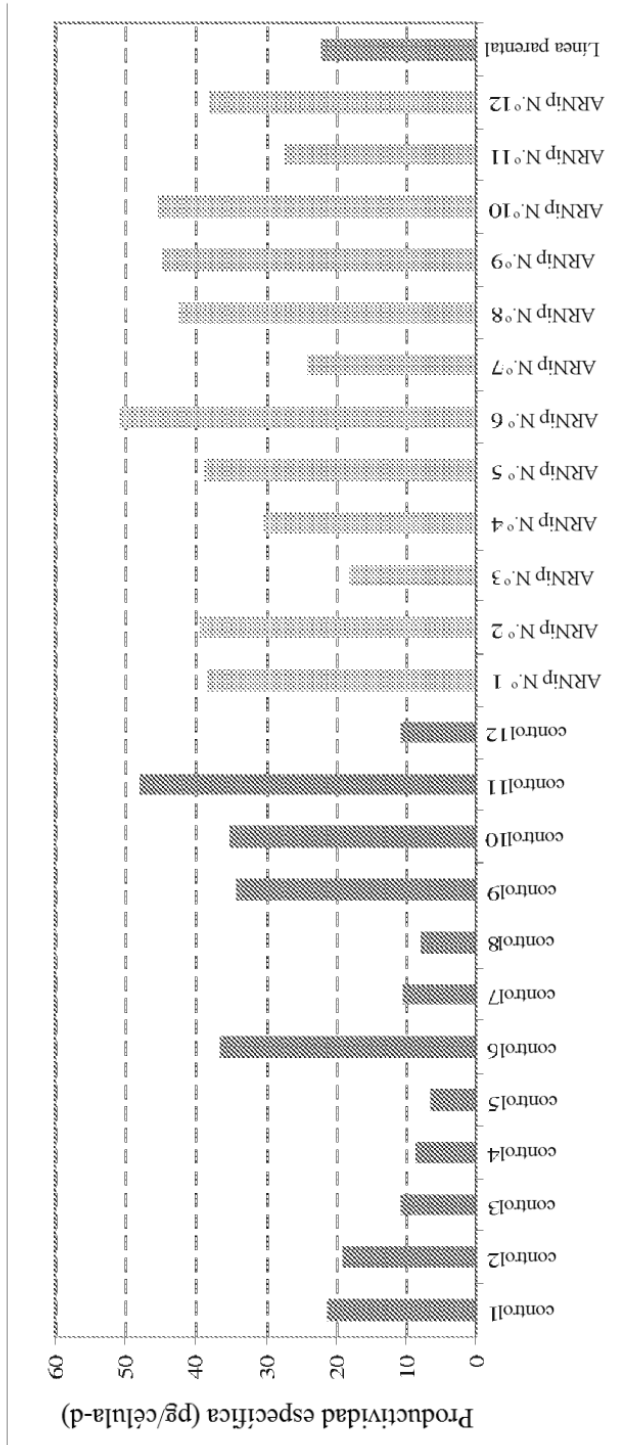


Figura 4C

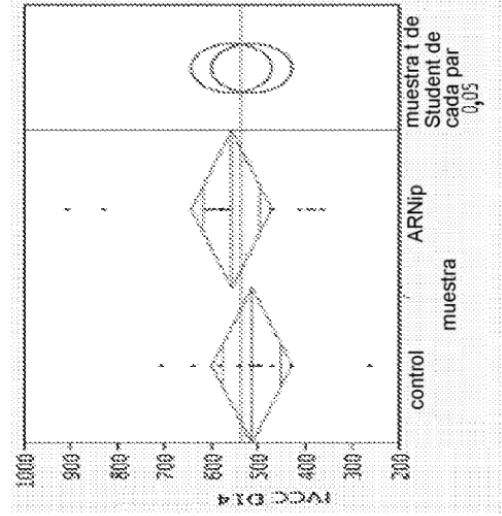
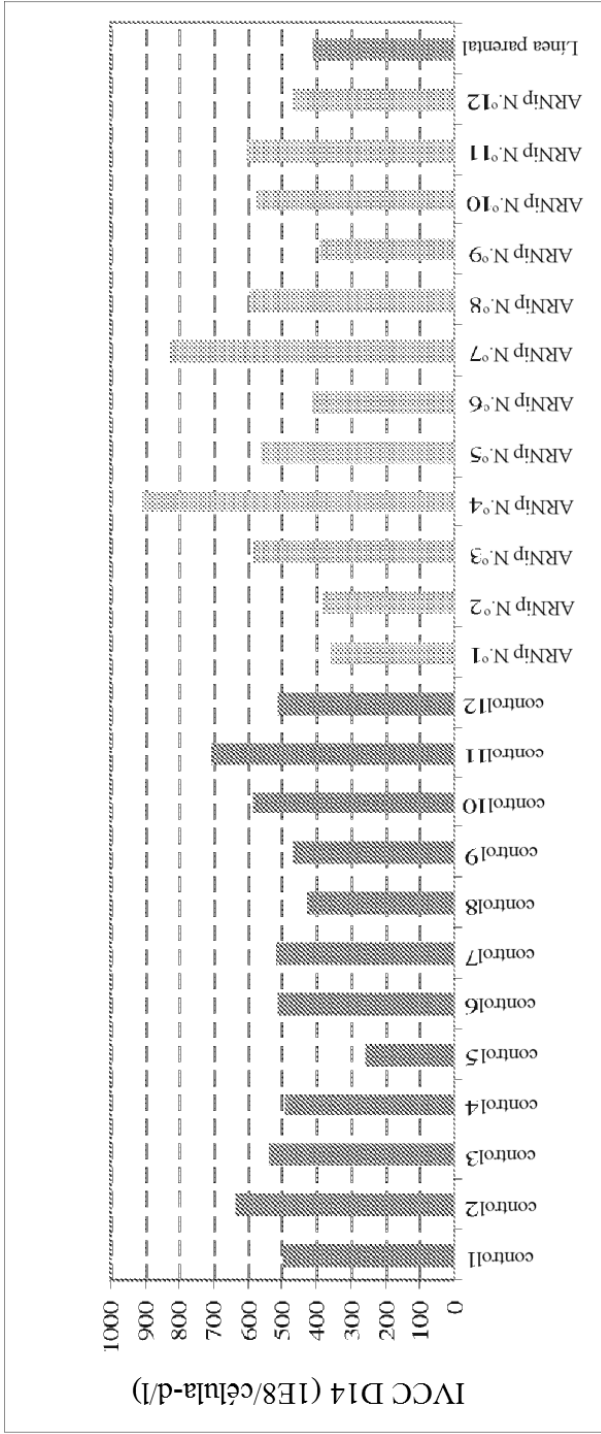


