

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 044**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2011 PCT/FR2011/050544**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2011 WO11114063**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2011 E 11715936 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2547694**

54 Título: **Nuevo péptido señal, y su utilización para la producción de proteínas recombinantes**

30 Prioridad:

17.03.2010 FR 1051905

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

17.02.2017

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANÇAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
(100.0%)
3 avenue des Tropiques, ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis, FR**

72 Inventor/es:

FONTAYNE, ALEXANDRE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 602 044 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

Nuevo péptido señal, y su utilización para la producción de proteínas recombinantes

5 La presente invención se refiere a un péptido señal, y a su utilización para la producción de proteínas recombinantes en los sistemas de expresión eucariotas.

10 El péptido señal (PS) es un segmento de 12 a 30 aminoácidos situado en el extremo N-terminal de una proteína que sirve para dirigir ésta última a un compartimiento celular (orgánulo) particular o que permite su dirección al medio extracelular.

15 El péptido señal induce el paso al retículo endoplásmico rugoso (RER) en el que la proteína madurará. Así, durante la síntesis de la proteína, una "partícula de reconocimiento de señal" (SRP) se fija al mismo tiempo al péptido señal (enlace receptor-ligando) y al ribosoma del cual el péptido señal emerge. El conjunto SRP/ribosoma se recluta después sobre la superficie del retículo endoplásmico por un receptor membranario, el receptor de SRP, el cual está a su vez unido al canal de translocación (PCC). Durante este proceso, la síntesis de la proteína se suspende, ya que el SRP bloquea el acceso de los factores de elongación, eEF-1 y eEF-2. Este reclutamiento va seguido de una hidrólisis de GTP, en GDP y Pi que libera la partícula SRP.

20 La proteína naciente, a lo largo de su crecimiento, utiliza el canal para pasar totalmente a la luz del retículo. La naturaleza hidrófoba del péptido señal (hélice- α) permite también una interacción con los fosfolípidos de la membrana.

25 Durante su síntesis, las proteínas destinadas a ser segregadas conservan su péptido señal que persiste en forma de hélice- α como sitio de inserción en la membrana, permitiendo que las proteínas chaperonas como BIP se hagan cargo de la cadena polipeptídica durante la síntesis para asegurar su replegamiento. Las modificaciones post-traduccionales como la glicosilación empiezan en el RE y acaban en el aparato de Golgi, en el que los glicanos maduran.

30 El extremo N-terminal de un péptido señal está dividido en 3 regiones, a saber la región n, la región h y la región c, cada una con una longitud y unas propiedades diferentes. La región n se sitúa en el extremo N-terminal del péptido señal, mientras que la región c está en el extremo C-terminal del péptido señal. La región h se sitúa entre la región n y la región c. Las regiones n y h constituyen el núcleo del péptido señal que condiciona el direccionamiento, mientras que la región c condiciona la escisión por una peptidasa. Se sabe que la región n es poco rica en arginina, mientras que la región h es una región hidrófoba. Se sabe también que los restos en la región c son más bien unos restos pequeños y no polares.

35 Durante la expresión de una proteína recombinante en un sistema eucariota, la presencia o no de péptido señal, o la elección de éste puede influir directamente en la productividad de dicha proteína recombinante, dicho de otra manera la cantidad de proteína segregada por las células que contienen un transgen calculadas por unidad de volumen.

45 Por ejemplo, algunas proteínas heterólogas son tóxicas para la supervivencia o el crecimiento de las células hospedantes, algunas otras no lo son, pero inhiben el crecimiento de las células hospedantes. En estos casos, la secreción de tal proteína tóxica hacia el medio extracelular permite evitar la toxicidad o la inhibición de crecimiento relacionada con la expresión de la proteína recombinante heteróloga.

50 Desde un punto de vista de producción industrial, una proteína recombinante capaz de ser segregada en el medio extracelular es mucho más ventajosa con respecto a una proteína recombinante acumulada en la célula hospedante, ya que el procedimiento de purificación de una proteína segregada es generalmente más simple que el de una proteína que se ha acumulado en una célula. Además, esto permite prescindir de la co-purificación de proteínas inmaduras que pueden interferir o reducir la actividad de la proteína de interés.

55 Además, dado que todos los péptidos señales no tienen el mismo poder secretor, el péptido señal endógeno de una proteína capaz de ser segregada no es siempre lo bastante eficaz para la producción industrial de la proteína en cuestión.

60 Algunos péptidos señales ya se han concebido para la expresión de proteínas recombinantes en algunos sistemas de expresión. La patente EP 0 329 127 describe un péptido señal destinado a la expresión de proteínas recombinantes en células de levaduras. La patente EP 0 356 335 describe un péptido señal bacteriano para mejorar la producción periplásmica de polipéptidos heterólogos en bacterias.

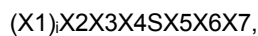
65 Sin embargo, estos péptidos señales no permiten optimizar la expresión de proteínas recombinantes en las líneas celulares eucariotas superiores que incluyen las células de mamífero, un sistema de expresión frecuentemente ineludible para la producción de numerosas proteínas recombinantes terapéuticas, tales como anticuerpos.

En consecuencia, se destaca que existe una gran necesidad en poner a disposición un péptido señal universal, que permita mejorar la expresión y la secreción de proteínas recombinantes en una línea celular eucariota superior.

El documento US 2004/229301 describe el péptido señal MAWVWTLFLMAAAQSAQA.

La presente invención se basa en una constatación inesperada hecha por los inventores, durante un estudio sobre la capacidad de secreción, por un lado, de una cadena ligera de un anticuerpo unida a los diferentes péptidos señales concebido por los inventores y, por otro lado, sobre una IgG entera. En efecto, algunos péptidos señales permiten aumentar significativamente la secreción de una cadena ligera de inmunoglobulina o de inmunoglobulina entera.

La presente divulgación está así ilustrada por la utilización de un péptido señal para la producción y la secreción de un polipéptido recombinante de interés en un sistema de expresión, siendo la cantidad del polipéptido segregado con la ayuda de dicho péptido señal al menos igual a la cantidad de dicho polipéptido segregado con la ayuda de su péptido señal natural, siendo la actividad biológica del polipéptido de interés conservada con respecto a la del polipéptido de interés producido por su péptido señal natural, comprendiendo dicho péptido señal al menos 12 aminoácidos de fórmula (I):



en la que: (incluidos los tres péptidos)

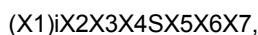
- X1 es un péptido que contiene de 3 a 6 aminoácidos, i es igual a 0 o 1,
- X2 es un péptido que contiene de 3 a 9 aminoácidos hidrófobos,
- X3 es un péptido que contiene de 3 a 5 aminoácidos, comprendiendo dicho péptido al menos 3 leucinas, contiguas o no,
- X4 es un péptido que contiene de 2 a 5 aminoácidos seleccionados entre Ala, Thr, Ser, Gln, Ile, Met,
- X5 es Ala o Val,
- X6 es Gln, Asn o His,
- X7 es Ala o Cys,

con la condición de que:

- cuando dicho péptido señal procede de un precursor natural de una proteína determinada, dicho polipéptido de interés es diferente de dicha proteína, y
- cuando el péptido señal es MAWVWTLFLMAAAQSAQA, dicho polipéptido de interés no es un anticuerpo anti-CD23,

pudiendo cualquier polipéptido de interés estar unido a uno de dichos péptidos señales para ser segregado en un medio extracelular.

En un primer aspecto, la invención se refiere así a la utilización de un péptido señal para la producción de un polipéptido recombinante de interés en un sistema de expresión, comprendiendo dicho péptido señal al menos 12 aminoácidos de fórmula (I):



en la que:

- X1 es un péptido que contiene de 3 a 6 aminoácidos, i es igual a 0 o 1,
- X2 es un péptido que contiene de 3 a 9 aminoácidos hidrófobos seleccionados entre Gly, Ala, Val, Ile, Pro, Phe, Trp,
- X3 es un péptido que contiene de 3 a 5 aminoácidos, comprendiendo dicho péptido al menos 3 leucinas, contiguas,
- X4 es un péptido que contiene de 2 a 5 aminoácidos seleccionados de entre Ala, Thr, Ser, Gln, Ile, Met,
- X5 es Ala o Val,

- X6 es Gln, Asn o His,

- X7 es Ala o Cys,

5 con la condición de que cuando dicho péptido señal procede de un precursor natural de una proteína determinada, dicho polipéptido de interés es diferente de dicha proteína, pudiendo cualquier polipéptido de interés estar unido a uno de dichos péptidos señales para ser segregado en el medio extracelular.

10 Por "péptido señal" se entiende una cadena peptídica de aproximadamente 10 a 30 aminoácidos, situada dentro de una cadena polipeptídica, que sirve para dirigir esta última a un compartimiento celular (orgánulo) particular o que permite su direccionamiento al medio extracelular.

15 Dicho péptido señal según la invención se sitúa, preferentemente, en el extremo N-terminal del polipéptido de interés.

La utilización de un péptido señal permite aumentar el porcentaje de secreción de un polipéptido de interés. Cabe señalar que el péptido señal utilizado en la invención es diferente del péptido señal naturalmente asociado a una proteína determinada.

20 Se entiende por "polipéptido recombinante de interés" un polipéptido producido *in vitro* por la maquinaria transcripcional y traduccional de una célula en cultivo, o más generalmente producido por células vivas (*in vitro* o *in vivo*) que han recibido un ADN exógeno que codifica para dicho polipéptido.

25 Dicho péptido señal permite producir un polipéptido recombinante de interés segregado en cantidad al menos igual a la cantidad de dicho polipéptido con la ayuda de su péptido señal natural.

Además, tal polipéptido de interés producido con la ayuda de un péptido señal según la invención conserva la actividad biológica del polipéptido de interés producido por su péptido señal natural.

30 Un péptido señal según la invención puede permitir producir un polipéptido recombinante de interés en un sistema de expresión *in vitro*, por ejemplo en un cultivo celular.

35 Un péptido señal según la invención puede permitir también producir un polipéptido recombinante de interés en un sistema de expresión *in vivo*, por ejemplo en animales transgénicos, tales como cabras, ovejas, bisontes, camellos, vacas, cerdos, conejos, caballos, ratas, ratones o llamas.

40 Un péptido señal según la invención se puede utilizar, o bien en la producción de una proteína que posee un péptido señal natural, o bien en la producción de una proteína que no posee péptido señal natural, tal como una proteína de fusión o una proteína artificial.

En un modo de realización particular, la invención se refiere a la utilización de un péptido señal tal como se ha definido anteriormente, en la que dicho péptido señal está representado por la fórmula (II):



en la que X1, i, X2, X3 X4, X5 X6 y X7 tienen los significados indicados en la fórmula I.

50 En un modo de realización de la utilización de un péptido señal tal como se ha definido anteriormente, el péptido X3 comprende al menos 3 leucinas contiguas.

Por "3 leucinas contiguas" se entienden tres leucinas enlazadas una tras otra sucesiva y directamente, sin ningún otro aminoácido insertado entre estas tres leucinas.

55 En una ilustración de la invención del péptido señal, tal como se ha definido anteriormente, el péptido X3 comprende al menos 3 leucinas no contiguas.

60 Por "3 leucinas no contiguas" se entiende que al menos una leucina de las tres no está enlazada directamente a una de las otras dos leucinas y que al menos un aminoácido diferente de la leucina está insertado entre al menos dos leucinas de entre las tres.

A título de ejemplo, tres leucinas no contiguas pueden comprender 2 leucinas enlazadas una a la otra directa o sucesivamente, estando una tercera leucina enlazada a estas dos leucinas por medio de al menos un aminoácido diferente de la leucina.

65 A título de ejemplo, tres leucinas no contiguas pueden también ser separadas la una de la otra por al menos un

aminoácido diferente de la leucina. Dicho de otra manera, estas tres leucinas están enlazadas la una a la otra por al menos un aminoácido diferente de la leucina situado entre cada una de las leucinas.

5 En un modo de realización particular, la invención se refiere a la utilización de un péptido señal tal como se ha definido anteriormente, en la que:

- X1, X2 y X4 tienen los significados indicados en la fórmula I,

- $i = 1$,

10 - X3 es un péptido constituido de leucinas, representado por L_n , en el que n es el número de leucinas, siendo n un número superior o igual a 3,

15 - X4 es un péptido que contiene de 2 a 5 aminoácidos seleccionados entre Ala, Thr, Ser, Gln, Ile,

- X5 es Ala,

- X6 es Gln o Asn,

20 - X7 es Ala,

comprendiendo dicho péptido la secuencia de aminoácidos siguiente: $X1X2L_nX4SAX6A$.

25 En un modo de realización más particular, la invención se refiere a la utilización de un péptido señal representado por la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1 (MRWSWIFLLLLSITSANA).

La solicitud divulga también la utilización de un péptido señal tal como se ha definido anteriormente, en la que:

30 - X1 y X2 tienen los significados indicados en la fórmula I,

- $i = 1$,

35 - X3 es un péptido que comprende 3 leucinas no contiguas, entre las cuales 2 leucinas están separadas por otro aminoácido hidrófobo seleccionado entre Gly, Ala, Val, Ile, Pro, Phe, Trp,

- X4 es un péptido que contiene de 2 a 5 aminoácidos seleccionados entre Ala, Thr, Ser, Gln, Ile,

- X5 es Val,

40 - X6 es His,

- X7 es Cys,

comprendiendo dicho péptido la secuencia de aminoácidos siguiente: $X1X2X3X4SVHC$.

45 La solicitud divulga también la utilización de un péptido señal representado por la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 (MRWSWIFLFLLSITASVHC), con la condición de que este péptido señal no sea utilizado en la producción de la cadena pesada de un anticuerpo anti-AMHRII. El péptido señal representado por la secuencia SEC ID nº 2 está codificado por el ácido nucleico representado por la secuencia SEC ID nº 28 (atgcatgagactggtcttctctctctctgcaataactgcaagtgtccattgc).

50 La solicitud divulga también la utilización de un péptido señal tal como se ha definido anteriormente, en la que:

55 - X1, X2 y X4 tienen los significados idénticos a la fórmula I,

- $i = 0$,

60 - X3 es un péptido que comprende 3 leucinas no contiguas, entre las cuales 2 leucinas son separadas por otro aminoácido hidrófobo seleccionado entre Gly, Ala, Val, Ile, Pro, Phe, Trp,

- X5 es Ala,

X6 es Gln,

65 X7 es Ala,

comprendiendo dicho péptido la secuencia de aminoácidos siguiente: X2X3X4SAQA.

La solicitud divulga también la utilización de un péptido señal representado por la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 3 (MAWVWTLFLMAAAQSAQA), con la condición de que este péptido señal no sea utilizado en la producción de la cadena pesada de un anticuerpo anti-CD5, o de un anticuerpo anti-CD23. El péptido señal representado por la secuencia SEC ID nº 3 está codificado por el ácido nucleico representado por la secuencia SEC ID nº 29 (atggctgggtgtggacctgtctattcctgatggcagctgcccaaatgccaagca).

