

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 702**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2011 PCT/EP2011/055835**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2011 WO11128377**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2011 E 11714284 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2558591**

54 Título: **Método para la selección de una célula productora a largo plazo**

30 Prioridad:

14.04.2010 EP 10003969

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

15.03.2017

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**GOEPFERT, ULRICH;
OSTERLEHNER, ANDREA y
SIMMETH, SILKE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 605 702 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

Método para la selección de una célula productora a largo plazo

5 El método presentado en este documento pertenece al campo de la selección celular y expresión de polipéptidos. En más detalle, en este documento se presenta un método para la selección de una célula de expresión o secreción de polipéptidos a largo plazo basado en la detección de la metilación del ácido nucleico del promotor unido operativamente al gen estructural que codifica el polipéptido.

10 Antecedentes de la invención

15 La metilación enzimática de bases de citosina en el carbono 5 que produce 5-metil-citosina es una modificación del ADN encontrada en procariotas, así como en eucariotas. En células eucariotas es bien conocido como un mecanismo epigenético fundamental que provoca silenciamiento génico. La metilación sucede específicamente en dinucleótidos CpG que se encuentran frecuentemente dentro de regiones promotoras. Fuera de los promotores, son infrecuentes los sitios CpG. Los promotores metilados son silenciosos, es decir, transcripcionalmente inactivos de modo que el gen no se expresa. El ADN metilado recluta proteínas de unión a metil-ADN que forman una plataforma para otros factores como HDAC que modifican y condensan la cromatina.

20 El silenciamiento génico por metilación del promotor se ha informado no solamente para genes autólogos sino también para construcciones génicas recombinantes (Escher, G., et al., J. Lipid Res. 46 (2005) 356-365; Brooks, A. R., et al., J. Gen. Med. 6 (2004) 395-404). El tratamiento con bisulfito del ADN es un método adecuado para discriminar entre sitios CpG metilados y no metilados. En las condiciones usadas, la citosina pero no la 5-metil-citosina se desamina en C4 y de ese modo se convierte en uracilo. De ese modo las hebras de ADN complementarias se convierten en dos hebras, A y B, que ya no son complementarias.

25 Barnes, L.M., et al. (Biotechnol. Bioeng. 96 (2006) 337-348) informan de que el nivel de ARNm LC/HC es para la célula NS0 un marcador para estabilidad a largo plazo. Chusainow, J., et al. (Biotechnol. Bioeng. 102 (2009) 1182-1196) y Jiang, Z., et al. (Biotechnol. Prog. 22 (2006) 313-318) informan de niveles mayores de ARNm LC/HC para células tratadas con MTX. Lee, C.J., et al. (Biotechnol. Bioeng. 102 (2008) 1107-1118) informan de la selección de células basándose en el nivel de ARNm HC.

30 Escher et al., (véase anteriormente) informan del silenciamiento del promotor de CMV en macrófagos transfectados de forma transitoria. El silenciamiento del promotor de CMV *in vivo* con adenovirus se presenta por Brooks et al., (véase anteriormente).

35 Los elementos VEZF1 median la protección de la metilación del ADN, que se presenta por Dickson, J., et al. (PLoS Genetics 6 (2001) e1000804). Mielke, C., et al. (Gene 254 (2000) 1-8) informan de la expresión a largo plazo estabilizada de proteínas heterodiméricas a partir de ARNm tricistrónico. La tasa específica de cepa de parada de la actividad potenciadora de CMV en hígado murino confirmada por el uso de vectores adenovíricos persistentes se presenta por Everett, R.S., et al. (J. Virol. 325 (2004) 96-105). Proesch, S., et al. (Biol. Chem. Hoppe-Seyler 377 (1996) 195-201) informan de la inactivación del promotor temprano inmediato de HCMV muy fuerte por metilación de CPG del ADN *in vitro*. Métodos basados en PCR para detectar biomarcadores de metilación del ADN de locus individual en diagnóstico, pronóstico y respuesta a tratamiento del cáncer se presentan por Kristensen, L.S. y Hansen, L.L. (Clin. Chem. 55 (2009) 1471-1483). Recillas-Targa, F., et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002) 6883-6888) informan de que la protección del efecto de posición y el bloqueo del potenciador por el aislante de beta-globina de pollo son actividades separables.

40 Mielke, C., et al. (Gene 254 (2000) 1-8) informaron de la expresión a largo plazo estabilizada de proteínas heterodiméricas a partir de ARNm tricistrónico. La tasa específica de cepa de parada de la actividad potenciadora de CMV en hígado murino confirmada por el uso de vectores adenovíricos persistentes [E1-, E2b-] se presenta por Everett, R. S., et al. (Virology 325 (2004) 96-105). Yang, Y., et al. (J. Biotechnol. 147 (2010) 180-185) informaron de que la metilación del ADN contribuye a la pérdida de productividad de líneas celulares CHO productoras de anticuerpos monoclonales.

45 Sumario de la invención

50 Se ha descubierto que la determinación del grado de metilación de un sitio CpG específico en el ácido nucleico promotor unido operativamente a un gen estructural que codifica un polipéptido en una célula o línea celular usada para la producción del polipéptido respectivo puede usarse para predecir una disminución en la productividad durante cultivo a largo plazo.

55 En este documento se presenta un método para seleccionar una célula que comprende las etapas siguientes:

60 a) identificar un sitio CpG en un ácido nucleico promotor con un método que comprende las etapas siguientes:

1) aislar por separado el ADN de al menos 10 células de un cultivo de una célula que tiene una tasa de producción de un polipéptido que es, después de un tiempo de cultivo de 30 generaciones de la célula en ausencia de un agente de selección, menor del 90 % de la tasa de producción de la célula después de la primera generación del cultivo,

2) modificar la citosina del ADN aislado por tratamiento con bisulfito,

3) identificar un sitio CpG dentro del ácido nucleico promotor unido operativamente al gen estructural que codifica el polipéptido con una frecuencia de metilación de al menos 0,2 basada en el ADN obtenido en la etapa 2) e identificar de ese modo un sitio CpG,

b) proporcionar al menos una célula que comprende un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica un polipéptido unido operativamente a un ácido nucleico promotor que es el mismo que el de la etapa a),

c) determinar la frecuencia de metilación del sitio CpG identificado en la etapa a) para cada uno de al menos una célula de la etapa b), basado en al menos 10 copias del ácido nucleico promotor o 10 células obtenidas de un cultivo de las mismas,

d) seleccionar una célula en que la frecuencia de metilación determinada en la etapa c) está por debajo de dos veces el valor promedio obtenido determinando la metilación de una citosina en un sitio no CpG, o seleccionar una célula en que la frecuencia de metilación determinada en la etapa c) está por debajo del 5 %.

Un aspecto presentado en este documento es un método para seleccionar un clon celular CHO que comprende las etapas siguientes:

a) determinar para cada uno de al menos un clon celular CHO que comprende un ácido nucleico, que comprende un gen estructural que codifica un polipéptido unido operativamente a un ácido nucleico promotor que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 01, la frecuencia de metilación de un sitio CpG en la posición 425 de la SEQ ID NO: 01 basándose en la metilación determinada para al menos 10 copias del ácido nucleico promotor o en al menos 10 células obtenidas de un cultivo de cada clon celular CHO,

b) seleccionar una célula en que la frecuencia de metilación determinada está por debajo del 5 %,

mediante lo cual la determinación comprende las etapas siguientes:

1) aislar el ADN de cada uno de los clones celulares CHO,

2) realizar para cada ADN aislado individualmente una reacción en cadena de la polimerasa con el par de cebadores específico de metilación de la SEQ ID NO: 11 y 18 y el par de cebadores universal de la SEQ ID NO: 09 y 11,

3) determinar con los resultados obtenidos en la etapa 2) la frecuencia de metilación del sitio CpG.

En una realización adicional, la etapa 2) es la etapa siguiente:

2) digerir de forma individual el ADN aislado con una enzima de restricción y realizar una reacción en cadena de la polimerasa para cada uno de los ADN digeridos con un par de cebadores específico de metilación y un par de cebadores universales.

En una realización, el ácido nucleico promotor tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 01 o comprende un fragmento del mismo o una variante del mismo y el sitio CpG es la posición 425 de la SEQ ID NO: 01 o una posición correspondiente a la misma en un fragmento o variante del mismo.

También un aspecto presentado en este documento es un método para la producción de un polipéptido, que comprende las siguientes etapas:

a) seleccionar un clon celular CHO por un método presentado en este documento,

b) cultivar el clon celular CHO seleccionado, y

c) recuperar el polipéptido del medio de cultivo y/o el clon celular CHO y producir de ese modo un polipéptido.

En una realización, el método comprende antes de la etapa a) las etapas siguientes:

a-3) proporcionar una célula CHO,

a-2) transfectar la célula CHO proporcionada con un ácido nucleico que contiene un gen estructural que codifica el polipéptido unido operativamente a un ácido nucleico promotor,

a-1) i) cultivar opcionalmente y propagar el clon celular CHO transfectado en presencia de un agente de selección, ii) depositar individualmente las células CHO transfectadas, y iii) cultivar las células CHO transfectadas depositadas individualmente en presencia de un agente de selección.

Se presenta en este documento un kit que comprende

a) un reactivo para la modificación de citosina no metilada en un sitio CpG, y

b) un cebador seleccionado de la SEQ ID NO: 13, 16, 17, 18, 19 y 20.

Descripción detallada de la invención

Las líneas celulares de mamífero para la producción de proteínas recombinantes tienen que mantener la productividad durante tiempos prolongados de cultivo. Los estudios de estabilidad a largo plazo requieren mucho tiempo y recursos, pero se realizan ampliamente para identificar y eliminar candidatos inestables durante el desarrollo de las líneas celulares. La inestabilidad de producción de líneas celulares productoras puede asociarse con la metilación y silenciamiento del promotor heterólogo. Los dinucleótidos CpG dentro del promotor/potenciador temprano inmediato principal de citomegalovirus de seres humanos (hCMV-MIE) se ha identificado en este documento que se metilan frecuentemente en líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO) productoras de anticuerpos inestables. Se ha establecido una qPCR a tiempo real específica de metilación para permitir una medición rápida y sensible de la metilación de hCMV-MIE en múltiples líneas celulares y para proporcionar evidencias de que la metilación de hCMV-MIE y los números de copias de transgenes pueden usarse como marcadores prematuros para predecir la estabilidad de producción de líneas celulares CHO recombinantes. Estos marcadores deben proporcionar la oportunidad de enriquecer productores estables de forma prematura en el desarrollo de la línea celular.

Por tanto, en este documento se presenta un método para la selección de una célula, así como un método para la producción de un polipéptido. La célula seleccionada y también la célula usada para la producción de un polipéptido es una célula productora a largo plazo. Dicha célula puede seleccionarse como se presenta en este documento basándose en la metilación del promotor unido operativamente al gen estructural que codifica el polipéptido.

El término "casi" indica que el valor que sigue a esta expresión es un valor central con cierta variabilidad. En una realización, la variabilidad es de ± 20 % del valor, en otra realización, la variabilidad es de ± 10 %, y en una realización adicional, la variabilidad es de ± 5 %. Por tanto, el término casi constante indica que un valor está en una realización en el intervalo del 80 % al 120 %, en otra realización en el intervalo del 90 % al 110 %, y en una realización adicional en un intervalo del 95 % al 105 %.

El término "anticuerpo" indica una molécula que comprende al menos dos de los llamados polipéptidos de cadena ligera (cadena ligera) y dos de los llamados polipéptidos de cadena pesada (cadena pesada). Cada uno de los polipéptidos de cadena pesada y ligera comprende un dominio variable (región variable) (generalmente la parte aminoterminal de la cadena polipeptídica) que comprende regiones de unión que son capaces de interactuar con un antígeno. Cada uno de los polipéptidos de cadena pesada y ligera también comprende una región constante (generalmente la parte carboxiterninal). La región constante de la cadena pesada media la unión del anticuerpo i) a células que albergan un receptor Fc gamma (Fc γ R), tales como células fagocíticas, o ii) a células que albergan el receptor Fc neonato (FcRn) también conocido como receptor de Brambell. También media la unión a algunos factores incluyendo factores del sistema clásico del complemento tales como el componente (C1q).

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de las cadenas pesadas, los anticuerpos se dividen en diferentes clases: clase IgA, clase IgD, clase IgE, clase IgG y clase IgM. Algunas de estas clases se dividen adicionalmente en subclases (isotipos), es decir, IgG en IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, o IgA en IgA1 e IgA2. De acuerdo con la clase a la que pertenece un anticuerpo, las regiones constantes de cadena pesada se llaman α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG), y μ (IgM), respectivamente. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo de la clase IgG. En otra realización, el anticuerpo tiene una región constante humana o una región constante derivada de origen humano. En una realización adicional, el anticuerpo es de la subclase IgG4 o de la subclase IgG1, IgG2 o IgG3, que se modifica de tal como que no puede detectarse unión al receptor de Fc γ (por ejemplo, Fc γ RIIIa) y/o unión a C1q. En una realización, el anticuerpo es de la subclase IgG4 humana o una de subclase de IgG1 humana mutada. En una realización, el anticuerpo es de la subclase IgG1 humana con mutaciones L234A y L235A. En otra realización, el anticuerpo es con respecto a la unión al receptor Fc γ de la subclase IgG4 o de la subclase IgG1 o IgG2, con una mutación en L234, L235 y/o D265, y/o contiene la mutación PVA236. En una realización adicional, el anticuerpo tiene una mutación seleccionada de S228P, L234A, L235A, L235E, SPLE (S228P y L235E) y/o PVA236 (PVA236 significa que la secuencia de aminoácidos ELLG (dada en código de aminoácidos de una letra) para la posición del aminoácido 233 a 236 de IgG1 o EFLG de IgG4 está remplazada por PVA). En una realización, el anticuerpo es de la subclase IgG4 y tiene la mutación S228P de IgG4, o el anticuerpo es de la subclase IgG1 y tiene las mutaciones L234A y L235A.

El dominio variable de una cadena de ligera o pesada de inmunoglobulina a su vez comprende diferentes segmentos, es decir, cuatro regiones flanqueantes (FR) y tres regiones hipervariables (CDR).

La expresión "tratamiento con bisulfito" indica una reacción para la conversión de las bases de citosina en un ácido nucleico en bases de uracilo en presencia de iones bisulfito mediante lo cual las bases de 5-metil-citosina no se convierten significativamente. Esta reacción para la detección de citosina metilada se describe en detalle por Frommer et al. (Frommer, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 1827-1831) y Grigg y Clark (Grigg, G.W. and Clark, S., Bioessays 16 (1994) 431-436; Grigg, G.W., DNA Seq. 6 (1996) 189-198). La reacción con bisulfito contiene una etapa de desaminación y una etapa de desulfonación que pueden realizarse por separado o simultáneamente. La declaración de que las bases de 5-metil-citosina no se convierten significativamente tendrá solamente en cuenta el hecho que no puede excluirse que un pequeño porcentaje de bases de 5-metil-citosina se

convierta en uracilo, aunque se pretenda convertir única y exclusivamente las bases de citosina (no metiladas).

El término "célula" indica una célula en que un ácido nucleico, por ejemplo, que codifica un polipéptido, opcionalmente heterólogo, puede introducirse/transfectarse o se introduce/transfecta. El término "célula" incluye tanto células procariontas, que se usan para propagación de plásmidos, como células eucariotas, que se usan para la expresión de un ácido nucleico. La célula puede ser una célula eucariota y la célula eucariota puede ser una célula de mamífero. La célula de mamífero puede seleccionarse del grupo de células de mamífero que comprenden células CHO (por ejemplo, CHO K1, CHO DG44), células BHK, células NS0, células SP2/0, células HEK 293, células HEK 293 EBNA, células PER.C6®, y células COS. Como se usa en este documento, el término "célula" incluye la célula objeto y su descendencia. Por tanto, el término "célula" indica la célula objeto primaria y cultivos derivados de la misma independientemente de la cantidad de transferencias. También se entiende que toda la descendencia puede no ser idéntica de forma precisa en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o accidentales. Se incluye la descendencia variante que tiene la misma función o actividad biológica que la explorada en la célula transformada originalmente.

La expresión "sitio CpG" indica el dinucleótido CG dentro de un ácido nucleico que puede reconocerse por las enzimas de metilación de una célula y donde la citosina puede convertirse en 5-metil-citosina. El sitio CpG está dentro de un ácido nucleico promotor.

La expresión "casete de expresión" indica una construcción que contiene los elementos reguladores necesarios, tales como el promotor y el sitio de poliadenilación, para la expresión de al menos el ácido nucleico contenido en una célula.

La expresión "plásmido de expresión" indica un ácido nucleico que proporciona todos los elementos necesarios para la expresión del gen o genes estructurales comprendidos en una célula. Típicamente, un plásmido de expresión comprende una unidad de propagación de plásmido procarionta, por ejemplo, para *E. coli*, que comprende un origen de replicación y un marcador de selección, un marcador de selección eucariota y uno o más casetes de expresión para la expresión del gen o genes estructurales de interés comprendiendo cada uno un ácido nucleico promotor, un gen estructural y un terminador de la transcripción incluyendo una señal de poliadenilación. La expresión génica se sitúa habitualmente bajo el control de un ácido nucleico promotor, y se dice que dicho gen estructural está "unido operativamente a" el ácido nucleico promotor. Asimismo, un elemento regulador o un ácido nucleico promotor central está unido operativamente si el elemento regulador modula la actividad del ácido nucleico promotor central.

La expresión "tiempo de generación" indica el tiempo necesario para que una célula se divida y para que produzca una célula hija. Por tanto, una célula que se ha dividido una vez tiene una edad de una generación. El término "generación" indica la cantidad de divisiones celulares de una célula.

La expresión "alta frecuencia" indica que en este sitio de metilación la citosina está metilada de forma más frecuente que en otros sitios de metilación basándose en el análisis de la metilación de una cantidad estadística significativa de células individuales o clones de ADN, respectivamente. Esta cantidad estadística significativa es, en una realización, de al menos 10 células individuales o clones de ADN, respectivamente, en una realización adicional, de al menos 15 células individuales o clones de ADN, respectivamente, y en otra realización, de al menos 20 células individuales o clones de ADN, respectivamente. En una realización, se analiza un máximo de 400 células o clones de ADN, respectivamente.

La expresión "célula productora a largo plazo" indica una célula que produce un polipéptido, en una realización un polipéptido heterólogo, mediante lo cual la tasa de producción específica de la célula es casi constante durante al menos 30 generaciones. La célula productora a largo plazo puede tener una tasa de producción específica que es casi constante durante al menos 30 generaciones, durante al menos 45 generaciones y durante al menos 60 generaciones. La célula productora a largo plazo puede tener una tasa de producción específica que es casi constante durante hasta 60 generaciones, durante hasta 75 generaciones y durante hasta 90 generaciones.

El término "metilación" indica un proceso dentro de una célula que se ha transfectado con un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica un polipéptido unido operativamente a un promotor en que una citosina del ácido nucleico promotor se convierte en 5-metil-citosina. Un ácido nucleico promotor en que al menos una citosina se convierte en 5-metil-citosina se indica como ácido nucleico "metilado".

La expresión "unido operativamente" indica una yuxtaposición de dos o más componentes, donde los componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar de su modo pretendido. Por ejemplo, un promotor y/o potenciador están unidos operativamente a una secuencia codificante si actúa en cis para controlar o modular la transcripción de la secuencia unida. Generalmente, pero no necesariamente, las secuencias de ADN que están "unidas operativamente" son contiguas y, cuando sea necesario unir dos regiones codificantes de proteína tales como el líder de secreción y un polipéptido, contiguas y en fase (de lectura). Sin embargo, aunque un promotor unido operativamente está generalmente localizado cadena arriba de la secuencia codificante, no está necesariamente contiguo con la misma. Los potenciadores no tienen que estar contiguos. Un potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si el potenciador aumenta la transcripción de la secuencia codificante.

Los potenciadores unidos operativamente pueden estar localizados cadena arriba, dentro o cadena abajo de las secuencias codificantes y a una distancia considerable del promotor. Un sitio de poliadenilación está unido operativamente a una secuencia codificante si está localizado en el extremo cadena abajo de la secuencia codificante de modo que la transcripción continúe a través de la secuencia codificante en la secuencia de poliadenilación. Un codón de parada de la traducción está unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico exónica si está localizado en el extremo cadena abajo (extremo 3') de la secuencia codificante de modo que la traducción continúe a través de la secuencia codificante hasta el codón de parada y se termine ahí. La unión se consigue por métodos recombinantes conocidos en la técnica, por ejemplo, usando metodología de PCR y/o por ligamiento en sitios de restricción convenientes. Si no existen sitios de restricción convenientes, entonces se usan adaptadores o enlazadores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

El término "polipéptido" indica un polímero que consiste en aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, se produzcan de forma natural o sintética. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 20 restos de aminoácido pueden mencionarse como "péptidos", mientras que moléculas que consisten en dos o más polipéptidos o que comprenden un polipéptido de más de 100 restos de aminoácido pueden mencionarse como "proteínas". Un polipéptido también puede comprender componentes no aminoacídicos, tales como grupos carbohidrato, iones metálicos o ésteres de ácido carboxílico. Los componentes no aminoacídicos pueden añadirse por la célula, en que se expresa el polipéptido y pueden variar con el tipo de célula. Los polipéptidos se definen en este documento en términos de su estructura de composición de aminoácidos o el ácido nucleico que los codifica. Adiciones tales como grupos carbohidrato generalmente no se especifican, pero no obstante pueden estar presentes.

El término "variante" de un ácido nucleico promotor indica que dentro del ácido nucleico promotor uno o más nucleótidos se cambia sin interferir con la función del ácido nucleico promotor. Dicho cambio puede ser para retirar o introducir un sitio de restricción.

El término "productor" indica la expresión de un gen estructural insertado en un casete de expresión en una célula. El término incluye los procesos de transcripción y traducción de ácido nucleico. La producción se realiza en células procariontas o eucariontas apropiadas y el polipéptido expresado, es decir, producido, puede recuperarse de las células después de lisis o del sobrenadante de cultivo.

La expresión "ácido nucleico promotor" indica una secuencia polinucleotídica que controla la transcripción de un gen/gen estructural o secuencia de ácido nucleico a la que está unido operativamente. Un ácido nucleico promotor incluye señales para la unión de la ARN polimerasa y el inicio de la transcripción. El ácido nucleico promotor usado será funcional en la célula en que se contemple la expresión del gen estructural seleccionado. Una gran cantidad de ácidos nucleicos promotores incluyendo promotores constitutivos, inducibles y reprimibles de una diversidad de fuentes diferentes son bien conocidos en la técnica (e identificados en bases de datos tales como GenBank) y están disponibles como o dentro de polinucleótidos clonados (a partir de, por ejemplo, depósitos tales como ATCC, así como otras fuentes comerciales o individuales).

Un "ácido nucleico promotor" indica una secuencia de nucleótidos que dirige o promueve la transcripción de un gen estructural unido operativamente. Típicamente, un ácido nucleico promotor está localizado en la región no codificante o no traducida 5' de un gen, próximo al sitio de inicio de la transcripción del gen estructural. Los elementos de secuencia dentro de los ácidos nucleicos promotores que funcionan en el inicio de la transcripción a menudo se caracterizan por secuencias de nucleótidos consenso. Estos elementos incluyen sitios de unión de la ARN polimerasa, secuencias TATA, secuencias CAAT, elementos específicos de diferenciación (DSE), elementos de respuesta a AMP cíclico (CRE), elementos de respuesta a suero (SER), elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) y sitios de unión para otros factores de transcripción, tales como CRE/ATF, AP2, SP1, la proteína de unión a elemento de respuesta de cAMP (CREP) y factores octaméricos. Si un ácido nucleico promotor es un ácido nucleico promotor inducible, entonces la tasa de transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor, tal como un ácido nucleico promotor de CMV seguido por dos sitios de operador tet, los ácidos nucleicos promotores de metalotioneína y de choque térmico. La tasa de transcripción no se regula por un agente inductor si el ácido nucleico promotor es un ácido nucleico promotor constitutivamente activo. Entre los ácidos nucleicos promotores eucariontas que se han identificado como ácidos nucleicos promotores fuertes para la expresión están el ácido nucleico promotor temprano de SV40, el ácido nucleico promotor tardío principal de adenovirus, el ácido nucleico promotor de la metalotioneína-I de ratón, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, el factor de elongación 1 alfa de hámster chino (CHEF-1), EF-1 alfa humano, ubiquitina y el ácido nucleico promotor temprano inmediato de citomegalovirus de ser humano (CMV IE).

La expresión "marcador de selección" indica un ácido nucleico que permite que las células que lo portan se seleccionen específicamente por o frente al mismo, en presencia de un agente de selección correspondiente. Típicamente, un marcador de selección conferirá resistencia a un fármaco o compensará un defecto metabólico o catabólico en la célula en que se introduce. Un marcador de selección puede ser positivo, negativo o bifuncional. Un marcador de selección positivo útil es un gen de resistencia a antibiótico que permite la selección de células transformadas con el mismo en presencia del agente de selección correspondiente, por ejemplo, el antibiótico. Una célula no transformada no es capaz de crecer o sobrevivir en las condiciones selectivas, es decir, en presencia del agente de selección. Los marcadores de selección negativos permiten que las células que portan el marcador se

eliminen selectivamente. Los marcadores de selección usados con células eucariotas incluyen, por ejemplo, los genes estructurales que codifican la aminoglucósido fosfotransferasa (APH), tal como, por ejemplo, los marcadores de selección de higromicina (hyg), neomicina (neo), y G418, la dihidrofolato reductasa (DHFR), la timidina quinasa (tk), la glutamina sintetasa (GS), la asparagina sintetasa, la triptófano sintetasa (agente de selección indol), la histidinol deshidrogenasa (agente de selección histidinol D) y ácidos nucleicos que confieren resistencia a puromicina, bleomicina, fleomicina, cloranfenicol, Zeocina, y ácido micofenólico.

