(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 620 306**

(51) Int. Cl.:

C12P 21/02	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
C12N 1/15	(2006.01)
C12N 1/19	(2006.01)
C12N 1/21	(2006.01)
C12N 5/10	(2006.01)
C12N 15/113	(2010.01)
C12P 21/08	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2012** **PCT/JP2012/058577**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2012** **WO2012137683**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2012** **E 12768095 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017** **EP 2695947**

(54) Título: **Método de producción de polipéptido recombinante**

(30) Prioridad:

01.04.2011 JP 2011082002

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.06.2017

(73) Titular/es:

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)
5-1 Ukima 5-chome
Kita-kuTokyo 115-8543, JP

(72) Inventor/es:

TABUCHI, HISAHIRO y
SUGIYAMA, TOMOYA

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 620 306 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 de producción de polipéptido recombinante

Campo técnico

La presente invención se refiere a un método de producción de un polipéptido recombinante, y más específicamente, a un método de producción de un polipéptido de manera eficaz utilizando una célula animal en la que la expresión del inhibidor α del factor nuclear κB (NFKBia) ha disminuido.

Técnica anterior

Cuando las proteínas útiles como medicamentos se producen utilizando tecnología de recombinación de genes, el uso de células animales permite una modificación y un plegamiento post-traduccionales complicados que las células procariotas no pueden realizar. Por lo tanto, las células animales se han utilizado con frecuencia como células anfitrionas para la producción de proteínas recombinantes.

En los últimos años, se ha desarrollado un gran número de productos biofarmacéuticos tales como anticuerpos y proteínas fisiológicamente activas. Las técnicas que permiten la producción de proteínas recombinantes de manera eficaz por parte de las células animales conducen a una reducción del coste de los productos biofarmacéuticos y prometen su suministro estable a los pacientes.

En estas circunstancias, se desea un método de producción de proteína con una mayor eficacia de producción.

El NfkBia (IKBα, inhibidor del factor nuclear κB), que es una abreviatura del inhibidor, alfa, de factor nuclear potenciador del gen del polipéptido ligero kappa de las células B, está implicado en la activación de NF-kappa B, un factor de transcripción relacionado con la señalización intracelular. NfkBia es uno de los factores que inactivan NF-kappa B. La expresión nuclear inducible de NfkBia recién biosintetizado regula negativamente la unión del ADN y las actividades transcripcionales de NF-kappa B (Documento No Relacionado con Patentes 1). Adicionalmente, la expresión de algunos genes que inhiben la proliferación celular, como NfkBia, está suprimida en casi todas las células tumorales de ratón o humanas (Documento No Relacionado con Patentes 2). NF-kappa B por lo general existe en un estado en el que está unido a un inactivador como NfkBia. Cuando se proporcionan diversos estímulos, el NF-kappa B es liberado de uno de tales inactivadores, activado y translocado al núcleo, y se une a una secuencia específica de ADN en las regiones promotoras/potenciadoras de varios genes diana de citoquinas, factores de crecimiento, moléculas de adherencia, reguladores de la muerte celular, y similares (5'-GGGACTTTCC-3'; la secuencia de ADN se denomina secuencia de unión a NFkB, motivo kB, elemento de respuesta a NFkB, o similar (SEQ ID NO: 35)), y de ese modo NF-kappa B se implica en la modulación de actividades transcripcionales (Documento No Pertenenciente a Patentes 3).

Mientras tanto, se desconoce totalmente desconocido cómo está relacionado NfkBia con la capacidad de producción de proteínas recombinantes, como un comportamiento de NfkBia dentro de las células animales cultivadas.

Los documentos WO2009/051109, WO2009/020144 y WO2008/114673 se refieren a métodos de producción de altas cantidades de anticuerpos recombinantes en células cultivadas, en donde dichas células expresan en exceso un transportador de taurina, alanina amino-transferasa o cisteína sulfinato descarboxilasa.

Lista de citas

Bibliografía no relacionada con Patentes

[0008]

Documento no relacionado con Pat 1: Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B, Mol. Cell. Biol., May 1995, 2689-2696, Vol. 15, Núm. 5

Documento no relacionado con Pat 2: From mice to humans: Identification of commonly deregulated genes in mammary cancer via comparative SAGE studies, Hu Y., Sun H., Drake J., Kittrell F., Abba M. C., Deng L., Gaddis S., Sahin A., Baggerly K., Medina D. y Aldaz C. M., Cancer Research 2004 64:21 (7748-7755)

Documento no relacionado con Pat 3: "New insights into the Role of Nuclear Factor-kappa B in Cell Growth Regulation", American Journal of Pathology, 2001, Vol. 159, Núm. 2: 387-397

Compendio de la invención

Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método capaz de producir una proteína natural o recombinante a un nivel elevado.

Solución al problema

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Los autores de la presente invención utilizan cepas de células cultivadas (cepas de células CHO) que tienen una elevada capacidad productora de anticuerpos recombinantes para llevar a cabo estudios sobre los genes expresados marcadamente en las cepas de células, en esfuerzos diligentes para lograr el objeto anterior. Como resultado, los autores de la presente invención identificaron un ARN no codificante, de tipo ARNm que fue reconocido mediante la utilización de una secuencia específica de ratón como sonda. Este transcrito correspondía a la hebra complementaria de la región no traducida del ARNm de NfkBia. Además, los autores de la presente invención encontraron que la expresión en células recombinantes cultivadas de una molécula de ácido nucleico que consistía en una secuencia parcial del transcrito aumentaba notablemente la capacidad de producción de polipéptido recombinante de las células cultivadas. Los autores de la presente invención también encontraron que la expresión de NfkBia estaba suprimida en las células altamente productoras de anticuerpos en las que se había aumentado la expresión de ARN no codificante. Los autores de la presente invención encontraron adicionalmente que las células cultivadas que tenían una elevada capacidad productora de anticuerpos recombinantes suprimían la expresión de NfkBia en las células. Basándose en estos hallazgos, los autores de la presente invención esperan que la cantidad de producción de un polipéptido deseado pueda ser aumentada mediante la inducción de una alta expresión de un transcrito que regule la expresión de NfkBia en células cultivadas. Estos hallazgos llevaron a la realización de la presente invención.

Semejante ARN o ADN o una secuencia de los mismos que tienen la función de aumentar la capacidad de producir una proteína tal como un anticuerpo recombinante por medio del aumento de la expresión de sí mismo en las células cultivadas se denomina colectivamente en la presente memoria APES (Secuencia Potenciadora de la Producción de Anticuerpo, por sus siglas en inglés) (también referidos como PPES (Secuencia Potenciadora de la Producción de Polipéptidos, por sus siglas en inglés) en algunos casos).