El sistema de expresión *in vitro* puede ser cualquier sistema de expresión conocido por el experto en la materia, por ejemplo la expresión de proteínas heterólogas en las bacterias, las levaduras, las células de insectos o de otras líneas celulares eucariotas.

Ventajosamente, la utilización de un péptido señal según la invención se realiza en una línea celular de eucariota superior.

Más ventajosamente, dicha línea celular eucariota superior se puede seleccionar entre SP2/0, (SP2/0-Ag 14), NS0, otros mielomas de rata como IR983F, líneas humanas como Namalwa, Wil-2, Jurkat, Molt-4, PER.C6, HEK293T/17, HEK293, HEK-293.2, Vero, Cos-1 ou Cos-7, BHK, CHO-K-1, CHO-Lec1, CHO-Lec10, CHO-Lec13, CHO Pro-5, CHO DX B11 y CHO DG44 y otras líneas como EBx con en particular EB66K6H6, y P3X63Ag8.653 y YB2/0, CHO-S y HEK-293F.

Tal polipéptido recombinante de interés producido con la ayuda de un péptido señal según la invención puede ser cualquier proteína de interés, o pertenecer a una proteína de interés. Tal polipéptido de interés se puede seleccionar entre, a título de ejemplo, una hormona, una enzima de inmunoglobulina, una inmunoglobulina entera o cualquier fragmento derivado de una inmunoglobulina, una proteína que interviene en la reacción inmunitaria tales como citoquinas, interleucinas, factores del complemento, una proteína quimérica, u otra proteína terapéutica tal como unos factores de coagulación, unas proteínas de la matriz extracelular, o unos receptores solubles.

En un modo de realización ventajoso, un péptido señal según la invención permite producir en el medio extracelular un polipéptido recombinante de interés, en el que las estructuras primaria y secundaria de dicho polipéptido son idénticas a las del polipéptido producido con la ayuda de su péptido señal natural.

En un modo de realización particular de la invención, el péptido señal MRWSWIFLLLLSITSANA según la invención permite producir en el medio extracelular un polipéptido recombinante de interés, en el que las estructuras primaria y secundaria de dicho polipéptido son idénticas a las del polipéptido producido con la ayuda de su péptido señal natural.

La presente divulgación está también ilustrada por un péptido señal que comprende una secuencia de al menos 12 aminoácidos de fórmula III:



en la que:

- X1 es un péptido que contiene de 3 a 6 aminoácidos,
- X2 es un péptido que contiene de 3 a 9 aminoácidos hidrófobos,
- X3 es un péptido que contiene de 3 a 5 aminoácidos, comprendiendo dicho péptido al menos 3 leucinas contiguas,
- X4 es un péptido que contiene de 2 a 5 aminoácidos seleccionado entre Ala, Thr, Ser, Gln, Ile,
- X5 es Ala,
- X6 es Gln o Asn,
- X7 es Ala.

La presente invención tiene así por objeto un péptido señal que comprende una secuencia de al menos 12 aminoácidos de fórmula III:



en la que:

- X1 es un péptido que contiene de 3 a 6 aminoácidos,
- X2 es un péptido que contiene de 3 a 9 aminoácidos hidrófobos seleccionados entre Gly, Ala, Val, Ile, Pro, Phe, Trp,
- X3 es un péptido que contiene de 3 a 5 aminoácidos, comprendiendo dicho péptido al menos 3 leucinas contiguas,
- X4 es un péptido que contiene de 2 a 5 aminoácidos seleccionados entre Ala, Thr, Ser, Gln, Ile,
- X5 es Ala,
- X6 es Gln o Asn,
- X7 es Ala.

Las leucinas situadas en la región h de dichos péptidos señales permiten crear un tramo de leucina.

En los péptidos señales descritos anteriormente, la región «SAX6A» corresponde al sitio de reconocimiento de la peptidasa. El aminoácido representado por X6 puede ser una glutamina o una asparagina, ya que presentan propiedades fisicoquímicas parecidas.

En un modo de realización ventajoso, los péptidos señales según la invención corresponden a la fórmula (IV): MX1X2X3X4SX5X6X7, en la que X1, X2, X3 X4, X5 X6 y X7 tienen los significados indicados en la fórmula III.

En un modo de realización particular, la invención se refiere a los péptidos señales que corresponden a la fórmula III o a la fórmula IV, en las que:

- X3 es un péptido que contiene 4 leucinas contiguas,
- el péptido X1 es RWS,
- X2, X4 y X6 tienen los significados indicados en la fórmula III,
- respondiendo el péptido señal a la fórmula siguiente: RWSX2X3X4SAX6A.

En otro modo de realización particular, la invención se refiere a los péptidos señales que corresponden a la fórmula III o a la fórmula IV, en las que:

- X3 es un péptido que contiene 4 leucinas contiguas,
- el péptido X2 es WIF,
- X1, X4 y X6 tienen los significados indicados en la fórmula III,
- respondiendo el péptido señal a la fórmula siguiente: X1WIFX3X4SAX6A.

En otro modo de realización particular, la invención se refiere a los péptidos señales que corresponden a la fórmula III o a la fórmula IV, en las que:

- X3 es un péptido que contiene 4 leucinas contiguas,
- el péptido X4 es SIT,
- X1, X2 y X6 tienen los significados indicados en la fórmula III,
- respondiendo el péptido señal a la fórmula siguiente: X1X2X3SITSAX6A.

En un modo de realización particularmente ventajoso, el péptido señal según la invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos: MRWSWIFLLLLSITSANA (SEC ID N° 1).

La invención tiene también por objeto los ácidos nucleicos que codifican uno de los péptidos señales que responden a la fórmula III o a la fórmula IV.

En una ilustración particular de la divulgación, el ácido nucleico codifica un péptido señal que comprende al menos 12 aminoácidos de fórmula III: X1X2X3X4SX5X6X7, en la que:

- X1 es un péptido que contiene de 3 a 6 aminoácidos,

- X2 es un péptido que contiene de 3 a 9 aminoácidos hidrófobos,

5 - X3 es un péptido que contiene de 3 a 5 aminoácidos, comprendiendo dicho péptido al menos 3 leucinas contiguas,

- X4 es un péptido que contiene de 2 a 5 aminoácidos seleccionados entre Ala, Thr, Ser, Gln, Ile,

10 - X5 es Ala,

- X6 es Gln o Asn,

- X7 es Ala.

15 En un modo de realización particular, el ácido nucleico según la invención codifica un péptido señal que comprende al menos 12 aminoácidos de fórmula III: X1X2X3X4SX5X6X7, en la que:

- X1 es un péptido que contiene de 3 a 6 aminoácidos,

20 - X2 es un péptido que contiene de 3 a 9 aminoácidos hidrófobos seleccionados entre Gly, Ala, Val, Ile, Pro, Phe, Trp,

25 - X3 es un péptido que contiene de 3 a 5 aminoácidos, comprendiendo dicho péptido al menos 3 leucinas contiguas,

- X4 es un péptido que contiene de 2 a 5 aminoácidos seleccionados entre Ala, Thr, Ser, Gln, Ile,

- X5 es Ala,

30 - X6 es Gln o Asn,

- X7 es Ala.

35 En un modo de realización más particular, el ácido nucleico según la invención codifica un péptido señal de fórmula (IV): MX1X2X3X4SX5X6X7, en la que X1, X2, X3 X4, X5 X6 y X7 tienen los significados indicados en la fórmula III.

En un modo de realización aún más particular, el ácido nucleico según la invención codifica un péptido señal que responde a la fórmula III o a la fórmula IV, en las que:

40 - X3 es un péptido que contiene 4 leucinas contiguas,

- el péptido X1 es RWS.

45 En otro modo de realización aún más particular, el ácido nucleico según la invención codifica un péptido señal que responde a la fórmula III o a la fórmula IV, en las que:

- X3 es un péptido que contiene 4 leucinas contiguas,

50 - el péptido X2 es WIF.

En otro modo de realización aún más particular, el ácido nucleico según la invención codifica un péptido señal que responde a la fórmula III o a la fórmula IV, en las que:

55 - X3 es un péptido que contiene 4 leucinas contiguas,

- el péptido X4 es SIT.

60 Las secuencias nucleotídicas según la invención pueden ser deducidas a partir de secuencias de aminoácidos de los péptidos señales según la invención. Los codones genéticos respectivos de cada aminoácido en las eucariotas son conocidos por el experto en la materia.

En un modo de realización particularmente ventajoso de la invención, el ácido nucleico según la invención codifica un péptido representado por la secuencia SEC ID N° 1: MRWSWIFLLLLSITSANA.

65

Más particularmente, esta secuencia nucleotídica es la secuencia siguiente (SEC ID N° 4): 5'-atgcatggagctgcatctctctgctgctgctgagcatcaccagcgccaacgcc-3'.

5 Los ácidos nucleicos que codifican uno de los péptidos señales según la invención pueden ser añadidos en el extremo 5' de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés mediante cualquier método conocido por el experto en la materia, por ejemplo la técnica de PCR.

10 La solicitud divulga también un precursor de un polipéptido recombinante de interés, en el que el péptido señal comprende al menos 12 aminoácidos de fórmula (I): (X1)_iX2X3X4SX5X6X7, en la que:

- X1 es un péptido que contiene de 3 a 6 aminoácidos, i es igual a 0 o 1,
- X2 es un péptido que contiene de 3 a 9 aminoácidos hidrófobos,
- 15 - X3 es un péptido que contiene de 3 a 5 aminoácidos, comprendiendo dicho péptido al menos 3 leucinas, contiguas o no,
- X4 es un péptido que contiene de 2 a 5 aminoácidos seleccionados entre Ala, Thr, Ser, Gln, Ile, Met,
- 20 - X5 es Ala o Val,
- X6 es Gln, Asn o His,
- X7 es Ala o Cys,

25 con la condición de que cuando dicho péptido señal procede de un precursor natural de una proteína determinada, dicho polipéptido de interés sea diferente de dicha proteína, y cuando el péptido señal es MAWVWTLFLMAAAQSAQA, dicho polipéptido de interés no sea un anticuerpo anti-CD23, pudiendo cualquier polipéptido de interés estar enlazado a uno de dichos péptidos señales para ser segregado en el medio extracelular.

30 La presente invención tiene también por objeto un precursor de un polipéptido recombinante de interés, en el que un péptido señal comprende al menos 12 aminoácidos de fórmula (I): (X1)_iX2X3X4SX5X6X7, en la que:

- 35 - X1 es un péptido que contiene de 3 a 6 aminoácidos, i es igual a 0 o 1,
- X2 es un péptido que contiene de 3 a 9 aminoácidos hidrófobos seleccionados entre Gly, Ala, Val, Ile, Pro, Phe, Trp,
- 40 - X3 es un péptido que contiene de 3 a 5 aminoácidos, comprendiendo dicho péptido al menos 3 leucinas contiguas,
- X4 es un péptido que contiene de 2 a 5 aminoácidos seleccionados entre Ala, Thr, Ser, Gln, Ile, Met,
- 45 - X5 es Ala o Val,
- X6 es Gln, Asn o His,
- X7 es Ala o Cys,

50 con la condición de que cuando dicho péptido señal procede de un precursor natural de una proteína determinada, dicho polipéptido de interés sea diferente de dicha proteína, pudiendo cualquier polipéptido de interés estar enlazado a uno de dichos péptidos señales para ser segregado en el medio extracelular, y en particular en el que el péptido señal es uno de los péptidos señales de la invención tales como se han definido anteriormente.

55 En un modo de realización particular, un precursor según la invención comprende un péptido señal que responde a la fórmula III o a la fórmula IV descritas anteriormente, en las que X1, X2, X3, X4, X5, X6 y X7 tienen los significados indicados en la fórmula III.

60 En una ilustración de la descripción, un precursor comprende un péptido señal que comprende la secuencia de aminoácidos siguiente: X1X2LnX4SAX6A, en la que:

- X1 es un péptido que contiene de 3 a 6 aminoácidos,
- X2 es un péptido que contiene de 3 a 9 aminoácidos hidrófobos,
- 65 - n es el número de leucinas, siendo n un número superior o igual a 3,

- X4 es un péptido que contiene de 2 a 5 aminoácidos seleccionados entre Ala, Thr, Ser, Gln, Ile,

- X6 es Gln o Asn.

5 En un modo de realización particular, un precursor según la invención comprende un péptido señal que comprende la secuencia de aminoácidos siguiente: X1X2LnX4SAX6A, en la que:

- X1 es un péptido que contiene de 3 a 6 aminoácidos,

10 - X2 es un péptido que contiene de 3 a 9 aminoácidos hidrófobos seleccionados entre Gly, Ala, Val, Ile, Pro, Phe, Trp,

- n es el número de leucinas, siendo n un número superior o igual a 3,

15 - X4 es un péptido que contiene de 2 a 5 aminoácidos seleccionados entre Ala, Thr, Ser, Gln, Ile,

- X6 es Gln o Asn.

20 En un modo de realización particularmente ventajoso, un precursor de un polipéptido de interés según la invención comprende un péptido señal que consiste en la secuencia de aminoácidos siguiente: MRWSWIFLLLLSITSANA (SEC ID nº 1).

25 En una ilustración descrita, un precursor comprende un péptido señal que comprende la secuencia de aminoácidos siguiente: X1X2X3X4SVHC, en la que:

- X1 es un péptido que contiene de 3 a 6 aminoácidos,

- X2 es un péptido que contiene de 3 a 9 aminoácidos hidrófobos,

30 - X3 es un péptido que comprende 3 leucinas no contiguas, entre las cuales 2 leucinas están separadas por otro aminoácido hidrófobo seleccionado entre Gly, Ala, Val, Ile, Pro, Phe, Trp,

- X4 es un péptido que contiene de 2 a 5 aminoácidos seleccionados entre Ala, Thr, Ser, Gln,

35 con la condición de que cuando dicho péptido señal proceda de un precursor natural de una proteína determinada, dicho polipéptido de interés sea diferente de dicha proteína.

40 En una ilustración descrita, un precursor de un polipéptido de interés comprende un péptido señal que consiste en la secuencia de aminoácidos siguiente: MRWSWIFLLSITASVHC (SEC ID Nº 2), con la condición de que dicho polipéptido de interés sea diferente de la cadena gamma de un anticuerpo anti-AMHRII.

45 En una ilustración descrita, un precursor comprende un péptido señal que comprende la secuencia de aminoácidos siguiente: X2X3X4SAQA, en la que:

- X2 es un péptido que contiene de 3 a 9 aminoácidos hidrófobos,

- X3 es un péptido que comprende 3 leucinas non contiguas, entre las cuales 2 leucinas están separadas por otro aminoácido hidrófobo seleccionado entre Gly, Ala, Val, Ile, Pro, Phe, Trp, Leu,

50 - X4 es un péptido que contiene de 2 a 5 aminoácidos seleccionados entre Ala, Thr, Ser, Gln, Met,

55 con la condición de que cuando dicho péptido señal proceda de un precursor natural de una proteína determinada, dicho polipéptido de interés sea diferente de dicha proteína.