La expresión "tasa de producción a corto plazo" indica la cantidad de polipéptido producida por una única célula en un día, determinada a partir de la cantidad de polipéptido producida dentro de un periodo de tiempo dado y la densidad de células viables, donde el periodo de tiempo es corto. El cultivo a corto plazo puede ser durante 2 a 20 días, durante 4 a 15 días y durante 10 a 14 días.

La expresión "tasa de producción específica" o "tasa de producción" indica la cantidad de polipéptido producida por una única célula en un día, determinada a partir de la cantidad de polipéptido producida en un periodo de tiempo dado y la densidad de células viables. La tasa de producción específica (SPR) puede calcularse usando la siguiente fórmula:

$$SPR = \frac{P_2 - P_1}{(D_2 - D_1) / 2 * \Delta t} \quad (\text{Fórmula 2})$$

con

SPR [pg/célula/d]: tasa de producción específica
 P_1 [µg/ml]: concentración de polipéptido al inicio del periodo de tiempo,
 P_2 : [µg/ml]: concentración de polipéptido al final del periodo de tiempo,
 D_1 [células/ml]: densidad de células viables al inicio del periodo de tiempo,
 D_2 [células/ml]: densidad de células viables al final del periodo de tiempo,
 Δt [d]: duración del periodo de tiempo.

La expresión "gen estructural" indica la región de un gen sin una secuencia señal, es decir, la región codificante.

Las células que producen un polipéptido, es decir, células transfectadas con un ácido nucleico que comprende un casete de expresión que contiene un gen estructural que codifica un polipéptido heterólogo, pueden agruparse en diferentes clases: en una primera clase de células la tasa de producción específica es casi constante sobre múltiples generaciones mientras que en la segunda clase de células la tasa de producción específica es decreciente, especialmente decreciente monotónicamente, sobre múltiples generaciones. La productividad decreciente de células y líneas celulares productoras de polipéptido, respectivamente, está causada por la metilación constantemente creciente y con ello el silenciamiento del ácido nucleico promotor unido operativamente al gen estructural que codifica el polipéptido o por pérdida de copias del gen estructural.

Se ha descubierto que la presencia de metilación detectable en el ácido nucleico promotor que está unido operativamente al gen estructural que codifica un polipéptido proporciona información respecto a la productividad a largo plazo de la célula o línea celular, respectivamente.

Cada ácido nucleico promotor usado para la expresión de un gen estructural comprende sitios propensos a metilación por las enzimas de la célula en que se ha introducido si el ácido nucleico promotor no está protegido por elementos protectores. Un sitio susceptible a metilación se llama sitio CpG y comprende/consiste en el dinucleótido CG. Pero no todos los sitios CpG se metilan con la misma frecuencia relativa - algunos de los sitios CpG se metilan más a menudo que otros. Se ha descubierto que ciertos sitios, por ejemplo, dentro del promotor de CMV de ser humano, se metilan con diferente frecuencia y tienen un impacto diferente sobre el silenciamiento del promotor.

El siguiente método puede usarse para identificar un sitio CpG en una secuencia de ácido nucleico. Comprende las etapas:

- 1) proporcionar una célula con una tasa de producción de un polipéptido que es, después de un tiempo de cultivo de 30 generaciones de la célula en ausencia de un agente de selección, menor del 90 % de la tasa de producción de la célula después de la primera generación del cultivo,
- 2) aislar por separado el ADN de al menos 10 células de un cultivo de la célula de 1),
- 3) modificar la citosina del ADN aislado por tratamiento con bisulfito,
- 4) identificar un sitio CpG dentro del ácido nucleico promotor unido operativamente al gen estructural que codifica el polipéptido con una frecuencia de metilación de al menos 0,2 basándose en el ADN obtenido en la etapa 3) e identificando de ese modo un sitio CpG.

La tasa de producción de la célula después de un tiempo de cultivo de 30 generaciones puede ser un 60 % o menos de la tasa de producción de la célula después de la primera generación de cultivo. La frecuencia de metilación puede ser de al menos 0,4. El ADN puede aislarse de al menos 20 células. El ácido nucleico promotor tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 01 o comprende un fragmento de la misma o una variante de la misma.

En una realización, la modificación de la citosina del ADN aislado por tratamiento con bisulfito comprende las etapas siguientes:

- 3-a) incubar el ADN aislado en presencia de iones sulfito mediante lo cual se desamina el ADN, y
- 3-b) incubar el ADN desaminado en condiciones alcalinas mediante lo cual el ADN desaminado se desulfona.

Un método para obtener una célula productora de un polipéptido es un proceso que comprende al menos una etapa de transfección y al menos una etapa de selección que incluye depositar células individuales de células transfectadas satisfactoriamente directamente después de la transfección o después de su crecimiento en presencia de un agente de selección. En la etapa de selección, las células se identifican basándose en su tasa de producción específica a corto plazo, es decir, basándose en la concentración de polipéptido en el sobrenadante después de un cultivo a corto plazo. Entre las células seleccionadas, algunas tienen una tasa de producción específica que es casi constante sobre múltiples generaciones y otras tienen una tasa de producción específica que es decreciente monotónicamente sobre múltiples generaciones. Por tanto, con los criterios de selección generalmente aplicados, no puede hacerse una selección específica de una célula o células con una productividad a largo plazo estable.

Por tanto, en este documento se presenta un método para seleccionar una célula productora de un polipéptido que comprende las etapas siguientes:

- a) determinar para al menos una célula que comprende un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica el polipéptido unido operativamente a un ácido nucleico promotor, la metilación de un sitio CpG con alta frecuencia de metilación dentro del ácido nucleico promotor, y
- b) seleccionar una célula productora de un polipéptido donde la metilación determinada en la etapa b) está por debajo de un valor umbral.

En el método presentado en este documento, puede analizarse cualquier célula obtenida por transfección con un plásmido de expresión que comprende un casete de expresión que comprende un ácido nucleico promotor unido operativamente a un gen estructural que codifica un polipéptido de interés a producir por la célula transfectada. El plásmido de expresión generalmente comprende también un marcador de selección. Por tanto, en una realización las células se cultivan en presencia de un agente de selección después de la etapa de transfección y antes de la etapa de selección. En otra realización, el método comprende cultivar las células sin deposición previa de células individuales o de dilución limitada como una combinación en presencia de un agente de selección. En una realización adicional, el método comprende cultivar las células después de la deposición de células individuales o de la dilución limitante.

En una realización, la determinación comprende

- 1) aislar individualmente el ADN de cada una de las células proporcionadas,
- 2) realizar una PCR específica de metilación,
- 3) calcular con los resultados obtenidos en la etapa 2) la metilación de un sitio CpG con alta frecuencia de metilación dentro del ácido nucleico promotor.

En otra realización, la etapa 2) es

- 2) realizar una PCR con un cebador específico de metilación y con un cebador universal, o
- 2) digerir el ADN con una enzima de restricción y realizar una PCR con el ADN digerido y un cebador específico de metilación y un cebador universal.

Después del cultivo/selección de la combinación tiene que realizarse una deposición de células individuales. Si la deposición de células individuales se realiza después de una etapa de cultivo de combinación, las células también se cultivan adicionalmente después de la deposición de células individuales.

Para identificar células o líneas celulares con una tasa de producción específica que sea casi constante sobre múltiples generaciones, tiene que determinarse la concentración de polipéptido en el sobrenadante y la densidad de células viables en tiempos definidos de cultivo en un cultivo a largo plazo sobre múltiples generaciones. Un sitio CpG con una alta frecuencia de metilación puede identificarse por tratamiento con bisulfito de ADN monocatenario, por ejemplo, a pH 5, con desulfuración alcalina subsiguiente. En este documento pueden discriminarse sitios CpG metilados y no metilados. En las condiciones de tratamiento específicas, la citosina, pero no la 5-metil-citosina, se desamina en la posición 4 del N-heterociclo y se convierte en uracilo. Las hebras de ADN complementario se convierten en dos hebras, hebra A y hebra B, que ya no son complementarias. La determinación puede basarse en cualquiera de estas hebras.

Este cultivo a largo plazo tiene que realizarse solamente una vez para el ácido nucleico promotor o combinación de ácido nucleico promotor y línea celular. Si se usa el mismo ácido nucleico promotor o combinación una segunda vez, la selección puede basarse en los datos ya recogidos.

Pueden aplicarse varias técnicas para revelar las diferencias de secuencia entre alelos metilados y no metilados después de tratamiento con bisulfito. La secuencia de interés (la hebra A o la hebra B) puede amplificarse por PCR en condiciones específicas sin metilación, es decir, con un cebador no sensible a sitios metilados, y analizarse posteriormente por métodos tales como secuenciación de ADN (con o sin clonación), análisis de punto de fusión de alta resolución o análisis de microserie. En una realización, puede realizarse una PCR cuantitativa (qPCR) con cebador o sondas sensibles a metilación o específicas de metilación. El ADN metilado puede precipitarse con anticuerpos específicos de 5-metil-citosina seguidos por una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

La PCR específica de metilación (MSP) también puede usarse para abordar la secuencia de ADN tratado con bisulfito directamente sin amplificación previa por PCR de la región de interés. Los cebadores usados en MSP comprenderán uno o más sitios CpG. Son complementarios a 5-metil-citosina no convertida para la detección de ADN metilado o complementarios a uracilo convertido a partir de citosina para la detección de ADN no metilado.

La metilación de los sitios CpG identificados se determina para varias células. En una realización, la cantidad de células es de al menos 10, en otra realización de al menos 15 y en una realización adicional de al menos 20. Después de ello, se calcula la frecuencia de metilación para cada sitio CpG, es decir, para cada sitio CpG se calcula la cantidad de células metiladas en ese sitio CpG dividida por la cantidad total de células analizadas. La determinación de la frecuencia de metilación se hace para una célula o para varias células que muestran la mayor disminución en la tasa de producción específica durante cultivo a largo plazo. Un sitio CpG con una alta frecuencia de metilación es un sitio CpG que tiene una frecuencia de metilación de al menos 0,2, de al menos 0,25, de al menos 0,4 y de al menos 0,5.

Después de la determinación de los sitios CpG con una alta frecuencia de metilación, se realiza la metilación de los sitios CpG respectivos en varias células que han demostrado la disminución más baja o casi ausencia de disminución en la tasa de producción específica durante el cultivo a largo plazo.

Un sitio CpG con alta frecuencia de metilación adecuado para el método presentado en este documento es un sitio CpG que tiene una alta frecuencia de metilación determinada basándose en varias células que muestran una disminución en la tasa de producción específica durante cultivo a largo plazo y que tienen una frecuencia de metilación determinada basándose en varias células que muestran la disminución más baja o casi ausente en la tasa de producción específica durante el cultivo a largo plazo que está por debajo de un valor umbral predeterminado.

El valor umbral predeterminado puede ser cinco veces el valor promedio de la metilación aparente de una citosina en un sitio no CpG. El término "aparente" indica que, aunque no está presente la metilación, puede determinarse una frecuencia de metilación. Por tanto, este valor corresponde al ruido de fondo. El valor umbral puede ser tres veces el promedio. El valor umbral puede ser dos veces el valor promedio. Pueden usarse los mismos valores umbral en la etapa de selección del método presentado en este documento.

Otro aspecto específico presentado en este documento es un método para la producción de un polipéptido, que comprende las etapas siguientes:

- a) seleccionar una célula productora de un polipéptido de acuerdo con el aspecto presentado en este documento,
- b) cultivar la célula seleccionada, y
- c) recuperar el polipéptido del medio de cultivo y/o la célula y producir de ese modo un polipéptido.

En una realización, el método comprende una etapa adicional

- d) purificar el polipéptido recuperado.

En otra realización, el método comprende antes de la etapa a) las siguientes etapas:

- a-3) proporcionar una célula,
- a-2) transfectar la célula proporcionada con un ácido nucleico que contiene un gen estructural que codifica el polipéptido unido operativamente a un ácido nucleico promotor,
- a-1) i) cultivar opcionalmente la célula transfectada en presencia de un agente de selección, ii) depositar individualmente las células transfectadas y iii) cultivar las células transfectadas depositadas individualmente en presencia de un agente de selección.

En una realización, la etapa a) comprende:

- 1) proporcionar al menos una célula que comprende un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica el polipéptido unido operativamente a un ácido nucleico promotor,
- 2) determinar la metilación de un sitio CpG con alta frecuencia de metilación dentro del ácido nucleico promotor, y
- 3) seleccionar una célula productora de un polipéptido donde la metilación determinada en la etapa b) está por debajo de un valor umbral.

Se ha descubierto que incluso niveles bajos de ácido nucleico promotor metilado, es decir, por encima de un valor umbral predeterminado, en una célula o en una línea celular usada para la producción de un polipéptido puede usarse para predecir una disminución en la productividad durante cultivo a largo plazo.

5 Por tanto, en este documento se presenta un método para determinar la metilación de un ácido nucleico promotor unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un polipéptido, opcionalmente heterólogo, y determinar de ese modo la productividad a largo plazo de la célula. También un aspecto es un método para seleccionar una célula para producir un polipéptido determinando la metilación del ácido nucleico promotor unido operativamente al gen estructural que codifica el polipéptido.

10 En más detalle, el método puede comprender las etapas siguientes:

- a) proporcionar una célula con productividad a largo plazo estable y una célula con productividad a largo plazo no estable,
- 15 b) identificación de sitios CpG metilados clonando el ácido nucleico promotor tratado con bisulfito de la línea celular con productividad a largo plazo no estable usando el ácido nucleico promotor de la línea celular con productividad a largo plazo estable como referencia,
- c) realizar opcionalmente un análisis de punto de fusión de alta resolución,
- 20 d) proporcionar un cebador de PCR o sondas sensibles a metilación para el sitio CpG metilado identificado en la etapa b),
- e) verificar opcionalmente el valor predictivo del sitio CpG metilado identificado proporcionando líneas celulares adicionales con productividad a largo plazo estable y no estable.

25 La etapa e) se realiza con al menos 10 células o líneas celulares diferentes derivadas de la misma línea celular precursora y que comprenden el mismo casete de expresión para expresar un polipéptido de interés unido operativamente al mismo ácido nucleico promotor.

En una realización, el ADN se digiere antes del tratamiento con bisulfito.

30 La célula puede ser una célula eucariota. La célula puede ser una célula de mamífero. La célula puede seleccionarse de células CHO, células BHK, células HEK y células SP2/0. En otra realización más, la célula es una célula CHO. En una realización adicional, la célula es una célula CHO K1.

35 En la Figura 1, se muestra la cantidad de sitios CpG metilados del mismo ácido nucleico promotor obtenido de diferentes células.

40 Los métodos presentados en este documento se ejemplifican a continuación con el promotor temprano inmediato de citomegalovirus de seres humanos (promotor de CMV IE) que estaba disponible en suficientes cantidades en nuestros laboratorios en el momento en que se hizo la invención. Estos datos se presentan para ejemplificar los métodos presentados en este documento y no como limitación. El alcance de la invención se expone en las reivindicaciones.

45 El promotor de CMV IE de seres humanos como secuencia de ácido nucleico se representa a continuación (los sitios CpG están subrayados):

```

ATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCA
TATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCC
GCCATTGACCGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCA
ATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACG
CCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGG
ACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTAGCATGGTGATGCGGTTTTGGCA
GTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTC1CAAGTCTCCACCCCATTGACGT2C
AATGGGAGTTTGT3TTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGT4CGTAACA5ACTCCGCCCCAT
TGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCCGTTT6AGTGAACG
    
```

(SEQ ID NO: 01).

50 En la SEQ ID NO: 01 están presentes treinta y tres sitios CpG, que son sitios potenciales para metilación del ácido

ES 2 605 702 T3

nucleico. Con el método resumido anteriormente pueden identificarse restos de citosina dentro del promotor de CMV de seres humanos que se metilan predominantemente.

La hebra A con todos los sitios CpG conservados tiene la secuencia de nucleótidos

5
ATGTTGATATTGATTATTGATTAGTTATTAATAGTAATTAATTACGGGGTTATTAGTTTATAGTTTA
TATATGGAGTTTCGCGTTATATAATTTACGGTAAATGGTTCGTTTGGTTGATCGTTTAACGATTTTC
GTTTATTGACGTTAATAATGACGTATGTTTTTATAGTAACGTTAATAGGGATTTTTTATTGACGTTA
ATGGGTGGAGTATTTACGGTAATTTGTTTTATTGGTAGTATATTAAGTGTATTATATGTTAAGTACG
TTTTTTATTGACGTTAATGACGGTAATGGTTCGTTTGGTATTATGTTTAGTATATGATTTTTATGGG
ATTTTTTTATTTGGTAGTATATTTACGTATTAGTTATCGTTATTAGTATGGTGATCGGTTTTGGTA
GTATATTAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGATTTACGGGGATTTTTAAGTTTTTTATTGACGTT
AATGGGAGTTTGTGGTATTAAAATTAACGGGATTTTTTAAAATGTCGTAATAATTTCGTTTTAT
TGACGTTAATGGGCGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTTTATATAAGTAGAGTTTCGTTTAGTGAACG

(SEQ ID NO: 02) y la hebra A completamente desaminada tiene la secuencia de nucleótidos

ATGTTGATATTGATTATTGATTAGTTATTAATAGTAATTAATTATGGGGTTATTAGTTTATAGTTTA
TATATGGAGTTTTGTGTATATAATTTATGGTAAATGGTTTTGTTGGTTGATGTTTAAATGATTTTT
GTTTATTGATGTTAATAATGATGTATGTTTTTATAGTAATGTTAATAGGGATTTTTTATTGATGTTA
ATGGGTGGAGTATTTATGGTAATTTGTTTTATTGGTAGTATATTAAGTGTATTATATGTTAAGTATG
TTTTTTATTGATGTTAATGATGGTAAATGGTTTTGTTGGTATTATGTTTAGTATATGATTTTTATGGG
ATTTTTTTATTTGGTAGTATATTTATGTATTAGTTATTGTTATTAGTATGGTGATGTGTTTTGGTA
GTATATTAATGGGTGTGGATAGTGGTTTGATTTATGGGGATTTTTAAGTTTTTTATTGATGTT
AATGGGAGTTTGTGGTATTAAAATTAATGGGATTTTTTAAAATGTTGTAATAATTTTGTTTTAT
10 TGATGTAATGGGTGGTAGGTGTGTATGGTGGGAGGTTTATATAAGTAGAGTTTTGTTTAGTGAATG

(SEQ ID NO: 03). La hebra B con todos los sitios CpG conservados tiene la secuencia de nucleótidos

CGTTTTATTA**AA****CG**GAGTTTTGTTTTATATAGATTTTTTAT**CG**TAT**CG**TTTTAT**CG**TTTTATTT**CG**GTTA
ATGGGG**CG**GAGTTGTT**CG**ATATTTTGGAAAGTTT**CG**TTGATTTTGGTGTTAAAATAAATTTTTATT
G**CG**TTAATGGGGTGGAGATTTGGAAAATTT**CG**TGAGTTAAAT**CG**TTATTT**CG**TTTTATTGATGTAT
TGTTAAAAT**CG**TATTATTATGTTAATAG**CG**ATGATTAATA**CG**TAGATGTATTGTTAAGTAGGAAAGT
TTTTATAAGGTTATGTATTGGGTATAATGTTAGG**CG**GGTTATTTAT**CG**TTATTG**CG**TTAATAGGGGG
15 **CG**TATTTGGTATATGATATATTTGATGTATTGTTAAGTGGGTAGTTTAT**CG**TAAATATTTTATTTAT
TGAC**CG**TTAATGGAAAGTTTTTATTGG**CG**TTATTATGGGAATATA**CG**TTATTATTGAC**CG**TTAATGGGC
GGGGGT**CG**TTGGG**CG**GTTAGTTAGG**CG**GGTTATTTAT**CG**TAAGTTATGTAAC**CGCG**GAATTTTTATATA
TGGGTTATGAATTAATGATTT**CG**TAATTGATTATTATTAATAATTAGTTAATAATTAATGTTAATAT

(SEQ ID NO: 04) y la hebra B en forma completamente desaminada tiene la secuencia de nucleótidos

TGTTTATTAAATGGAGTTTTGTTTATATAGATTTTTTATTGTATATGTTTTATTGTTTTATTTGTGTTA****
ATGGGGTGGAGTTGTTATGATATTTTGGAAAGTTTTGTTGATTTTGGTGTAAAATAAATTTTTATT****
GATGTTAATGGGGTGGAGATTTGGAAATTTTTGTTGAGTTAAAT**GTTATTTATGTTTTATTGATGTAT******
TGTTAAAATTGTATTATTATGTTAATAG**TGATGATTAATA**TGTAGATGTATTGTTAAGTAGGAAAGT******
TTTATAAGGTTATGTATTGGGTATAATGTTAGGTGGGTTATTTAT**TGTTATTGAT**GTTAATAGGGGG******
****TGTATTTGGTATATGATATATTTGATGTATTGTTAAGTGGGTAGTTTAT**TGTAAATATTTTATTTAT******
TGATGTTAATGGAAAGTTTTTATTGG**TGTTATTATGGGAATATAT**TGTTATTATTGAT**GTTAATGGGT********
****GGGGGT**TGTTGGG**TGTTAGTTAGG**TGGGTTATTTAT**TGTAAGTTATGTAAT**TGTGGAATTTTATATA**********
TGGGTTATGAATTAATGATTTTGTAATTGATTATTATTAATAATTAGTTAATAATTAATGTTAATAT**************

(SEQ ID NO: 05).

5 En la Figura 4, se muestra la frecuencia de metilación en sitios CpG individuales en diferentes líneas celulares. Las cantidades se han determinado analizando de 19 a 22 clones diferentes obtenidos de diferentes líneas celulares precursoras CHO después de transfección con un plásmido que comprende un casete de expresión para expresar un polipéptido. Muestra los patrones de metilación de ADN individuales (parte inferior) y la frecuencia de metilación en sitios CpG individuales (parte superior) para cada línea celular. La línea celular K18.1 está altamente metilada (Figuras 4A). La frecuencia de metilación no es igual en los diferentes sitios CpG pero parece tener centros en tres grupos, es decir, en el extremo 5', en el extremo 3' y en aproximadamente la posición (o nucleótido, respectivamente) 400. Catorce de 22 insertos secuenciados tenían una citosina en la posición 425. La metilación del ácido nucleico promotor en la línea celular 43-16 A10 se muestra en la Figura 4E. La distribución de la metilación es similar a la distribución observada con la línea celular K18.1. Como con K18.1., la posición 425 estaba metilada de manera muy frecuente - cinco de 20 insertos secuenciados contenían una citosina en esta posición.

10 En otras tres líneas celulares analizadas se detecta citosina esporádicamente, es decir, como eventos individuales, en diferentes sitios CpG (Figuras 4B, 4C y 4D). Para obtener significancia estadística para las líneas celulares con una baja metilación global, se requeriría secuenciación de cientos de insertos. Adicionalmente, los eventos individuales también pueden representar eventos positivos falsos debido a desaminación incompleta de citosinas en lugar de metilación real del promotor.

15 Para la determinación fiable de la metilación específica de la posición CpG, se ha desarrollado un método de PCR específico de metilación. Para la PCR específica de metilación, pueden usarse los cebadores mostrados en la siguiente Tabla.

Tabla: Cebadores que pueden usarse en PCR específica de metilación

| n.º de cebador (dirección) | específico de metilación | Secuencia de nucleótidos | SEQ ID NO: |
|----------------------------|--------------------------|------------------------------|------------|
| 227 (directo) | no | ATGTTGATATTGATTATTGATTAG | 06 |
| 228 (directo) | no | TATGGGATTTTTTTATTTGGTAGT | 07 |
| 229 (inverso) | no | ACTCCTCTCCCAAACTAAATCTA | 08 |
| 237 (inverso) | no | CCAAAACAACTCCCATTAAC | 09 |
| 238 (directo) | no | GGGGTTATTAGTTTATAGTTTATA | 10 |
| 239 (directo) | no | TGGTATTATGTTTAGTATATGATTTTAT | 11 |
| 240 (directo) | no | GGATTTTTTTATTTGGTAGTATATT | 12 |
| 254 (inverso) | sí | AAATCCCGTAAATCAAACCG | 13 |
| 263 (directo) | no | GGGATTTTTTTATTTGGTAGTATATT | 14 |
| 264 (directo) | no | TATGGGATTTTTTTATTTGGTAGTA | 15 |
| 265 (inverso) | sí | ATCCCGTAAATCAAACCG | 16 |
| 266 (inverso) | sí | TCCCGTAAATCAAACCG | 17 |
| 267 (inverso) | sí | CCCGTAAATCAAACCG | 18 |
| 268 (inverso) | sí | CCCGTAAATCAAACCGC | 19 |
| 262 (inverso) | sí | AAATCCCRATAATCAAACCG | 20 |

30 En el curso de la evaluación de cebadores se ha descubierto que pares de cebadores específicos de metilación, que son altamente selectivos para el ADN promotor de CMV desaminado con una citosina en la posición 425, difieren en sus propiedades (véase la Figura 6). El cebador para la PCR específica de metilación puede tener la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 14 y de la SEQ ID NO: 18.