Figura 5A

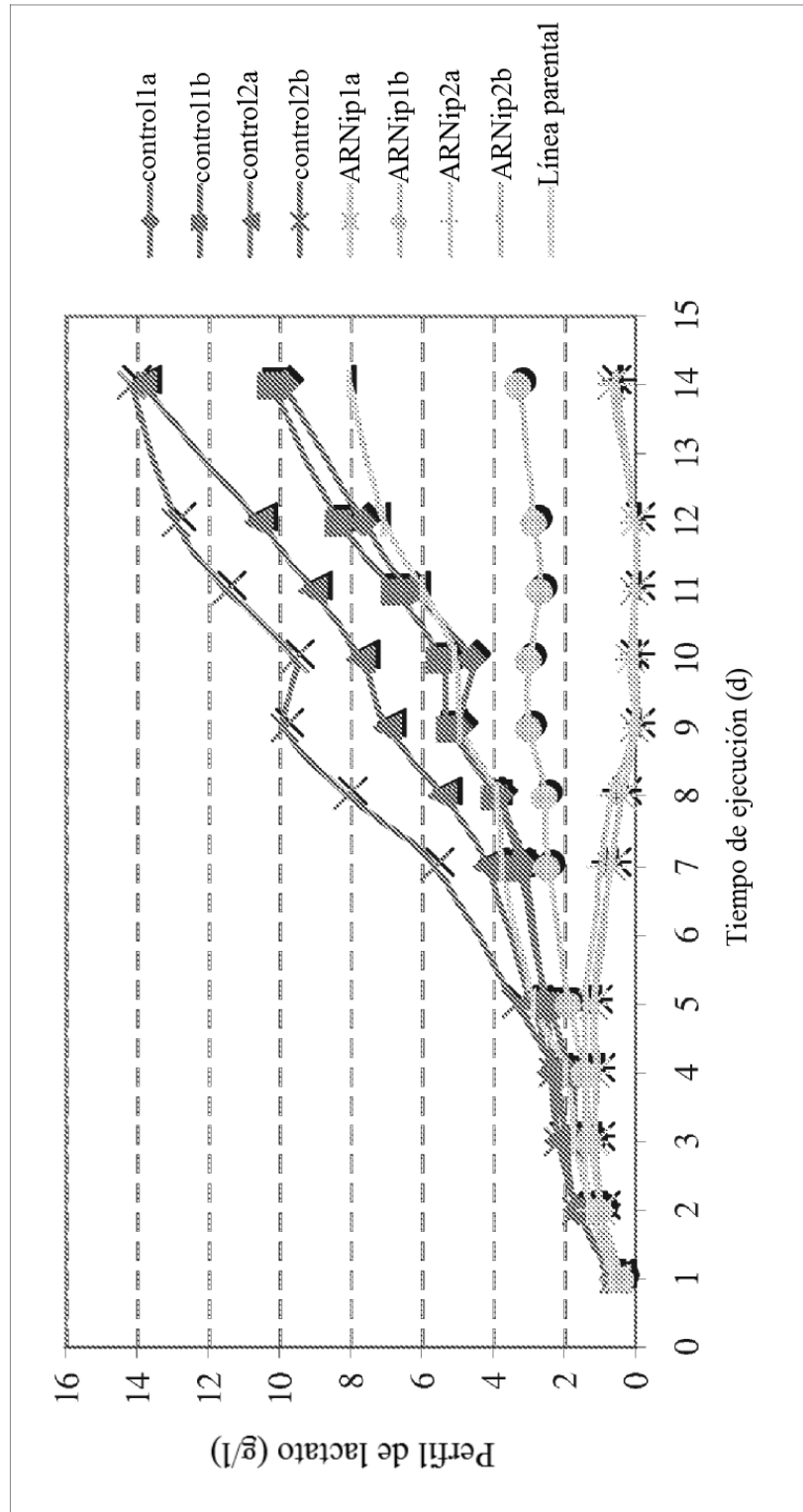