60 En un modo de realización particularmente ventajoso, un precursor de un polipéptido de interés según la invención comprende un péptido señal que consiste en la secuencia de aminoácidos siguiente: MAWVWTLFLMAAAQSAQA (SEC ID Nº 3), con la condición de que dicho polipéptido de interés sea diferente de la cadena gamma de un anticuerpo anti-CD5, y que dicho polipéptido de interés sea diferente de un anticuerpo anti-CD23.

65 En un modo de realización particularmente, tal precursor según la invención es un precursor de un polipéptido recombinante de interés seleccionado entre una hormona, una enzima, una cadena de inmunoglobulina, una inmunoglobulina entera o cualquier fragmento derivado de una inmunoglobulina, una proteína que interviene en la reacción inmunitaria tal como citoquinas, interleucinas, factores del complemento, una proteína quimérica, u otras proteínas terapéuticas tales como factores de coagulación, proteínas de la matriz extracelular o receptores solubles.

En un modo de realización más particular, tal precursor según la invención es un precursor de un polipéptido recombinante de interés seleccionado entre una cadena ligera de un anticuerpo y/o una cadena pesada de un anticuerpo.

5 La presente invención tiene también por objeto un ácido nucleico que codifica uno de los precursores de un polipéptido recombinante de interés según la presente invención.

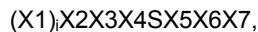
10 La presente invención tiene también por objeto un vector de expresión que comprende un ácido nucleico tal como se ha descrito anteriormente, que codifica un precursor de un polipéptido recombinante de interés tal como se ha descrito anteriormente.

15 En un modo de realización particular, el vector según la invención comprende además los medios genéticos, en particular los orígenes de replicación, los promotores, que permiten controlar la expresión de dicho polipéptido recombinante de interés.

20 Dicho vector de expresión según la invención puede ser capaz de expresar dicho polipéptido recombinante de interés en una línea celular de eucariota superior después de una transfección transitoria o estable, pudiendo dicha línea ser ventajosamente seleccionada entre SP2/0, (SP2/0-Ag 14), NS0, otros mielomas de rata como IR983F, líneas humanas como Namalwa, Wil-2, Jurkat, Molt-4, PER.C6, HEK293T/17, HEK293, HEK-293.2, Vero, Cos-1 o Cos-7, BHK, CHO-K-1, CHO-Lec1, CHO-Lec10, CHO-Lec13, CHO Pro-5, CHO DX B11 y CHO DG44 y otras líneas como EBx con, en particular, EB66K6H6, y P3X63Ag8.653, YB2/0, CHO-S y HEK-293F.

25 La presente divulgación se ilustra también por un procedimiento de producción de un polipéptido recombinante de interés, que comprende:

- la adición de un ácido nucleico que codifica un péptido señal que comprende al menos 12 aminoácidos de fórmula (I):



30 en la que:

- X1 es un péptido que contiene de 3 a 6 aminoácidos, i es igual a 0 o 1,
- 35 - X2 es un péptido que contiene de 3 a 9 aminoácidos hidrófobos,
- X3 es un péptido que contiene de 3 a 5 aminoácidos, comprendiendo dicho péptido al menos 3 leucinas, contiguas o no,
- 40 - X4 es un péptido que contiene de 2 a 5 aminoácidos seleccionados entre Ala, Thr, Ser, Gln, Ile, Met,
- X5 es Ala o Val,
- X6 es Gln, Asn o His,
- 45 - X7 es Ala o Cys,

50 en el extremo 5' de un ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante de interés, para obtener un ácido nucleico que codifica el precursor de dicho polipéptido recombinante de interés, con la condición de que cuando dicho péptido señal proceda de un precursor natural de una proteína determinada, dicho polipéptido de interés sea diferente de dicha proteína,

- la clonación del ácido nucleico artificial obtenido en la etapa anterior a un vector de expresión, para obtener un vector capaz de expresar el precursor de dicho polipéptido recombinante de interés, y

55 - la transfección de una línea celular de eucariota superior por el vector de expresión que comprende dicha secuencia nucleotídica artificial y la expresión de dicha secuencia nucleotídica,

- la recuperación del polipéptido recombinante de interés segregado en el medio de cultivo.

60 La presente invención se refiere también a un procedimiento de producción de un polipéptido recombinante de interés, que comprende:

- la adición de un ácido nucleico que codifica un péptido señal que comprende al menos 12 aminoácidos de fórmula (I):

65

(X1),X2X3X4SX5X6X7,

en la que:

- 5 - X1 es un péptido que contiene de 3 a 6 aminoácidos, i es igual a 0 o 1,
- X2 es un péptido que contiene de 3 a 9 aminoácidos hidrófobos seleccionados entre Gly, Ala, Val, Ile, Pro, Phe, Trp,
- 10 - X3 es un péptido que contiene de 3 a 5 aminoácidos, comprendiendo dicho péptido al menos 3 leucinas, contiguas,
- X4 es un péptido que contiene de 2 a 5 aminoácidos seleccionados entre Ala, Thr, Ser, Gln, Ile, Met,
- 15 - X5 es Ala o Val,
- X6 es Gln, Asn o His,
- X7 es Ala o Cys,

20 en el extremo 5' de un ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante de interés, para obtener un ácido nucleico que codifique el precursor del mencionado polipéptido recombinante de interés, con la condición de que cuando dicho péptido señal proceda de un precursor natural de una proteína determinada, dicho polipéptido de interés sea diferente de dicha proteína,

- 25 - la clonación del ácido nucleico artificial obtenido en la etapa anterior a un vector de expresión, para obtener un vector capaz de expresar el precursor de dicho polipéptido recombinante de interés, y
- la transfección de una línea celular de eucariota superior por el vector de expresión que comprende dicha secuencia nucleotídica artificial y la expresión de dicha secuencia nucleotídica,
- 30 - la recuperación del polipéptido recombinante de interés segregado en el medio de cultivo.

35 La recuperación de un polipéptido recombinante se puede efectuar mediante cualquier método conocido por el experto en la materia, por ejemplo la precipitación, la centrifugación, la elución por cromatografía. Esta etapa se puede asociar también a una etapa de purificación del polipéptido.

40 Un vector de expresión utilizado en dicho procedimiento según la invención puede ser cualquier vector de expresión conocido por el experto en la materia, por ejemplo un vector que permite expresar *in vitro* un polipéptido en una línea celular de eucariota superior en transfección transitoria o estable.

45 En un modo de realización particular del procedimiento de producción según la invención, la línea celular eucariota se selecciona entre las líneas celulares: SP2/0, (SP2/0-Ag 14), NS0, otros mielomas de rata como IR983F, líneas humanas como Namalwa, Wil-2, Jurkat, Molt-4, PER.C6, HEK293T/17, HEK293, HEK-293.2, Vero, Cos-1 o Cos-7, BHK, CHO-K-1, CHO-Lec1, CHO-Lec10, CHO-Lec13, CHO Pro-5, CHO DX B11 y CHO DG44 y otras líneas como EBx con, en particular, EB66K6H6, y P3X63Ag8.653, YB2/0, CHO-S y HEK-293F.

50 En un modo de realización particular del procedimiento de producción según la invención, el polipéptido recombinante de interés se selecciona entre una hormona, una enzima, una cadena de inmunoglobulina, una inmunoglobulina entera o cualquier fragmento derivado de una inmunoglobulina, una proteína que interviene en la reacción inmunitaria, tales como citoquinas, interleucinas, factores del complemento, una proteína química, o cualquier otras proteínas terapéuticas, tal como factores de coagulación, proteínas de la matriz extracelular, receptores solubles.

55 En un modo de realización particular de la invención, la presente invención se refiere a un procedimiento de producción de anticuerpo recombinantes:

- 60 - la adición de un ácido nucleico que codifica el péptido señal MRWSWIFLLLLSITSANA en el extremo 5' de un ácido nucleico que codifica una cadena de inmunoglobulina, para obtener un ácido nucleico que codifique el precursor de una cadena de inmunoglobulina,
- la clonación del ácido nucleico artificial obtenido en la etapa anterior a un vector de expresión, para obtener un vector capaz de expresar el precursor de una cadena de inmunoglobulina,
- 65 - la transfección de una línea celular de eucariota superior seleccionado de entre PER.C6, YB2/0, CHO-S y HEK 293, por el o los vectores de expresiones que comprenden dicha secuencia nucleotídica artificial y la expresión

de dicha secuencia nucleotídica,

- la recuperación del anticuerpo segregado en el medio de cultivo.

5 En un modo de realización más particular de la invención y en el ámbito de la producción de un anticuerpo, el péptido señal utilizado para la producción de la cadena pesada es el mismo que el utilizado para la producción de la cadena ligera.

10 En un modo de realización aún más particular de la invención, para la producción de un anticuerpo, el péptido señal MRWSWIFLLLLSITSANA se utiliza para producir al mismo tiempo la cadena pesada y la cadena ligera de dicho anticuerpo de interés.

La presente invención se ilustra, únicamente a título de ejemplo, mediante las figuras y los ejemplos siguientes.

15 Figura 1: la figura 1 representa el principio utilizado para la adición de los péptidos señales en 5' de la cadena kappa T125. Las flechas indican los diferentes cebadores utilizados para la PCR de ensamblaje.

Figura 2A: la figura 2A representa el principio utilizado para preparar los vectores de expresión que codifican el anticuerpo anti-CD20 (R603) y que permiten evaluar el poder de secreción de PS sobre IgG enteras. Los recuadros
20 representan las partes variables de cadenas pesada o ligera a clonar en el vector. Los vectores finales que son objeto de las evaluaciones están resaltados en gris.

Figura 2B: la figura 2A representa el principio utilizado para preparar los vectores de expresión que codifican el anticuerpo anti-RhD (R593) y que permiten evaluar el poder secretor de PS sobre IgG enteras. Los recuadros
25 representan las partes variables de cadenas pesada o ligera a clonar en el vector. Los vectores finales que son objeto de las evaluaciones están resaltados en gris.

Figura 3: la figura 3 presenta una comparación del efecto de 3 péptidos señales incluyendo

30 12G4 (representado por la secuencia SEC ID n° 2), XXII49 (representado por la secuencia SEC ID n° 3) y MB7 (representado por la secuencia SEC ID n° 1), sobre la secreción de un anticuerpo anti-RhD entero (R593), en la línea celular PER.C6 evaluada por transfección transitoria. Las cuatro columnas, de izquierda a derecha, representan respectivamente el porcentaje de secreción del anticuerpo R593 unido respectivamente a sus péptidos
35 señales iniciales (cadena pesada, cadena ligera), al péptido señal 12G4, al péptido señal XXII49 y al péptido señal según la invención MB7. El eje de las ordenadas representa la concentración en anticuerpos R593 segregado en el medio de cultivo.

Figura 4: la figura 4 presenta una comparación del efecto de 3 péptidos señales, incluyendo 12G4, XXII49 y MB7, sobre la secreción de un anticuerpo anti-CD20 entero (R603), en la línea celular YB2/0 evaluada por transfección
40 transitoria. Las cuatro columnas, de izquierda a derecha, representan respectivamente el porcentaje de secreción del anticuerpo R603 unido respectivamente a sus péptidos señales iniciales (cadena pesada, cadena ligera), al péptido señal 12G4, al péptido señal XXII49 y al péptido señal según la invención MB7. El eje de las ordenadas representa la concentración en anticuerpos R603 segregado en el medio de cultivo.

Figura 5: la figura 5 presenta una comparación del efecto de 3 péptidos señales, incluyendo 12G4, XXII49 y MB7, sobre la secreción de un anticuerpo anti-RhD(R593) entero, en la línea celular CHO-S evaluada por transfección
45 transitoria. Las cuatro columnas, de izquierda a derecha, representan respectivamente el porcentaje de secreción del anticuerpo R593 unido respectivamente a sus péptidos señales iniciales (cadena pesada, cadena ligera), al péptido señal 12G4, al péptido señal XXII49 y al péptido señal según la invención MB7. El eje de las ordenadas
50 representa la concentración en anticuerpos R593 segregado en el medio de cultivo.

Figura 6: la figura 6 presenta una comparación del efecto de 3 péptidos señales, incluyendo 12G4, XXII49 y MB7, sobre la secreción de un anticuerpo anti-RhD (R593) entero, en la línea celular HEK293 evaluada por transfección
55 transitoria. Las cuatro columnas, de izquierda a derecha, representan respectivamente el porcentaje de secreción del anticuerpo R593 unido respectivamente a sus péptidos señales iniciales (cadena pesada, cadena ligera), al péptido señal 12G4, al péptido señal XXII49 y al péptido señal según la invención MB7. El eje de las ordenadas representa la concentración en anticuerpos R593 segregado en el medio de cultivo.

Figura 7: la figura 7 presenta la comparación de las producciones medias en función de los diferentes péptidos
60 señales con respecto a los péptidos señales naturales en la línea celular PER.C6. El eje de las ordenadas representa la relación entre el porcentaje de secreción del anticuerpo unido a un péptido señal según la invención (12G4 o MB7) y el porcentaje de secreción del anticuerpo unido a sus péptidos señales naturales. Las tres columnas, de izquierda a derecha, representan respectivamente el porcentaje de secreción del anticuerpo R603 unido al péptido señal MB7, y el porcentaje de secreción del anticuerpo R593 unido respectivamente al péptido señal
65 12G4, y al péptido señal MB7.

Figura 8A: la figura 8A muestra la recuperación de la viabilidad después de la transfección para el anti-CD20 unido respectivamente a su péptido señal natural (rombo), al péptido señal XXII49 (cuadrado), al péptido señal MB7 (triángulo), y al péptido señal 12G4 (cruz). El eje de las ordenadas representa el porcentaje de viabilidad. El eje de las abscisas representa los días post-transfección. Los resultados son la media sobre los tres Pools estables.

Figura 8B: la figura 8A muestra la recuperación de la viabilidad después de la transfección para el anti-Rh(D) unido respectivamente a su péptido señal natural (rombo), al péptido señal XXII49 (cuadrado), al péptido señal MB7 (triángulo), y al péptido señal 12G4 (cruz). El eje de las ordenadas representa el porcentaje de viabilidad. El eje de las abscisas representa los días post-transfección. Los resultados son la media sobre los tres Pools estables.

Ejemplos

Ejemplo 1: Materiales y métodos

1.1 Péptidos señales analizados

Se seleccionan por los inventores siete péptidos señales procedentes respectivamente de una cadena polipeptídica que lleva naturalmente un péptido señal para analizar el poder secretor de estos 7 diferentes péptidos señales.