Por tanto, en una realización de los métodos presentados en este documento, el ácido nucleico promotor es el ácido

nucleico promotor de CMV de seres humanos de la SEQ ID NO: 01. El sitio CpG con alta frecuencia de metilación puede seleccionarse de los sitios CpG en la posición (pb) 80, 96, 425, 437, 563 y 591 de la SEQ ID NO: 01. En otra realización, el sitio CpG con alta frecuencia de metilación se selecciona de los sitios CpG en la posición (pb) 425 y combinaciones del sitio CpG en la posición (pb) 425 con al menos uno de los sitios CpG en la posición (pb) 80, 96, 438, 563 and 591.

Tabla: Resultados esperados para pares de cebadores específicos de metilación (MSP) y el par de cebadores universal en qPCR.

| Molde | n.º 11 | n.º 62 | n.º 01 | n.º 04 |
|---|--------|--------|--------|--------|
| posición 425 | T | C | C | T |
| posición 437 | T | C | T | C |
| Amplificación | | | | |
| par de cebadores específico de metilación | - | + | + | - |
| par de cebadores universal | + | + | + | + |

El par de cebadores universal debe amplificar los cuatro moldes mientras que el par de cebadores MSP debe amplificar de forma selectiva el molde n.º 62 (SEQ ID NO: 22) y el molde n.º 01 (SEQ ID NO: 23). El valor ΔC_p debe ser lo más pequeño posible entre el par de cebadores MSP y el par de cebadores universal sobre el molde n.º 62 y el molde n.º 01. En cambio, los valores C_p obtenidos con el par de cebadores MSP sobre los moldes n.º 11 (SEQ ID NO: 21) y n.º 04 (SEQ ID NO: 24) debe ser lo más alto posible, es decir, ΔC_p en comparación con la amplificación con el par de cebadores universal debe ser máximo.

El par de cebadores específico de metilación debe ser capaz de detectar 5-metil-citosina en la posición 425 selectivamente, si bien están presentes dos posiciones adicionales de metilación en la posición 416 y 437.

La determinación de la metilación es posible con una frecuencia de metilación del 1 % al 100 %.

Se observaron resultados comparables con respecto al grado de metilación con una PCR específica de metilación y por clonación y secuenciación, pero la PCR específica de metilación es mucho más sensible. Líneas celulares con una productividad decreciente en producción a largo plazo tienen una metilación en la posición 425 con una frecuencia de metilación por encima de un valor umbral. El valor umbral puede ser dos veces el ruido de fondo del método de determinación. Una línea celular con productividad estable a largo plazo tiene una frecuencia de metilación en el sitio CpG que está por debajo del valor umbral.

Para análisis de punto de fusión de alta resolución, el ácido nucleico promotor se amplifica empezando desde la posición 334 hasta la posición 487, es decir, 154 pb. Un análisis de punto de fusión ejemplar se muestra en la Figura 10A y su primera derivada en la Figura 10B. Puede observarse que, con un análisis de punto de fusión de alta resolución, puede distinguirse un ácido nucleico promotor metilado (molde n.º 16, SEQ ID NO: 25) a partir de un ácido nucleico promotor no metilado (molde n.º 11). El fragmento de ácido nucleico promotor metilado puede detectarse a una frecuencia relativa del 50 % o más. El fragmento promotor no metilado puede detectarse a una frecuencia relativa del 10 % o más.

Estos datos muestran que la estabilidad de líneas celulares CHO recombinantes que contienen genes foráneos dirigidos por el promotor/potenciador temprano inmediato de CMV de seres humanos puede predecirse midiendo el estado de metilación de la citosina en la posición 425.

Por tanto, se ha descubierto que la determinación de la metilación C425 puede usarse como marcador predictivo para determinar la estabilidad de la expresión de polipéptidos en clones celulares generados y para permitir de ese modo la selección de clones estables con productividad estable durante el desarrollo de líneas celulares. Se ha descubierto adicionalmente que la metilación C425 del 5 % o menos es un criterio adecuado para la selección de clones celulares estables. También se ha descubierto que la fracción de clones celulares que se predicen de forma falsa como estables (clones celulares negativos falsos) puede reducirse cultivándolos durante algún tiempo en ausencia de MTX antes del ensayo.

Habiendo establecido un método de PCR sensible y preciso para cuantificar la metilación del nucleótido hCMV-MIE en el sitio CpG 425, se ha evaluado la metilación de las líneas celulares CHO recombinantes K18.1, 43 16 A10 y G45-2. El ADN tratado con bisulfito que se había analizado por secuenciación se usó como molde en qPCR a tiempo real específica de metilación, directamente o después de amplificación por PCR de la región hCMV-MIE completas (Figuras 8A y 8B). Las dos configuraciones de ensayo proporcionaron resultados comparables. De forma más importante, se correlacionaban bien con los resultados de secuenciación con bisulfito. Esto demuestra que el ensayo de qPCR específico de metilación del sitio CpG 425 puede usarse para medir la metilación de hCMV-MIE en el sitio CpG 425 en líneas celulares CHO recombinantes y puede usarse sin amplificación previa por PCR del ADN diana.

En principio, otros sitios CpG dentro del ADN promotor/potenciador temprano inmediato de CMV podrían explorarse para predecir inestabilidad de producción. Sin embargo, se descubrió que la metilación en C425 era aproximadamente 5 veces mayor que la metilación promedio en todos los sitios CpG. Además, algunos sitios no se metilaban en absoluto incluso en clones celulares altamente metilados, por ejemplo, C280 y C289 (Figuras 4F, 4J y 13). Eligiendo el correcto, es decir, el sitio CpG modificado frecuentemente para el análisis de metilación del promotor, el ensayo se vuelve más sensible. La metilación significativa de los clones G25-17, G25-10 y 43-16 A10 que es de aproximadamente el 10 %, probablemente se perdería, si se eligiera aleatoriamente un sitio CpG para el análisis.

La predicción de la estabilidad abordando el estado de metilación de un sitio CpG relevante dentro de un ácido nucleico promotor puede usarse también con otros ácidos nucleicos promotores heterogéneos.

Para evaluar una correlación potencial de la metilación del promotor temprano y la inestabilidad de producción, se representó la metilación del sitio CpG 425 al inicio del estudio de estabilidad frente a la alteración relativa de qP en presencia o en ausencia de MTX. Los diagramas de correlación se muestran en las Figuras 11A (con MTX) y 11B (sin MTX). Para la evaluación, las áreas del diagrama se dividieron en cuatro compartimentos con límites en metilación al 5 %, que es igual a dos o tres veces el fondo de la medición de metilación, es decir, el límite de detección - y disminución del 40 % en qP - que representa el límite de aceptación de la estabilidad de producción. Se determinó la cantidad de clones en los diferentes compartimentos. El análisis de contingencia del estado de estabilidad por el estado de metilación usando un ensayo de chi cuadrado de Pearson demostró una asociación significativa con un valor-p de 0,05 para el cultivo con MTX y una tendencia con un valor-p de 0,13 para el cultivo sin MTX. Resultó que la mayoría de los clones con menos del 5 % de metilación en el sitio CpG 425 se encontraban en la fracción de clones estables (menos del 40 % de disminución en qP con o sin MTX, mostrado en los compartimentos superiores de la izquierda).

Por tanto, resumiendo lo anterior, la pérdida de productividad durante el aumento de escala es un riesgo principal en el desarrollo de líneas celulares productoras. Por lo tanto, existe una necesidad de marcadores moleculares para la inestabilidad de producción que puedan examinarse rápida y fácilmente. Se ha descubierto que la metilación del promotor puede emplearse para predecir una pérdida futura de productividad en líneas celulares CHO recombinantes. Para evaluar esto, se analizó la metilación del ADN de 33 sitios CpG con una región de 603 pb del promotor/potenciador de hCMV-MIE usando ampliamente. El nivel global de metilación de la región investigada variaba entre aproximadamente el 1 % y el 18 % de todos los sitios CpG. La metilación aparente del 1 % representa el fondo técnico que resulta de la desaminación incompleta de citosinas no metiladas (datos no mostrados). Además, dentro de los promotores metilados, el nivel de metilación varía enormemente entre sitios CpG individuales y se acumula en tres grupos con un máximo en el sitio CpG 425. La metilación en el sitio CpG 425 parecía ser aproximadamente 5 veces mayor que el grado promedio de metilación de todos los demás sitios CpG. Por otro lado, algunos sitios CpG parecen estar completamente no metilados, incluso en líneas celulares altamente metiladas. La metilación global de hCMV-MIE, así como la distribución de la metilación entre los sitios CpG individuales, puede variar considerablemente entre tipos celulares y tejidos (véanse, por ejemplo, Kong, Q., et al., PLoS One 4 (2009) e6679, Krishnan, M., et al., FASEB J. 20 (2006) 106-108, Mehta, A.K., et al., Gene 428 (2009) 20-249).

Se ha descubierto que la metilación dominante del sitio CpG 425 es adecuada como marcador para la metilación de hCMV-MIE. Se ha establecido una qPCR específica de metilación del sitio CpG 425 como un método rápido y sensible con rendimiento medio. Cuando se analiza una gran cantidad de líneas celulares por qPCR específica de metilación en el sitio CpG 425, se descubrió que la mayoría de los productores inestables presentaban más del 5 % de metilación en el sitio CpG 425, incluso antes del cultivo a largo plazo, mientras que la mayoría de los productores estables mostraban menos del 5 % de metilación en este sitio.

La metilación prematura del sitio CpG 425 se encontraba exclusivamente con clones que portan más de 10 copias del plásmido heterólogo. Los informes previos han proporcionado algunas evidencias de que repeticiones en tándem de múltiples copias de transgenes son más susceptibles a metilación y silenciamiento en células de mamífero (Garrick, D., et al., Nat. Genet. 18 (1998) 56-59, McBurney, M.W., et al., Exp Cell Res 274 (2002) 1-8).

Los números de copias de cadena ligera y los niveles de metilación, ambos antes del ensayo de estabilidad, se representan unos frente a otros en la Figura 15. La metilación prematura, es decir, la metilación antes del ensayo de estabilidad, se encontró exclusivamente con células que portaban más de 10 copias del transgén (círculos negros en la Fig. 15A). Como consecuencia, la selección de clones con bajos números de copias del transgén antes del ensayo de estabilidad enriquece asimismo los clones con productividad estable. Dos clones con 10 o menos de 10 copias del transgén adquirieron metilación durante el cultivo a largo plazo (círculos grises en la Fig. 15A) con números de copias de diez copias a tres copias y de dos copias a seis copias.

Los números de copias del transgén antes y después del cultivo a largo plazo sin MTX se comparan en la Figura 15. En la Figura 15A la metilación del sitio CpG 425 de clones individuales al inicio del ensayo de estabilidad (mCpG 425_inicio) se representó frente al número de copias del gen de cadena ligera al inicio del ensayo de estabilidad (copias del gen LC_inicio), círculos blancos: clones con metilación del sitio CpG 425 por debajo del 5 % al inicio, así como al final del ensayo de estabilidad a largo plazo; círculos grises: clones que aumentan por encima del 5 % en la

metilación del sitio CpG 425 durante el ensayo de estabilidad a largo plazo; círculos negros: clones con la metilación del sitio CpG 425 por encima del 5 % al inicio y al final del ensayo de estabilidad. Los clones se identifican por números. En la figura 15B se muestra el número de copias del gen de cadena ligera (copias del gen LC) de clones individuales al inicio (S) del ensayo de estabilidad y al final (E) del cultivo a largo plazo sin MTX. Barras blancas: clones con la metilación del sitio CpG 425 por debajo del 5 % al inicio, así como al final del ensayo de estabilidad a largo plazo; barras grises: clones que aumentan por encima del 5 % en la metilación del sitio CpG 425 durante el ensayo de estabilidad a largo plazo; barras negras: clones con la metilación del sitio CpG 425 por encima del 5 % al inicio y al final del ensayo de estabilidad. Los datos representan los valores medios \pm ETM (barras de error) de cuatro experimentos independientes.

Se ha demostrado en este documento que los productores estables pueden enriquecerse seleccionando clones con pocas copias del transgén.

En resumen, la metilación de hCMV-MIE en el sitio CpG 425 y altos números de copias del transgén, es decir, la presencia de más de 10 copias del gen estructural y del ácido nucleico promotor, puede usarse como indicadores de inestabilidad de producción de líneas celulares CHO recombinantes. Estos indicadores proporcionan una oportunidad para enriquecer productores estables de forma prematura en el desarrollo de líneas celulares.

Los siguientes ejemplos, listas de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de la lista de secuencias

- SEQ ID NO: 01 Secuencia de nucleótidos del promotor/potenciador temprano inmediato de CMV de seres humanos (hCMV).
- SEQ ID NO: 02 Secuencia de nucleótidos de la hebra A del promotor/potenciador de hCMV, todos los sitios CpG conservados.
- SEQ ID NO: 03 Secuencia de nucleótidos de la hebra A del promotor/potenciador de hCMV, completamente desaminada.
- SEQ ID NO: 04 Secuencia de nucleótidos de la hebra B del promotor/potenciador de hCMV, todos los sitios CpG conservados.
- SEQ ID NO: 05 Secuencia de nucleótidos de la hebra B completamente desaminada del promotor/potenciador de hCMV, completamente desaminada.
- SEQ ID NO: 06 Cebador 227.
- SEQ ID NO: 07 Cebador 228.
- SEQ ID NO: 08 Cebador 229.
- SEQ ID NO: 09 Cebador 237.
- SEQ ID NO: 10 Cebador 238.
- SEQ ID NO: 11 Cebador 239.
- SEQ ID NO: 12 Cebador 240.
- SEQ ID NO: 13 Cebador específico de metilación 254.
- SEQ ID NO: 14 Cebador 263.
- SEQ ID NO: 15 Cebador 264.
- SEQ ID NO: 16 Cebador específico de metilación 265.
- SEQ ID NO: 17 Cebador específico de metilación 266.
- SEQ ID NO: 18 Cebador específico de metilación 267.
- SEQ ID NO: 19 Cebador específico de metilación 268.
- SEQ ID NO: 20 Cebador específico de metilación 262
- SEQ ID NO: 21 Secuencia del molde n.º 11.
- SEQ ID NO: 22 Secuencia del molde n.º 62.
- SEQ ID NO: 23 Secuencia del molde n.º 01.
- SEQ ID NO: 24 Secuencia del molde n.º 04.
- SEQ ID NO: 25 Secuencia del molde n.º 16.
- SEQ ID NO: 26 Cebador 133.
- SEQ ID NO: 27 Cebador 132.
- SEQ ID NO: 28 Cebador 166.
- SEQ ID NO: 29 Cebador 178.
- SEQ ID NO: 30 Cebador 180.
- SEQ ID NO: 31 Cebador 185.

Descripción de las figuras

Figura 1 Cantidad de sitios CpG metilados del promotor/potenciador de hCMV obtenido de diferentes líneas celulares.

Figura 2 Mapa plasmídico de p5057.

- Figura 3 A: Tasa de producción específica en ausencia de un agente de selección de la línea celular K18.1 sobre múltiples generaciones en una producción a largo plazo.
 B: Tasa de producción específica en ausencia de un agente de selección de la línea celular G25-10 sobre múltiples generaciones en una producción a largo plazo.
 5 C: Tasa de producción específica en ausencia de un agente de selección de la línea celular G25-17 sobre múltiples generaciones en una producción a largo plazo.
 D: Tasa de producción específica en ausencia de un agente de selección de la línea celular G42-5 sobre múltiples generaciones en una producción a largo plazo.
 10 E: Tasa de producción específica en ausencia de un agente de selección de la línea celular 43-16A10 sobre múltiples generaciones en una producción a largo plazo.
- Figura 4 Figura superior: frecuencia de metilación dentro del ADN de hCMV-MIE de líneas celulares CHO recombinantes en diferentes sitios de metilación determinada por el análisis de 19-22 ácidos nucleicos promotores individuales; Figura inferior: representación esquemática de los sitios CpG metilados dentro del ADN promotor/potenciador de hCMV-MIE de líneas celulares CHO recombinantes - los sitios metilados se muestran en negro - la posición 425 está resaltada por una flecha.
 15 A: línea celular K18.1 - metilación de todos los sitios CpG: 12 %, metilación del sitio C425: 64 %, metilación del sitio C591: 27 %, metilación del sitio C96: 32 %;
 B: línea celular G25-10 - metilación de todos los sitios CpG: 0,5 %, metilación del sitio C425: 0 %, metilación del sitio C591: 5 %, metilación del sitio C96: 0 %;
 20 C: línea celular G25-17 - metilación de todos los sitios CpG: 0,3 %, metilación del sitio C425: 0 %, metilación del sitio C591: 0 %, metilación del sitio C96: 0 %;
 D: línea celular G42-5 - metilación de todos los sitios CpG: 0,6 %, metilación del sitio C425: 0 %, metilación del sitio C591: 0 %, metilación del sitio C96: 0 %;
 25 E: línea celular 43-16 A10 - metilación de todos los sitios CpG: 4,4 %, metilación del sitio C425: 25 %, metilación del sitio C591: 15 %, metilación del sitio C96: 10 %.
- Figura 5 Discriminación de hCMV-MIE que está metilado en el sitio 425 de hCMV-MIE que no está metilado en el sitio 425 por qPCR a tiempo real específico de metilación; curvas de amplificación por PCR para los moldes n.º 11 (A), n.º 62 (B), n.º 01 (C) y n.º 04 (D).
 30
- Figura 6 Curvas de amplificación por PCR para diferentes pares de cebadores específicos de metilación y cebadores.
 35
- Figura 7 Recuperación de hCMV-MIE metilado en el sitio 425 en el fondo de hCMV-MIE no metilado por qPCR a tiempo real específico de metilación.
 40
- Figura 8 Metilación del ácido nucleico promotor de CMV en el sitio de metilación 425 obtenido con el cebador n.º 239 y n.º 267 con pre-amplificación (A) y directamente del ADN genómico tratado con bisulfito (B).
 45
- Figura 9 Metilación del ácido nucleico promotor de CMV en el sitio de metilación 425 obtenido con el cebador (negro) 239+237 y 239+267, (blanco) 263+237 y 263+267, (líneas horizontales) 264+237 y 264 +267 y (líneas verticales) 239+237 y 239+266.
 50
- Figura 10 Análisis de la curva de fusión normalizada de alta resolución ejemplar (A) y primera derivada de la misma, es decir, picos de fusión (B).
 55
- Figura 11 Correlación del grado de metilación en C425 antes de cultivo a largo plazo y la alteración relativa de la SPR después de 60 generaciones de cultivo con MTX 250 nM (A) o sin MTX (B).
 60
- Figura 12 Correlación del grado de metilación en C425 antes de cultivo a largo plazo y el grado de metilación después de 60 generaciones de cultivo con MTX 250 nM.
 65
- Figura 13 Representación esquemática de sitios CpG metilados dentro del ADN promotor/potenciador de hCMV-MIE del clon 44-28. Los sitios metilados se muestran en negro. La posición del nucleótido 425 está resaltada por una flecha. Metilación de todos los sitios CpG: 18 %; metilación en C425: 80 %; metilación en C591: 70 %; metilación en C96: 60 %.
- Figura 14 Números de copias del gen de cadena ligera antes y después del ensayo de estabilidad sin MTX.
- Figura 15 Números de copias del gen de cadena ligera y metilación de hCMV-MIE de líneas celulares CHO productoras de anticuerpos.

Ejemplo 1

Técnicas generales

Técnicas de ADN recombinante

Se usaron métodos convencionales para manipular el ADN como se describe en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). Los reactivos de biología molecular se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Determinación de la secuencia de ADN

La secuenciación de ADN se realizó en SequiServe GmbH (Vaterstetten, Alemania).

Análisis de secuencia de ADN y proteína y tratamiento de los datos de secuencia

Se usaron el paquete de software EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite) y vector NTI versión 9.1 de Invitrogen para la creación, mapeo, análisis, anotación e ilustración de secuencias.

Determinación de proteínas

Se usó un método cromatográfico para cuantificar la cantidad de anticuerpo presente en una muestra. Se usó una columna PorosA que se une a la región Fc del anticuerpo. El anticuerpo se une a la columna y posteriormente se eluye por condiciones de bajo pH. La concentración de proteínas se determinó determinando la densidad óptica (DO) a 280 nm, con una longitud de onda de referencia de 320 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado sobre la base de la secuencia de aminoácidos.

Ejemplo 2

Generación de líneas celulares CHO recombinantes

Se generaron líneas celulares recombinantes que expresaban un anticuerpo humano de clase IgG por transfección estable de células de crecimiento en suspensión CHO-K1 o CHO-DG44 con un vector que codifica la cadena ligera y pesada de anticuerpo que comprende una cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana y una cadena pesada gamma 1 o gamma 4 de inmunoglobulina humana. El vector comprendía adicionalmente un ácido nucleico que codifica la dihidrofolato reductasa (DHFR) murina (Figura 2). Los casetes de expresión de cadena ligera y pesada estaban ambos bajo el control un promotor y potenciador temprano inmediato de CMV de seres humanos (SEQ ID NO: 1). La transfección de células se realizó por nucleofección (Lonza Cologne GmbH o Amaxa Biosystems) o por electroporación usando Gene Pulser XCell (BIO-RAD).

Por ejemplo, la suspensión de CHO-K2 o de CHO-DG44 se transfectó con ADN plasmídico linealizado, usando el dispositivo Nucleofector en combinación con el Nucleofector Kit V (Lonza Cologne GmbH, Colonia, Alemania) o por electroporación usando el Gene Pulser XCell (Bio-Rad, Hércules, CA), de acuerdo con los protocolos de los fabricantes. Las células transfectadas se sembraron en placas de 96 o 384 pocillos que contenían medio sin timidina con diversas concentraciones de metotrexato (MTX) como agente de selección. Después de tres semanas, las líneas celulares que expresan anticuerpos se identificaron midiendo los títulos de anticuerpo en el medio de cultivo por ELISA. Los mayores productores se expandieron a volúmenes mayores, se subclonaron por dilución limitante y se crioconservaron.

Las células transfectadas de forma estable se seleccionaron en timidina y medio sin proteínas que contenía metotrexato (MTX) 20 nM a 1200 nM como agente de selección. Las células o líneas celulares que expresaban anticuerpos se identificaron midiendo los títulos de anticuerpo en el medio de cultivo y se subclonaron por dilución limitante y/o deposición de células individuales FACS.

Las células se propagaron en matraces de agitación ventilados de 50 ml desechables en condiciones humidificadas convencionales (95 % de rH, 37 °C, y del 5 % al 8% de CO₂) a una tasa de agitación constante de 120 rpm/min a 150 rpm/min. Cada 3-4 días, las células se dividieron en medio fresco. Se determinaron la densidad y la viabilidad de los cultivos usando el contador celular CASY TT o Cedex HiRes (Roche Innovates AG, Bielefeld, Alemania).

Además, se aplicaron técnicas convencionales de cultivo celular como se describe, por ejemplo, en Current Protocols in Cell Biology, Bonifacino, J.S. et al. (ed.), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (2000).

Ejemplo 3

Cultivo y producción a largo plazo

Cinco líneas celulares CHO obtenidas de acuerdo con el Ejemplo 2 se investigaron para la productividad a largo plazo: la línea celular K18.1 se obtiene de una célula CHO-K1 y produce un anticuerpo de la subclase humana IgG1; las líneas celulares G25-10, G25-17 y G42-5 se obtienen cada una de una célula CHO-K1 y producen un anticuerpo de la subclase humana IgG4; la línea celular 43-16 A10 se obtiene de una célula CHO-DG44 y produce un

anticuerpo de la subclase humana IgG4.

Las células se ensayaron para la producción fenotípica, es decir, estabilidad durante 35 a 70 generaciones en ausencia de un agente de selección. Las células se cultivaron de forma continua en matraces de agitación de 125 ml ventilados que contenían 50 ml de medio sin MTX y se diluyeron dos veces a la semana con medio fresco. La densidad de siembra fue de 2 a 3 x 10⁵ células/ml. Antes de pasarlas, se determinaron la densidad de células viables y la viabilidad. La edad de cultivo en las generaciones al final de cada pase se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$a_2 = a_1 + \ln(D_2/D_1)/\ln 2 \quad (\text{Fórmula 1})$$

con

a₂ [n.º de generaciones]: edad del cultivo al final del pase,
 a₁ [n.º de generaciones]: edad del cultivo al inicio del pase, es decir, edad del cultivo al final del pase previo,
 D₁ [células/ml]: densidad de células viables al inicio del pase,
 D₂: [células/ml]: densidad de células viables al final del pase.

La concentración de anticuerpos en el sobrenadante (títulos de anticuerpos) se determinó por HPLC de proteína A al final de cada pase. A partir de estos datos, se calculó la tasa de producción específica (SPR) para cada pase usando la siguiente fórmula:

$$SPR = P_2 - P_1 / ((D_2 - D_1) / 2 * \Delta t) \quad (\text{Fórmula 2})$$

con

SPR [pg/célula/d]: tasa de producción específica,
 P₁ [µg/ml]: título de anticuerpos al inicio del pase,
 P₂ [µg/ml]: títulos de anticuerpos al final del pase,
 D₁ [células/ml]: densidad de células viables al inicio del pase,
 D₂ [células/ml]: densidad de células viables al final del pase,
 Δt [d]: duración del pase.

Los valores de SPR se representaron frente a la edad del cultivo al final del pase respectivo en generaciones. Se calculó la curva de tendencia lineal sobre todos los datos puntuales de SPR y la alteración relativa de la SPR (en porcentaje) sobre el periodo ensayado se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\Delta SPR = m * a / SPR_0 * 100 \quad (\text{Fórmula 3})$$

con

ΔSPR [%]: alteración porcentual de SPR,
 m [pg/célula/d/generación]: pendiente de la curva de tendencia lineal,
 a [n.º de generaciones]: edad del cultivo,
 SPR₀: punto de corte con el eje-y de la curva de tendencia lineal.