Los autores de la presente invención supusieron que las APES (o PPES) regularían la expresión de NfkBia en células cultivadas, mejorando de este modo la actividad de NF-kappa B y aumentando así la capacidad de producción de polipéptido recombinante. Se presume que el NF-kappa B que tiene una mayor actividad se translocaría al núcleo, aumentaría la expresión de genes relacionados con la inmunidad, la inflamación y la anti-apoptosis (p. ej., Bcl-2, Bcl-XL, IAP (inhibidores de las proteínas de la apoptosis)) y contribuiría al crecimiento de las células, el mantenimiento de la tasa de supervivencia de las células, y similares.

Además, existe una pluralidad de secuencias de unión a NF-kappa B en las regiones promotoras/potenciadoras de plásmidos comunes para la expresión de un gen que codifica una proteína o péptido recombinante tal como un anticuerpo. Por lo tanto, también se presume que NF-kappa B que se ha translocado al núcleo aumentaría la actividad del promotor de los plásmidos de expresión y contribuiría a una mayor producción de anticuerpos. Por ejemplo, en el caso del promotor de MCMV, existen tales secuencias de unión a NF-kappa B en ocho sitios en una secuencia derivada de citomegalovirus de ratón (DD434486) y en tres sitios en una secuencia de citomegalovirus derivada de ser humano (DI097553).

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

También se describen los siguientes aspectos:

(1) Un método para producir un polipéptido que comprende cultivar una célula que expresa APES y en la que se ha introducido un ADN que codifica un polipéptido deseado, produciendo de ese modo el polipéptido deseado.

(1-1) El procedimiento de acuerdo con (1), en donde la célula es una célula que expresa fuertemente APES.

(2) El método de acuerdo con (1), en donde la APES es una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que se puede unir al ADN o ARNm del gen de NfkBia derivado de ser humano, ratón, rata o hámster por medio de emparejamiento de bases y por lo tanto puede suprimir la expresión del gen de NfkBia.

(3) El método de acuerdo con (2), en donde la APES es un ARN pequeño de, a lo sumo, 30 nucleótidos de longitud que comprende una secuencia de 19 a 25 nucleótidos de longitud que se puede unir a una parte del ARNm de NfkBia por medio de emparejamiento de bases.

(4-1) El método de acuerdo con (2), en donde la APES es un ARN no codificante de tipo ARNm de, a lo sumo, 561 nucleótidos de longitud que comprende una secuencia de 19 a 25 nucleótidos de longitud que se puede unir a una parte del ARNm de NfkBia por medio de emparejamiento de bases.

(4) El método de acuerdo con (2), en donde la APES es un ARN no codificante de tipo ARNm de, a lo sumo, 500 nucleótidos de longitud que comprende una secuencia de 19 a 25 nucleótidos de longitud que se puede

unir a una parte de NfkBia, por medio de emparejamiento de bases.
(5-1) El método de acuerdo con (2), en donde la APES es un ARN no codificante de tipo ARNm de 561 a 1579 nucleótidos de longitud que comprende una secuencia de 19 a 25 nucleótidos de longitud que se puede unir a una parte del ARNm de NfkBia por medio de emparejamiento de bases.
(5) El método de acuerdo con (2), en donde la APES es un ARN no codificante de tipo ARNm de 500 a 1000 nucleótidos de longitud que comprende una secuencia de 19 a 25 nucleótidos de longitud que se puede unir a una parte de NfkBia, por medio de emparejamiento de bases.
(6) El método de acuerdo con cualquiera de (3) a (5), en donde la secuencia continua de 19 a 25 nucleótidos de longitud es cualquier secuencia parcial en la secuencia de nucleótidos representada por el SEQ ID NO: 2.
(7-1) El método de acuerdo con (6), en donde la APES se selecciona entre moléculas de ácido nucleico que comprenden cada una una de las siguientes secuencias de nucleótidos:
(a) un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 16 y 29;
(b) un ADN que comprende la secuencia de (a) anterior y es una secuencia parcial de la región no traducida 3' del gen de NfkBia;
(c) un ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos idéntica a la secuencia de (a) o (b) anteriores a excepción de uno o varios nucleótidos;
(d) un ARN que es un transcrito de (a), (b) o (c) anteriores; y
(e) un ADN o ARN que consiste en la secuencia que se puede unir a la secuencia de (a) anterior por medio de emparejamiento de bases.
(7) El método de acuerdo con (6), en donde la APES se selecciona entre moléculas de ácido nucleico que comprenden cada una de las siguientes secuencias de nucleótidos:
(a) un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los SEQ ID NO: 4-16;
(b) un ARN que es un transcrito de (a) anterior;
(c) un ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos idéntica a la secuencia de (a) anterior, excepto por un nucleótido;
(d) un ARN que es un transcrito de (c) anterior; y
(e) un ADN o ARN que consiste en la secuencia que se puede unir a la secuencia de (a) anterior por medio del emparejamiento de bases.
(8) El método de acuerdo con (1), en donde un ADN exógeno que codifica el polipéptido deseado se ha introducido en la célula y la APES se ha introducido artificialmente en la célula.
(9) El método de acuerdo con (8), en donde la célula en la que se ha introducido artificialmente APES es una célula transfectada con APES.
(10) El método de acuerdo con (8), en donde la célula en la que se ha introducido artificialmente APES es una célula en la que se ha activado la transcripción de la APES endógena.
(11) El método de acuerdo con (8), en donde se ha introducido adicionalmente en la célula un ADN que codifica un transportador de taurina.
(12) El método de acuerdo con (8), en donde se ha introducido adicionalmente en la célula un ADN que codifica ácido cisteinsulfínico descarboxilasa.
(13) El método de acuerdo con (8), en donde se ha introducido adicionalmente en la célula un ADN que codifica alanina transferasa.
(14) El método de acuerdo con (1), en donde el polipéptido es un anticuerpo.
(15) El método de acuerdo con (1), en donde la célula es una célula de ovario de hámster chino.
(16) Un método de producción de un producto farmacéutico que comprende el polipéptido producido por cualquiera de los métodos mostrados anteriormente.
(17) Una molécula de ácido nucleico (APES o SPED) que comprende cualquiera de las siguientes secuencias de nucleótidos y tiene actividad APES, a condición de que se excluya la molécula de ácido nucleico del SEQ ID NO: 1:
(a) un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los SEQ ID NO: 2 a 16 y 29;
(b) un ADN que comprende la secuencia de (a) anterior y es una secuencia parcial de la región no traducida 3' del gen de NfkBia;
(c) un ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos idéntica a la secuencia de cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 16 y 29 o la secuencia de (b), a excepción de uno o varios nucleótidos;
(d) un ARN que es un transcrito de (a), (b) o (b) anterior; o
(e) un ADN o ARN que consiste en la secuencia que se puede unir a la secuencia de (a) anterior por medio de emparejamiento de bases.
(18) Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con (17) anterior.
(19) Una célula en la que se ha introducido artificialmente la molécula de ácido nucleico de acuerdo con (17) anterior o el vector de acuerdo con (18) anterior.