Estas 7 cadenas polipeptídicas son respectivamente la cadena gamma de un anticuerpo anti-AMHR11 (12G4, I-3673 CNCM) la cadena gamma de un anticuerpo anti-CD5 (XXII49, dato no publicado), la cadena gamma de un anticuerpo anti-RhD (D29, FR 2861078), la cadena gamma de un anti-receptor LDL (5E5, I-3488 CNCM), la cadena kappa de un anticuerpo anti-CD20 (Cat13, proveedor: DSMZ, ref. ACC 474), la cadena α del receptor TCR de linfocito T² (HAVT20, número de acceso Genbank H32536) y la eritropoyetina humana (EPO, número de acceso Genbank AAI43226).

El poder secretor de un péptido señal se aprecia según dos aspectos, a saber la capacidad de direccionamiento y la capacidad para ser escindido.

Descripciones y predicciones del poder secretor de un péptido señal son analizadas previamente (Emanuelsson *et al.*, Nature Protocols 2, 953-971 (2007)).

Los péptidos señales (PS) se han sometido en el algoritmo SeñalP V3.0 en forma de proteína de fusión PS/cadena ligera del anticuerpo anti-Rh(D) T125 (FR2807767).

1.2 Construcción de los vectores de expresión para la evaluación de PS sobre la expresión de la cadena ligera del anticuerpo anti-Rh(D) T125

El método es idéntico para cada PS, se descompone en dos series de PCR. Una primera PCR se efectúa con los cebadores P1 y P2, que permiten la síntesis de las 40 a 50 bases de PS y la integración del sitio NheI en 5' de la secuencia. Se realiza una segunda PCR en paralelo con los cebadores P3 y P2_Kappa_XbaI y como matriz el plásmido RSV-int_KT125 2stp. Permitirá a continuación la unión entre PS y la cadena kappa e integrar en 3' el sitio de clonación XbaI. Se efectúa después una tercera PCR. Esta PCR de ensamblaje se realiza con los cebadores P1 y P2_Kappa_XbaI (Figura 1).

A fin de limitar los errores de incorporación de nucleótidos, la enzima Proofreading (proofstart Taq, Qiagen) se utiliza para la amplificación de ADN, y el número de ciclos es limitado.

Las PCR son realizadas en las siguientes condiciones:

Activación de enzima 94°C, 5 min.	} 15 ciclos
Desnaturalización 94°C 15s	
Hibridación 52°C 30s	
Extensión 72°C 1,5min	
Extensión final 72°C 2 min.	

Los cebadores utilizados son los siguientes:

* Para la construcción de la cadena de fusión PS(12G4)/kappa(T125)

P1_12G4 (SEC ID N° 5) 5'-CTCTTGCTAGCGCCGCCACCATGCGATGGAGCTGGATCTT-3'
 P2_12G4 (SEC ID N° 6) 5'-CACTTGCAAGTTATTGACAGGAGGAAGAGAAAGATCCAGCT-3'
 P3_12G4 (SEC ID N° 7) 5'-ACTGCAAGTGTCCATTGCGCCATCCGGATGACCCAGTCTC-3'

*** Para la construcción de la cadena de fusión PS(XXII49)/kappa(T125)**

5 P1_XXII49 (SEC ID N° 8) 5'-CTCTTGCTAGCGCCGCCACCATGGCTTGGGTGTGGACCTT-3'
 P2_XXII49 (SEC ID N° 9) 5'-CACTTTGGGCAGCTGCCATCAGGAATAGCAAGGTCCACAC-3'
 P3_XXII49 (SEC ID N° 10) 5'-GCCCAAAGTGCCAAAGCAGCCATCCGGATGACCCAGTCTC-3'

*** Para la construcción de la cadena de fusión PS(D29)/kappa(T125)**

10 P1_D29 (SEC ID N° 11) 5'-CTCTTGCTAGCGCCGCCACCATGGAGCTTGGGCTGAGCTG-3'
 P2_D29 (SEC ID N° 12) 5'-ACACCTCTTAAAAGAGCAACGAGAAAAACCCAGCTCAGCCC-3'
 P3_D29 (SEC ID N° 13) 5'-TTAAGAGGTGTCCAGTGTGCCATCCGGATGACCCAGTCTC-3'

*** Para la construcción de la cadena de fusión PS(5E5)/kappa(T125)**

15 P1_5E5 (SEC ID N° 14) 5'-CTCTTGCTAGCGCCGCCACCATGGGTTGGAGCTGTATCAT-3'
 P2_5E5 (SEC ID N° 15) 5'-ACACCTGTAGCTGTTGCTACCAGAAAGAAGATGATACAGCTC-3'
 P3_5E5 (SEC ID N° 16) 5'-AGCTACAGGTGTGCACTCCGCCATCCGGATGACCCAGTCTC-3'

*** Para la construcción de la cadena de fusión PS(CAT13)/kappa(T125)**

20 P1_CAT13 (SEC ID N° 17): 5'-CTCTTGCTAGCGCCGCCACCATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTC-3'
 P2_CAT13 (SEC ID N° 18): 5'-CATTATGACTGAAGCACTGATTAGCAGGAAGCTGAAAATCTGCAC-3'
 P3_CAT13 (SEC ID N° 19): 5'-CTTCAGTCATAATGTCCAGAGGAGCCATCCGGATGACCCAGTCTC-3'

*** Para la construcción de la cadena de fusión PS(EPO)/kappa(T125)**

30 P1_EPO(H) (SEC ID N° 20): 5'-CTCTTGCTAGCGCCGCCACCATGGGGGTGCACGAATGTCCTGCCTGGCTG-3'
 P2_EPO(H) (SEC ID N° 21): 5'-CAGAGGGAGCGACAGCAGGGACAGGAGAAGCCACAGCCAGGCAGGA-3'
 P3_EPO(H) (SEC ID N° 22): 5'-TCGCTCCCTCTGGGCTCCAGTCTGGGCGCCATCCGGATGACCCAGTCTC-3'

*** Para la construcción de la cadena de fusión PS(HAVT20)/kappa(T125)**

35 P1_HAVT20 (SEC ID N° 23): 5'-CTCTTGCTAGCGCCGCCACCATGGCATGCCCTGGCTTCTGT-3'
 P2_HAVT20 (SEC ID N° 24): 5'-AATTCAAGACAGGTGGAGATCACAAGTGCCACAGGAAGCCAG-3'
 P3_HAVT20 (SEC ID N° 25): 5'-CCTGTCTTGAATTTCCATGGCTGCCATCCGGATGACCCAGTCTC-3'
 P2_KAPPA_Xba1 (SEC ID N° 26): 5'-GCGAGCTCTAGAGTTCACTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTC-3'

40 El vector RSV-int_KT125 2stp está digerido por NheI y XbaI. Se elimina un fragmento de 725 bases, que corresponde a la secuencia nucleotídica que codifica la cadena ligera de T125. Se recupera un fragmento de 5028 bases. El producto de PCR así preparado está también digerido por NheI y XbaI. Los fragmentos después de la digestión se recuperan y se purifican por Nucleospin® Extract (Clonetech). El producto de PCR así digerido se clona entre los sitios NheI y XbaI en el vector de expresión RSV-int_KT125-2stp en lugar de la cadena ligera ya presente. La inserción correcta del producto PCR se verifica mediante una PCR con la ayuda de dos cebadores: P1 y P2_KAPPA_Xba1. Se debe obtener un amplicón de aproximadamente 750 a 760 bases que sigue a los péptidos señales, cuando el vector se ha construido correctamente. La inserción correcta del producto PCR en el vector está también verificada por la secuenciación utilizando el cebador 2BGHPA representada por la secuencia SEC ID N° 27 (5'-CAGATGGCTGGCAACTAGAA-3').

50 1.3 Construcción de los vectores de expresión para la evaluación de PS sobre la expresión de los anticuerpos anti-Rh(D) T125 y anti-CD20

55 En base al mismo principio que anteriormente (sección 1.2), los PS del anti-AMHR II, del anti-CD5, y de PS artificial MB7 son añadidos a las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos anti-Rh(D) T125 y anti-CD20 por PCR de ensamblaje (Tabla 3), PCR convencional (Tabla 2) o simple clonación (Tabla 1) de los fragmentos generados en la primera parte de estudio según las tablas siguientes:

Tabla 1

Cadenas					Vector final
Nombre	Vector	Enzima1	Enzima2	Tamaño (pb)	nombre
K_WT_R593	RSV_int_KT125_2STP	NheI	XbaI	725	WT_R593
K_XXII49_R593	RSV_PSG_XXII49_KT125	NheI	XbaI	722	XXII49_R593
K_AMHR II_R593	RSV_PSG_AMHR II_KT125	NheI	XbaI	722	AMHR II_R593

60 Tabla 2

Cadenas					Vector final
Nombre	Vector	Cebador1	Cebador2	Tamaño (pb)	nombre
H_WT_R593	H K463-18-9	P1_NheI_H_R593	GSP2ANP	555	WT_R593
K_WT_R603	HK463-25	P1_CAT13	CK4	509	WT_R603

Tabla 3

vector	cadena	PCR1			PCR2				
		cebador 5'	cebador 3'	tamaño amplicón 1 (pb)	PCR3 de ensamble		tamaño amplicón 2 (pb)	tamaño final (pb)	tamaño después de la digestión (pb)
					cebador 5'	cebador 3'			
XXII49_R603	cadena pesada	P1_XXII49	P2_XXII49	69	P3_XXII49_H_R603	GSP2ANP	472	531	441
	cadena ligera				P3_XXII49_K_R603	CK4	441	500	408
AMHRII_R603	cadena pesada	P1-AMHRII	P2-AMHRII	69	P3_AMHRII_H_R603	GSP2ANP	472	531	441
	cadena ligera				P3_AMHRII_K_R603	CK4	441	500	408
MB7_R603	cadena pesada	P1-AMHRII	P2_MB7	63	P3_MB7_H_R603	GSP2ANP	475	528	438
	cadena ligera				P3_MB7_K_R603	CK4	444	497	405
XXII49_R593	cadena pesada	P1_XXII49	P2_XXII49	69	P3_XXII49_H_R593	GSP2ANP	496	555	465
AMHRII_R593	cadena pesada	P1-AMHRII	P2-AMHRII	69	P3_AMHRII_H_R593	GSP2ANP	496	555	465
MB7_R593	cadena pesada	P1-AMHRII	P2_MB7	63	P3_MB7_H_R593	GSP2ANP	499	552	462
	cadena ligera				P3_MB7_K_R593	P2_Kappa_Xbal	683	736	719

5 Cada par de cadena pesada y ligera fusionada con un PS a evaluar se clona después en el vector HK463-25 de manera secuencial según el diagrama de la figura 2A o de la figura 2B. La parte variable de cada cadena ligera se amplifica según las tablas anteriores, y después se digiere por NheI/DrallI antes de ser enlazado en el vector, él mismo digerido por SpeI/DrallI. Se realiza después un cribado por PCR y digestión enzimática para identificar los clones bacterianos que resultan de la transformación con el vector. Los clones correctamente generados son después manipulados para insertar la parte variable de la cadena pesada. Esto se lleva a cabo por digestión NheI/ApaI del vector y del producto de PCR antes de una ligación, transformación bacteriana y cribado para identificar los clones bacterianos conformes.

10 Los diferentes vectores así contruidos se han evaluado en transfección transitoria en YB2/0, PER.C6, CHO-S y HEK o en transfección estable en las líneas YB2/0 y PER.C6.

15 1.4 Transfección transitoria

20 En YB2/0, las células parentales son sembradas la víspera de la transfección (D-1) a 2×10^5 cv/ml en EMS (Invitrogen, medio por encargo) + 5% SVF (Invitrogen) en Flask. El día de la electroporación (D0), centrifugación de 4×10^6 células por cubeta (Biorad) de 4 mm recogida en 100 μ l de tampón V (Cell line nucleofector kitV, Lonza) que son nucleofectadas por AMAXA con 4 μ g de ADN plasmídico utilizando el programa T020 del aparato. Las células son cultivadas en pocillo placa P6 a 37°C, 7% de CO₂ en 3 ml de medio EMS + 5% de SVF. Los sobrenadantes se recogen para evaluación ELISA a D+5.

25 En PER.C6 adherente, las células parentales son sembradas 24H antes de la transfección (D-1) en placas de 24 pocillos a 1×10^6 cv/ml en DMEM (Fisher Bioblock Scientific) + 10% SVF. El día de la transfección, se forma un complejo FuGENE®HD (Roche)/ADN, con la relación 6:2, en DMEM durante 15 min. a temperatura ambiente. El complejo (25 μ l) se deposita después sobre las células en presencia de 250 μ l de DMEM + 10% SVF fresco e incubado durante 4h a 37°C y 10% de CO₂. Al final de este periodo, se añaden 250 μ l de medio completo y se recogen los sobrenadantes a D+5 para la evaluación de la molécula segregada en el medio.

35 En CHO-S, se evalúan los PS en transfección transitoria según el protocolo del kit FreeStyle (Invitrogen). Las células parentales son inoculadas 24H antes de la transfección (D-1) en Erlenmeyer (VWR) a 6×10^5 cell/ml en FreeStyle CHO EM (Fisher Bioblock scientific) e incubadas a 120 rpm durante 37°C, 8% CO₂. El día de la transfección, se forma un complejo FreeStyle MAX Reagent (Fisher Bioblock Scientific) /ADN, con la relación 1:1, en Opti Pro SFM (Invitrogen). Después, el complejo se deposita en las células en suspensión previamente centrifugadas y recogidas a 1×10^6 c/ml en FreeStyle CHO EM en un cultiflask (Sartorius) (5 ml) e incubado a 200 rpm a 37°C, 8% de CO₂. Los sobrenadantes se recogen a D+5 para la evaluación del porcentaje de moléculas segregadas en el medio.

40 En HEK293F, se evalúan los PS en transfección transitoria según el protocolo del kit FreeStyle (Invitrogen). Las células parentales son sembradas 24H antes de la transfección (D-1) en Erlenmeyer a 6×10^5 cv/ml en medio F17 293 EM (Fisher Bioblock Scientific) e incubadas a 120 rpm 37°C, 8% CO₂. El día de la transfección, se forma un complejo 293Fectin/ADN, con la relación 2:1, en Opti Pro SFM. Después, el complejo se deposita sobre las células

en suspensión previamente centrifugadas y recogidas a 10^6 c/ml en F17 293 EM e incubado a 200 rpm a 37°C, 8% de CO₂. Se recogen los sobrenadantes a D+5 para la evaluación del porcentaje de molécula segregada en el medio.

1.5 Transfección estable

5 Las evaluaciones son realizadas en pools de transfectantes («transfección en pool estable») con el fin de comparar las diferentes construcciones en base a un nivel de expresión promedio en un gran número de transfectantes (varios miles).

10 En YB2/0, se realizan las transfecciones en pool estables de la siguiente manera:

Las células deben tener un crecimiento estabilizado, y ser descongeladas durante al menos 4 semanas en medio EMS + 5% SVF en flask F150 (80ml). Las células son trasplantadas la víspera a 2×10^5 cv/ml en medio EMS + 5% SVF.