La línea celular G42-5 no mostró cambios de SPR sobre el periodo completo ensayado (casi 70 generaciones). Todas las demás líneas celulares mostraron una disminución en la productividad ya después de 30 generaciones. La disminución varió del 29 % al 73 %. Para las líneas celulares G25-17, G42-5 y 43-16 A10, el cultivo se detuvo después de 35 a 45 generaciones (Figuras 3A a 3E, Tablas 1 y 2).

Tabla 1: Cambio en SPR durante el cultivo de cinco líneas celulares en ausencia de MTX

| | Línea celular K18.1 | Línea celular G25-10 | Línea celular G25-17 | Línea celular G42-5 | Línea celular 43-16 A10 |
|------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|---------------------|-------------------------|
| ΔSPR (30 generaciones) | -59 % | -29 % | -73 % | 0 % | -49 % |
| ΔSPR (60 generaciones) | n.d. | -57 %. | n.d. | -1 % | n.d. |

n.d. = no determinado.

Tabla 2: SPR restante durante el cultivo de cinco líneas celulares en ausencia de MTX. 100 % = SPR en la primera generación.

| | Línea celular K18.1 | Línea celular G25-10 | Línea celular G25-17 | Línea celular G42-5 | Línea celular 43-16 A10 |
|-----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|---------------------|-------------------------|
| SPR (30 generaciones) | 41 % | 71 % | 27 % | 100 % | 51 % |
| SPR (60 generaciones) | n.d. | 43 % | n.d. | 99 % | n.d. |

n.d. = no determinado

Ejemplo 4

Identificación de sitios CpG metilados dentro del ADN promotor/potenciador temprano inmediato de CMV de seres humanos por tratamiento con bisulfito y secuenciación de ADN

5 El fragmento promotor/potenciador temprano inmediato de CMV de seres humanos (SEQ ID NO: 01) usado para la expresión de genes de cadena ligera y pesada de anticuerpo contiene 33 sitios CpG.

10 El ADN genómico se aisló de las líneas celulares CHO K18.1, G25-10, G25-17, G42-5 y 43-16 A10 usando el kit Allprep ADN/ARN Mini de Qiagen (Hilden, Alemania). Se escindieron cinco microgramos de ADN con la enzima Dra I y se cuantificaron midiendo la extinción a 260 nm. Se sometieron cien nanogramos de ADN a tratamiento con bisulfito y se purificaron usando el kit de bisulfito EpiTect (Qiagen, Hilden, Alemania). El ADN tratado con bisulfito se recuperó en 20 µl de agua sin RNAsa (Qiagen, Hilden, Alemania).

15 Para amplificar la hebra A (directa) del fragmento promotor/potenciador temprano inmediato de CMV de seres humanos (SEQ ID NO: 02), se combinó 1 µl de ADN tratado con bisulfito con 24 µl de mezcla maestra de PCR y se sometió a PCR usando el sistema de PCR GeneAmp® System 9700 (Applied Biosystems Inc., EE. UU.).

20 24 µl de mezcla maestra de PCR comprendían:

- 1 µl de cebador directo 227 de la SEQ ID NO: 06 (10 pmol/µl),
- 1 µl de cebador inverso 229 de la SEQ ID NO: 08 (10 pmol/µl),
- 22 µl de Platinum® PCR SuperMix HighFidelity (Invitrogen Corp., EE. UU.).

25 El cebador directo 227 es complementario al extremo 5' del fragmento promotor/potenciador temprano inmediato de CMV de seres humanos. El cebador inverso 229 se une a una cadena abajo dentro de la 5'-UTR de los genes de inmunoglobulina.

30 Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

| | | temp. | duración |
|-------------------|-------------------|-------|------------|
| Etapa 1 | Desnaturalización | 95 °C | 10 min. |
| Etapa 2: PCR | Desnaturalización | 94 °C | 30 s. |
| n.º de ciclos: 45 | Hibridación | 50 °C | 2 min. |
| | Extensión | 68 °C | 2 min. |
| Etapa 3 | Extensión final | 72 °C | 10 min. |
| Etapa 4 | Impregnación | 4 °C | Indefinido |

35 El producto de PCR se comprobó para el tamaño y pureza por electroforesis en gel de agarosa y se clonó en el vector pCR4 (Invitrogen Corp., EE. UU.) usando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen Corp., EE.UU.). Los clones plasmídicos se aislaron y analizaron por digestión de restricción y electroforesis en gel de agarosa. Para cada línea celular, se secuenciaron de 19 a 22 plásmidos que contenían el inserto. Para estimar la eficacia de desaminación del tratamiento con bisulfito en sitios no CpG, se determinó la cantidad de citosina residual en sitios no CpG. La eficacia de desaminación porcentual se calcula del siguiente modo:

$$E_{\text{mod}} = 100 - (C_{\text{res}}/C_{\text{total}} * 100) \text{ (Fórmula 4)}$$

40 con

E_{mod} [%]: eficacia de desaminación,

45 C_{res} : cantidad de citosina residual en sitios no CpG en todos los insertos analizados, los sitios de los cebadores de PCR excluidos,

C_{total} : cantidad de citosina en el fragmento promotor/potenciador de CMV no tratado con bisulfito, los sitios del cebador de PCR excluido, multiplicado por la cantidad de insertos analizados, es decir, $107 * 20$.

50 Se descubrió que la eficacia de desaminación en citosina no CpG era mayor del 99 % en todas las muestras (Tabla 3).

Tabla 3: Eficacia de desaminación en citosina no CpG

| | Línea celular K18.1 | Línea celular G25-10 | Línea celular G25-17 | Línea celular G42-5 | Línea celular 43-16 A10 |
|------|---------------------|----------------------|----------------------|---------------------|-------------------------|
| Emod | 99,1 % | 99,3 % | 99,5 % | 99,3 % | 99,3 % |

55 La protección de la 5-metil-citosina de la desaminación se confirmó por tratamiento con bisulfito y posterior clonación y secuenciación del ADN plasmídico aislado de dcm^+ *E. coli*. Dcm^+ *E. coli* metila los restos internos de citosina dentro de las secuencias CCAGG o CCTGG (sitios dcm). Se descubrió que la eficacia de desaminación era del 99 %

en sitios no dcm y menor del 5 % en citosinas internas dentro de sitios dcm.

Para cuantificar el grado de metilación del ADN en sitios CpG dentro del fragmento promotor/potenciador de CMV tratado con bisulfito, se determinó la cantidad de citosina encontrada en cada sitio CpG y se representó para cada célula analizada.

La línea celular K18.1 está altamente metilada (Figura 3A). La frecuencia de metilación se acumula en tres grupos, uno en el extremo 5', uno en extremo 3' y uno en aproximadamente la posición 400. El mayor grado de metilación se encontró en la posición 425. Catorce de los veintidós insertos secuenciados tenía citosina ahí.

La metilación del promotor de CMV de la línea celular 43-16 A10 era notable (Figura 3E). La distribución de la metilación era similar a la distribución observada con la línea celular K18.1. La posición 425 se metilaba de forma muy frecuente. Cinco de los veinte insertos secuenciados contenían una citosina en esta posición.

En las otras tres líneas celulares investigadas la citosina se detectaba solamente de forma esporádica en sitios CpG (Figuras 3B, 3C y 3D).

Ejemplo 5

PCR cuantitativa específica de metilación de ADN promotor/potenciador temprano inmediato de CMV de seres humanos tratado con bisulfito

En este ejemplo, se presenta una qPCR a tiempo real específica de metilación como método para detectar la metilación en una posición CpG, para ser más precisos en la posición 425 del ácido nucleico promotor de hCMV.

Se diseñaron dos conjuntos de cebadores:

- un par de cebadores específico de metilación (par de cebadores MSP) que amplifica selectivamente el ADN promotor de CMV desaminado con una citosina en la posición 425 que representa el ADN que está metilado en la posición 425, y
- un par de cebadores universal que amplifica el ADN promotor de CMV desaminado independientemente del estado de metilación.

El par de cebadores universal se usó para la normalización. Para usarse en la misma ejecución de PCR, ambos pares de cebadores deben tener puntos de fusión similares.

El diseño de cebadores que detectan metilación en la posición 425 se complicó por la presencia de dos sitios CpG adicionales en cercana proximidad (posición 416 y posición 437). Los cebadores sensibles a metilación deben detectar 5mC425 independientemente del estado de metilación en la posición 416 y en la posición 437.

Se han usado cuatro fragmentos promotores/potenciadores tempranos inmediatos de CMV de seres humanos desaminados aislados en el Ejemplo 4 que representan las posibles variaciones de secuencia en las posiciones 425 y 437: n.º 11, n.º 62, n.º 01 y n.º 04 (Tabla 4, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22) como moldes de qPCR para PCR específica de metilación y pares de cebadores universales.

Tabla 4: Resultados esperados para los pares de cebadores MSP y universales en qPCR

| Moldes | n.º 11 | n.º 62 | n.º 01 | n.º 04 |
|----------------------------|---------------|--------|--------|--------|
| Pos. 425 | T | C | C | T |
| Pos. 437 | T | C | T | C |
| | Amplificación | | | |
| Par de cebadores MSP | - | + | + | - |
| Par de cebadores universal | + | + | + | + |

Con el cebador universal, los cuatro moldes pueden amplificarse de forma comparable mientras que el par de cebadores específico de metilación puede amplificar selectivamente el molde n.º 62 y el molde n.º 01. ΔC_p debe ser lo más pequeño posible entre el par de cebadores específicos de metilación y el par de cebadores universal sobre el molde n.º 62 y el molde n.º 01. Los valores C_p obtenidos con el par de cebadores específico de metilación sobre el molde n.º 11 y el molde n.º 04 deben ser lo más alto posible, es decir, ΔC_p en comparación con la amplificación con el par de cebadores universal debe ser máxima.

Para qPCR, se empleó el sistema LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y las muestras se prepararon usando el LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Se combinaron cinco microlitros de solución de molde que contenía 0,05 ng de ADN con 15 μ l de mezcla

maestra de PCR en un pocillo de una placa de 96 pocillos.

15 µl de la mezcla maestra de PCR comprendían:

- 5 - 4,2 µl de agua,
- 0,4 µl de cebador directo 239, 263 o 264 (también es posible el cebador 227, 228, 240, 238) (10 pmol/µl),
- 0,4 µl de cebador inverso 237, 254, 262, 265, 266, 267 o 268 (también es posible el cebador 229) (10 pmol/µl),
- 10 µl de SYBR Green I Master.

10 La placa de múltiples pocillos se selló con una hoja de sellado LightCycler® 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y se centrifugó a 1500 x g durante 2 minutos. Después de ello, la placa se montó en el sistema LightCycler® 480 y se sometió a qPCR. Cada muestra se ensayó por duplicado, triplicado o cuadruplicado. Para permitir la determinación de números absolutos de copias, se generaron curvas patrón para el transgén LC y HC, usando el plásmido de expresión linealizado como patrón. Las diluciones de patrón contenían 2,5 x 10⁷, 2,5 x 10⁶, 2,5 x 10⁵, 2,5 x 10⁴ o 2,5 x 10³ copias de plásmido. El ADN genómico se ensayó por triplicado; los patrones se ejecutaron por cuadruplicado.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

| | etapa | n.º de ciclos | T [°C] | t [min:s] | Tasa de aumento [°C s ⁻¹] | adquisición |
|-------------------|-------------------|---------------|---------|-----------|---------------------------------------|-------------|
| | desnaturalización | 1 | 95 | 10:00 | 4,40 | - |
| PCR a tiempo real | desnaturalización | 45 | 95 | 00:10 | 4,40 | - |
| | hibridación | | 57 a 59 | 00:15 | 2,20 | - |
| | elongación | | 72 | 00:07 | 4,40 | - |
| | detección | | 66 | 00:01 | 2,20 | individual |
| curva de fusión | desnaturalización | 1 | 95 | 00:05 | 4,40 | - |
| | hibridación | | 60 | 01:00 | 2,20 | - |
| | fusión | | 90 | 00:00 | 0,11 | continuo |
| refrigeración | | 1 | 40 | 00:30 | 2,2 | |

20 La recogida y el análisis de los datos se hizo con el software LightCycler® 480 versión 1.5. El grado aparente de metilación se calculó usando la siguiente fórmula, donde se asumió la eficacia ideal de amplificación (E = 2).

$$mC_{app} = 2^{Cp(t)-Cp(m)} \times 100 \quad (\text{Fórmula 5})$$

25 con

- mC_{app} [%]: grado aparente de metilación,
- Cp(t): valor Cp obtenido con cebadores universales,
- Cp(m): valor Cp obtenido con cebadores específicos de metilación.

30 Durante la evaluación de cebadores, se descubrió que el diseño del cebador específico de metilación, que es muy selectivo para ADN promotor de CMV desaminado con una citosina en la posición 425 ("metilada"), tiene que realizarse con cuidado. El cebador 266 y 267 mostró la diferencia máxima entre Cp(n.º 11) y Cp(n.º 62), es decir, la selectividad más alta para ADN "metilado". El cebador 265, 268 y 254 mostraron selectividad minoritaria. El par de cebadores universal 263/237 se ensayó como control para ΔCp mínimo (Figura 6 y Tabla 5).

Tabla 5: Resultados de la evaluación de cebadores.

| Cebador | Molde | Cp medio | Cp patrón | ΔCp [Cp(n.º 11)-Cp(n.º 62)] | Des.típ. ΔCp [Cp(n.º 11)-Cp(n.º 62)] |
|---------|--------|----------|-----------|-----------------------------|--------------------------------------|
| 263+237 | n.º 11 | 11,71 | 0,06 | 0,23 | 0,06 |
| | n.º 62 | 11,48 | 0,01 | | |
| 263+254 | n.º 11 | 15,22 | 0,08 | 3,89 | 0,19 |
| | n.º 62 | 11,32 | 0,17 | | |
| 263+265 | n.º 11 | 20,29 | 0,23 | 8,74 | 0,23 |
| | n.º 62 | 11,55 | 0,02 | | |
| 263+266 | n.º 11 | 23,76 | 0,04 | 12,31 | 0,16 |
| | n.º 62 | 11,45 | 0,16 | | |
| 263+267 | n.º 11 | 24,74 | 0,14 | 13,05 | 0,16 |
| | n.º 62 | 11,69 | 0,07 | | |
| 263+268 | n.º 11 | 21,75 | 0,06 | 10,25 | 0,10 |

ES 2 605 702 T3

| Cebador | Molde n.º 62 | Cp medio 11,51 | Cp patrón 0,09 | ΔCp [Cp(n.º 11)-Cp(n.º 62)] | Des.típ. ΔCp [Cp(n.º 11)-Cp(n.º 62)] |
|---------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------------------------|--|
| | | | | | |

5 En la Figura 5 se muestran los resultados obtenidos con el par de cebadores específicos de metilación 239/267 (SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 18) en combinación con el par de cebadores universal 239/237 (SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 09). El par de cebadores universal 239/237 amplificó los cuatro moldes aproximadamente igual de bien, mientras que el par de cebadores específico de metilación 239/267 amplificó los moldes n.º 62 y n.º 01. Los moldes n.º 11 y n.º 4 se amplifican solamente mal por el par de cebadores 239/267.

10 La frecuencia de metilación calculada a partir de los valores Cp fue casi del 100 % para el molde n.º 62 y el molde n.º 01 y casi del 0 % para el molde n.º 11 y el molde n.º 04 (Tabla 6A). Esto muestra que el par de cebadores específico de metilación 239/267 en combinación con el par de cebadores universal 239/237 puede usarse para discriminar ADN promotor de CMV que se metila en la posición 425 del ADN promotor de CMV que no se metila en la posición 425 por qPCR a tiempo real.

15 Se encuentran pares de cebadores universales y específicos de metilación adicionales y se caracterizan en la Tabla 6A y 6B.

Tabla 6A: Cebador inverso específico de metilación 267 y cebador inverso no específico de metilación 237 combinados con tres cebadores directos diferentes.

| molde | sitio de metilación | | pares de cebadores universales | | | | | |
|--------|---------------------|-----|--|----------|-----------------------|----------|-----------------------|----------|
| | | | 239 (dir) + 237 (inv) | | 263 (dir) + 237 (inv) | | 264 (dir) + 237 (inv) | |
| | 425 | 437 | Cp(u) | Des.típ. | Cp(u) | Des.típ. | Cp(u) | Des.típ. |
| n.º 11 | T | T | 16,41 | 0,23 | 15,65 | 0,01 | 15,73 | 0,1 |
| n.º 62 | C | C | 16,73 | 0,04 | 16 | 0,08 | 16,38 | 0,25 |
| n.º 01 | C | T | 17,51 | 0,24 | 16,64 | 0,08 | 16,87 | 0,21 |
| n.º 04 | T | C | 17,58 | 0,24 | 16,18 | 0,16 | 16,54 | 0,22 |
| molde | sitio de metilación | | pares de cebadores específicos de C425 | | | | | |
| | | | 239 (dir) + 267 (inv) | | 263 (dir) + 267 (inv) | | 264 (dir) + 267 (inv) | |
| | 425 | 437 | Cp(m) | Des.típ. | Cp(m) | Des.típ. | Cp(m) | Des.típ. |
| n.º 11 | T | T | 30,71 | 0,23 | 26,84 | 0,28 | 28,01 | 0,14 |
| n.º 62 | C | C | 16,74 | 0,13 | 16 | 0,38 | 16,82 | 0,29 |
| n.º 01 | C | T | 17,52 | 0,18 | 16,91 | 0,36 | 17,06 | 0,17 |
| n.º 04 | T | C | 25,34 | 0,24 | 23 | 0,14 | 23,68 | 0,27 |
| molde | sitio de metilación | | $\Delta Cp = Cp(m) - Cp(u)$ | | | | | |
| | | | ΔCp | Des.típ. | ΔCp | Des.típ. | ΔCp | Des.típ. |
| n.º 11 | T | T | 14,3 | 0,33 | 11,19 | 0,28 | 12,28 | 0,17 |
| n.º 62 | C | C | 0,01 | 0,14 | 0 | 0,39 | 0,44 | 0,38 |
| n.º 01 | C | T | 0,01 | 0,30 | 0,27 | 0,37 | 0,19 | 0,27 |
| n.º 04 | T | C | 7,76 | 0,34 | 6,82 | 0,21 | 7,14 | 0,35 |
| molde | sitio de metilación | | mCapp [%] | | | | | |
| | | | mCapp | Des.típ. | mCapp | Des.típ. | % rel. | Des.típ. |
| n.º 11 | T | T | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| n.º 62 | C | C | 99,3 | 9,4 | 100,0 | 26,9 | 73,7 | 19,6 |
| n.º 01 | C | T | 99,3 | 20,7 | 82,9 | 21,2 | 87,7 | 16,4 |
| n.º 04 | T | C | 0,5 | 0,1 | 0,9 | 0,1 | 0,7 | 0,2 |

20 Tabla 6B: Cebador inverso específico de metilación 266 y cebador inverso no específico de metilación 237 combinados con dos cebadores directos diferentes.

| molde | sitio de metilación | | pares de cebadores universales | | | |
|--------|---------------------|-----|--|----------|-----------------------|----------|
| | | | 263 (dir) + 237 (inv) | | 264 (dir) + 237 (inv) | |
| | 425 | 437 | Cp(u) | Des.típ. | Cp(u) | Des.típ. |
| n.º 11 | T | T | 15,32 | 0,18 | 15,88 | 0,08 |
| n.º 62 | C | C | 15,73 | 1,07 | 16,22 | 0,57 |
| n.º 01 | C | T | 15,42 | 0,19 | 16,35 | 0,22 |
| n.º 04 | T | C | 15,4 | 0,24 | 16,8 | 1,12 |
| molde | sitio de metilación | | pares de cebadores específicos de C425 | | | |
| | | | 263 (dir) + 267 (inv) | | 264 (dir) + 267 (inv) | |
| | 425 | 437 | Cp(m) | Des.típ. | Cp(m) | Des.típ. |
| n.º 11 | T | T | 28,33 | 0,62 | 28,27 | 0,44 |
| n.º 62 | C | C | 15,64 | 0,25 | 16,32 | 0,35 |
| n.º 01 | C | T | 15,83 | 0,34 | 16,59 | 0,01 |
| n.º 04 | T | C | 22,39 | 0,15 | 22,83 | 0,88 |

| molde | sitio de metilación | | pares de cebadores universales | | | |
|--------|---------------------|---|--------------------------------|----------|-----------------------|----------|
| | | | 263 (dir) + 237 (inv) | | 264 (dir) + 237 (inv) | |
| molde | sitio de metilación | | $\Delta C_p = C_p(m) - C_p(u)$ | | | |
| | | | ΔC_p | Des.típ. | ΔC_p | Des.típ. |
| n.º 11 | T | T | 13,01 | 0,65 | 12,39 | 0,45 |
| n.º 62 | C | C | -0,09 | 1,10 | 0,1 | 0,67 |
| n.º 01 | C | T | 0,41 | 0,39 | 0,24 | 0,22 |
| n.º 04 | T | C | 6,99 | 0,28 | 6,03 | 1,42 |
| molde | sitio de metilación | | mCapp [%] | | | |
| | | | mCapp | Des.típ. | % rel. | Des.típ. |
| n.º 11 | T | T | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| n.º 62 | C | C | 106,4 | 81,1 | 93,3 | 43,3 |
| n.º 01 | C | T | 75,3 | 20,3 | 84,7 | 12,9 |
| n.º 04 | T | C | 0,8 | 0,2 | 1,5 | 1,5 |

Para la cuantificación del grado de metilación sobre un amplio intervalo, se mezcló el molde n.º 62 en diferentes relaciones con el molde n.º 11. Se realizó qPCR como se ha descrito anteriormente usando los pares de cebadores 239/237 y 239/167 se calculó la recuperación del molde n.º 62 en el fondo del molde n.º 11.

Para el cálculo de la fracción de ADN del molde n.º 62, se determinaron las eficacias de amplificación de los pares de cebadores en las mismas condiciones usadas. Diluciones en serie de los moldes n.º 62 y n.º 11 de n=0,005 ng a 0,5 ng de ADN se sometieron a qPCR y los valores Cp determinados se representaron frente al log (n). Se calculó una curva de regresión lineal usando XL fit (Microsoft). La eficacia de amplificación se calculó usando la siguiente fórmula:

$$E = 10^{-1/m} \text{ (Fórmula 6)}$$

con

E: eficacia de amplificación,
m: pendiente de la curva de tendencia lineal.

Las eficacias de amplificación de ambos pares de cebadores se calcularon en aproximadamente 1,7. La siguiente fórmula se empleó para calcular la fracción de ADN del molde n.º 62:

$$mC = 1,7^{C_p(t) - C_p(m)} * 100 \text{ (Fórmula 7)}$$

con

mC[%]: fracción de ADN metilado en la posición 425,
Cp(t): valor Cp obtenido con el par de cebadores universal,
Cp(m): valor Cp obtenido con el par de cebadores específico de metilación.

Las fracciones determinadas del ADN del molde n.º 62 de dos experimentos independientes se representaron frente a los valores esperados (Figura 7). Puede realizarse la cuantificación de la metilación entre el 1 % y el 100 %.

Ejemplo 6

Correlación de la metilación del promotor/potenciador temprano inmediato de CMV de seres humanos con productividad a largo plazo

a) qPCR específica de metilación con la hebra A del promotor/potenciador temprano inmediato de CMV de seres humanos pre-amplificada

Como se presenta en el Ejemplo 4, se aisló ADN genómico de líneas celulares CHO K18.1, G25-10, G25-17, G42-5 y 43-16 A10, se escindió con la enzima *DraI* y se desaminó por tratamiento con bisulfito. La hebra A del promotor/potenciador temprano inmediato de CMV de seres humanos se amplificó usando el cebador 227 y 229.

En producto de PCR se diluyó 1:50.000. Se usaron cinco microlitros de cada dilución para qPCR a tiempo real. Se emplearon los cebadores 239 y 237 para la cuantificación del ADN promotor de CMV total; se emplearon los cebadores 239 y 237 para la cuantificación del ADN promotor/potenciador de CMV en la posición 425. Las muestras se ensayaron por triplicado. Los moldes n.º 11, n.º 62 y n.º 01 se usaron como controles.

La qPCR se configuró como se presenta en el Ejemplo 5 combinado 5 µl de molde con 15 µl de mezcla maestra de PCR. Las condiciones de PCR fueron las presentadas en el Ejemplo 5. La temperatura de hibridación del cebador

fue de 58 °C.

b) qPCR específica de metilación con ADN genómico tratado con bisulfito

5 Se extrajo el ADN genómico de líneas celulares CHO K18.1, G25-10, G25-17, G42-5 y 43-16 A10, se escindió con la enzima *Dral* y se desaminó por tratamiento con bisulfito. Se usaron dos microlitros de ADN desaminado diluido en 3 µl de agua como molde en qPCR a tiempo real aplicando el par de cebadores 239/237 para la amplificación de la hebra A del promotor/potenciador de CMV total y el par de cebadores 239/267 para la amplificación de la hebra A del promotor/potenciador de CMV metilada en la posición 425. Las muestras se ensayaron por triplicado. Los moldes n.º 11 y n.º 62 se usaron como controles.

La PCR se configuró y se realizó la qPCR como se presenta en el Ejemplo 5. La temperatura de hibridación del cebador fue de 58 °C.

15 Para a) y b), la fracción de ADN promotor metilado en la posición 425 se calculó del siguiente modo:

$$mC = 1,7^{Cp(t)-Cp(m)} * 100 \quad (\text{Fórmula 7})$$

con

20

mC [%]: fracción de ADN metilado en la posición 425,
Cp(t): valor Cp obtenido con el par de cebadores universal 239/237,
Cp(m): valor Cp obtenido con el par de cebadores específico de metilación 239/267.