Efectos ventajosos de la invención

La presente invención permite la producción eficaz de anticuerpos recombinantes.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la secuencia del transcrito AI462015 identificado y su ubicación en el genoma del ratón.
La Figura 2 muestra la intensidad de la expresión del transcrito AI462015 en el tercer día de un subcultivo de una célula productora de anticuerpos obtenida mediante la expresión de mAb1 (anticuerpo anti-receptor de IL-6) a un alto nivel en una célula CHO-DG44.
La Figura 3 muestra la intensidad de la expresión del transcrito AI462015 el tercer día de un subcultivo de una célula productora de anticuerpos obtenida mediante la expresión de Mab2 (anticuerpo anti-glipicano 3) a un alto nivel en una célula CHO-DXB11s.
La Figura 4 muestra la intensidad de la expresión del transcrito AI462015 el 3er día de un cultivo alimentando por lotes en una jarra de 1L de células productoras de Mab2 (anticuerpo anti-glipicano 3).
La Figura 5 muestra un aumento de la intensidad de la expresión del transcrito AI462015 el día 13 de la última fase de cultivo alimentado por lotes en una jarra de 1L de células productoras de Mab2.
La Figura 6 muestra la intensidad de la expresión del transcrito AI462015 el 3er día de un cultivo alimentado por lotes en una jarra de 1L de células que tenían un bajo potencial para producir Mab1 (anticuerpo anti-receptor de IL-6).
La Figura 7 muestra un plásmido de expresión de una secuencia parcial de 434 pb del transcrito AI462015 (437p).
La Figura 8 muestra un plásmido de expresión de una secuencia parcial de 165 pb del transcrito AI462015 (437p).
La Figura 9 muestra un plásmido en el que solamente se expresa un gen de resistencia a higromicina como control.
La Figura 10 muestra que la cantidad de producción de Mab1 se incrementa por la fuerte expresión de secuencias parciales del transcrito AI462015 (437p).
La Figura 11 muestra la fuerte expresión del transcrito AI462015 y la expresión de NfkBia suprimido en células altamente productoras de anticuerpos.
La Figura 12 muestra un conjunto de sondas utilizado para cuantificar la expresión de NfkBia.
La Figura 13 muestra el resultado de la cuantificación de la expresión de NfkBia suprimido en las células altamente productoras de anticuerpos.
La Figura 14 muestra los ocho sitios de unión a NfkB en el promotor IE2 de CMV de ratón (SEQ ID NO: 23) (los sitios están subrayados).
La Figura 15 es un esquema de un método para el análisis de la expresión de microARN.
La Figura 16 muestra los productos de PCR derivados de los microARN que se habían expresado a altos niveles en las células altamente productoras de anticuerpos.
La Figura 17 muestra los plásmidos pPur-APES165 y pPur-ALT1 que se utilizaron para la co-expresión de la secuencia parcial de 165 pb del transcrito AI642048 (437p) y la co-expresión de ALT1, respectivamente, en células que expresan pHyg-TAUT.
La Figura 18 muestra un resultado de un cultivo alimentado por lotes con agitador que muestra un alto efecto de crecimiento celular y un alto efecto de producción de anticuerpo que era el resultado de la fuerte expresión de APES.
La Figura 19 muestra un resultado de un cultivo alimentado por lotes en una jarra de 1L que muestra un alto efecto de crecimiento celular y un alto efecto de producción de anticuerpo que era el resultado de la fuerte expresión APES.
La Figura 20 muestra una correlación entre el nivel de expresión de APES de células anfitrionas candidato que expresan fuertemente APES165 (nueve cepas) y su densidad de células viables.
La Figura 21 muestra que la cantidad de producción de Mab1 se incrementa por la fuerte expresión de secuencias parciales de la secuencia parcial APES 165 del transcrito AI462015 (437p).
La Figura 22 muestra que las secuencias parciales de APES 165, que se encontró que tenían un efecto de alta producción de anticuerpos, como se muestra en la Figura 21, comprenden la secuencia complementaria NfkBia.
La Figura 23 muestra que AI462015 es la cadena complementaria del ARNm de NfkBia de ratón (Ejemplo 8).
La Figura 24 muestra que hay una secuencia homóloga de AI462015 en el genoma de células CHO-K1 (Ejemplo 8).
La Figura 25a muestra que una secuencia parcial (nucleótidos 7 a 91 desde el extremo 5') de AI462015 se conserva independientemente de la especie.
La Figura 25b muestra que una secuencia parcial (nucleótidos 7 a 91 desde el extremo 5') de AI462015 se conserva independientemente de la especie.
La Figura 25c muestra que una secuencia parcial (nucleótidos 7 a 91 desde el extremo 5') de AI462015 se conserva independientemente de la especie.
La Figura 25d muestra que una secuencia parcial (nucleótidos 7 a 91 desde el extremo 5') de AI462015 se conserva independientemente de la especie.
La Figura 25e muestra que una secuencia parcial (nucleótidos 7 a 91 desde el extremo 5') de AI462015 se conserva independientemente de la especie.

Descripción de las realizaciones

Las realizaciones de la presente invención se describen a continuación con más detalle.
(1) APES (Secuencia Potenciadora de la Producción de Anticuerpo)

Se describe un método de producción de un polipéptido que comprende cultivar una célula que expresa APES y en la que se ha introducido un ADN que codifica un polipéptido deseado, produciendo de ese modo el polipéptido deseado.

Como se detalla en los Ejemplos descritos más adelante, los autores de la presente invención encontraron un ARN no codificante de tipo ARNm con un mayor nivel de expresión en correlación con la capacidad productora de anticuerpos en células CHO cultivadas, y los autores de la presente invención identificaron el ARN no codificante de tipo ARNm como un transcrito de 437 nucleótidos en el genoma de ratón (Figura 1; ID Acceso de GenBank: AI462015; SEQ ID NO: 1). La secuencia de AI462015 y su ubicación en el genoma del ratón se muestran en la Figura 1. La secuencia AI462015 existe en la hebra complementaria cerca de la región no traducida 3' del ARNm de NfkBia (inhibidor α del factor nuclear kappa B) en el genoma de ratón (Nota: La actualización de la información posterior propuesta por GeneBank reveló que el transcrito de 437 nucleótidos de AI462015 corresponde a la hebra complementaria de la región no traducida 3' (513 nucleótidos) del ARNm de NfkBia de ratón (Figura 23)).

Adicionalmente, los autores de la presente invención encontraron que la cantidad de producción del polipéptido deseado se puede aumentar mediante la introducción de moléculas de ácido nucleico que tienen cada una una secuencia parcial derivada de AI462015 en células anfitrionas para permitir de este modo la expresión.