15 El día de la electroporación, las células son electroporadas por Gene Pulser Xcell (BioRad) con un voltaje de 230V y una capacidad de 960 μ F en cubetas (Biorad) de 4 mm con 5×10^6 cv (csp 500 μ l de tampón de electroporación del kit electrobuffer (Ozyme) que contiene el ADN plasmídico linealizado). Después de la electroporación, se realiza la dispersión en placas de 24 pocillos (P24) (25000 células/pocillo) en medio EMS + 5% SVF.

20 En D+3: Puesta en medio selectivo para obtener las concentraciones finales siguientes: EMS + 5%SVF + G418 1g/1 + rojo de fenol 1%.

A D+7: Renovación de las placas con el medio correspondiente.

25 A D+10: Cuando los pocillos han desarrollado bien, se realizan 3 pools de 8 pocillos P24, se trasplantan las células a 2×10^5 cv/ml en F25 y se realiza una producción máxima (Prod. max. a D+7), se recoge y evalúa el sobrenadante en FastElysa.

30 En PER.C6, las células parentales utilizadas son unas células PERC6SF adaptadas en medio Permab (ThermoFisher) y cultivadas durante 3 semanas bajo agitación a 100 rpm. Dos días antes de la electroporación, las células trasplantadas se pasan a 5×10^5 cv/ml por un cambio completo del medio Permab. El día de la electroporación, cada pool se prepara mediante 5 electroporaciones en unas cubetas de 4mm para 6×10^6 cv con 8 μ g de ADN plasmídico linealizado. Las células son electroporadas por Gene Pulser Xcell (BioRad) según las instrucciones del fabricante.

35 48 horas después de la transfección, se añade la presión de selección (G418 a 125 μ g/ml) a las células que son mantenidas en cultivo durante aproximadamente 4 a 5 semanas adaptando el volumen de cultivo para mantener una concentración de 3×10^5 cv/ml a cada paso. Después de una caída de viabilidad celular hasta un 20%, las células se pasan a condición agitada. Cuando la viabilidad alcanza aproximadamente el 50% y al 85%, se efectúa una evaluación de la productividad del pool sobre unos cultivos en "batch" a D+7.

40 Para cada construcción, se efectúan 3 pool diferentes por línea celular y se analizan. Las producciones en pool son expresadas en ng/ml.

45 1.6 Evaluación del porcentaje de proteína recombinante segregada

La evaluación del porcentaje de cadena kappa libre del anticuerpo anti-Rh(D) T125 así como la producción de IgG1 de anti-CD20 o de anti-Rh(D) T12 se determinan mediante la técnica Enzima-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

50 La cadena kappa libre presente en el sobrenadante de cultivo se captura durante 2h por un anticuerpo de cabra anti-kappa humano (Caltag Lab) que es absorbido sobre unas placas de 96 pocillos. El anticuerpo capturado se revela después por un anti-kappa humano de cabra biotilado (Pierce) y después se añade estreptavidina acoplada con peroxidasa (Pierce). Entre cada etapa, se efectúan 4 lavados para eliminar las proteínas poco reactivas que no entran en el complejo. La revelación se realiza por adición del sustrato de la enzima, el PD (Sigma) y detención de la reacción por HCl 1N. La lectura se realiza por espectrofotómetro a 492nm. La concentración de anticuerpo se determina en comparación con una escala patrón.

60 Las IgG1 producidas en transfección transitoria y estables son evaluadas mediante el kit Fast ELYSA (RD-biotech) según las instrucciones del proveedor. La lectura de la densidad óptica se realiza con espectrofotómetro a 450nm. La concentración de anticuerpo se determina en comparación con una escala patrón contenida en el kit.

La comparación se efectúa entre la cadena kappa del anticuerpo anti-Rh(D) T125 segregada por los péptidos señales según la invención y la segregada por su péptido señal natural.

La comparación se efectúa también entre el anticuerpo anti-Rh(D) T125 o el anticuerpo anti-CD20 producido con la ayuda de al menos uno de los péptidos señales según la invención y el producido por los péptidos señales naturales de cada uno de los anticuerpos respectivamente.

5 El péptido señal natural de la cadena ligera del anticuerpo anti-Rh(D) T125 está codificado por el ácido nucleico SEC ID N° 30 (atgaggtccccgctcagctcctgggctcgtgctgctggctcccaggtgccagatgt).

El péptido señal natural de la cadena pesada del anticuerpo anti-Rh(D) T125 está codificado por el ácido nucleico SEC ID N° 31 (atggagttgggctgagctggggtttcctcgttgccttttaagaggtgtccagtg).

10 El péptido señal natural de la cadena ligera del anticuerpo anti-CD20 está codificado por el ácido nucleico SEC ID N° 32 (atggatttcaagtcagattttcagcttctgtaatacagtgcttcagtcataatgccagagga).

15 El péptido señal natural de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD20 está codificado por el ácido nucleico SEC ID N° 33 (atggattcagcagatctttcttctcctcgtcagtaactacaggtgtccactcc).

Ejemplo 2: Evaluación *in vitro* de los péptidos señales sobre la secreción de una cadena ligera de anticuerpo

20 El poder secretor de estos 7 péptidos señales se ensaya *in vitro* en transfección transitoria en las líneas PER.C6, CHO-S, YB2/0. El método de transfección transitoria está descrito en la parte anterior (véase la parte 1.2).

2.1 Efecto de 7 péptidos señales en la línea PER.C6

25 Los resultados obtenidos a partir de las 4 transfecciones transitorias realizadas sobre 4 semanas diferentes permiten observar unas diferencias significativas entre los PS.

30 Se realiza una comparación múltiple para los promedios (ng/ml) de producción de cadena ligera de Ig obtenidas con los diferentes péptidos señales en la línea PER.C6 (Tabla 4). El método actualmente utilizado para discriminar entre los promedios es el procedimiento de las diferencias significativas mínimas de Fisher (LSD). Unos ensayos de las múltiples extensiones se efectúan con el método 95,0% LSD. Estos pares tienen unas diferencias estadísticamente significativas a nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 4

	<i>Efectivo</i>	<i>Promedio</i>	<i>Grupo homogéneo</i>
EPO_h	16	3828,92	X
PSK_CAT13	16	3834,16	X
HAVT20	16	3985,15	X
PSG_12G4	16	4468,87	XX
PSG_5E5	16	5207,61	XX
PSG D29	16	5563,95	X
PSG_XXII49	16	5696,46	X

35 Dos grupos homogéneos son identificados utilizando unas columnas de X. En cada columna, los niveles que contienen unas X forman un grupo de promedios en el interior de los cuales no hay diferencias estadísticamente significativas. Los péptidos señales de las cadenas pesadas de los anticuerpos XXII49 y D29 son significativamente más eficaces en la producción de la cadena ligera de Ig (anti-Rh(D)) que los PS del anticuerpo Cat13 (anti-CD20), de HAVT20, y de EPO.

40 Se mantienen las diferencias de producción obtenidas entre los diferentes PS. Sin embargo, los PS de las cadenas pesadas del anticuerpo XXII49 y del anticuerpo D29 se destacan de las otras en la línea PER.C6, con una ligera ventaja para el del anticuerpo XXII49. Los tres peores péptidos son los del anticuerpo Cat13, de HAVT20, y de EPO.

45 2.2 Efecto de 7 péptidos señales en la línea YB2/0

Los resultados obtenidos a partir de las 5 transfecciones realizadas en 5 semanas diferentes permiten observar unas diferencias significativas entre los PS.

50 Se realiza una comparación múltiple para los promedios (ng/ml) de producción de cadena ligera de Ig obtenidos con los diferentes péptidos señales en la línea YB2/0 (Tabla 5). El método actualmente utilizado para discriminar entre los promedios es el procedimiento de las diferencias significativas mínimas de Fisher (LSD). Unos ensayos múltiples de las extensiones son efectuados con el método 95,0% LSD. Estos pares tienen unas diferencias estadísticamente significativas a nivel de confianza del 95,0%.

55 Tabla 5

	<i>Efectivo</i>	<i>Promedio</i>	<i>Grupo homogéneo</i>
PSK_CAT13	20	2744,26	X
HAVT20	20	3181,69	XX
EPO_h	20	3479,19	XXX
PSG_5E5	20	3756,33	XX
PSG_D29	20	4255,05	XX
PSG_12G4	20	5131,64	XX
PSG_XXII49	20	5372,39	X

Cinco grupos homogéneos son identificados utilizando unas columnas de X. El PS de la cadena pesada del anticuerpo XXII49 es significativamente más eficaz que todos los demás péptidos salvo el del 12G4. Por el contrario, el PS de la cadena ligera anti-CD20 (Cat13) aparece como el peor de los PS con los de HAVT20, y de EPO.

5 Los PS de las cadenas pesadas de los anticuerpos XXII49, 12G4, y D29 aparecen como los mejores PS con una ventaja al del XXII49. Los tres peores péptidos son los del anticuerpo Cat13, de HAVT20, y de EPO, como se observa anteriormente en la línea PER.C6.

10 2.3 Efecto de 7 péptidos señales en la línea CHO-S

Los resultados obtenidos a partir de las 4 transfecciones realizadas sobre 4 semanas diferentes permiten observar unas diferencias significativas entre los PS.

15 Se realiza una comparación múltiple para los promedios (ng/ml) de producción de cadena ligera de Ig obtenidos con los diferentes péptidos señales en la línea CHO-S (Tabla 6). El método actualmente utilizado para discriminar entre los promedios es el procedimiento de las diferencias significativas mínimas de Fisher (LSD). Se efectúan unos ensayos múltiples de las extensiones con el método 95,0% LSD. Estos pares tienen unas diferencias estadísticamente significativas a nivel de confianza del 95,0%.

20

Tabla 6

	<i>Efectivo</i>	<i>Promedio</i>	<i>Grupo homogéneo</i>
EPO_h	16	8210,98	X
HAVT20	16	9297,38	X
PSK_CAT13	16	10345,3	XX
PSG_D29	16	10994,3	XX
PSG_5E5	16	13399,1	XX
PSG_12G4	16	14156,1	X
PSG_XXII49	16	14720,1	X

25 Se identifican tres grupos homogéneos utilizando unas columnas de X. El PS de la cadena pesada del anticuerpo XXII49 es significativamente más eficaz que los de los anticuerpos D29, Cat13, de HAVT20 y de EPO. Por el contrario, su poder secretor es similar a los de cadenas pesadas de los anticuerpos 12G4 y 5E5.

Los PS de las cadenas pesadas de los anticuerpos XXII49, y 12G4, son los mejores PS con una ventaja al del XXII49. Los tres peores péptidos son aún los del anticuerpo Cat13, de HAVT20, y de EPO, como se observa anteriormente en las líneas PER.C6, y YB2/0.

30

Ejemplo 3: Validación *in vitro* de los péptidos señales sobre la secreción de una inmunoglobulina entera

35 Los dos mejores PS identificados (XXII49 y 12G4) *in silico* e *in vitro* así como un PS artificial según la invención, MB7, se ensayaron para evaluar la ganancia potencial de productividad en anticuerpos enteros que podrían aportar estos PS fusionados a las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulinas. Los anticuerpos ensayados son el anti-Rh(D) (R593) y el anti-CD20 (R603). Las diferentes moléculas se han ensayado en transfección transitoria en las líneas PER.C6, YB2/0, CHO-S y HEK después sobre pool estables en PER.C6 y YB2/0.

40 El método de transfección transitoria así como el de transfección estable en cada línea en cuestión se han descrito en las partes antes mencionadas (véanse 1.4 y 1.5).

3.1 Efecto de los péptidos señales en la línea PER.C6

3.1.1 Transfecciones transitorias

45

Los resultados obtenidos a partir de las 4 transfecciones transitorias realizadas sobre 4 semanas diferentes permiten observar diferencias significativas entre los PS.

La secreción promedio del anticuerpo R593 con la ayuda del péptido señal MB7 según la invención aumenta en un factor 1,80 con respecto a la del anticuerpo R593 unido a su propio péptido señal. El péptido señal 12G4 y el péptido señal XXII49 permiten también aumentar respectivamente en un factor de 1,71 y 1,58 el porcentaje de secreción del anticuerpo R593 en la línea PER.C6. (figura 3 y tabla 7).

5

Tabla 7

	<i>Efectivo</i>	<i>Promedio</i>	<i>Grupo homogéneo</i>
WT_R593	12	425,03	X
XXII49_R593	12	672,51	X
12G4_R593	12	727,532	XX
MB7_R593	11	766,072	X

En la tabla 7, el método actualmente utilizado para discriminar entre los promedios es el procedimiento de las diferencias significativas mínimas de Fisher (LSD). Se efectúan unos ensayos múltiples de las extensiones con el método 95,0% LSD. Estos pares tienen unas diferencias estadísticamente significativas a nivel de confianza del 95,0%.

10

3.1.2. Transfecciones estables

Las células PER.C6 se han transfectado para la generación de pool estables como se describe en la sección 1.5. Estas transfecciones se han repetido durante 3 semanas para ser comparadas con los resultados obtenidos en transfección transitoria.

15

Los resultados son mostrados en la tabla 8 y la figura 7.

20

En la tabla 8, el método actualmente utilizado para discriminar entre los promedios es el procedimiento de las diferencias significativas mínimas de Fisher (LSD). Se efectúan unos ensayos múltiples de las extensiones con el método 95,0% LSD. Estos pares tienen unas diferencias estadísticamente significativas a nivel de confianza del 95,0%.

25

Tabla 8

	<i>Efectivo</i>	<i>Promedio</i>	<i>Grupo homogéneo</i>
WT_R603	6	1708,87	X
MB7_R603	6	2293,53	X
WT_R593	6	4576,45	X
12G4_R593	6	5258,34	X
MB7_R593	6	5629,72	X

Se ha efectuado una producción en "batch" durante 7 días, sobre los tres pool estables y se han evaluado las extracciones mediante FastELYSA. Los resultados de la producción en D+7 se han analizado estadísticamente para comparar el efecto de los péptidos señales sobre la secreción de IgG1. El análisis estadístico muestra una diferencia significativa entre el péptido señal MB7 y los péptidos naturales (WT), tanto para el anticuerpo anti-CD20 (R603) como para el anti-Rh(D) (R593) (tabla 8).

30

Para el anticuerpo anti-Rh(D), el péptido señal 12G4 (cadena pesada) muestra también un promedio significativamente diferente del de los péptidos señales naturales (WT).

35

La figura 7 muestra la relación de las producciones promedio entre los péptidos señales optimizados y los naturales. Se observa un porcentaje de producción superior en un factor 1,3 para el MB7-R603 y en un factor 1,2 para el MB7-R593. Esto muestra por lo tanto que el péptido señal MB7 aporta una ganancia real de productividad.

40

Para el anticuerpo anti-Rh(D) que contiene el péptido señal 12G4, la diferencia promedio significativa mostrada por el ensayo de las extensiones múltiples se traduce por un aumento de productividad en un factor 1,15.