25 Ambas configuraciones de ensayo proporcionaron resultados comparables. La desviación típica dentro de los triplicados fue mayor sin pre-amplificación de la hebra A del promotor de CMV (Figuras 8A y 8B). La metilación de la posición 425 del ácido nucleico promotor de CMV en las líneas celulares K18.1, G25-10, G25-17 y 43-16 A10 fue mayor que el fondo de desaminación incompleta, que se había descubierto que era de aproximadamente el 1 %. La metilación en la línea celular G42-5 estuvo por debajo del máximo a nivel de fondo. Para la línea celular K18.1, se determinó la metilación más alta (mayor del 60 %).

30

La configuración a) del ensayo se realizó con otros pares de cebadores universales y específicos de metilación. Para el cálculo de la fracción de ADN metilado en la posición 425, se asumió que la eficacia de amplificación para todos los pares de cebadores era 2:

35

$$mC = 2^{Cp(t)-Cp(m)} * 100 \quad (\text{Fórmula 5'})$$

con

40

mC[%]: fracción de ADN metilado en la posición 425,
Cp(t): valor Cp obtenido con el par de cebadores universal,
Cp(m): valor Cp obtenido con el par de cebadores específico de metilación.

45 La Tabla 7 muestra un resumen de las combinaciones de pares de cebadores que se han ensayado sobre moldes de ADN clonados o sobre ADN genómico con o sin pre-amplificación del ADN promotor de CMV.

Tabla 7: Combinaciones de pares de cebadores.

| Combinación | universal | específico de la posición 425 |
|-------------|-----------|-------------------------------|
| 1 | 239+237 | 239+266 |
| 2 | 263+237 | 263+266 |
| 3 | 264+237 | 264+266 |
| 4 | 239+237 | 239+267 |
| 5 | 263+237 | 263+267 |
| 6 | 264+237 | 266+267 |

Ejemplo 7

50

Metilación de promotor/potenciador temprano inmediato de CMV de seres humanos y predicción de la inestabilidad de producción de la línea celular CHO recombinante

55

Se transfectaron células CHO-K1 con un plásmido que codificaba un anticuerpo IgG4 humano y se seleccionaron clones estables usando el sistema DHFR/MTX. Los clones parentales de alta producción se subclonaron por dilución limitante. Se mantuvo MTX en el medio de cultivo durante el proceso completo de generación de la línea celular. Se seleccionaron 16 subclones de 10 clones parentales.

Las células seleccionadas se volvieron a cultivar con MTX 250 nM. Tan pronto como mostraron crecimiento estable, se ensayaron para la estabilidad de producción a largo plazo sobre 60 a 80 generaciones en presencia y en ausencia de MTX. Se calculó la alteración relativa de la SPR sobre 60 generaciones. Se determinó la metilación de C435 al inicio del estudio con células cultivadas con MTX y al final del estudio de células que se habían cultivado sin MTX.

La metilación de C425 al inicio del estudio se representó frente a la alteración relativa de la SPR en presencia (Figura 11A) y en ausencia de MTX (Figura 11B). La mayoría de los clones con menos del 5% de metilación en C425 pueden encontrarse en la fracción de clones estables (menos del 40 % de disminución de SPR con o sin MTX), mientras que la mayoría de clones con más del 5 % de metilación en C425 se agrupaba en la fracción de clones inestables. Esto fue independiente de si la metilación estaba correlacionada con la estabilidad en presencia o en ausencia de MTX (véase también la tabla 8). La mayoría de los clones estables, que perdieron menos del 20 % de productividad con MTX y menos del 30 % de productividad sin MTX, muestran menos del 5 % de metilación de C425.

Tabla 8: Correlación de la metilación con la estabilidad en presencia o en ausencia de MTX (A) y número de copias del plásmido (B).

| A - 16 clones | número de clones con metilación en C425 al inicio menor del 5 % | número de clones con metilación en C425 al inicio mayor del 5 % |
|--|---|---|
| SPR _{rel_final} ≥ 60% (cultivo en presencia de MTX) | 8 | 3 |
| SPR _{rel_final} < 60% (cultivo en presencia de MTX) | 1 | 4 |
| SPR _{rel_final} ≥ 60% (cultivo en ausencia de MTX) | 6 | 2 |
| SPR _{rel_final} < 60% (cultivo en ausencia de MTX) | 3 | 5 |
| B - 16 clones | número de copias del plásmido menor de 10 | número de copias del plásmido igual a o mayor de 10 |
| SPR _{rel_final} ≥ 60% (cultivo en presencia de MTX) | 7 | 4 |
| SPR _{rel_final} < 60% (cultivo en presencia de MTX) | 0 | 5 |
| SPR _{rel_final} ≥ 60% (cultivo en ausencia de MTX) | 6 | 2 |
| SPR _{rel_final} < 60% (cultivo en ausencia de MTX) | 1 | 7 |

Este hallazgo muestra que la determinación de la metilación de C425 puede usarse como marcador predictivo para determinar la estabilidad de la expresión del polipéptido en clones celulares generados y de ese modo permitir la selección de clones estables con productividad estable durante el desarrollo de la línea celular. Se ha descubierto que la metilación de C425 del 5 % o menos es un criterio adecuado para la selección de clones celulares estables.

Se ha descubierto adicionalmente que dos clones celulares de estabilidad intermedia, así como dos clones muy inestables que no estaban metilados al inicio del estudio aumentaban su metilación por encima del 5 % durante el ensayo de estabilidad sin MTX (véase también la Figura 12). Esto muestra que la fracción de clones celulares que se predecían de forma falsa como estables (clones celulares negativos falsos) pueden reducirse cultivándolos durante algún tiempo en ausencia de MTX antes del ensayo.

Para confirmar la metilación de C425 por un segundo método, se realizó secuenciación con bisulfito con el clon 44-28 altamente metilado (Figura 13). Se descubrió que el grado de metilación en C425 era del 80 %. Esto era coherente con el resultado de PCR específica de metilación, considerando la variación de ambos ensayos. Como con los clones K18.1 y 43-16 A10 (Figura 4), C425 era el más frecuentemente metilado entre todos los sitios CpG dentro del ADN promotor/potenciador temprano inmediato de CMV de seres humanos. Otros eventos de metilación se agrupaban en el extremo 5' y el extremo 3'. El grado promedio de metilación en todos los sitios era del 18 %.

Ejemplo 8

La metilación prematura coincide con altos números de copias del transgén

Se determinaron las copias integradas de los genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina al inicio y al final del ensayo de estabilidad usando un ensayo de qPCR combinado basado en el principio TaqMan. Se usaron dos conjuntos de cebadores que consistían en un cebador directo, un cebador inverso y una sonda de hidrólisis: siendo uno específico para el gen de la cadena kappa humana, siendo el otro específico para los genes de cadena pesada gamma humana. Para permitir la determinación de los números absolutos de copias, se usó el plásmido de

expresión linealizado, que se había usado para la transfección, como patrón. Se aseguraron iguales eficacias de amplificación de las muestras y el patrón.

Para qPCR, se empleó el sistema LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y las muestras se prepararon usando LightCycler® 480 Probes Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).

Se combinaron 5 ml de la solución de molde que contenía 50 ng de ADN genómico con 15 ml de mezcla maestra de PCR en el pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos. En el caso del patrón, la solución de molde contenía $2,5 \times 10^7$, $2,5 \times 10^6$, $2,5 \times 10^5$, $2,5 \times 10^4$ y $2,5 \times 10^3$ copias del ADN plasmídico linealizado correspondiente.

15 ml de mezcla maestra de PCR comprendía:

- 10 ml de LightCycler® 480 Probes Master
- 1 ml de cebador directo n.º 133 (10 pmol/ml)
- 1 ml de cebador inverso n.º 132 (10 pmol/ml)
- 0,5 ml de sonda n.º 166 (10 pmol/ml)
- 1 ml de cebador directo n.º 178 (10 pmol/ml)
- 1 ml de cebador inverso n.º 180 (10 pmol/ml)
- 0,5 ml de sonda n.º 185 (10 pmol/ml)

La placa se selló con una hoja de sellado LightCycler® 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y se centrifugó a 1.500 g durante 2 minutos. Después de ello, la placa se montó en el sistema LightCycler® 480 y se sometió a qPCR. Cada muestra se ensayó por triplicado, los patrones se ejecutaron por cuadruplicado.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

| | etapa | N.º de ciclos | T [°C] | t | tasa de aumento | adquisición |
|-------------------|-------------------|---------------|--------|---------|-----------------------|-------------|
| | | | | [min:s] | [°C s ⁻¹] | |
| desnaturalización | | 1 | 95 | 10:00 | 4,40 | - |
| PCR a tiempo real | desnaturalización | 45 | 95 | 00:10 | 4,40 | - |
| | hibridación | | 60 | 00:05 | 2,20 | - |
| | elongación | | 72 | 00:01 | 4,40 | individual |
| refrigeración | | 1 | 37 | 01:00 | 2,2 | |

La recogida y análisis de los datos se realizó usando el software LightCycler® 480 versión 1.5. Básicamente, los valores Cp medios de las diluciones patrón del plásmido se representaron frente a los números respectivos de copias del gel para generar una curva patrón de la cual se extrapoló la cantidad de transgenes en la muestra.

La cantidad de transgenes por célula se calculó asumiendo que el contenido promedio de ADN por célula es 10^6 pg:

$$N_c = N_s / 50000 * 6$$

- N_c : número de copias del transgén por célula
- N_s : número de copias del transgén en la muestra

Tabla 9 Secuencias cebadoras.

| N.º de cebador. | Secuencias cebadoras (5'→ 3') | SEQ ID NO: |
|-----------------|--|------------|
| 133 | TCACAGAGCAGGACAGCAAG | 26 |
| 132 | GACTTCGCAGGCGTAGACTT | 27 |
| 166 | (FAM)-AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC-(B HQ1) | 28 |
| 178 | CGAACCGGTGACGGTGT | 29 |
| 180 | GAGGGCACGGTCACCAC | 30 |
| 185 | (Cy5)-CACACCTTCCCGGCTGTCCTACAG-(BHQ3) | 31 |

La Figura 14 representa los números de copias del gen de cadena ligera de células metiladas y no metiladas antes y después del ensayo de estabilidad. Como es lógico, se encontraron número idénticos de copias del gen de la cadena pesada porque las células se habían transfectado con un vector de dos genes que portaba ambos genes (datos no mostrados). La metilación prematura, es decir, la metilación antes del ensayo de estabilidad, se encontró exclusivamente con células que portaban más de 10 copias del transgén, mientras que algunos clones con menos de 10 copias del transgén adquirieron la metilación durante el ensayo de estabilidad. Como consecuencia, la selección de clones con bajos números de copias del transgén antes del ensayo de estabilidad enriquece igualmente los clones con productividad estable (Tabla 10).

Tabla 10: Correlación de las copias del transgén con estabilidad en presencia o en ausencia de MTX.

| 16 clones | Copias del plásmido < 10 | Copias del plásmido ≥ 10 |
|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| qP _{rel.} final + MTX ≥ 60% | 7 | 4 |
| qP _{rel.} final + MTX < 60% | 0 | 5 |
| qP _{rel.} final - MTX ≥ 60% | 6 | 2 |
| qP _{rel.} final - MTX < 60% | 1 | 7 |

Se observó adicionalmente que la inestabilidad de producción no estaba generalmente asociada con una pérdida de copias del transgén. Los clones 1A5-05, 1A5-21, 1A5-24 y 2B1-02 perdieron copias del transgén, 2B-13 era estable y 14-13, así como 14-23 aumentaban en copias del gen (véase también la Figura 11B).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG
 <120> Método para la selección de una célula productora a largo plazo
 <130> 26598 WO
 <150> EP10003969.2
 <151> 14-04-2010
 <160> 31
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 603
 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus de ser humano
 <400> 1

 atgttgacat tgattattga ctagttatta atagtaatca attacggggt cattagttca 60
 tagcccatat atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc 120
 gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat 180
 agggactttc cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgcc acttggcagt 240
 acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc ccotattgac gtcaatgacg gtaaattggcc 300
 cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta 360
 cgtattagtc atcgctatta gcatggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggogtgg 420
 atagcggttt gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt 480
 gttttggcac caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac 540
 gcaaatgggc ggtaggcgtg tacgggtggga ggtctatata agcagagctc cgtttagtga 600
 acg 603

 <210> 2
 <211> 603
 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus de ser humano
 <400> 2

ES 2 605 702 T3

```

atgttgatat tgattattga ttagttatta atagtaatta attacgggggt tattagttta      60
tagtttatat atggagtttc gcgttatata atttacggta aatggttcgt ttggttgac      120
gtttaacgat ttcgtttat tgacgttaat aatgacgat gtttttatag taacgttaat      180
agggattttt tattgacggt aatgggtgga gtatttacgg taaattgttt atttggtagt      240
atattaagtg tattatatgt taagtacggt ttttattgac gttaatgacg gtaaatgggt      300
cgtttggtat tatgtttagt atatgatttt atgggatttt tttatttggg agtatattta      360
cgtattagtt atcgttatta gtatggtgat gcggttttgg tagtatatta atgggcgtgg      420
atagcggttt gatttacggg gatttttaag tttttatttt attgacgta atgggagttt      480

gttttggtat taaaattaac gggatttttt aaaatgtcgt aataatttcg ttttattgac      540
gtaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga ggtttatata agtagagttt cgttttagtga      600
acg                                                                           603

```

5 <210> 3
 <211> 603
 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus de ser humano
 <400> 3

```

atgttgatat tgattattga ttagttatta atagtaatta attatgggggt tattagttta      60
tagtttatat atggagtttt gtgttatata atttatggta aatggtttgt ttggttgatt      120
gtttaatgat ttttgtttat tgatgttaat aatgatgat gtttttatag taatgttaat      180
agggattttt tattgatggt aatgggtgga gtatttatgg taaattgttt atttggtagt      240
atattaagtg tattatatgt taagtatggt ttttattgat gttaatgatg gtaaatgggt      300
tgtttggtat tatgtttagt atatgatttt atgggatttt tttatttggg agtatattta      360
tgtattagtt attgttatta gtatggtgat gtgggttttgg tagtatatta atgggtgtgg      420
atagtggttt gatttatggg gatttttaag tttttatttt attgatgta atgggagttt      480
gttttggtat taaaattaat gggatttttt aaaatggtgt aataattttg ttttattgat      540
gtaaatgggt ggtaggtgtg tatggtggga ggtttatata agtagagttt tgtttagtga      600
atg                                                                           603

```

10
 15 <210> 4
 <211> 603
 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus de ser humano
 <400> 4

ES 2 605 702 T3

```

cgtttattaa acggagtttt gtttatatag attttttatac gtatacgttt atcgtttatt      60
tgcggttaatg gggcggagtt gttacgatat tttggaaagt ttcggtgatt ttggtgtaa      120
aataaatfff tattgacggtt aatggggtgg agatttgaa attttcgtga gttaaatcgt      180
tatttacggtt tattgatgta ttgttaaaat cgtattatta tgtaaatagc gatgattaat      240
acgtagatgt attgttaagt aggaaagttt tataaggta tgtattgggt ataatgtag      300
gcgggttatt taccgttatt gacgttaata gggggcgtat ttggtatatg atatattga      360
tgtattgta agtgggtagt ttatcgtaaa ttttttattt attgacgta atgaaagtt      420
tttattggcg ttattatggg aatatacgtt attattgacg ttaatggcg ggggtcgttg      480
ggcgggttagt tagggcgggt atttatcgta agttatgtaa cgcggaattt tataatggg      540
ttatgaatta atgatttcgt aattgattat tattaataat tagttaataa ttaatgtaa      600
tat                                                                              603

```

5 <210> 5
 <211> 603
 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus de ser humano
 <400> 5

```

tgtttattaa atggagtttt gtttatatag attttttatt gtatatgttt attgtttatt      60
tgtgttaatg gggcggagtt gttatgatat tttggaaagt tttggtgatt ttggtgtaa      120
aataaatfff tattgatggt aatggggtgg agatttgaa atttttgtga gttaaattgt      180
tatttatggt tattgatgta ttgttaaaat tgtattatta tgtaaatagt gatgattaat      240
atgtagatgt attgttaagt aggaaagttt tataaggta tgtattgggt ataatgtag      300
gtgggttatt tattgttatt gatgttaata gggggcgtat ttggtatatg atatattga      360
tgtattgta agtgggtagt ttattgtaaa ttttttattt attgatgta atgaaagtt      420
tttattggcg ttattatggg aatatacgtt attattgatg ttaatggcg ggggtcgttg      480
ggcgggttagt taggtgggtt atttattgta agttatgtaa tgtggaattt tataatggg      540
ttatgaatta atgattttgt aattgattat tattaataat tagttaataa ttaatgtaa      600
tat                                                                              603

```

10
 15 <210> 6
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador 227

20 <400> 6
 atgttgat tgattattga ttag 24

25 <210> 7
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 605 702 T3

| | | |
|----|---|----|
| | <223> Cebador 228 | |
| 5 | <400> 7 tatgggattt tttattgg tagt | 24 |
| | <210> 8 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 10 | <220> <223> Cebador 229 | |
| 15 | <400> 8 actcctctcc caaaactaaa tcta | 24 |
| | <210> 9 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 20 | | |
| | <220> <223> Cebador 237 | |
| 25 | <400> 9 ccaaaacaaa ctcccattaa c | 21 |
| | <210> 10 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 30 | | |
| | <220> <223> Cebador 238 | |
| 35 | <400> 10 gggggtatta gtttagt tata | 24 |
| 40 | <210> 11 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 45 | <220> <223> Cebador 239 | |
| 50 | <400> 11 tggattatg ttagtatat gatttat | 28 |
| | <210> 12 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 55 | <220> <223> Cebador 240 | |
| 60 | <400> 12 ggatttttt attgtagt atatt | 25 |
| | <210> 13 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 65 | | |

ES 2 605 702 T3

| | | |
|----|---------------------------------------|----|
| | <220> | |
| | <223> Cebador 254 | |
| 5 | <400> 13 aatccccgt aatcaaacc g | 21 |
| | <210> 14 | |
| | <211> 26 | |
| 10 | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador 263 | |
| 15 | <400> 14 gggattttt tattgtag tatatt | 26 |
| | <210> 15 | |
| | <211> 25 | |
| 20 | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador 264 | |
| 25 | <400> 15 tatgggattt tttattgg tagta | 25 |
| | <210> 16 | |
| 30 | <211> 19 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| | <220> | |
| 35 | <223> Cebador 265 | |
| | <400> 16 atccccgtaa atcaaaccg | 19 |
| 40 | <210> 17 | |
| | <211> 18 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| 45 | <220> | |
| | <223> Cebador 266 | |
| | <400> 17 tccccgtaaa tcaaaccg | 18 |
| 50 | <210> 18 | |
| | <211> 17 | |
| | <212> ADN | |
| 55 | <213> Secuencia Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador 267 | |
| 60 | <400> 18 ccccgtaaat caaaccg | 17 |
| | <210> 19 | |
| | <211> 17 | |
| 65 | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia Artificial | |

ES 2 605 702 T3

<220>
 <223> Cebador 268

5 <400> 19
 cccgtaaadc aaaccgc 17

10 <210> 20
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Cebador 262

20 <400> 20
 aaatcccrct aaatcaaacc g 21

25 <210> 21
 <211> 628
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Molde n.º 11

atggtgatat tgattattga ttagttatta atagtaatta attatgggggt tattagttta 60
 tagttcatat atggagtttt gtgttatata atttatggta aatgggtttgt ttggttgatt 120
 gtttaaatgat ttttgtttat tgatgttaat aatgatgat gtttttatag taatgttaat 180
 agggatTTTT tattgatggt aatgggtgga gtatttatgg taaattggtt atttggtagt 240
 atattaagtg tattatatgt taagtatggt ttttattgat gttaatgatg gtaaattggtt 300
 tgtttggtat tatgtttagt atatgatttt atgggatttt tttatttggg agtatattta 360
 tgtattagtt attgttatta gtatggtgat gtggttttgg tagtatatta atgggtgtgg 420
 atagtggttt gatattatggg gatttttaag tttttatttt attgatgta atgggagttt 480
 gttttggtat taaaattaat gggatttttt aaaatgttgt aataattttg ttttattgat 540
 gtaaattgggt ggtagggtgtg tatggtggga ggtttatata agtagagttt tgtttagtga 600
 atggttagatt tagttttggg agaggagt 628

30 <210> 22
 <211> 629
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Molde n.º 62

<400> 22

ES 2 605 702 T3

atggtgatat tgattattga ttagttatta atagtaatta attatgggggt tattagttta 60
 tagttyatat atggagttty gygttatata atttatgrta aatggtttgt ttggttgatt 120
 gtttaaatgat ttttgtttat tgatgttaaat aatgatgtat gtttttatag taatgttaat 180
 agggattttt tattgatggt aatgggtgga gtatttatgg taaaytgttt atttggtagt 240
 atattaagtg tattatatgt taagtatggt ttttattgat gttaatgatg gtaaatgggt 300

 tgtttggat tatgtttagt atatgatttt atgggatttt tttatttggg agtatattta 360
 ygtattagtt atygttatta gtatggtgat gtggttttgg tagtatatta atgggcgtgg 420
 atagcggttt gatttacggg gatttttaag tttttatttt attgatgtta atgggagttt 480
 gttttggat taaaattaat gggatttttt aaaatgttgt aataattttg ttttattgat 540
 gtaaatgggt ggtaggtgtg tacgggtgga ggtttatata agtagagttt cgttttagtga 600
 atcgttagat ttagttttgg gagaggagt 629

5 <210> 23
 <211> 629
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Molde n.º 01
 <400> 23

atggtgatat tgattattga ttagttatta atagtaatta attatgggggt tattagttta 60
 tagtttatat atggagtttt gtgttatata atttatggta aatggtttgt ttggttgatt 120
 gtttaaatgat ttttgtttat tgatgttaaat aatgatgtat gtttttatag taatgttaat 180
 agggattttt tattgatggt aatgggtgga gtatttatgg taaattgttt atttggcagt 240
 atattaagtg tattatatgt taagtatggt ttttattgat gttaatgatg gtaaatgggt 300
 cgtttggat tatgtttagt atatgatttt atgggatttt tttatttggg agtatattta 360
 tgtattagtt attgttatta gtatggtgat gtggttttgg tagtatatta atgggtgtgg 420
 atagcggttt gatttatggg gatttttaag tttttatttt attgatgtta atgggagttt 480
 gttttggat taaaattaat gggatttttt aaaatgttgt aataattttg ttttattgat 540
 gtaaatgggt ggtaggtgtg tacgggtgga ggtttatata agtagagttt tgttttagtga 600
 attgttagat ttagttttgg gagaggagt 629

15 <210> 24
 <211> 629
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Molde n.º 04
 <400> 24

ES 2 605 702 T3

atgttgatat tgattattga ttagttatta atagtaatta attatggggt tattagttta 60
 tagtttatat atggagtttt gtgttatata atttatggta aatggtttgt ttggttgatt 120
 gtttaaatgat ttttgtttat tgatgttaat aatgatgat gtttttatag taatgttaat 180
 agggattttt tattgatggt aatgggtgga gtatttatgg taaattggtt atttggtagt 240
 atattaagtg tattatatgt taagtatggt ttttattgat gttaatgatg gtaaattggtt 300
 tgtttggtat tatgtttagt atatgatttt atgggatttt tttatttggg agtatattta 360
 tgtattagtt attgttatta gtatggtgat gtggttttgg tagtatatta atgggtgtgg 420
 atagtggttt gatttacggg gatttttaag tttttatttt attgatgta atgggagttt 480
 gttttggtat taaaattaat gggatttttt aaaatggtgt aataattttg ttttattgat 540
 gtaaattggt ggtaggtgtg tacgggtgga ggtttatata agtagagttt tgtttagtga 600
 attgttagat ttagttttgg gagaggagt 629

5 <210> 25
 <211> 629
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Molde n.º 16
 <400> 25

atgttgatat tgattattga ttagttatta atagtaatta attatggggt tattagttta 60
 tagtttatat atggagtttt gtgttatata atttacggta aatggtttgt ttggttgatc 120
 gtttaacgat tttcgtttat tgatgttaat aatgacgat gtttttatag taatgttaat 180
 agggattttt tattgatggt aatgggtgga gtatttacgg taaattggtt atttggtagt 240
 atattaagtg tattatatgt taagtatggt ttttattgat gttaatgatg gtaaattggtt 300
 tgtttggtat tatgtttagt atatgatttt atgggacttt cttatttggg agtatattta 360
 cgtattagtt atcgttatta gtatggtgat gtggttttgg tagtatatta atgggcgtgg 420
 atagcggttt gatttacggg gatttttaag tttttatttt attgatgta atgggagttt 480
 gttttggtat taaaattaat gggatttttt aaaatggtgt aataattttg ttttattgat 540
 gtaaattggt ggtaggtgtg tatggtgga ggtttatata agtagagttt tgtttagtga 600
 attgttagat ttagttttgg gagaggagt 629

15 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador 133

<400> 26
 tcacagagca ggacagcaag 20

25 <210> 27
 <211> 20

ES 2 605 702 T3

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Cebador 132

<400> 27
gacttcgcag gcgtagact 20

10 <210> 28
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Cebador 166

20 <400> 28
agcacctaca gcctcagcag cacc 24

25 <210> 29
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Cebador 178

35 <400> 29
cgaaccggtg acggtgt 17

40 <210> 30
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Cebador 180

50 <400> 30
gagggcagcg tcaccac 17

55 <210> 31
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> Cebador 185

65 <400> 31
cacacctcc cggctgtcct acag 24

REIVINDICACIONES

1. Método para seleccionar un clon celular CHO, que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) determinar para cada uno de al menos un clon celular CHO, que comprende un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica un polipéptido unido operativamente a un ácido nucleico promotor que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 01, la frecuencia de metilación de un sitio CpG en la posición 425 de la SEQ ID NO: 01 basándose en la metilación determinada para al menos 10 copias del ácido nucleico o en al menos 10 células obtenidas de un cultivo de cada clon celular CHO,
- 10 b) seleccionar un clon celular CHO en que la frecuencia de metilación determinada está por debajo del 5 %,

mediante lo cual la determinación comprende las siguientes etapas:

- 15 1) aislar el ADN de cada uno de los clones celulares CHO,
2) realizar para cada ADN aislado individualmente una reacción en cadena de la polimerasa con el par de cebadores específico de metilación de la SEQ ID NO: 11 y 18 y el par de cebadores universal de la SEQ ID NO: 09 y 11,
3) determinar, con los resultados obtenidos en la etapa 2), la frecuencia de metilación del sitio CpG.