Los autores de la presente invención supusieron que estas moléculas de ácido nucleico regularían la expresión NfkBia en células cultivadas, mejorando de este modo la actividad de NF-kappa B y aumentando así la capacidad de producción de polipéptido recombinante. Específicamente, los autores de la presente invención supusieron que NF-kappa B que tenía una actividad mejorada se translocaría al núcleo, aumentaría la expresión de genes relacionados con la inmunidad, la inflamación y la anti-apoptosis (p. ej., Bcl-2, Bcl-xL, IAP (Inhibidores de Proteínas de la Apoptosis)) y contribuirían al crecimiento de las células, el mantenimiento de la tasa de supervivencia de las células, y similares.

Los autores de la presente invención denominaron colectivamente como APES (Secuencia Potenciadora de la Producción de Anticuerpos) (también conocidos como PPES (Secuecia Potenciadora de la Producción de Polipéptidos) en algunos casos) a un ARN o ADN o una secuencia de los mismos que tienen las siguientes funciones proporcionadas por su propia expresión o por un aumento de expresión en células cultivadas: regulan la expresión de NfkBia en las células cultivadas y de ese modo mejoran la actividad de NF-kappa B y aumentan la capacidad de producir un polipéptido recombinante deseado, tal como un anticuerpo recombinante, y que preferiblemente no codifica proteínas.

La secuencia derivada de AI462015 anterior o una secuencia parcial de la misma se conservan no sólo en roedores tales como el ratón y hámster, sino también en seres humanos, y se consideran que también es una secuencia altamente conservada en otros mamíferos y animales como peces e insectos. Por lo tanto, una secuencia parcial de la región no traducida 3' de varios ARNm de NfkBia derivados de células animales o una secuencia complementaria a la secuencia (la secuencia parcial y la secuencia complementaria corresponden a la secuencia derivada de AI462015 o la secuencia parcial de la misma) también se puede utilizar como secuencias APES de la presente invención.

En una realización, una parte de la secuencia APES comprende la secuencia complementaria de NfkBia o es la secuencia complementaria de NfkBia, y esta característica da como resultado la supresión de la expresión de NfkBia en las células que expresan APES. Este efecto de supresión promueve la función de producción de un anticuerpo y similares, a niveles elevados.

En una realización, APES es una molécula de ácido nucleico que interfiere en el ARNm de NfkBia (ARN de interferencia) y que tiene la función de unirse por sí mismo al ARNm de NfkBia en una célula para regular negativamente la expresión del ARNm. El aumento del nivel de expresión intracelular de APES conduce a la supresión de la expresión de la función de NfkBia y por lo tanto aumenta el nivel de expresión de genes de anticuerpos y adicionalmente produce un polipéptido recombinante tal como un anticuerpo a niveles elevados.

Por lo tanto, APES puede ser la siguiente que comprende una secuencia que se puede unir al ADN o ARNm del gen de NfkBia por medio de emparejamiento de bases: un ARN de doble hebra (ARNdh) o un ARNip, que es un ARNdh corto, o un ARNip disociado en hebras sencillas, o un ARNhc, un ADN o ARN antisentido, un microARN (miARN) o un ARN no codificante de tipo ARNm.

Por ejemplo, la secuencia APES puede ser un oligonucleótido que consiste en una secuencia que comprende una secuencia parcial complementaria a un ARNm de NfkBia diana. Semejante oligonucleótido es, por ejemplo, un

miARN que tiene una secuencia que corresponde a 19 a 25 nucleótidos en la hebra complementaria del ARNm de NfkBia o una secuencia idéntica a la secuencia anterior excepto por un nucleótido y que tiene el efecto de suprimir la expresión de NfkBia. Alternativamente, APES puede ser un ARN no codificante de tipo ARNm de cadena larga y puede ser, por ejemplo, un ARN que consiste en una secuencia de 561 nucleótidos de longitud (561 unidades) o a lo sumo 500 nucleótidos de longitud (500 unidades) que comprende una secuencia capaz de unirse al ADN o ARNm del gen de NfkBia, por medio de emparejamiento de bases y que tiene el efecto de suprimir la expresión de NfkBia. Alternativamente, APES puede ser una cadena más larga (de cientos a cientos de miles de nucleótidos), de ARN no codificante de tipo ARNm. Por ejemplo, APES puede ser una molécula de ácido nucleico o secuencia de 200 a 100.000 nucleótidos de longitud o de 300 a 300.000 nucleótidos de longitud.

La secuencia que se puede unir por medio de emparejamiento de bases no se limita a una secuencia que se empareja completamente (es decir, una secuencia complementaria al 100%), pero la presencia de nucleótidos no emparejables también es aceptable, siempre y cuando no interfieran en sus funciones. Más bien, se prefiere la complementación parcial dependiendo de la forma de APES. Por lo tanto, por ejemplo, una secuencia que homóloga en al menos 70%, más preferiblemente 80%, aún más preferiblemente 90%, lo más preferiblemente 95% a un ADN o ARNm genético que comprende NfkBia, la región no traducida, o la secuencia complementaria a la secuencia anterior también se incluye en la "secuencia que se puede unir mediante emparejamiento de bases". Por ejemplo, en cuanto al ARN no codificante de tipo ARNm de 561 unidades o 500 unidades, la secuencia homóloga al menos en 90% abarca secuencias mutantes que comprenden 1 a 50 nucleótidos no coincidentes (o 1 a 56 nucleótidos no coincidentes en el caso del ARN de 561 unidades) resultantes de la inserción, supresión o mutación puntual de nucleótidos y que tienen la función de aumentar la capacidad de producir un polipéptido recombinante tal como un anticuerpo asociado con la expresión de las propias secuencias mutantes en células anfitrionas, o la función de suprimir la expresión de NfkBia. Por lo tanto, se considera que una secuencia derivada de NfkBia, ortólogo (gen homólogo xenogénico), que tiene un cierto grado de similitud de secuencia (p. ej., una homología de al menos 70%) y deriva de una especie diferente de una célula anfitriona también puede ser utilizada como APES.

Alternativamente, la secuencia que se puede unir por medio de emparejamiento de bases abarca una secuencia que se puede unir al ARNm de NfkBia bajo una condición tal como una condición intracelular. Semejante secuencia abarca, por ejemplo, una secuencia que hibrida en condiciones conocidas por el experto como condiciones altamente rigurosas y que tiene las funciones deseadas. Un ejemplo de las condiciones altamente rigurosas es la incubación de un polinucleótido y otro polinucleótido en una solución tampón de hibridación que comprende 6 x SSPE o SSC, formamida al 50%, 5 x reactivo de Denhardt, SDS al 0,5% y 100 µg/mL de un ADN de esperma de salmón desnaturalizado, fragmentado, a una temperatura de hibridación de 42°C durante 12 a 16 horas (uno de los polinucleótidos se puede adherir a la superficie de semejante sólido tal como una membrana) y varios lavados posteriores del material resultante con una solución tampón de lavado que comprende 1 x SSC y SDS al 0,5% a una temperatura óptima de 42°C o superior. Para otras condiciones concretas, remitirse a múltiples manuales de experimentación que son bien conocidos para el experto, tales como Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ª Edición)", Cold Spring Harbor Laboratory Press; y Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", Maruzen Co., Ltd.