45

El efecto de los péptidos señales sobre la viabilidad celular se ha estudiado también para la producción del anticuerpo anti-CD20(R603) (figura 8A) o la producción del anticuerpo anti-Rh(D)(R593) (figura 8B), en la línea celular PER.C6. Para el anticuerpo anti-CD20 (R603), se observa que la recuperación de la viabilidad después de la transfección y adición de la presión de selección se realiza ligeramente más rápidamente en presencia del péptido señal MB7 que en presencia de los péptidos naturales. Esto aporta una ligera ganancia de tiempo en el establecimiento del pool estable ya que el retorno a la condición agitada de las células que contiene el MB7 puede llevarse a cabo de 1 a 2 días antes que las células que contienen los péptidos señales naturales. El anticuerpo anti-CD20 se acumula en la célula y produce un efecto tóxico para la célula. El péptido señal MB7, aumentando la secreción del anticuerpo, disminuye este efecto tóxico y favorece por lo tanto así la reanudación de las células. Este efecto no se observa con el anticuerpo anti-Rh(D) que tiene una mejor productividad que el anti-CD20 y no sufre por lo tanto esta toxicidad por acumulación del anticuerpo en la célula (figura 8B).

50

3.2 Efecto de los péptidos señales en la línea YB2/0

3.2.1 Transfecciones transitorias

Los resultados obtenidos a partir de las 3 transfecciones transitorias realizadas durante 3 semanas diferentes permiten observar diferencias significativas entre los PS (tabla 9).

Tabla 9

	<i>Efectivo</i>	<i>Promedio</i>	<i>Grupo homogéneo</i>
12G4_R603	12	618,756	X
MB7_R603	12	656,243	X
XXII49_R603	12	904,177	X
WT_R603	12	374,04	X

En la tabla 9, el método actualmente utilizado para discriminar entre los promedios es el procedimiento de las diferencias significativas mínimas de Fisher (LSD). Se efectúan unos ensayos múltiples de las extensiones con el método 95,0% LSD. Estos pares tienen unas diferencias estadísticamente significativas a nivel de confianza del 95,0%.

La secreción promedio del anticuerpo R603 con la ayuda del péptido MB7 según la invención aumenta en un factor 1,75 con respecto a la del anticuerpo R603 unido a su propio péptido señal (figura 4). El péptido señal 12G4 y el péptido señal XXII49 permiten también aumentar respectivamente en un factor de 1,65 y 2,42 el porcentaje de secreción del anticuerpo R603 en la línea YB2/0.

3.2.2 Transfecciones estables

Las células YB2/0 se han transfectado para la generación de pool estables como se ha descrito en la sección 1.5. Estas transfecciones se han repetido durante 3 semanas para ser comparadas con los resultados obtenidos en transfección transitoria.

Se ha efectuado una producción en "batch" durante 7 días sobre los tres pool estables y se han evaluado las extracciones por FastELYSA. Los resultados de la producción a D+7 se han analizado estadísticamente para comparar el efecto de los péptidos señales sobre la secreción de IgG1.

El péptido señal MB7 da el mismo nivel de productividad del anticuerpo R603 en las células YB2/0 que el de su péptido señal natural.

3.3 Efecto de los péptidos señales en la línea CHO-S

Los resultados obtenidos a partir de las 3 transfecciones transitorias realizadas sobre 3 semanas diferentes permiten observar diferencias significativas entre los PS (tabla 10).

Tabla 10

	<i>Efectivo</i>	<i>Promedio</i>	<i>Grupo homogéneo</i>
XXII49_R593	12	2902,13	X
12G4_R593	10	2984,74	X
MB7_R593	10	3570,06	X
WT_R593	10	1702,78	X

En la tabla 10, el método actualmente utilizado para discriminar entre los promedios es el procedimiento de las diferencias significativas mínimas de Fisher (LSD). Se efectúan unos ensayos múltiples de las extensiones con el método 95,0% LSD. Estos pares tienen unas diferencias estadísticamente significativas a nivel de confianza del 95,0%.

La secreción promedio del anticuerpo R593 con la ayuda del péptido MB7 según la invención aumenta en un factor 2,1 con respecto a la del anticuerpo R593 unido a su propio péptido señal (figura 5). El péptido señal 12G4 y el péptido señal XXII49 permiten también aumentar respectivamente en un factor de 1,75 y 1,7 el porcentaje de secreción del anticuerpo R593 en la línea CHO-S.

3.4 Efecto de los péptidos señales en la línea HEK293

Los resultados obtenidos a partir de las 3 transfecciones transitorias realizadas sobre 3 semanas diferentes permiten observar unas diferencias significativas entre los PS (Tabla 11).

Tabla 11

	Efectivo	Promedio	Grupo homogéneo
MB7_R593	12	1490,05	X
XXII49_R593	12	1578,98	X
12G4_R593	12	1598,12	X
WT_R593	12	1099,81	X

En la tabla 11, el método actualmente utilizado para discriminar entre los promedios es el procedimiento de las diferencias significativas mínimas de Fisher (LSD). Se efectúan unos ensayos múltiples de las extensiones con el método 95,0% LSD. Estos pares tienen unas diferencias estadísticamente significativas a nivel de confianza del 95,0%.

La secreción promedio del anticuerpo R593 con la ayuda del péptido MB7 según la invención aumenta en un factor 1,35 con respecto a la del anticuerpo R593 unido a su propio péptido señal (figura 6). El péptido señal 12G4 y el péptido señal XXII49 permiten también aumentar respectivamente en un factor de 1,45 y 1,44 el porcentaje de secreción del anticuerpo R593 en la línea HEK 293.

3.5 Efecto del cambio de péptido señal sobre la estructura primaria de la molécula producida.

A fin de ver si el cambio de péptido señal no tiene impacto sobre la estructura primaria del anticuerpo segregado, se han realizado unos análisis fisicoquímicos por espectrometría de masa y secuenciación N-terminal mediante la técnica de Edman a nivel de las cadenas pesada y ligera del anti-Rh(D) y del anti-CD20 producidos en YB2/0 y PER.C6 en transfección estable.

Los resultados de espectrometría de masa resumidos en la tabla 12 muestran que las masas observadas para los 16 anticuerpos analizados corresponden a las masas teóricas con una escisión efectiva del péptido señal.

La modificación del péptido señal no tiene por lo tanto impacto alguno sobre la secuencia proteica de los anticuerpos producidos.

Tabla 12

Anticuerpo		Fc		LC		Fab	
		Masa teórica (Da)	Masa experimental (Da)	Masa teórica (Da)	Masa experimental (Da)	Masa teórica (Da)	Masa experimental (Da)
R593 YB2/0 WT	(H)	25 058	25 058	23 495	23 496	26 370	26 372
R593 YB2/0 AMHR II	(E)	25 058	25 058	23 495	23 497	26 370	26 372
R593 YB2/0 MB7	(F)	25 058	25 058	23 495	23 497	26 370	26 372
R593 YB2/0 XXII49	(G)	25 058	25 058	23 495	23 496	26 370	26 372
R593 PER.C6 WT	(M)	25 366	25 367	23 495	23 496	26 370	26 371
R593 PER.C6 AMHR II	(O)	25 366	25 367	23 495	23 497	26 370	26 372
R593 PER.C6 MB7	(N)	25 366	25 366	23 495	23 496	26 370	26 371
R593 PER.C6 XXII49	(P)	25 366	25 367	23 495	23 496	26 370	26 372
R603 YB2/0 WT	(D)	25 058	25 058	23 168	23 170	25 197	25 200
R603 YB2/0 AMHR II	(A)	25 058	25 059	23 168	23 170	25 197	25 200
R603 YB2/0 MB7	(B)	25 058	25 059	23 168	23 170	25 197	25 200
R603 YB2/0 XXII49	(C)	25 058	25 059	23 168	23 170	25 197	25 200
R603 PER.C6 WT	(I)	25 366	25 367	23 168	23 170	25 197	25 199
R603 PER.C6 AMHR II	(K)	25 366	25 367	23 168	23 169	25 197	25 199
R603 PER.C6 MB7	(J)	25 366	25 367	23 168	23 169	25 197	25 199
R603 PER.C6 XXII49	(L)	25 366	25 367	23 168	23 169	25 197	25 199

LISTADO DE SECUENCIA

<110> LFB Biotechnologies
<120> NUEVO PÉPTIDO SEÑAL, Y SU UTILIZACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

<130> WOB 10 AA LFB PEPS

<150> FRn ° 10/51905

<151> 2010-03-17

ES 2 602 044 T3

<160> 33
<170> PatentIn version 3.5

5 <210> 1
<211> 18
<212> PRT
<213> MB7 péptido señal
<400> 1
Met Arg Trp Ser Trp Ile Phe Leu Leu Leu Leu Ser Ile Thr Ser Ala
1 5 10 15

10 Asn Ala
<210> 2
<211> 19
<212> PRT
<213> 12G4 péptido señal
15 <400> 2
Met Arg Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Ile Thr Ala Ser
1 5 10 15

20 Val His Cys
<210> 3
<211> 19
<212> PRT
<213> XXII49 péptido señal
<400> 3
Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15

25 Ala Gln Ala
<210> 4
<211> 54
<212> DNA
<213> MB7 ácido nucleico
30 <400> 4
atgcatgga gctgatctt cctgctgctg ctgagcatca ccagcgccaa cgcc 54

35 <210> 5
<211> 40
<212> ADN
<213> P1_12G4
<400> 5
ctcttgctag cgccgccacc atgcatgga gctgatctt 40

40 <210> 6
<211> 40
<212> ADN
<213> P2_12G4
<400> 6
cactgcagt tattgacagg aggaagagaa agatccagct 40

45 <210> 7
<211> 40
<212> ADN
<213> P3_12G4
50 <400> 7
actgcaagtg tccattgctc catccgatg acccagtctc 40

55 <210> 8
<211> 40
<212> ADN

ES 2 602 044 T3

<213> P1_XXII49
<400> 8
ctcttgctag cgccgccacc atggcttggg tgtggacctt 40

5 <210> 9
<211> 40
<212> ADN
<213> P2_XXII49
<400> 9
10 cactttgggc agctgccatc aggaatagca aggtccacac 40

<210> 10
<211> 40
<212> ADN
15 <213> P3_XXII49
<400> 10
gcccaaagtg cccaagcagc catccggatg acccagtctc 40

<210> 11
<211> 40
<212> ADN
20 <213> P1_D29
<400> 11
ctcttgctag cgccgccacc atggagcttg ggctgagctg 40

25 <210> 12
<211> 41
<212> ADN
<213> P2_D29
30 <400> 12
acaccttta aaagagcaac gagaaaaacc cagctcagcc c 41

<210> 13
<211> 40
<212> ADN
35 <213> P3_D29
<400> 13
ttaagagggtg tccagtgtgc catccggatg acccagtctc 40

40 <210> 14
<211> 40
<212> ADN
<213> P1_5E5
<400> 14
45 ctcttgctag cgccgccacc atgggttggg gctgtatcat 40

<210> 15
<211> 42
<212> ADN
50 <213> P2_5E5
<400> 15
acacctgtag ctgttctac cagaaagaag atgatacagc tc 42

<210> 16
<211> 41
<212> ADN
55 <213> P3_5E5
<400> 16
agctacaggt gtgcactccg ccatccggat gacccagtct c 41

60 <210> 17
<211> 44
<212> ADN
<213> P1_CAT13
65 <400> 17
ctcttgctag cgccgccacc atggatttc aagtcagat tttc 44

<210> 18
 <211> 45
 <212> ADN
 5 <213> P2_CAT13
 <400> 18
 cattatgact gaagcactga ttagcaggaa gctgaaaatc tgcac 45

<210> 19
 10 <211> 45
 <212> ADN
 <213> P3_CAT13
 <400> 19
 cttcagtc atgtccaga ggagccatcc ggatgacca gtctc 45

15 <210> 20
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> P1_EPO(H)
 20 <400> 20
 ctcttgctag cgccgccacc atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg 50

<210> 21
 <211> 46
 25 <212> ADN
 <213> P2_EPO(H)
 <400> 21
 cagagggagc gacagcaggg acaggagaag ccacagccag gcagga 46

30 <210> 22
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> P3_EPO(H)
 <400> 22
 35 tcgctccctc tgggcctccc agtctctgggc gccatccgga tgaccagtc tc 52

<210> 23
 <211> 42
 <212> ADN
 40 <213> P1_HAVT20
 <400> 23
 ctcttgctag cgccgccacc atggcatgcc ctggcttct gt 42

<210> 24
 45 <211> 43
 <212> ADN
 <213> P2_HAVT20
 <400> 24
 aattcaagac agtggagat cacaagtgcc cacaggaagc cag 43

50 <210> 25
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> P3_HAVT20
 55 <400> 25
 cctgtcttga atttccatg gctgcatcc ggatgacca gtctc 45

<210> 26
 <211> 42
 60 <212> ADN
 <213> P2_KAPPA_Xba1
 <400> 26
 gcgagctcta gattcacta acactctccc ctgttgaagc tc 42

65 <210> 27
 <211> 20

<212> ADN
 <213> 2BGHPA
 <400> 27
 cagatggctg gcaactagaa 20
 5
 <210> 28
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> 12G4 ácido nucleico
 <400> 28
 10 atgcatgga gctggatctt tctctcctc ctgtcaataa ctgcaagtgt ccattgc 57

 <210> 29
 <211> 57
 15 <212> ADN
 <213> XXII49 ácido nucleico
 <400> 29
 atggcttggg tgtggacctt gctattcctg atggcagctg cccaaagtgc ccaagca 57

 20 <210> 30
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> R 593 VL péptido señal
 <400> 30
 25 atgagggtcc ccgctcagct cctggggctc ctgctgctct ggctcccagg tgccagatgt 60

 <210> 31
 <211> 57
 <212> ADN
 30 <213> R 593 VH péptido señal
 <400> 31
 atggagtgtt ggctgagctg ggtttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgt 57

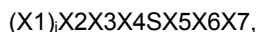
 <210> 32
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> R603 VL péptido señal
 <400> 32
 35 atggatttc aagtcagat ttcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc 60
 40 agagga 66

 <210> 33
 <211> 57
 <212> ADN
 45 <213> R603 VH péptido señal
 <400> 33
 atgggatca gcaggatctt tctctcctc ctgtcagtaa ctacaggtgt cactcc 57

REIVINDICACIONES

1. Utilización de un péptido señal para la producción de un polipéptido recombinante de interés en un sistema de expresión, comprendiendo dicho péptido señal al menos 12 aminoácidos de fórmula (I):

5



en la que:

- 10 - X1 es un péptido que contiene de 3 a 6 aminoácidos, i es igual a 0 o 1,
- X2 es un péptido que contiene de 3 a 9 aminoácidos hidrófobos seleccionados entre Gly, Ala, Val, Ile, Pro, Phe, Trp,
- 15 - X3 es un péptido que contiene de 3 a 5 aminoácidos, comprendiendo dicho péptido al menos 3 leucinas, contiguas,
- X4 es un péptido que contiene de 2 a 5 aminoácidos seleccionados entre Ala, Thr, Ser, Gln, Ile, Met,
- 20 - X5 es Ala o Val,
- X6 es Gln, Asn o His,
- X7 es Ala o Cys,

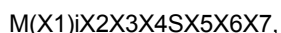
25

con la condición de que:

- 30 - cuando dicho péptido señal procede de un precursor natural de una proteína determinada, dicho polipéptido de interés sea diferente de dicha proteína, pudiendo cualquier polipéptido de interés estar enlazado a uno de dichos péptidos señales para ser segregado en el medio extracelular.