Figura 5B

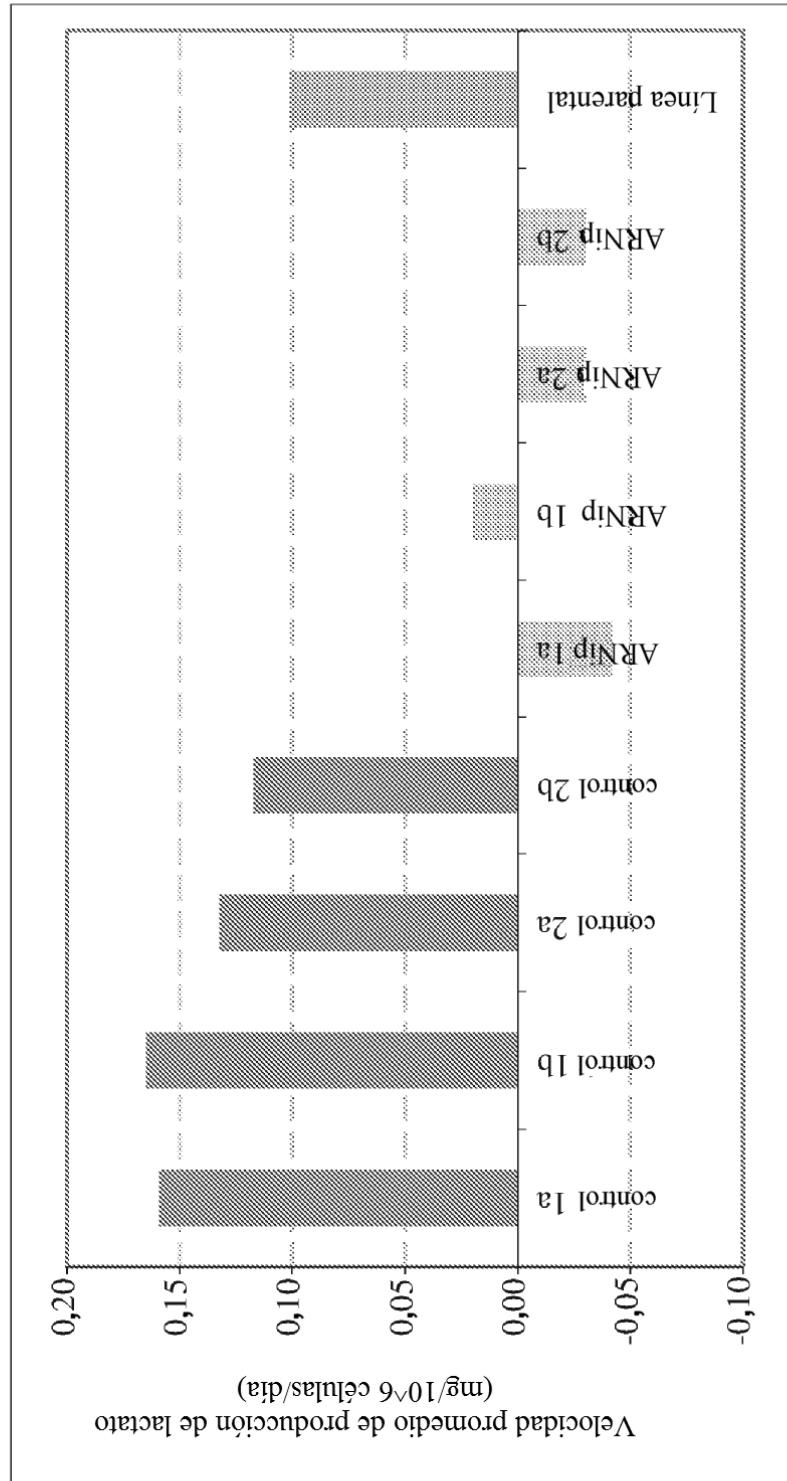


Figura 5C