[0032] La molécula de ácido nucleico novedosa que tiene actividad de APES o una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia complementaria a la molécula es una característica importante de la presente invención.

En una realización, la APES es una molécula de ácido nucleico que tiene la función de suprimir la expresión de NfkBia o aumentar la producción de un polipéptido recombinante y es un ARN o ADN que se puede unir al ADN o ARNm del gen de NfkBia derivado de ser humano, ratón, rata o hámster por emparejamiento de bases. Se considera que semejante molécula de ácido nucleico comprende una secuencia homóloga o complementaria al ARNm que codifica NfkBia y se puede unir al gen o al ARNm de NfkBia e inhibir su expresión.

En una realización, APES es un ARN pequeño de 19 a 25 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia complementaria a una parte del ARNm de NfkBia, o un ARN pequeño que tiene una secuencia idéntica a la secuencia a excepción de un nucleótido y tiene la función de suprimir la expresión de NfkBia o incrementar la producción de polipéptidos recombinantes. El ARN pequeño al que se hace referencia en la presente memoria representa un ARN no codificante, pequeño (ARNnp), y el ARNnp abarca miARN.

En una realización, APES es un ARN no codificante de tipo ARNm de 561 nucleótidos de longitud como máximo o de 500 nucleótidos de longitud como máximo que comprende la secuencia complementaria a una parte del ARNm de NfkBia (por ejemplo, la secuencia es una secuencia de ARN no codificante pequeño como se describe anteriormente).

En una realización, APES es un ARN no codificante de tipo ARNm de 561 a 1579 nucleótidos de longitud o de 500 a 1000 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia complementaria a una parte del ARNm de NfkBia (por ejemplo, la secuencia es una secuencia de ARN no codificante pequeño como se describe anteriormente).

Un ejemplo específico de APES que se encontró en el transcrito en células CHO tiene una secuencia parcial derivada de AI462015 de ratón o una secuencia parcial semejante en la que se han sustituido, suprimido o añadido uno o varios nucleótidos. En particular, se incluye una secuencia de ADN de 165 nucleótidos que consiste en la secuencia de nucleótidos entre la G del nucleótido 4 y la C del nucleótido 168 del extremo 5' (SEQ ID NO: 2, APES165); la secuencia de ADN complementaria (antisentido) de la secuencia de ADN; una secuencia que comprende una secuencia de ARN transcrita a partir de estos ADN; o una secuencia parcial de cualquier longitud de secuencia. Alternativamente, se incluye una secuencia de ADN de 434 nucleótidos que consiste en la secuencia de nucleótidos entre la G del nucleótido 4 del extremo 5' y la T del extremo 3' (SEQ ID NO: 3, APES434); la secuencia de ADN complementaria (antisentido) de la secuencia de ADN; una secuencia que comprende una secuencia de ARN transcrita a partir de estos ADN; o una secuencia parcial de cualquier longitud derivada de la secuencia. También se incluye una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia derivada de un mamífero tal como un ser humano, hámster o rata que corresponde a la secuencia de AI462015 de ratón; una secuencia parcial de la secuencia que comprende la secuencia derivada de mamífero; o una secuencia parcial semejante en la que uno o varios nucleótidos se han sustituido, suprimido o añadido.

En una realización, APES tiene la secuencia de nucleótidos entre los nucleótidos 4 y 133 de el extremo 5' (SEQ ID NO: 4, APES130), en AI462015 o una secuencia parcial derivada de la secuencia. Por ejemplo, se incluye la secuencia de ADN entre los nucleótidos 4 y 68 del extremo 5' (SEQ ID NO: 5, APES4-68) o la secuencia de ADN entre los nucleótidos 69 y 133 del extremo 5' (SEQ ID NO: 6, APES69-133) o la secuencia de ADN complementaria de la misma, o una secuencia transcrita a partir de estos ADN.

En una realización, APES tiene la secuencia de 52 nucleótidos entre los nucleótidos 40 y 91 desde el extremo 5' (SEQ ID NO: 7) en AI462015 o una secuencia derivada de una secuencia parcial obtenida por escisión de los 52 nucleótidos en cualquier ubicación. Por ejemplo, se incluye la secuencia de ADN de la parte anterior (los 29 nucleótidos de APES40-68, los 24 nucleótidos de APES40-63, o los 22 nucleótidos de APES40-61) o la última parte (los 23 nucleótidos de APES69-91) o la secuencia de ADN complementaria del mismo (correspondiente a los SEQ ID NO: 8 a 11, respectivamente) o una secuencia transcrita a partir de estos ADN.

Los 52 nucleótidos descritos anteriormente son una secuencia idéntica a la de la hebra complementaria de la región no traducida 3' del gen de NfkBia de rata, excepto por un nucleótido. Los 24 nucleótidos 5' (APES40-63, SEQ ID NO: 9) son una secuencia idéntica a la de la región no traducida 3' del gen de NfkBia humano. Los 22 nucleótidos 5' (APES40-61, SEQ ID NO: 10: AAGTACCAAAATAATTACCAAC) son una secuencia idéntica a la de la hebra complementaria de la región no traducida 3' del ARNm de NfkBia independientemente de la especie, tal como rata, mono rhesus, perro y caballo. Se espera que el efecto del ARNi se produzca mediante la expresión en células anfitrionas de una secuencia parcial complementaria a la región no traducida 3' del gen de NfkBia. Por ejemplo, es posible que un RNA que tenga una secuencia complementaria a 19 a 25 nucleótidos de los 52 nucleótidos anteriores actúe como un microARN (miARN) en la región no traducida del ARNm de NfkBia, interfiriendo de ese modo en el proceso de traducción.

Alternativamente, APES tiene la secuencia de 85 nucleótidos entre los nucleótidos 7 y 91 desde el extremo 5' (SEQ ID NO: 29) en AI462015 o una secuencia derivada de una secuencia parcial obtenida por escisión de los 85 nucleótidos en cualquier ubicación. Es posible que un ARN que tenga una secuencia complementaria a 19 a 25 nucleótidos de los 85 nucleótidos anteriores actúe como un microARN (miARN) en la región no traducida del ARNm de NfkBia, interfiriendo de ese modo en el proceso de traducción.

En una realización, APES tiene una secuencia encontrada en una búsqueda de ARNip de 21 nucleótidos. Los ejemplos incluyen secuencias de miARN que comprenden la secuencia complementaria a la secuencia de ADN entre los nucleótidos 84 y 104 (SEQ ID NO: 12, APES84-104) en AI462015, la secuencia de ADN entre los nucleótidos 99 y 119 (SEQ ID NO: 13, APES99-119) o la secuencia de ADN entre los nucleótidos 101 y 121 (SEQ ID NO: 14, APES101-121). La secuencia entre los nucleótidos 71 y 112 (SEC ID NO: 16) en los APES 69-133 anteriores es una región que ha sido cuantificada en GeneChip y en efecto se expresa en un nivel alto. Por lo tanto, se considera que es muy posible que APES84-104 funcione como un miARN.