35

2. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicho péptido señal universal está representado por la fórmula (II):



40

En la que X1, i, X2, X3 X4, X5 X6 y X7 tienen los significados indicados en la reivindicación 1.

3. Utilización según la reivindicación 1, en la que:

- 40 - X1, X2 y X4 tienen los significados indicados en la reivindicación 1,
- i = 1,
- 45 - X3 es un péptido constituido de leucinas, representado por Ln, en la que n es el número de leucinas, siendo n un número superior o igual a 3,
- X4 es un péptido que contiene de 2 a 5 aminoácidos seleccionados entre Ala, Thr, Ser, Gln, Ile,
- 50 - X5 es Ala,
- X6 es Gln o Asn,
- X7 es Ala,

55

comprendiendo dicho péptido la secuencia de aminoácidos siguiente: X1X2LnX4SAX6A.

4. Utilización de un péptido señal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el sistema de expresión es una línea celular de eucariota superior, y en particular una línea celular seleccionada entre SP2/0, SP2/0-Ag 14, NS0, otros mielomas de rata como IR983F, líneas humanas como Namalwa, Wil-2, Jurkat, Molt-4, PER.C6, HEK293T/17, HEK293, HEK-293.2, Vero, Cos-1 o Cos-7, BHK, CHO-K-1, CHO-Lec1, CHO-Lec10, CHO-Lec13, CHO Pro-5, CHO DX B11 y CHO DG44 y otras líneas como EBx con en particular EB66K6H6, y P3X63Ag8.653, YB2/0, CHO-S y HEK-293F.

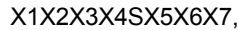
60

5. Utilización de un péptido señal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el sistema de expresión es un animal transgénico, seleccionado entre cabras, ovejas, bisontes, camellos, vacas, cerdos, conejos, caballos, ratas, ratones o llamas.

65

6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el polipéptido recombinante de interés se selecciona entre una hormona, una enzima, una cadena de inmunoglobulina, una inmunoglobulina entera o cualquier fragmento derivado de una inmunoglobulina, una proteína que interviene en la reacción inmunitaria tales como citoquinas, interleucinas, factores del complemento, una proteína quimérica, u otras proteínas terapéuticas tal como unos factores de coagulación, unas proteínas de la matriz extracelular, o unos receptores solubles.

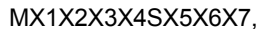
7. Péptido señal que comprende una secuencia de al menos 12 aminoácidos de fórmula III:



en la que:

- X1 es un péptido que contiene de 3 a 6 aminoácidos,
- X2 es un péptido que contiene de 3 a 9 aminoácidos hidrófobos seleccionados entre Gly, Ala, Val, Ile, Pro, Phe, Trp,
- X3 es un péptido que contiene de 3 a 5 aminoácidos, comprendiendo dicho péptido al menos 3 leucinas contiguas,
- X4 es un péptido que contiene de 2 a 5 aminoácidos seleccionados entre Ala, Thr, Ser, Gln, Ile,
- X5 es Ala,
- X6 es Gln o Asn,
- X7 es Ala.

8. Péptido señal de fórmula (IV):



en la que X1, X2, X3 X4, X5 X6 y X7 tienen los significados indicados en la reivindicación 7.

9. Péptido señal de fórmula III según la reivindicación 7 o de fórmula (IV) según la reivindicación 8, en la que:

- X3 es un péptido que contiene 4 leucinas contiguas,
- el péptido X2 es WIF,
- X1, X4 y X6 tienen los significados indicados en la reivindicación 7,

respondiendo el péptido señal a la fórmula siguiente: X1WIFX3X4SAX6A.

10. Péptido señal según la reivindicación 7 a 9, en el que el péptido señal de fórmula (IV) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos: MRWSWIFLLLLSITSANA.

11. Ácido nucleico que codifica uno de los péptidos señales según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en particular un péptido representado por la secuencia siguiente: MRWSWIFLLLLSITSANA.

12. Precursor de un polipéptido recombinante de interés, en la que un péptido señal comprende al menos 12 aminoácidos de fórmula (I): $(X1)_iX2X3X4SX5X6X7$, en la que:

- X1 es un péptido que contiene de 3 a 6 aminoácidos, i es igual a 0 o 1,
- X2 es un péptido que contiene de 3 a 9 aminoácidos hidrófobos seleccionados entre Gly, Ala, Val, Ile, Pro, Phe, Trp,
- X3 es un péptido que contiene de 3 a 5 aminoácidos, comprendiendo dicho péptido al menos 3 leucinas contiguas,
- X4 es un péptido que contiene de 2 a 5 aminoácidos seleccionados entre Ala, Thr, Ser, Gln, Ile, Met,
- X5 es Ala o Val,

- X6 es Gln, Asn o His,

- X7 es Ala o Cys,

5 con la condición de que cuando dicho péptido señal procede de un precursor natural de una proteína determinada, dicho polipéptido de interés sea diferente de dicha proteína,

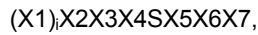
10 pudiendo cualquier polipéptido de interés estar enlazado a uno de dichos péptidos señales para ser segregado en el medio extracelular, y en particular en la que el péptido señal es uno de los péptidos señales según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10.

13. Ácido nucleico que codifica uno de los precursores de un polipéptido recombinante de interés según la reivindicación 12.

15 14. Vector que contiene un ácido nucleico según la reivindicación 13.

15. Procedimiento de producción de un polipéptido recombinante de interés, que comprende:

20 - añadir un ácido nucleico que codifica un péptido señal que comprende al menos 12 aminoácidos de fórmula (I):



En la que:

25 - X1 es un péptido que contiene de 3 a 6 aminoácidos, i es igual a 0 o 1,

- X2 es un péptido que contiene de 3 a 9 aminoácidos hidrófobos seleccionados entre Gly, Ala, Val, Ile, Pro, Phe, Trp,

30 - X3 es un péptido que contiene de 3 a 5 aminoácidos, comprendiendo dicho péptido al menos 3 leucinas, contiguas,

- X4 es un péptido que contiene de 2 a 5 aminoácidos seleccionados entre Ala, Thr, Ser, Gln, Ile, Met,

35 - X5 es Ala o Val,

- X6 es Gln, Asn o His,

40 - X7 es Ala o Cys,

en el extremo 5' de un ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante de interés, para obtener un ácido nucleico que codifica el precursor de dicho polipéptido recombinante de interés, con la condición de que cuando dicho péptido señal procede de un precursor natural de una proteína determinada, dicho polipéptido de interés sea diferente de dicha proteína,

45 - clonar el ácido nucleico artificial obtenido en la etapa anterior a un vector de expresión, para obtener un vector capaz de expresar el precursor de dicho polipéptido recombinante de interés, y

50 - transfectar una línea celular de eucariota superior por el vector de expresión que comprende dicha secuencia nucleotídica artificial y la expresión de dicha secuencia nucleotídica,

- recuperar el polipéptido recombinante de interés segregado en el medio de cultivo.