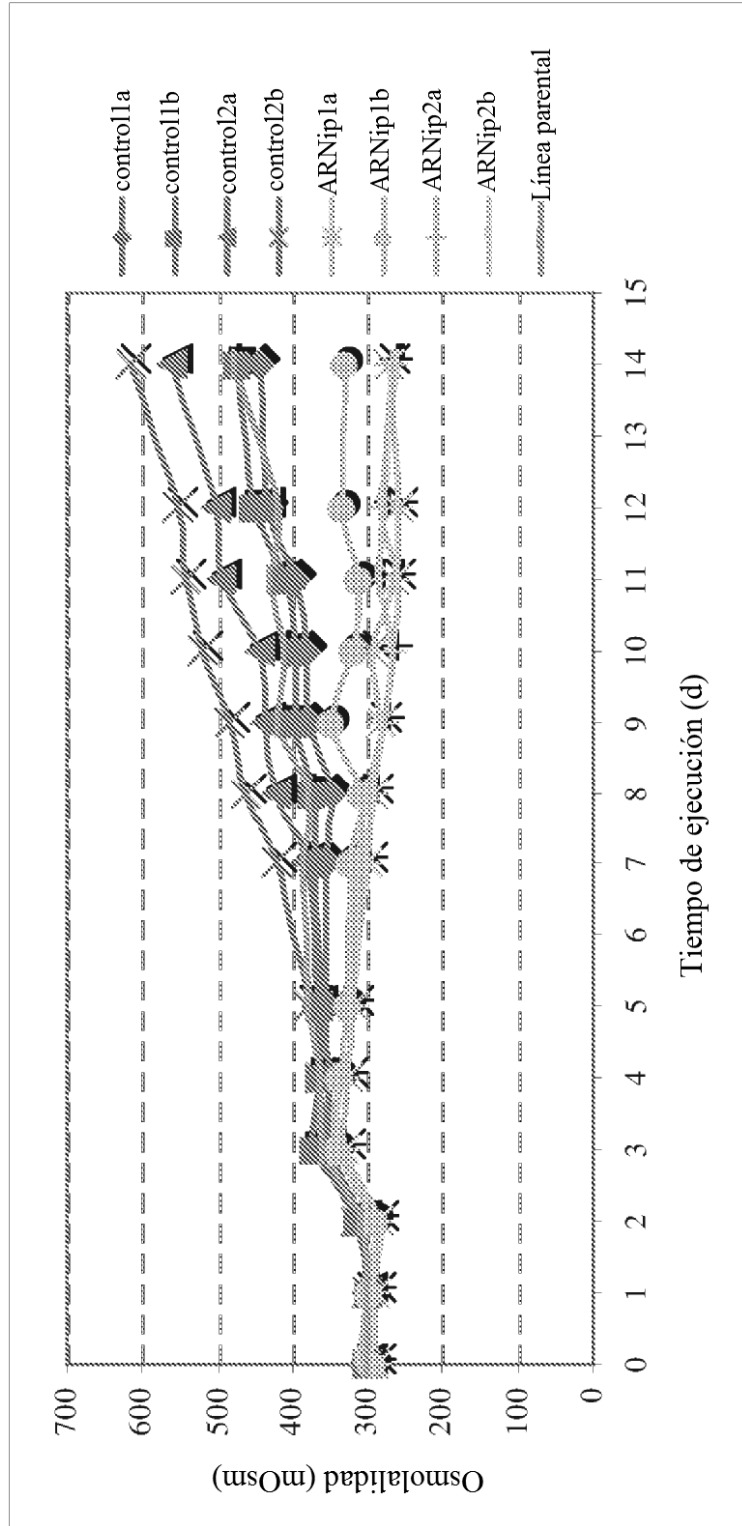


Figura 6