Adicionalmente, basándose en la característica estructural o funcional de APES, se puede sintetizar químicamente una nueva molécula de ácido nucleico que tiene actividad APES o se puede aislar a partir de fuentes biológicas. La característica estructural de APES es que es una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia complementaria a una parte del ARNm de NfkBia diana. La molécula de ácido nucleico puede estar en cualquier forma, independientemente de cuestiones tales como si se trata de un ADN, un transcrito de ADN, ARNm o ADNc, ARN de exosoma, ARN de hebra sencilla sintetizado químicamente, o ARN de doble hebra sintetizado químicamente. La característica funcional es el aumento de la capacidad de producir un polipéptido recombinante tal como un anticuerpo o la supresión de la expresión de NfkBia, asociado con la expresión de APES en células anfitrionas.

Si APES se aísla de una fuente biológica, puede derivar de cualquier organismo vivo, sin ninguna limitación

particular. Los ejemplos específicos incluyen APES derivadas de animales, incluyendo primates, tales como seres humanos y chimpancés; roedores, tales como ratón, rata y hámster; ganado tal como vacas, cerdos y cabras; aves tales como pollos; peces tales como peces cebra; insectos tales como moscas; nematodos; y similares. La APES deriva preferiblemente de seres humanos, roedores, o de la misma especie que la célula anfitriona. Por ejemplo, cuando una célula que expresa fuertemente APES es una célula de ovario de hámster chino (células CHO), la APES deriva preferiblemente de ser humano, ratón o hámster.

Semejante molécula de ácido nucleico se puede preparar por un método conocido por el experto en la técnica. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico se puede preparar de acuerdo con los procedimientos siguientes: preparación de ARN total a partir de una célula cultivada que ha producido un polipéptido recombinante tal como un anticuerpo a un alto nivel, síntesis de un oligonucleótido basándose en una secuencia de ácido nucleico de la presente invención (p. ej., APES 165 del SEQ ID NO: 2), y realización de PCR utilizando el oligonucleótido como un cebador para amplificar el ADNc que tiene las características de APES. Adicionalmente, después de la preparación de un ARN pequeño a partir de la célula cultivada que ha producido un polipéptido recombinante tal como un anticuerpo a un alto nivel, se puede preparar una biblioteca de ADNc para producir un ARN pequeño que comprende una secuencia parcial complementaria al ARNm de NfkBia basándose en la secuencia de nucleótidos de un ADNc clonado. La biblioteca de ADNc también puede ser construida por un método descrito, por ejemplo, por Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), después de preparar un ARN pequeño tal como un microARN (miARN).

Además, se puede aislar un ADN genómico que expresa APES mediante la determinación de la secuencia de nucleótidos del ADNc obtenido y el escrutinio de una biblioteca de ADN genómico utilizando el ADNc como sonda.

En concreto, se pueden utilizar los siguientes procedimientos: en primer lugar, el ARN total se aísla de células, tejidos o similares que son propensos a expresar la APES de la presente invención; para el aislamiento del ARNm, se utiliza un método conocido tal como el método de ultracentrifugación de guanidina (Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299) o el método AGPC (Chomczynski, P. y Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159) para preparar el ARN total, y luego el ARN total se purifica adicionalmente utilizando RNeasy Mini Kit (QIAGEN) o similares.

A partir del ARN total obtenido, se sintetiza ADNc utilizando una transcriptasa inversa. El ADNc también se puede sintetizar utilizando SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) o similares. También es posible sintetizar y amplificar ADNc de acuerdo con el método 5'-RACE (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 8.998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) utilizando 5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con un cebador y similares.

Se prepara un fragmento de ADN de interés a partir del producto de PCR resultante y se liga a un ADN vector para preparar de ese modo un vector recombinante. El vector se introduce en *E. coli* o similares, y, a continuación, las colonias obtenidas se seleccionan para preparar un vector recombinante deseado. La secuencia de nucleótidos del ADN de interés puede ser confirmada por un método conocido tal como el método de terminación de la cadena de didesoxinucleótidos.

El ADN obtenido puede ser modificado utilizando un kit disponible comercialmente o un método conocido. Semejante modificación es, por ejemplo, la introducción de polimorfismos de un único nucleótido utilizando el método de mutagénesis dirigida al sitio, o similar. Las secuencias modificadas de ese modo también se incluyen en el alcance de la presente invención, siempre que tengan actividad APES.

Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "tiene (o que tiene) actividad APES" se refiere a que tiene la acción de supresión de la expresión de NfkBia en una célula anfitriona cultivada para activar de ese modo NF-kappa B y por lo tanto aumentar la capacidad de producción de polipéptido recombinante. La expresión se refiere de manera unívoca a que tiene la función de suprimir la expresión de NfkBia por medio de la expresión del sujeto en una célula.

En algunos casos, una molécula de ácido nucleico que tiene actividad APES es referida en la presente memoria como molécula de ácido nucleico de la presente invención.

(2) Expresión de APES

En la presente invención, se encontró que mediante el uso de células que expresan APES, preferiblemente, células que expresan APES fuertemente, se aumenta la cantidad de polipéptidos producidos por las células.
Una célula que expresa fuertemente APES representa una célula en la que se ha introducido artificialmente APES utilizando un vector o similar, y la expresión fuerte de APES significa que el nivel de expresión de APES se ha incrementado en comparación con una célula original en la que gen del anticuerpo todavía no se ha introducido. Los ejemplos de la célula original incluyen, pero no se limitan particularmente a, células para su uso como anfitrionas (p.

ej., células CHO) en la producción de proteínas recombinantes. Si esto se explica con referencia a los Ejemplos descritos más adelante, un ejemplo específico es el siguiente: en un experimento GeneChip utilizando una matriz de oligonucleótido producida por AFFYMETRIX, Inc. (Affymetrix MOUSE430_2), los valores de señal de AI462015 son 2.000 o menos en las células originales en las que aún no se ha introducido el gen de anticuerpo. Un aumento del nivel de expresión de APES en comparación con los valores significa que un valor de señal de AI462015 es, por ejemplo, dos veces superior a esos valores o más.

Una célula que expresa fuertemente APES comprende APES endógenas o exógenas en la célula. Los ejemplos de la célula que expresa fuertemente APES incluyen células en las que se ha introducido artificialmente APES.

Una célula en la que se ha introducido artificialmente APES se puede preparar por un método conocido por el experto en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede preparar mediante la incorporación de una secuencia de ADN que codifica APES a un vector y la transformación del vector en una célula.

La célula en la que se ha introducido artificialmente APES, referida en la presente memoria, abarca adicionalmente células en las que una APES endógena ha sido activada por medio de tecnología de activación de genes (remítase, por ejemplo, al folleto de la Publicación Internacional Núm. WO 94/12650) que da como resultado una fuerte expresión de APES.