Figura 1

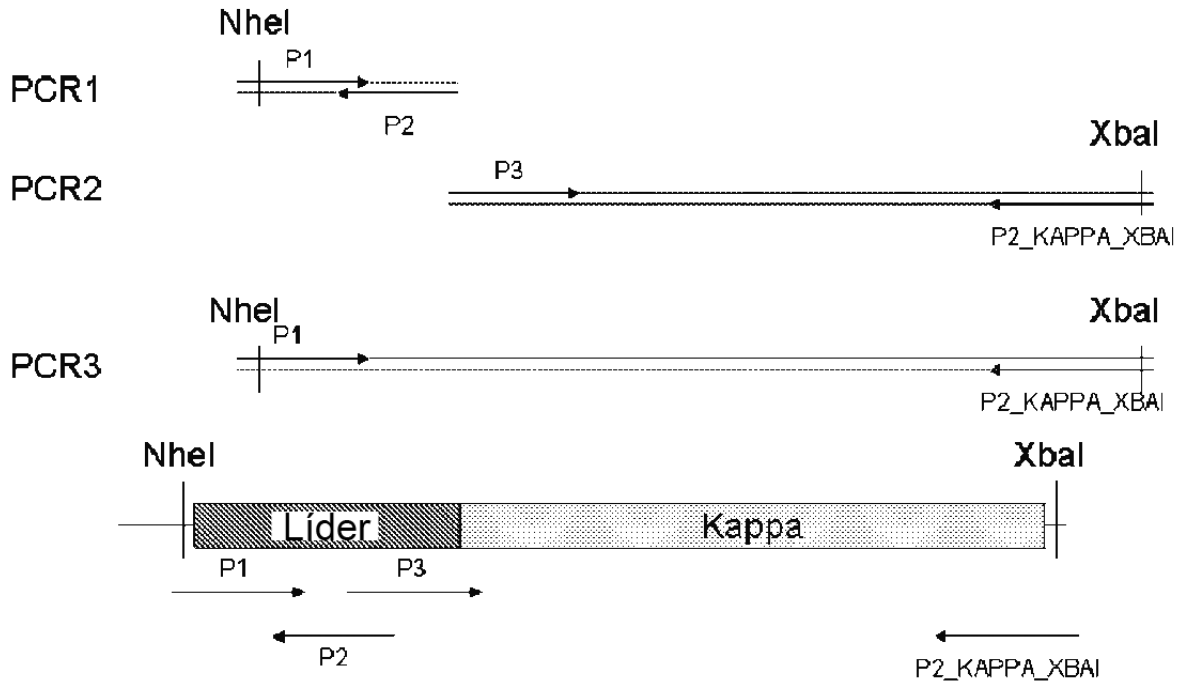


Figura 2A

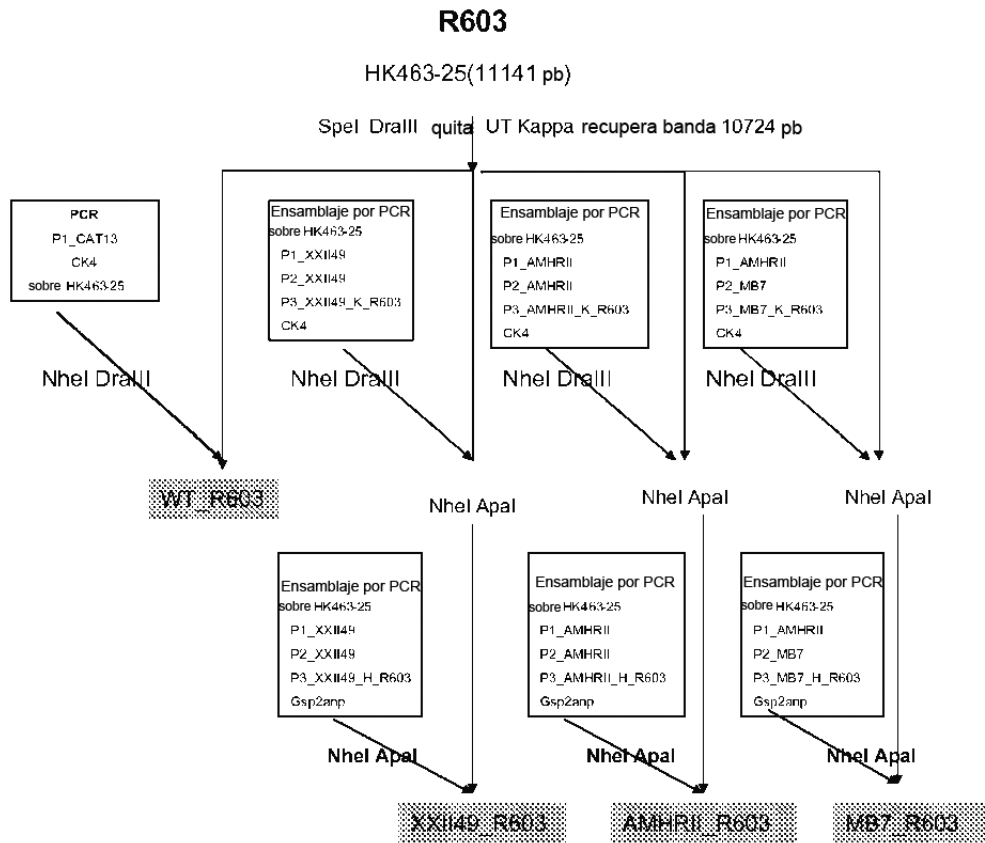


Figura 2B

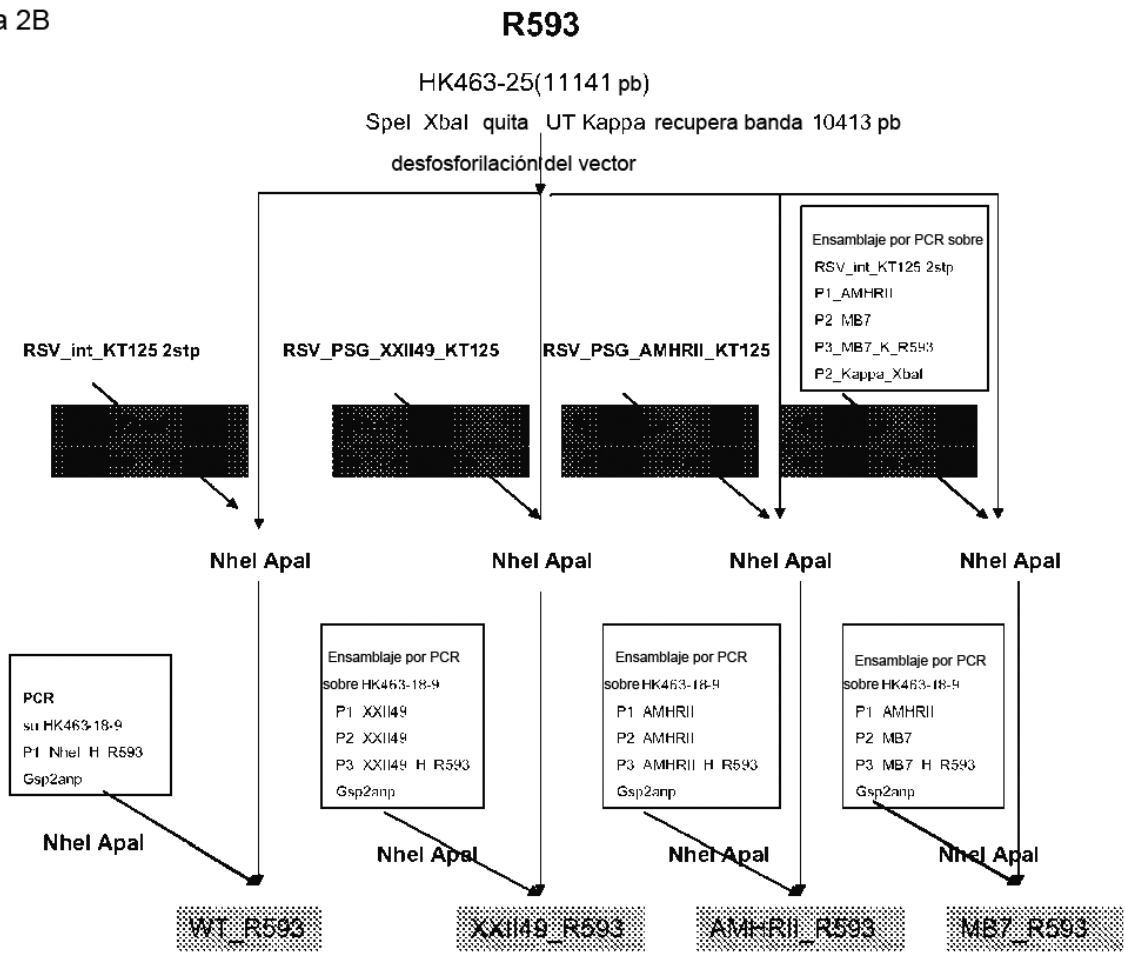


Figura 3

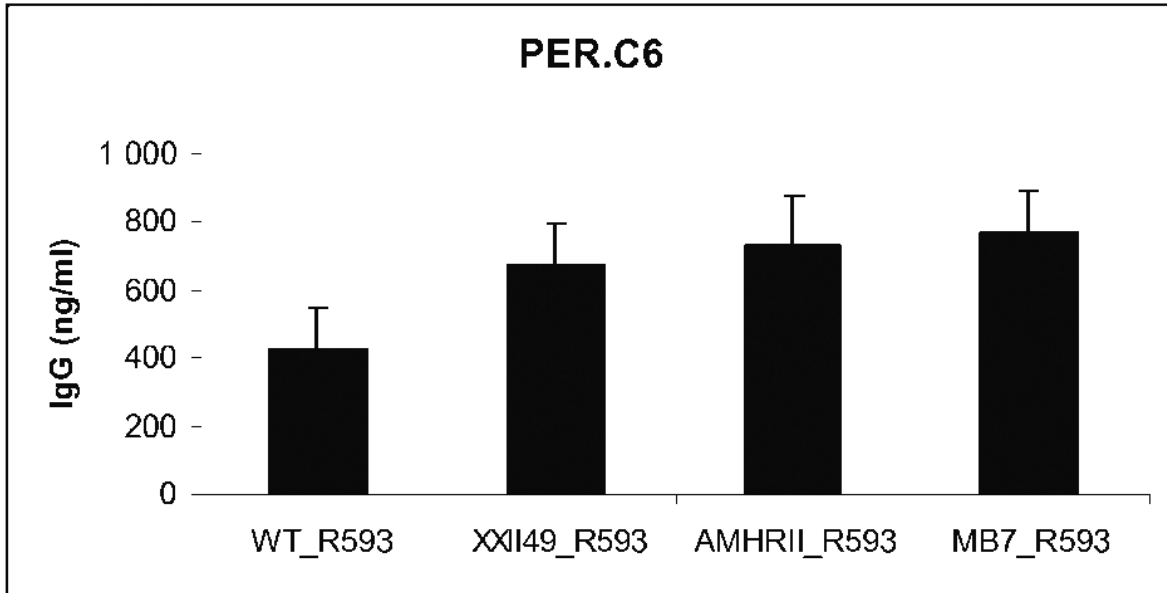


Figura 4

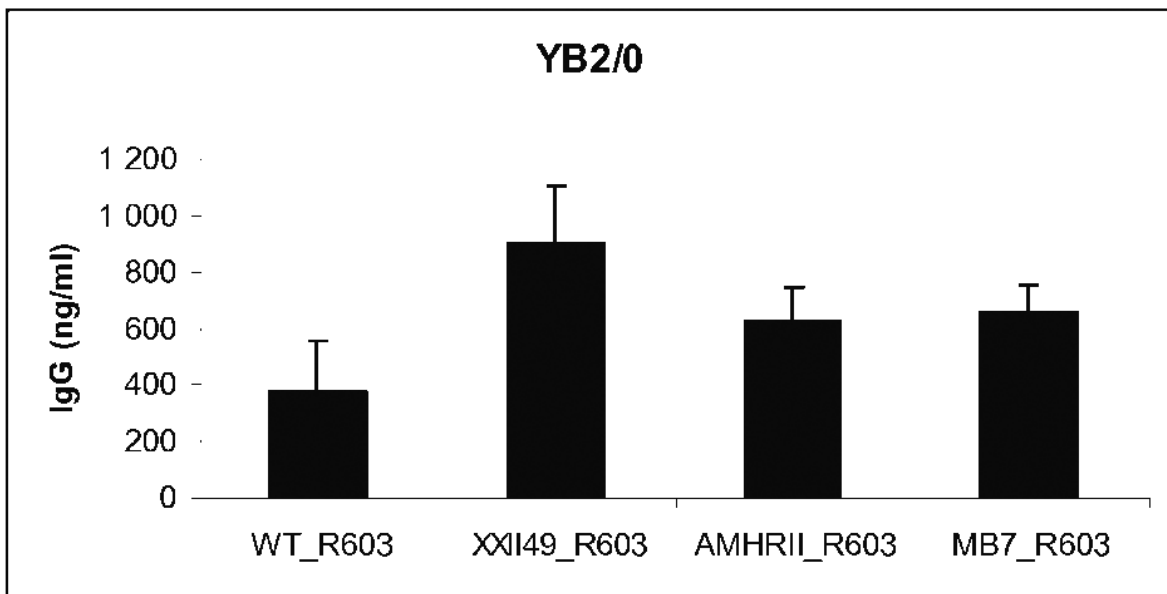


Figura 5

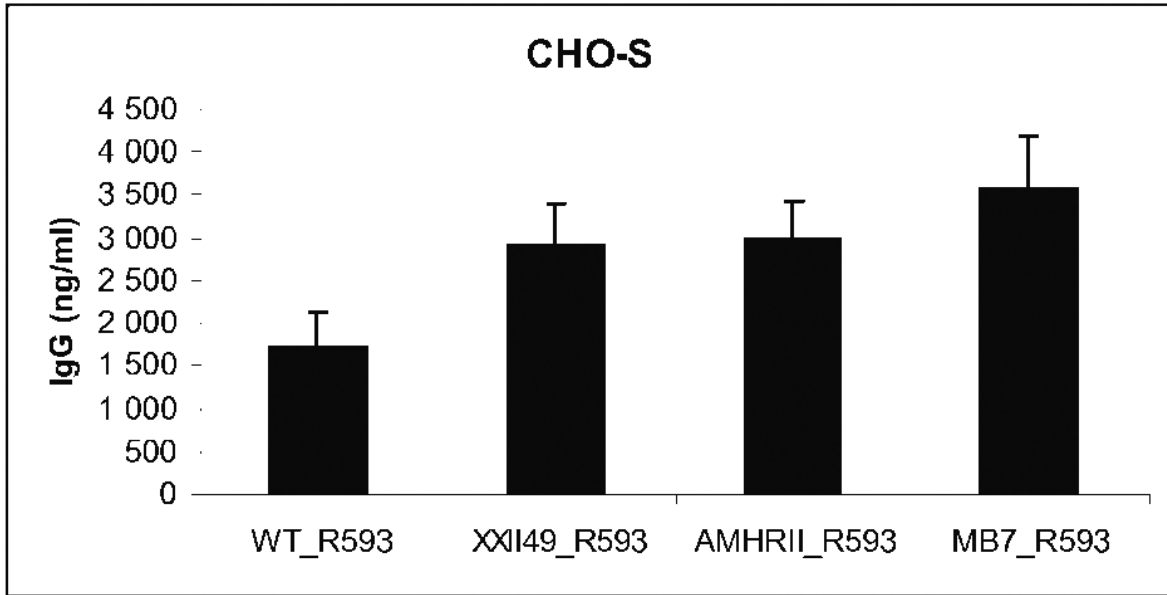


Figura 6

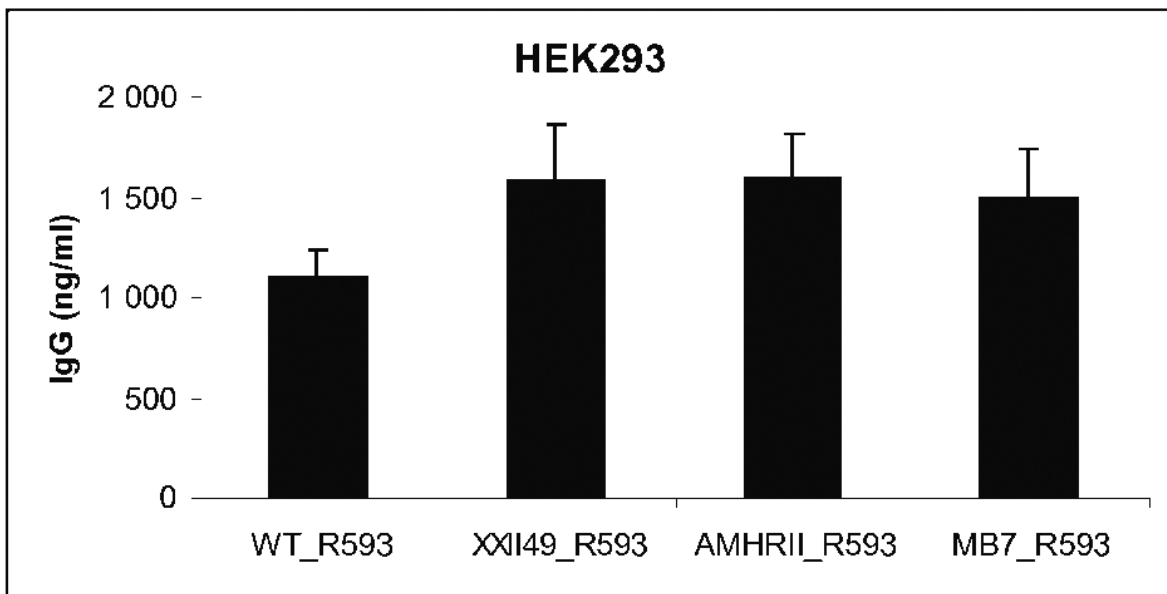


Figura 7

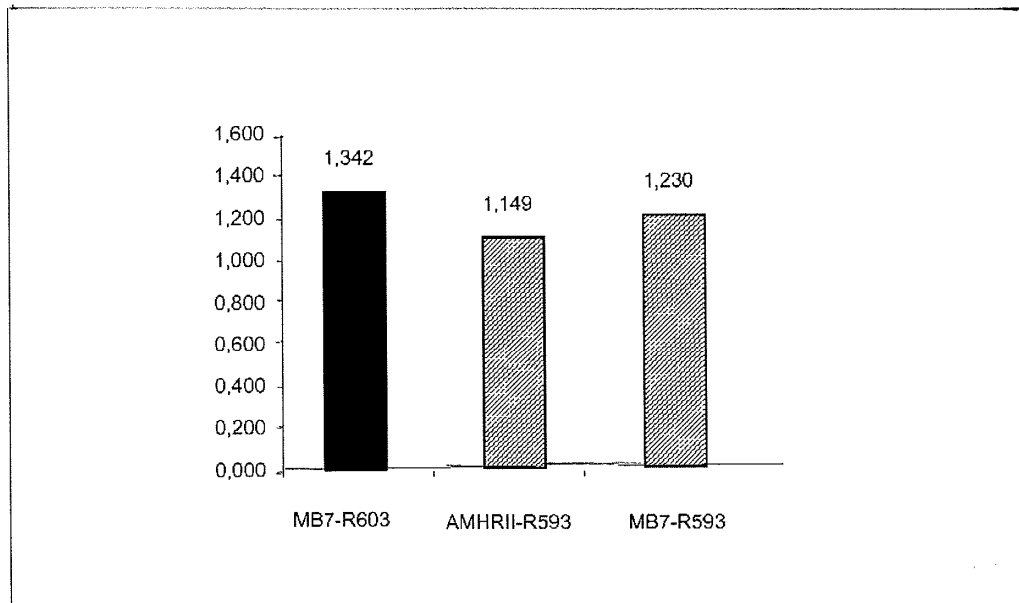


Figura 8A

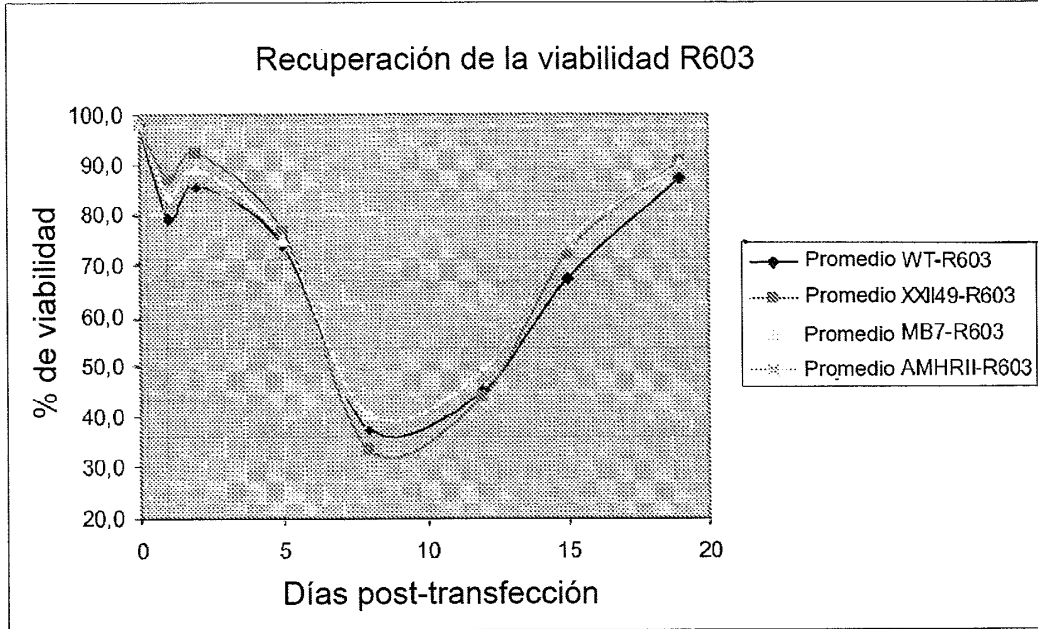


Figura 8B