20 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la etapa 2) es

- 2) digerir individualmente el ADN aislado con una enzima de restricción y realizar una reacción en cadena de la polimerasa para cada ADN digerido con dicho par de cebadores específico de metilación y dicho par de cebadores universal.

25 3. Método para la producción de un polipéptido, que comprende las siguientes etapas:

- a) seleccionar un clon celular CHO con un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2,
b) cultivar el clon celular CHO seleccionado, y
30 c) recuperar el polipéptido del medio de cultivo y/o el clon celular CHO y producir de ese modo un polipéptido.

4. Método de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado por que antes de la etapa a) comprende las siguientes etapas:

- 35 a-3) proporcionar una célula CHO,
a-2) transfectar la célula CHO proporcionada con un ácido nucleico que contiene un gen estructural que codifica el polipéptido unido operativamente a un ácido nucleico promotor,
a-1) i) opcionalmente cultivar el clon celular CHO transfectado en presencia de un agente de selección, ii) depositar individualmente las células CHO transfectadas y iii) cultivar las células CHO transfectadas depositadas individualmente en presencia de un agente de selección.
- 40

Fig. 2

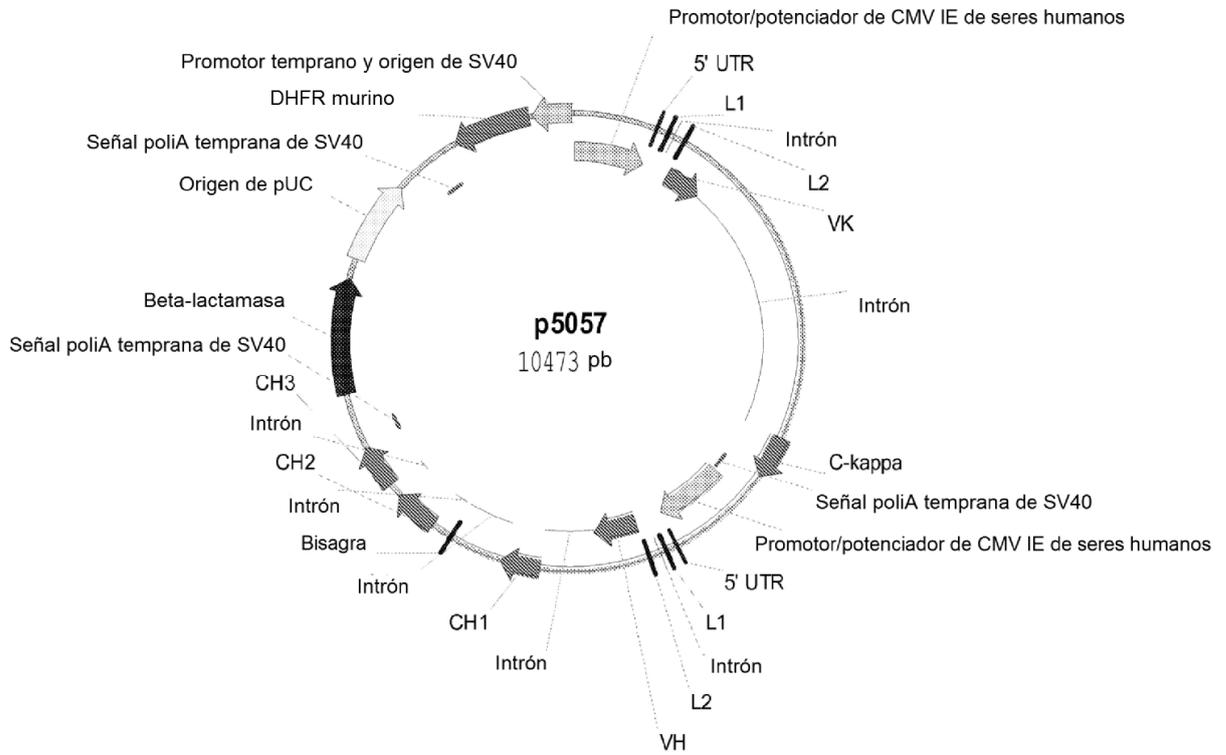


Fig. 3 A

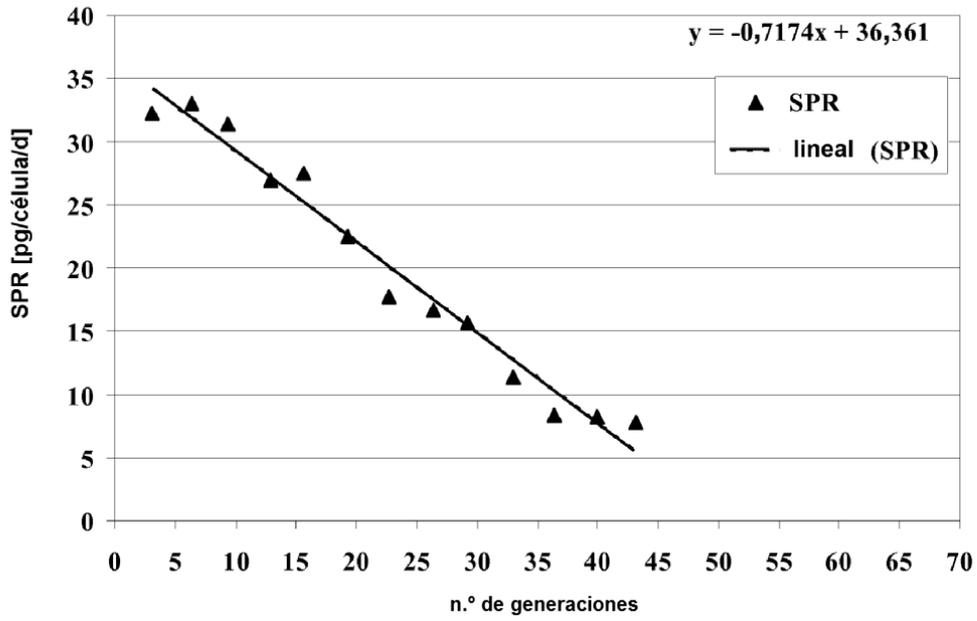


Fig. 3 B

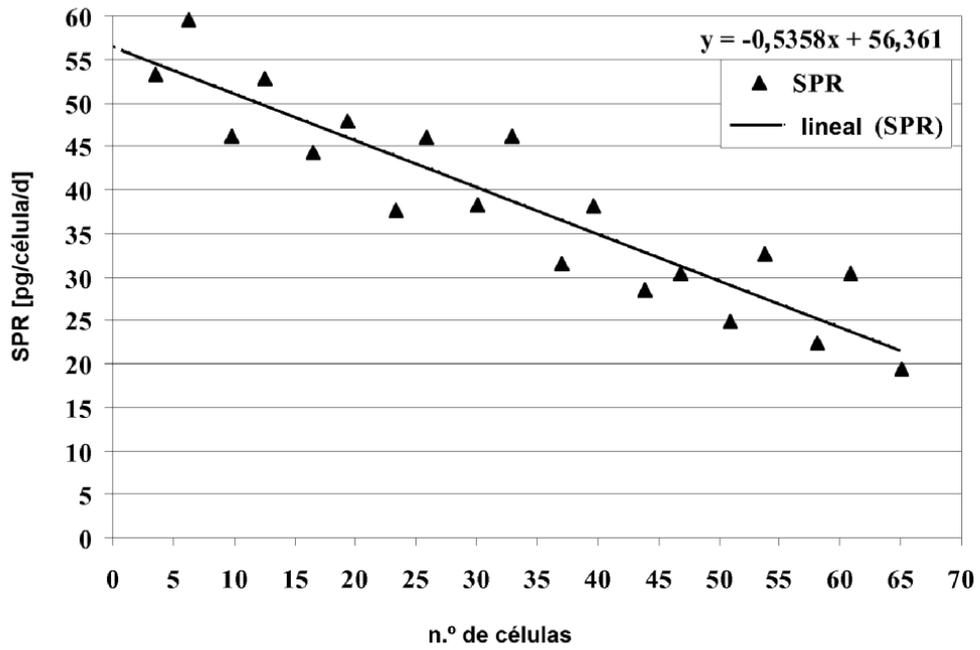


Fig. 3 C

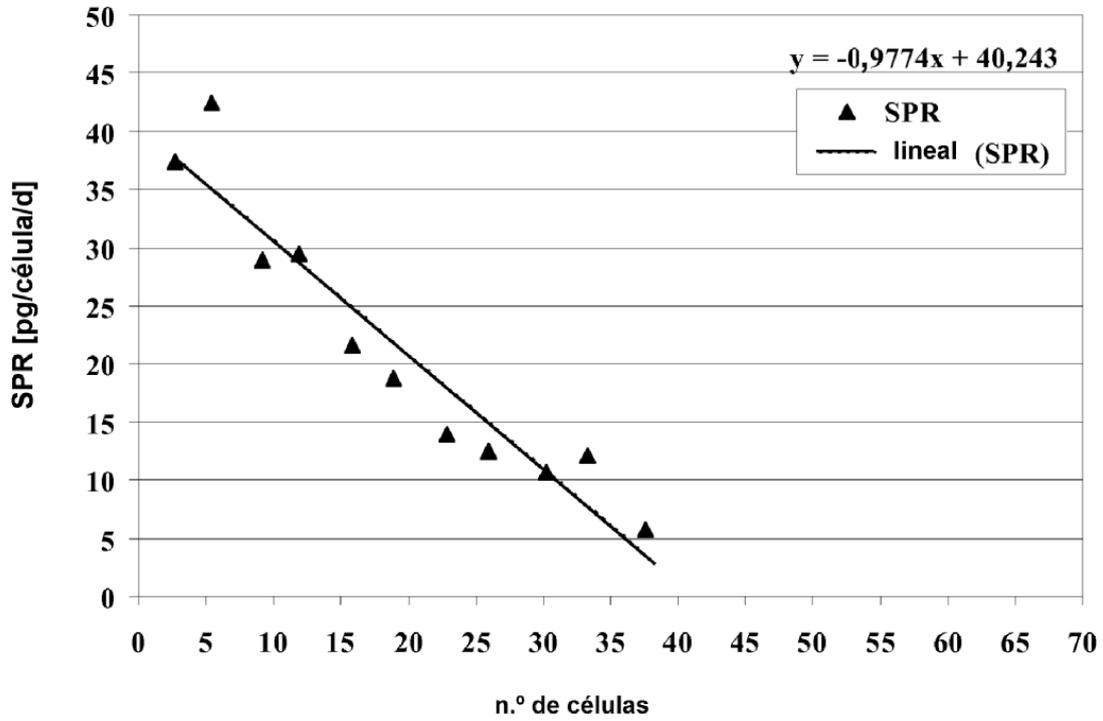


Fig. 3 D

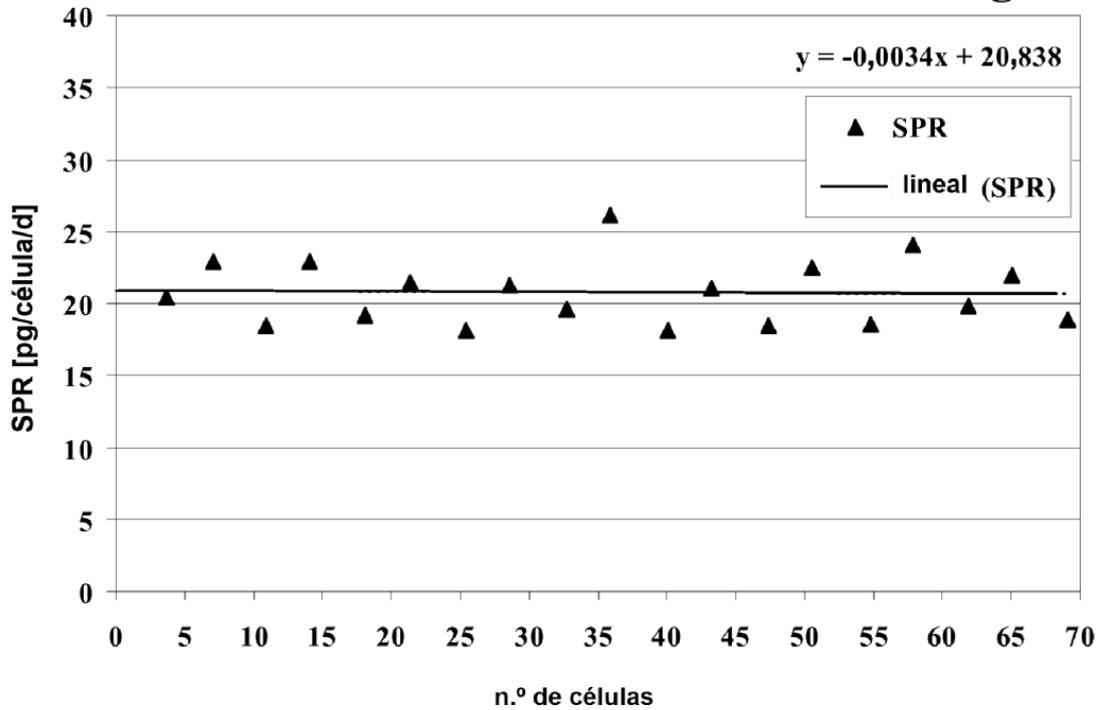


Fig. 3 E

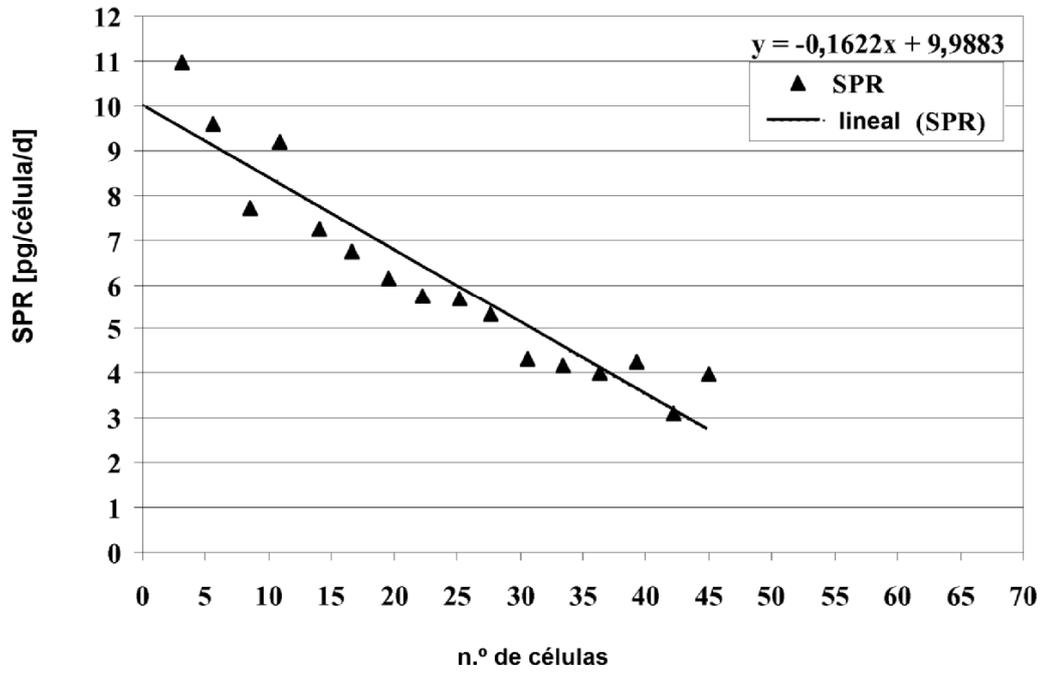


Fig. 4 A

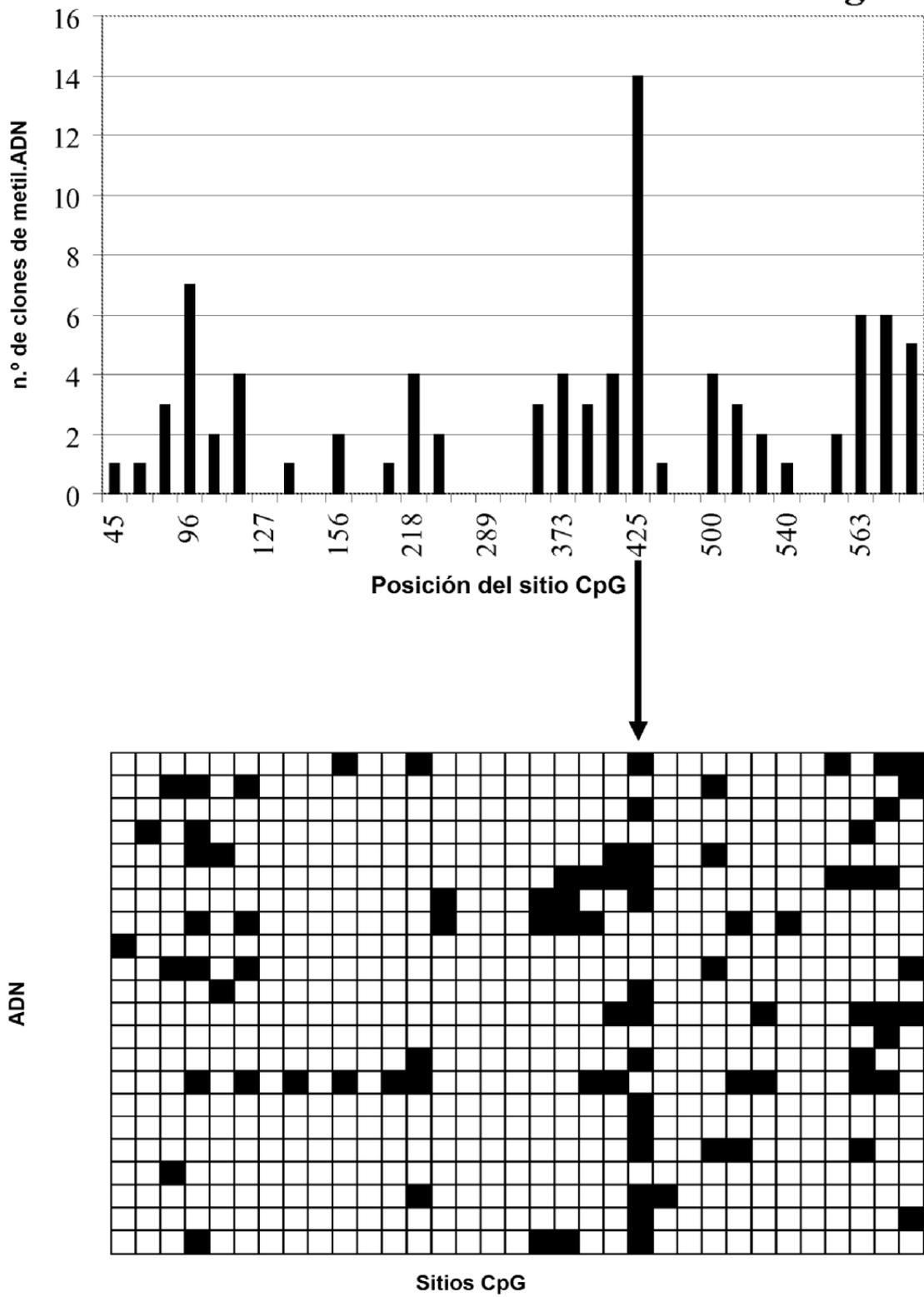


Fig. 4 B

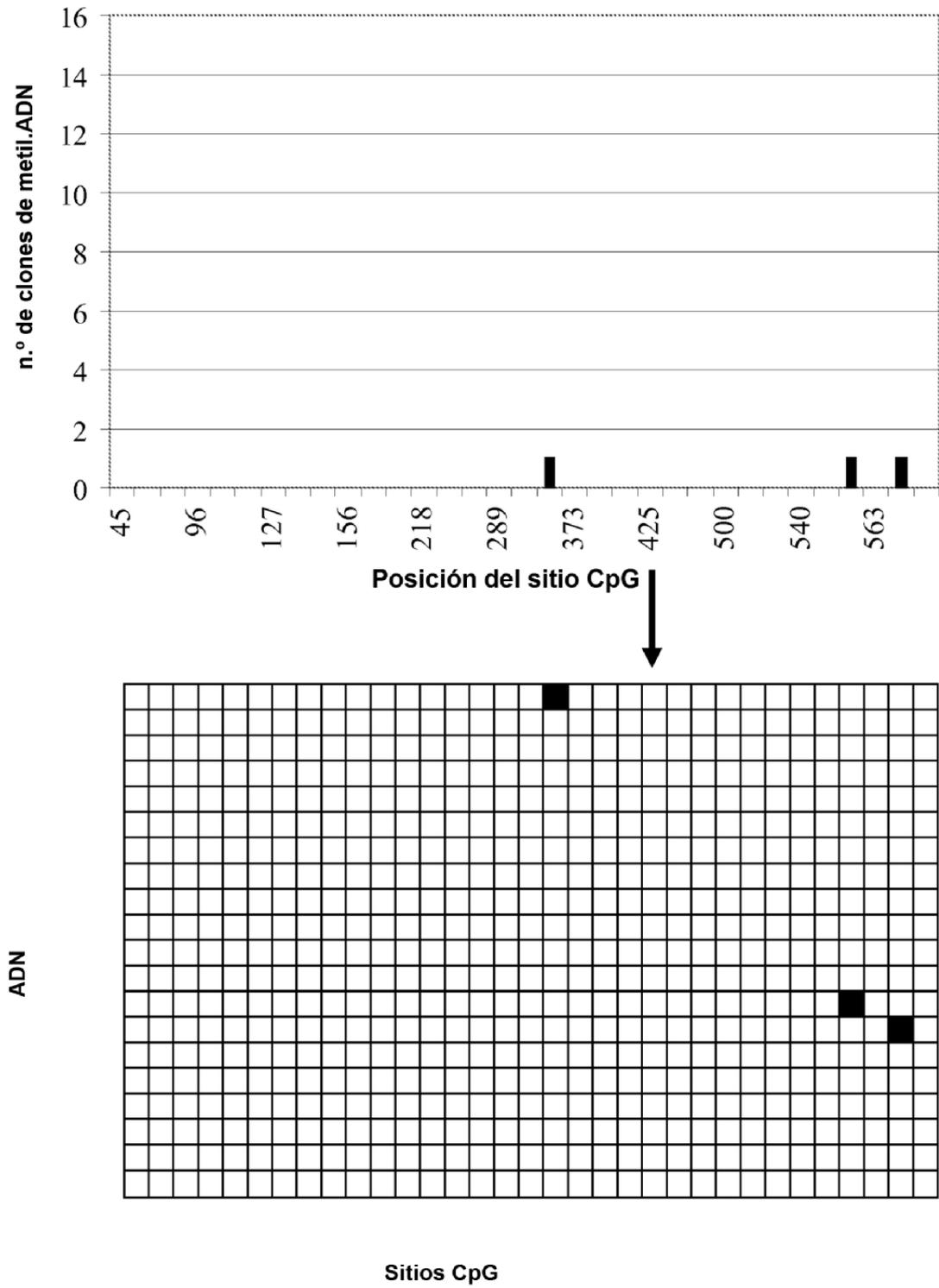


Fig. 4 C

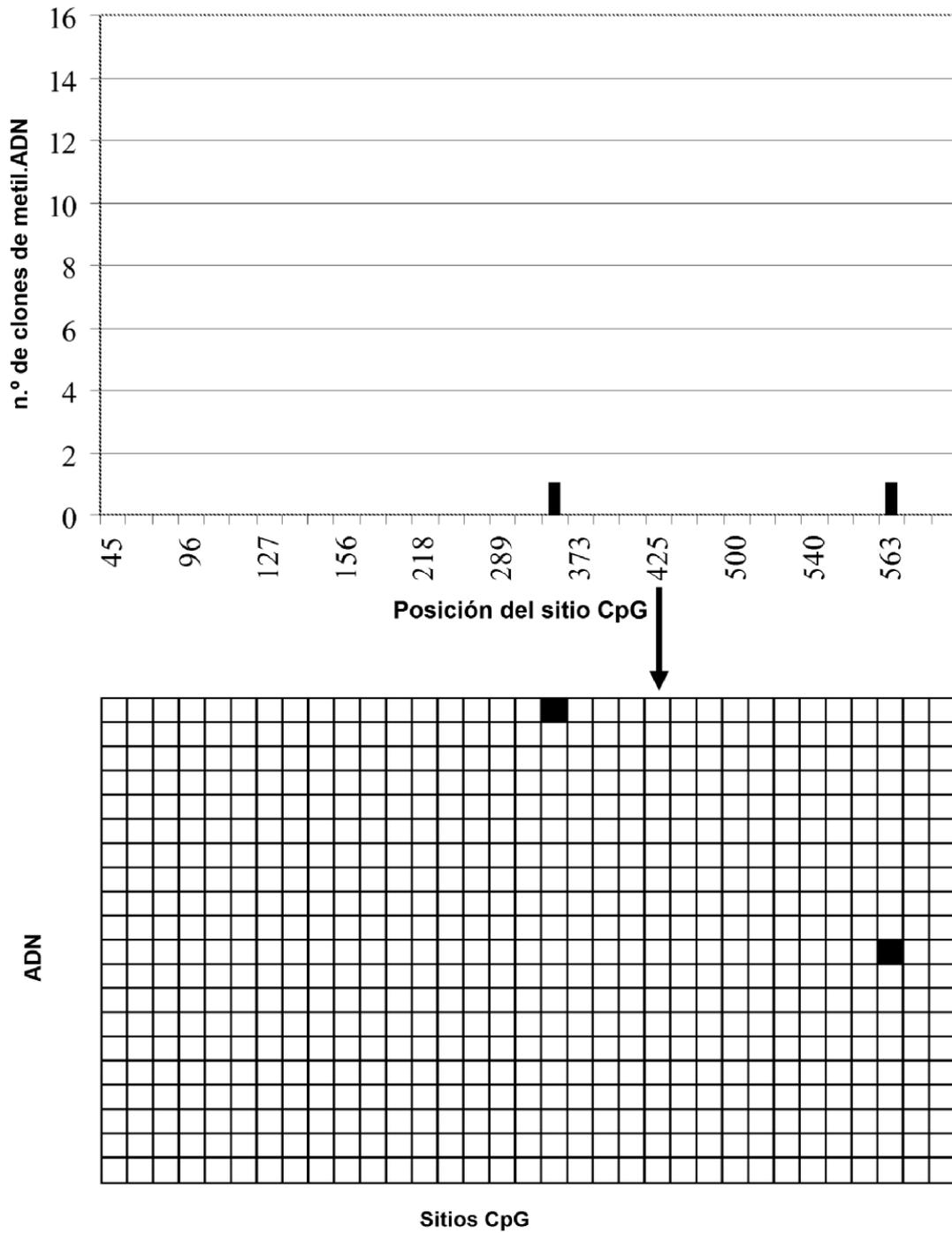


Fig. 4 D

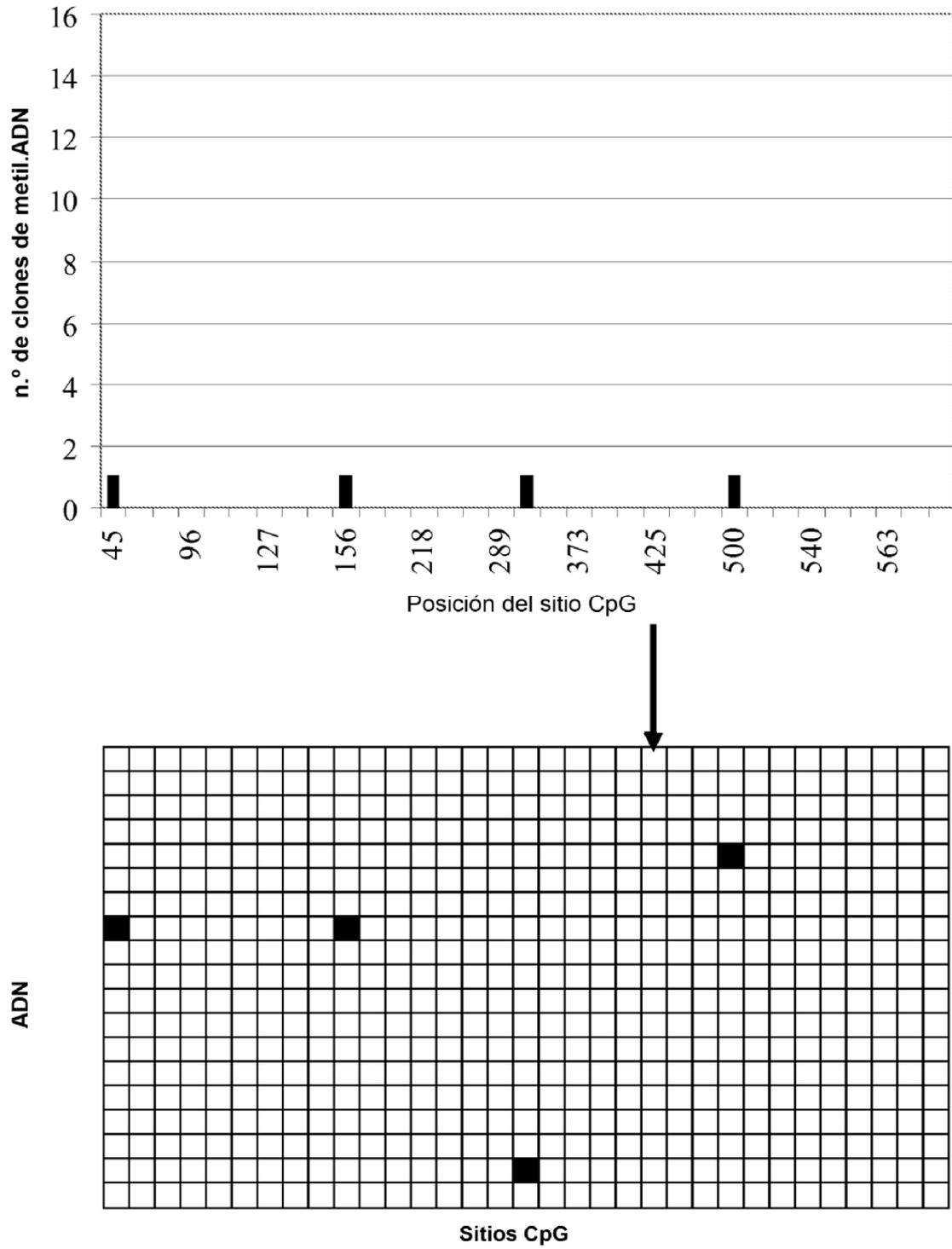


Fig. 4 E

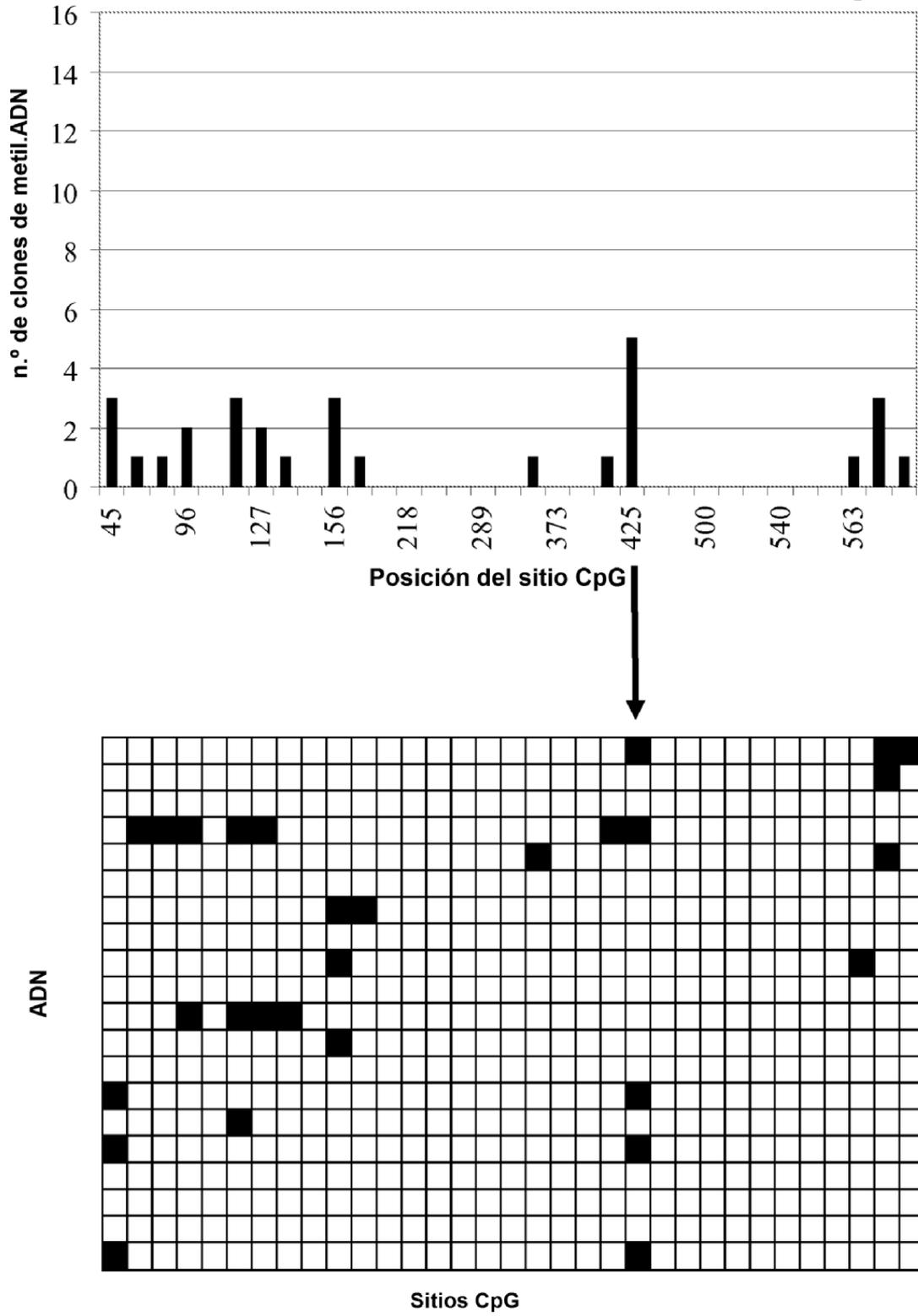


Fig. 5 A

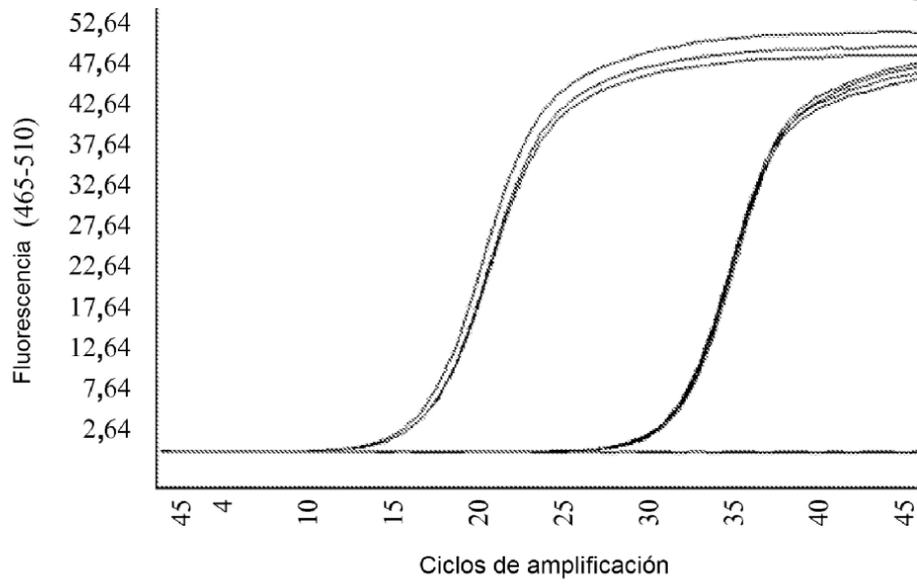


Fig. 5 B

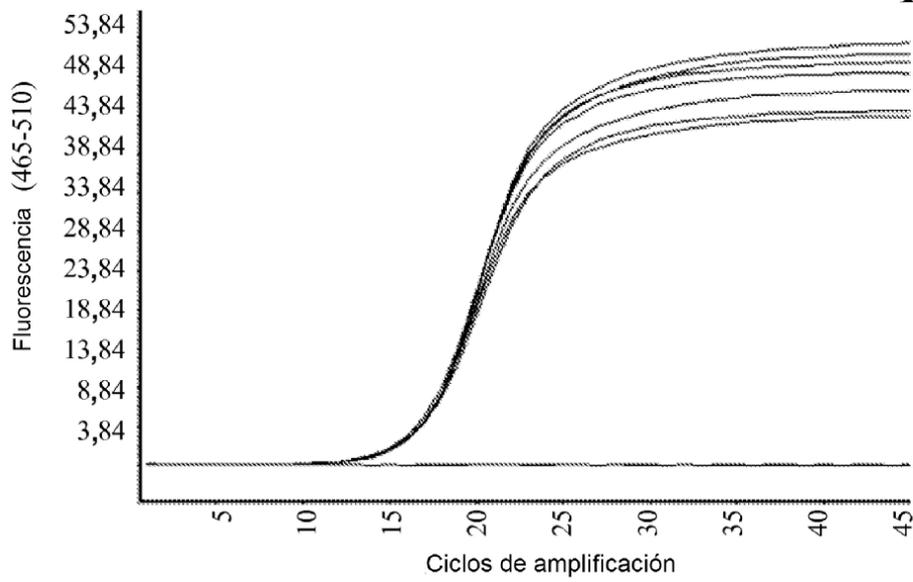


Fig. 5 C

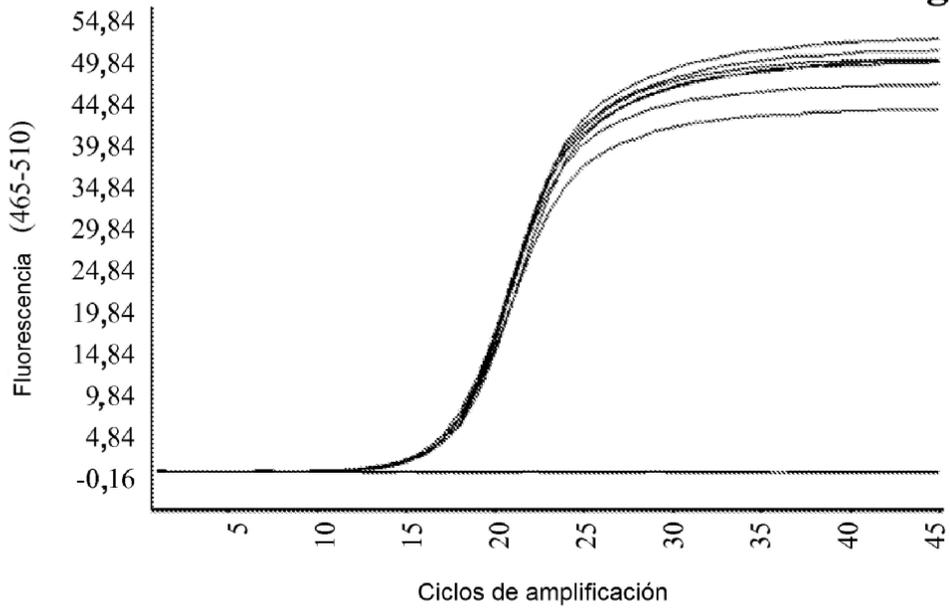


Fig. 5 D

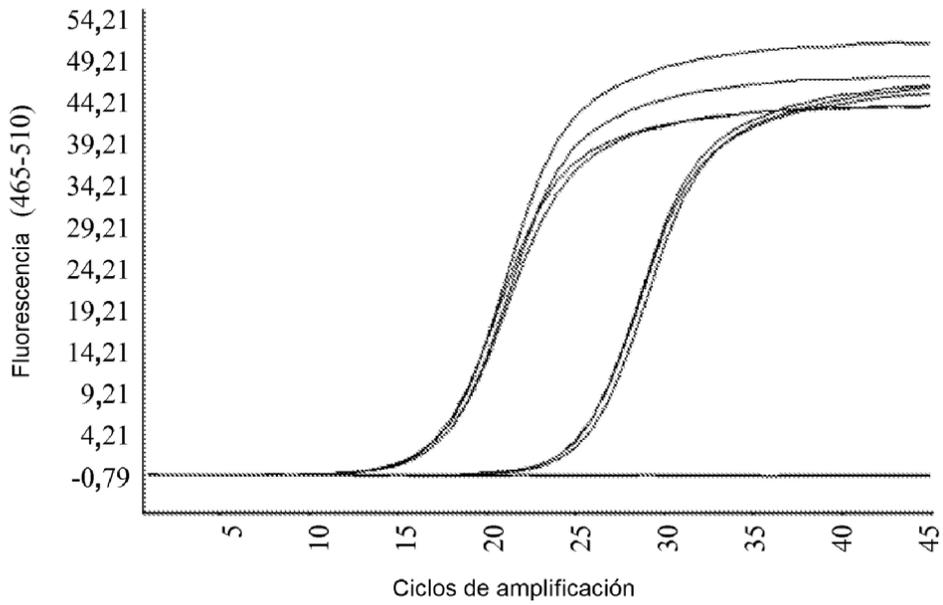