Un ejemplo típico de APES endógena es una APES en forma de una secuencia de ADN codificada en el genoma de la célula anfitriona. En la presente invención, también se pueden utilizar células en las que después de la introducción del gen del anticuerpo, se ha activado la transcripción de la APES endógena debido a algún factor sin el uso de ninguna tecnología de activación de genes, dando como resultado una fuerte expresión.

Un vector en el que se ha insertado una secuencia de ADN que codifica APES también entra dentro del alcance de la presente invención. El vector de la presente invención es útil para la retención de la molécula de ácido nucleico de la presente invención dentro o fuera de una célula anfitriona y la expresión de la molécula de ácido nucleico de la presente invención. El vector de la presente invención también es útil para permitir que una célula anfitriona exprese APES fuertemente. Al permitir que una célula anfitriona exprese APES fuertemente, puede aumentar la cantidad de un polipéptido deseado producido por la célula anfitriona.

Por ejemplo, cuando *E coli* se utiliza como una célula anfitriona, se prefiere que el vector tenga un "ori" para la amplificación en *E coli* (p. ej., JM109, DH5a, HB101, XL1Blue) para lograr la amplificación y la preparación de una gran cantidad del vector en *E coli* o similar, y también tenga un gen para la selección en *E coli* transformada (p. ej., un gen de resistencia a fármacos que permita la discriminación utilizando algún fármaco (ampicilina, tetraciclina, kanamicina, cloranfenicol)). Los ejemplos del vector incluyen vectores M13, vectores pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script, y similares. Además de estos vectores, se enumeran pGEM-T, pDIRECT, pT7 y similares si se utilizan los vectores para la subclonación y la escisión de ADNc.

(3) Vector de expresión

En la presente invención, cuando se utiliza un vector para la expresión fuerte de APES y/o la producción de polipéptido, es especialmente útil un vector de expresión. Los ejemplos del vector de expresión que se puede utilizar en la presente invención incluyen vectores de expresión derivados de mamíferos (p. ej., pcDNA3 (Invitrogen), pEGF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990, 18(17), p5322), pEF, pCDM8), vectores de expresión derivados de células de insectos (p. ej., "sistema de expresión de baculovairus Bac-to-Bac" (GIBCO BRL), pBacPAK8), vectores de expresión derivados de plantas (p. ej., pMH1, pMH2), vectores de expresión derivados de virus animales (p. ej., pVHS, pMV, pAdexLcw), vectores de expresión derivados de retrovirus (p. ej., pZIpneo), vectores de expresión derivados de levadura (p. ej., "Pichia Expression Kit" (Invitrogen), pNV11, SP-Q01), vectores de expresión derivados de *Bacillus subtilis* (p. ej., pPL608, pKTH50), y similares.

El vector de expresión para expresar un polipéptido exógeno comprende un ADN que codifica el polipéptido y una secuencia reguladora de la expresión capaz de promover la expresión del ADN. Del mismo modo, el vector de expresión para expresar APES comprende un ADN que codifica APES y una secuencia reguladora de la expresión capaz de promover la expresión del ADN. Se puede construir un único vector para expresar tanto un polipéptido como APES. Por ejemplo, si un gen de APES o polipéptido que es parte del genoma del anfitrión se activa mediante la tecnología de activación de genes, se puede introducir una secuencia reguladora de la expresión que promueve la expresión de semejante ADN derivado de una célula anfitriona.

Los ejemplos de la secuencia reguladora de la expresión incluyen un promotor, un potenciador, terminador de la transcripción, una secuencia de Kozak que contiene un codón de inicio (es decir, ATG) en un gen que codifica la proteína, una señal de corte y empalme para el intrón, un sitio de poliadenilación, un codón de parada apropiados, y similares. El vector puede ser construido adecuadamente por el experto en la técnica.

La secuencia reguladora de la expresión contiene preferiblemente una región promotora/potenciadora capaz de aumentar el nivel de transcripción génica en la célula animal en la que se vaya a utilizar. La región promotora/potenciadora implicada en la expresión de un gen que codifica un polipéptido deseado puede contener una secuencia de unión a NF-kB.

Cuando se pretende la expresión en células de mamífero tales como células CHO, células COS y células NIH3T3, el vector tiene preferiblemente un promotor necesario para la expresión en las células, tal como el promotor de SV40 (Mulligan et al., Nature (1979) 277, 108), el promotor de MMLV-LTR, el promotor de EF1α (Mizushima et al., Nucleic Acids Res. (1990)18, 5322) o el promotor de CMV. Más preferiblemente, el vector también tiene un gen para la selección de la transformación en células (p. ej., un gen de resistencia a fármacos que permite la discriminación utilizando un fármaco (p. ej., neomicina, G418)). Los ejemplos del vector que tiene tales características incluyen pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV, pOP13 y similares.

Además, cuando se pretenden la expresión estable de un gen y la amplificación intracelular del número de copias del gen, se puede utilizar un método en el que, en células CHO que carecen de una vía de síntesis de ácido nucleico, se introduce un vector que tiene el gen de DHFR que complementa la carencia (p. ej., pCHOI), seguido de la amplificación con metotrexato (MTX). Cuando se pretende la expresión transitoria de un gen, se puede utilizar un método en el que células COS que llevan un gen que expresa el antígeno T de SV40 en el cromosoma se transforman con un vector que tiene el origen de replicación de SV40 (p. ej., pcD). En cuanto al origen de replicación, también se puede utilizar un origen de replicación derivado de poliomavirus, adenovirus, virus del papiloma bovino (BPV) o similar. Además, para amplificar el número de copias del gen en un sistema de células anfitrionas, el vector de expresión puede contener un marcador de selección tal como el gen de la aminoglucósido transferasa (APH), el gen de la timidina quinasa (TK), el gen de la xantina-guanina fosforribosil transferasa de *E. coli* (Ecogpt), o el gen de la dihidrofolato reductasa (dhfr).

(4) Célula anfitriona

La célula que se utiliza en la presente invención puede ser o bien una célula natural capaz de producir un polipéptido deseado o bien una célula en la que se ha introducido un ADN que codifica un polipéptido deseado. Preferiblemente, se utiliza una célula transformada en la que se ha introducido un ADN que codifica un polipéptido deseado.

Un ejemplo de la célula transformada en la que se ha introducido un ADN que codifica un polipéptido deseado es una célula anfitriona que ha sido transfectada con un vector de expresión que contiene al menos un ADN que codifica un polipéptido deseado y que ha expresado fuertemente APES endógenos o exógenos.

Adicionalmente, en la presente invención, la célula en la que "se ha introducido un ADN (o un gen)" abarca las células transfectadas con ADN exógeno, así como células en las que el ADN endógeno se ha activado mediante la tecnología de activación de genes (remitirse, por ejemplo, al folleto de la Publicación Internacional Núm. WO 94/12650) que da como resultado la expresión de una proteína correspondiente al DNA o el inicio o aumento de la transcripción del ADN.