Fig. 6

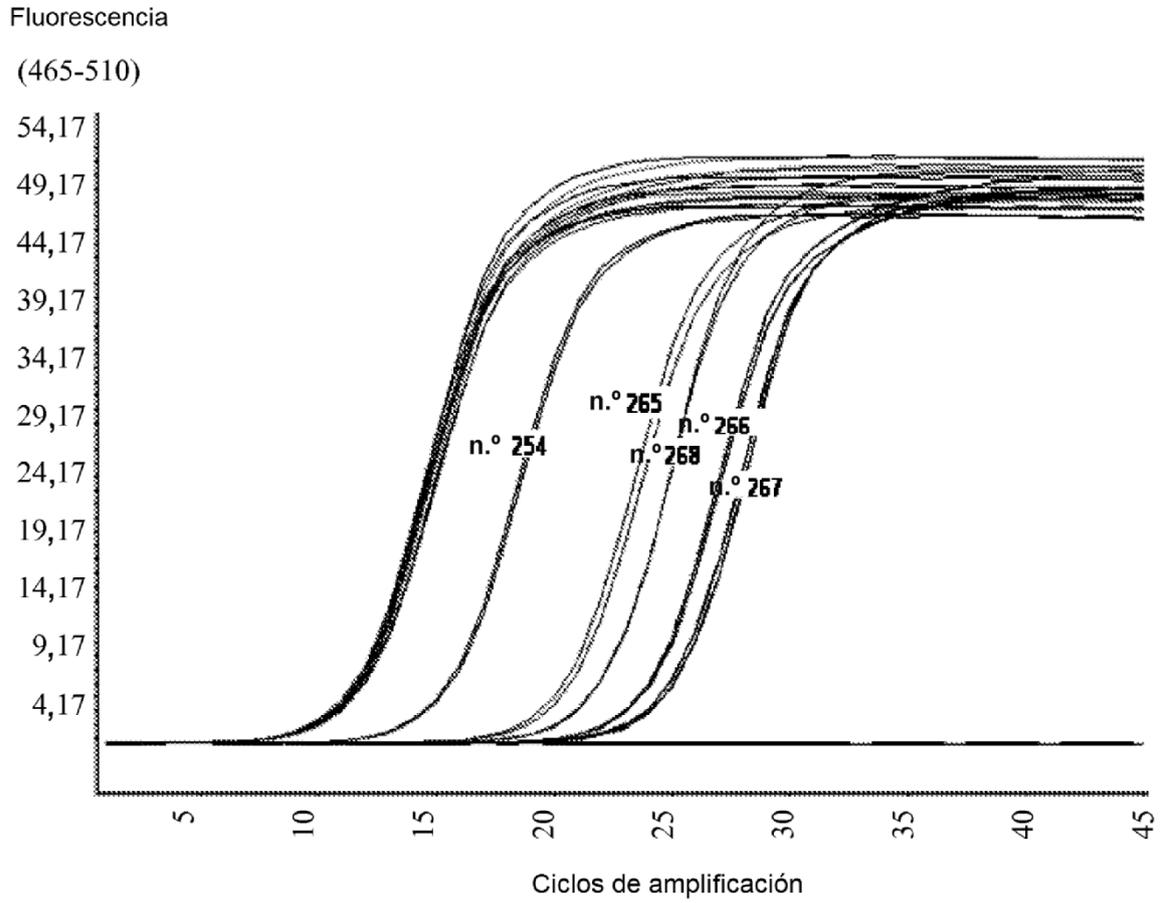


Fig. 7

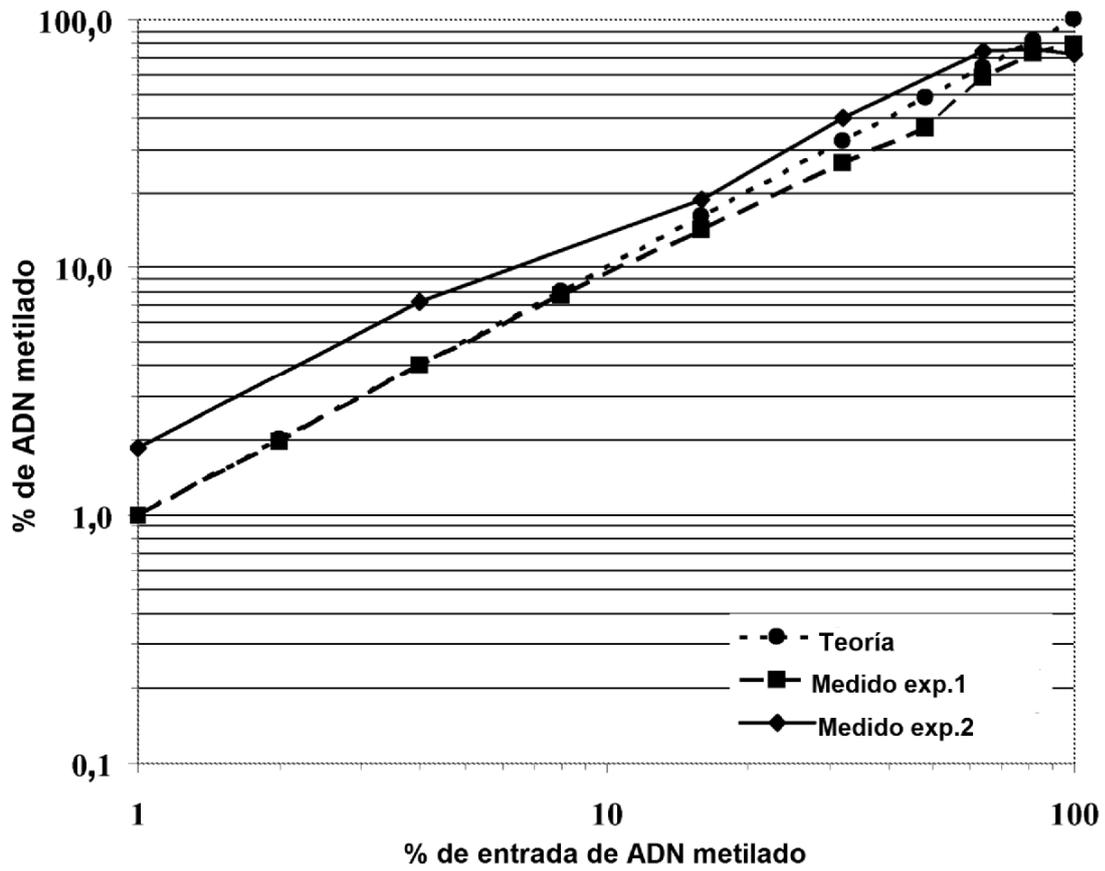


Fig. 8 A

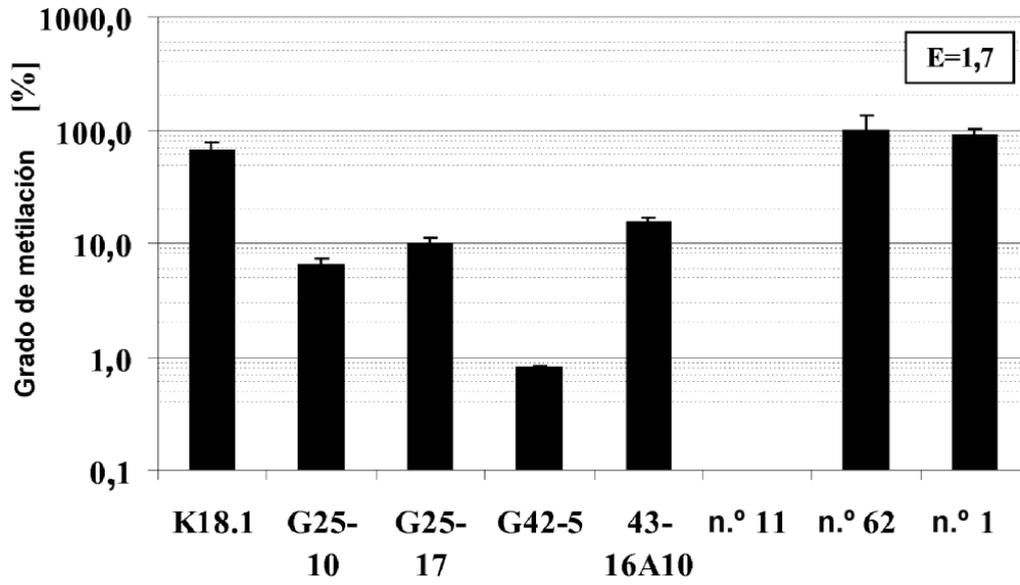


Fig. 8 B

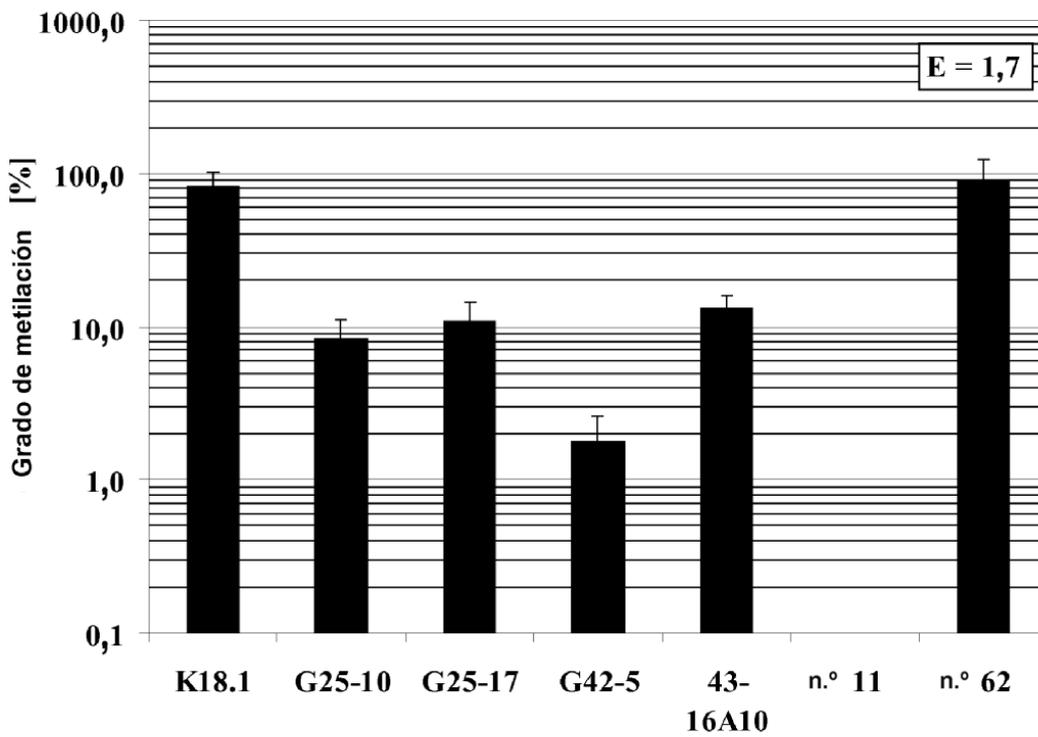


Fig. 9

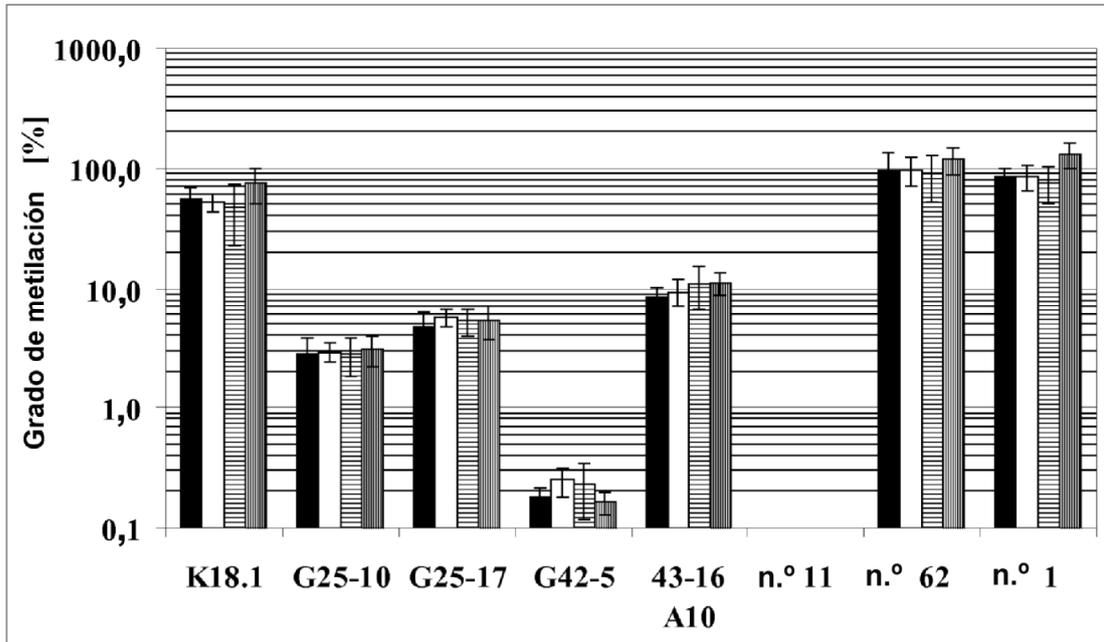


Fig. 10 A

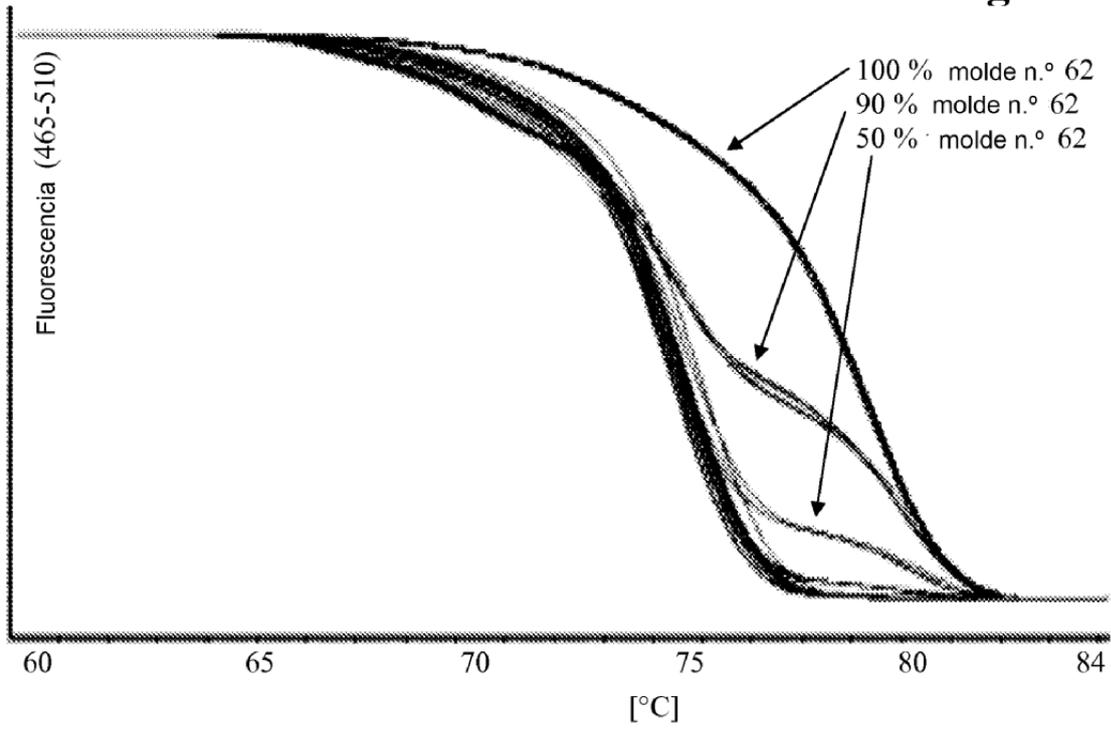


Fig. 10 B

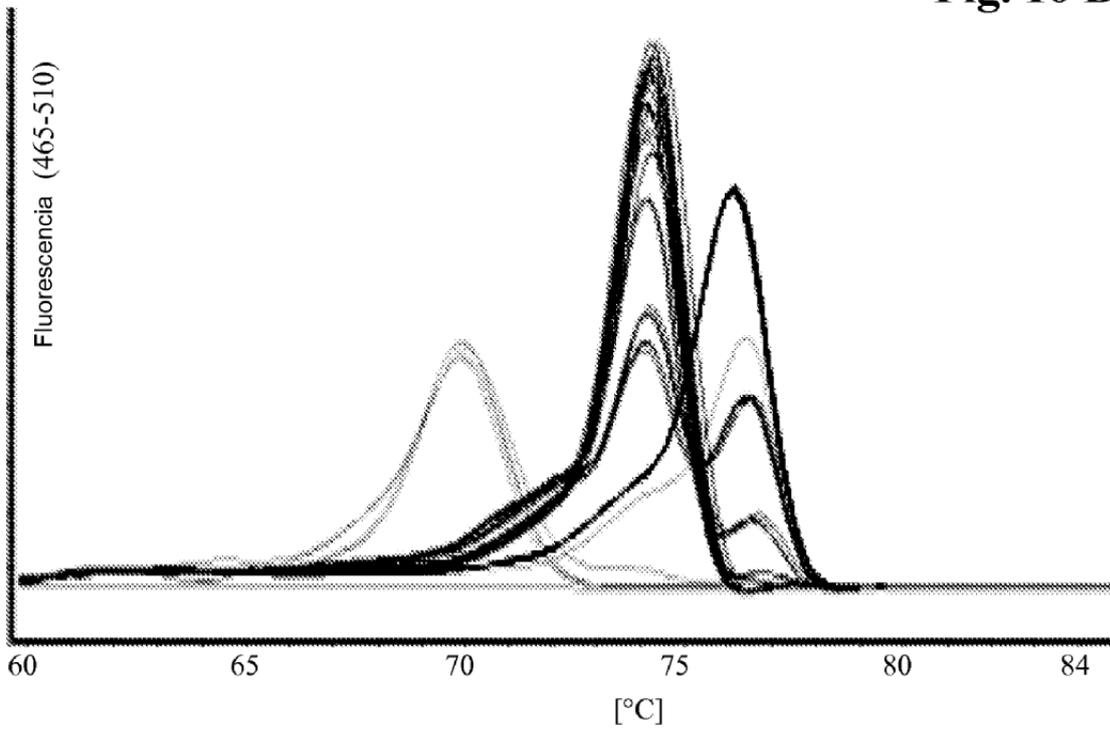
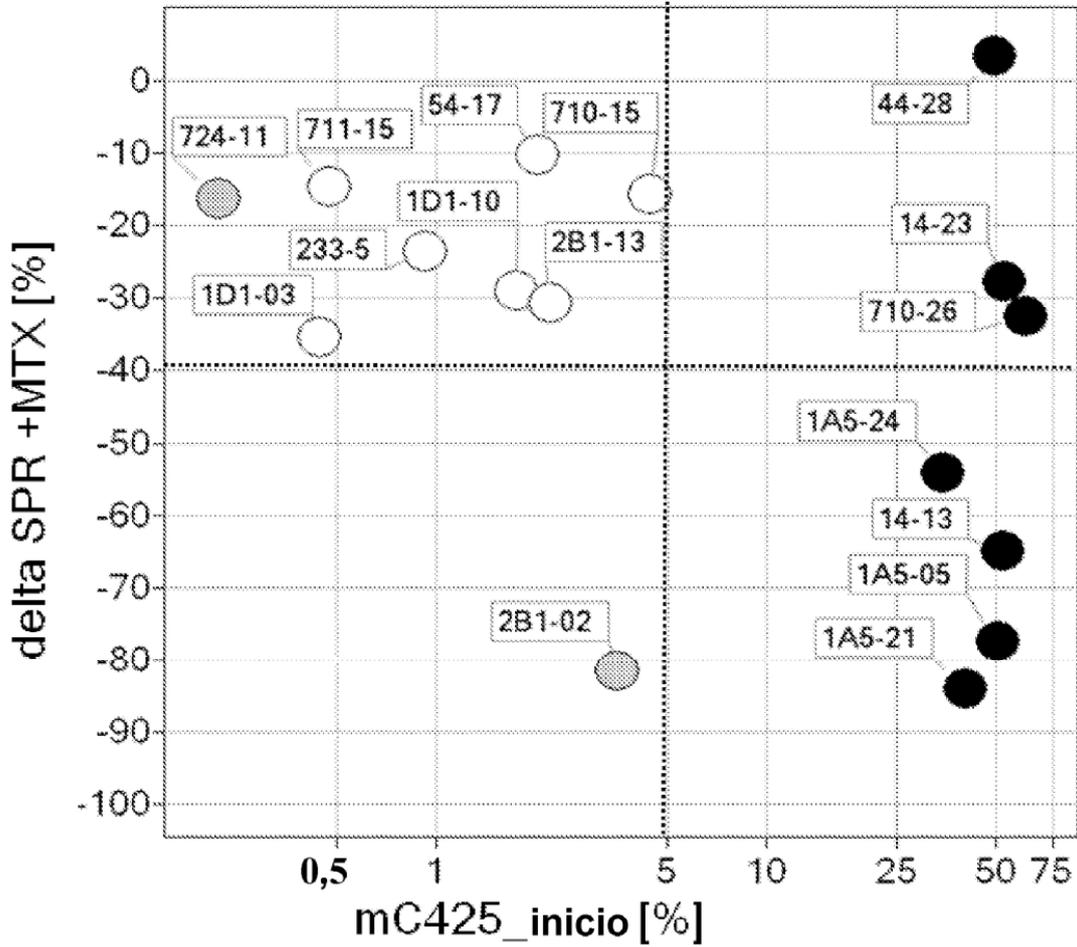
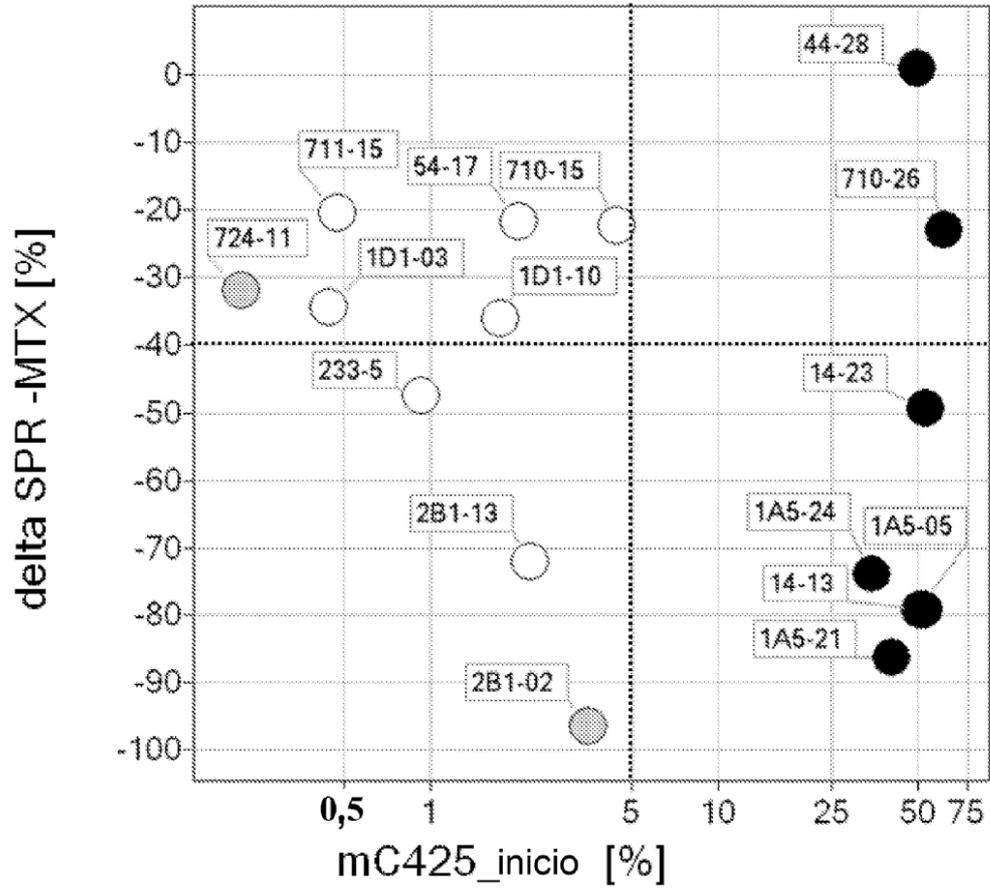


Fig. 11 A



- mC425_inicio < 5%
mC425_final con MTX < 5%
- mC425_inicio < 5%
mC425_final con MTX > 5%
- mC425_inicio > 5%
mC425_final con MTX > 5%

Fig. 11 B



- mC425_inicio < 5%
mC425_final sin MTX < 5%
- mC425_inicio < 5%
mC425_final sin MTX > 5%
- mC425_inicio > 5%
mC425_final sin MTX > 5%

Fig. 12

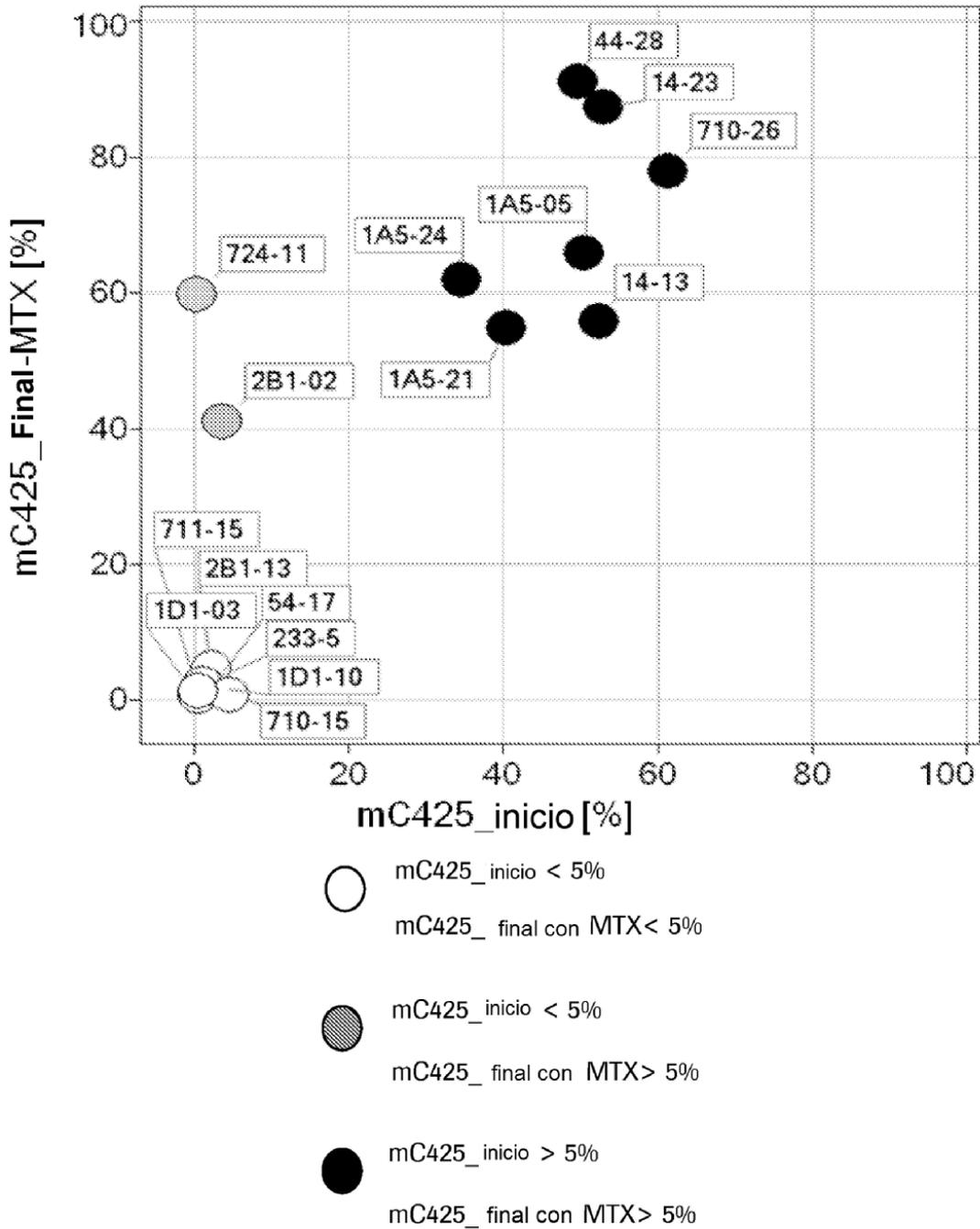


Fig. 13

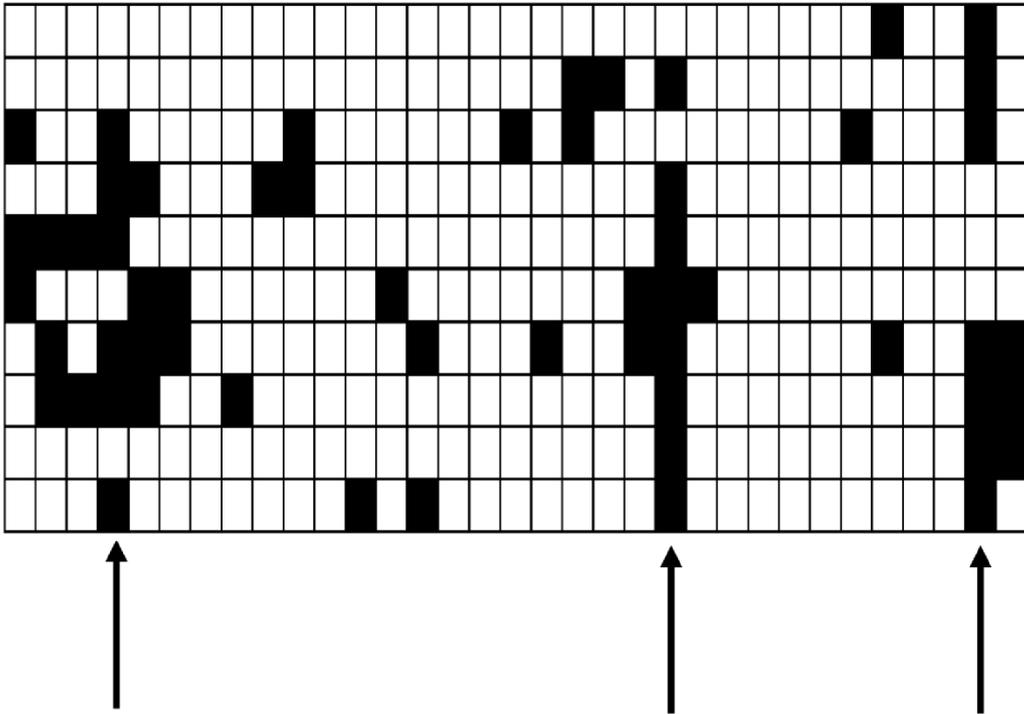
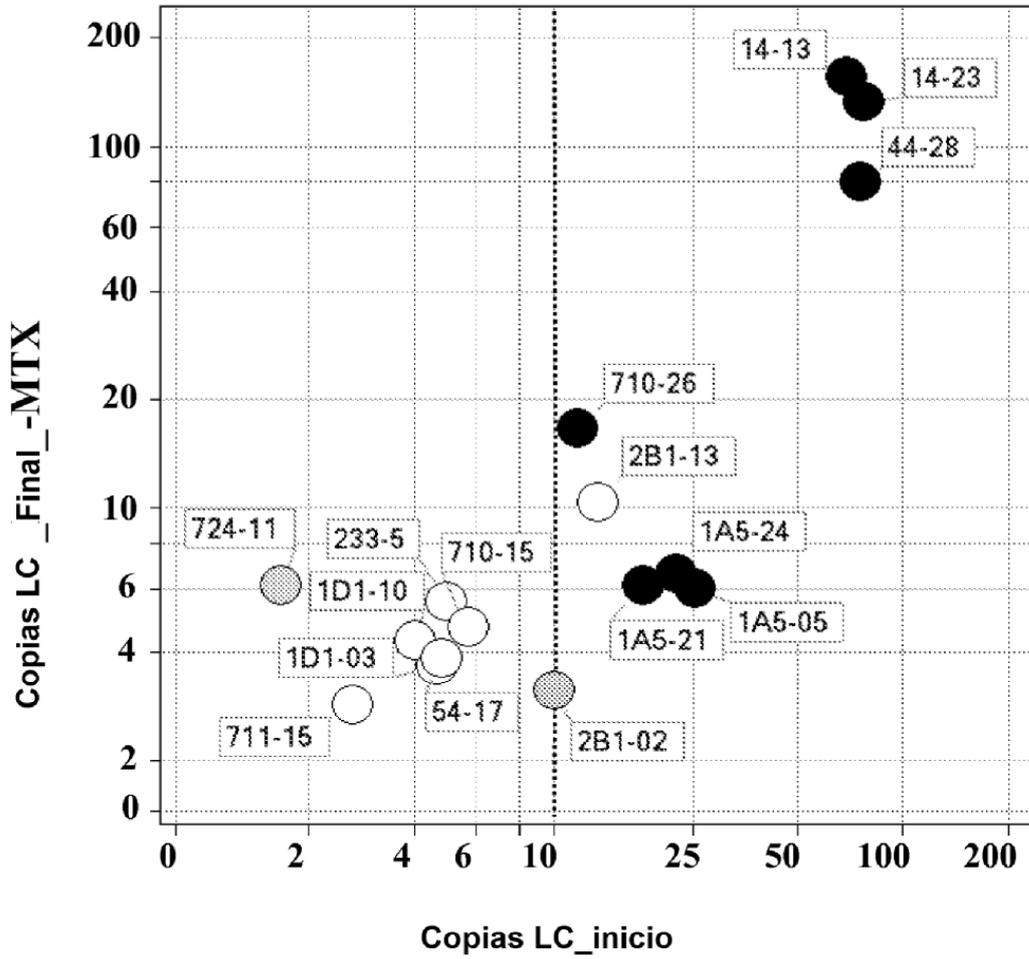


Fig. 14



- mC425_inicio < 5%
mC425_final sin MTX < 5%
- mC425_inicio < 5%
mC425_final sin MTX > 5%
- mC425_inicio > 5%
mC425_final sin MTX > 5%

Fig. 15