Cuando una célula en la que se ha introducido APES artificialmente se utiliza para producir un polipéptido deseado, la secuencia de introducción de APES y un gen que codifica el polipéptido deseado no está particularmente limitada; APES puede ser introducida antes de la introducción del gen que codifica el polipéptido deseado, o el gen que codifica el polipéptido deseado puede ser introducido antes de la introducción de APES. Alternativamente, APES y el gen que codifica el polipéptido deseado se pueden introducir de forma simultánea.

Cuando se utiliza un vector, APES y el gen que codifica el polipéptido deseado se pueden introducir de forma simultánea utilizando un único vector, o se pueden introducir por separado utilizando una pluralidad de vectores.

La célula que se va a utilizar en la presente invención no está particularmente limitada. Puede ser cualquier célula tal como una célula eucariota (p. ej., célula animal, célula vegetal, levadura) o una célula procariota (p. ej., *E coli* y *B. subtilis*). Se prefieren las células animales derivadas de insectos, peces, anfibios, reptiles y mamíferos, y son particularmente preferidas las células de mamíferos. Los orígenes de las células de mamífero son primates, tales como seres humanos y chimpancés, roedores, tales como ratón, rata y hámster, y similares, preferiblemente seres humanos y roedores. Adicionalmente, se prefiere que las células de la presente invención sean células de mamífero cultivadas que por lo general se utilizan a menudo para la expresión de polipéptidos, tales como células CHO, células COS, células 3T3, células de mieloma, células BHK, células HeLa y células Vero. Para la expresión de una gran cantidad de un polipéptido deseado, se utilizan de forma especialmente preferente las células CHO. En particular, se pueden utilizar ventajosamente células dhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220), que son células CHO que carecen del gen de DHFR, o CHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) como células CHO.

En particular, se prefiere la cepa DG44, la cepa DXB-11, K-1 o CHO-S como célula CHO anterior, y es

particularmente preferida la cepa DG44 o DXB-11.
La célula anfitriona de la presente invención se puede utilizar, por ejemplo, como un sistema de producción para la producción o expresión de un polipéptido deseado. Si un ADN que codifica un polipéptido deseado se introduce en una célula anfitriona que expresa fuertemente APES, el polipéptido deseado puede ser producido a un nivel alto. En la célula anfitriona de la presente invención, se puede introducir adicionalmente un ADN que codifica un transportador de taurina (TauT) o un intercambiador de aniones (AE1) (el ADN puede incorporarse en un vector). En la célula anfitriona de la presente invención, se puede introducir adicionalmente un ADN que codifica ácido cisteín-sulfínico descarboxilasa (CSAD) o alanina transferasa (ALT1). Para más detalles, remitirse a los documentos WO 2007/119774, WO 2008/114673, WO 2009/020144 y WO 2009/054433.

El ADN exógeno (que puede estar incorporado en un vector) se puede introducir en la célula anfitriona mediante un método tal como el método de fosfato de calcio, el método de DEAE dextrano, un método que utiliza DOTAP catiónico ribosomal (Boehringer Mannheim), la electroporación, el método Nucleofection (Amaxa), o la lipofección.

(5) Polipéptido previsto

El polipéptido que va a ser producido por el método de la presente invención no está particularmente limitado. Puede ser cualquier polipéptido tal como un anticuerpo (p. ej., anticuerpo anti-receptor de IL-6, anticuerpo anti-IL-6, anticuerpo anti-glipicano-3, anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-GPIIb/IIIa, anticuerpo anti-TNF, anticuerpo anti-CD25, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo anti-Her2/neu, anticuerpo anti-RSV, anticuerpo anti-CD33, anticuerpo anti-CD52, anticuerpo anti-IgE, anticuerpo anti-CD11a, anticuerpo anti-VEGF, anticuerpo anti-VLA4) o una proteína fisiológicamente activa (p. ej., factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), eritropoyetina, interferón, interleuquina (p. ej., IL-1, IL-6), t-PA, uroquinasa, albúmina de suero, factor de coagulación de la sangre, PTH). Es particularmente preferido un anticuerpo, y puede ser cualquier anticuerpo tal como un anticuerpo natural, un anticuerpo de bajo peso molecular (p. ej., Fab, scFv, sc(Fv)2), un anticuerpo quimérico, o un anticuerpo humanizado.

(6) Producción de polipéptido

Un polipéptido de interés puede ser obtenido mediante el cultivo de la célula anfitriona descrita anteriormente, la producción de un polipéptido deseado y la recogida del polipéptido.

Para cultivar la célula, se pueden utilizar los medios que se utilizan en cultivos celulares comunes (preferentemente, células animales). Estos medios contienen generalmente aminoácidos, vitaminas, factores lipídicos, fuentes de energía, reguladores osmóticos, fuentes de hierro y tamponadores de pH. En general, es apropiado que el contenido de estos componentes se encuentre dentro de los intervalos siguientes: aminoácidos 0,05-1500 mg/L, vitaminas 0,001 a 10 mg/L, factores lipídicos 0-200 mg/L, fuentes de energía 1-20 g/L, reguladores osmóticos 0,1-10.000 mg/L, fuentes de hierro 0,1-500 mg/L, tamponadores de pH 1-10.000 mg/L, oligoelementos metálicos 0,00001-200 mg/L, tensioactivos 0-5000 mg/L, cofactores de crecimiento 0.05-10.000 µg/L y nucleósidos 0,001-50 mg/L. Sin embargo, el contenido no se limita a estos intervalos y se pueden determinar apropiadamente dependiendo del tipo de la célula que se vaya a cultivar, el tipo del polipéptido deseado, y similares.

Además de los componentes descritos anteriormente, por ejemplo, se pueden añadir oligoelementos metálicos, agentes tensioactivos, cofactores de crecimiento, nucleósidos y similares.

Los ejemplos específicos incluyen aminoácidos tales como L-alanina, L-arginina, L-asparragina, ácido L-aspártico, L-cisteína, L-cistina, L-glutamina, ácido L-glutámico, glicina, L-histidina, L-isoleucina , L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-ornitina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina y L-valina (preferiblemente, L-alanina , L-arginina, L-asparragina, ácido L-aspártico, L-cistina, L-glutamina, ácido L-glutámico, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina y L-valina); vitaminas, tales como i-inositol, biotina, ácido fólico, ácido lipoico, nicotinamida, ácido nicotínico, ácido p-aminobenzoico, pantotenato de calcio, hidrocloruro de piridoxal, hidrocloruro de piridoxina, riboflavina, hidrocloruro de tiamina, vitamina B12 y ácido ascórbico (preferiblemente, biotina, fólico ácido, ácido lipoico, nicotinamida, pantotenato de calcio, hidrocloruro de piridoxal, riboflavina, hidrocloruro de tiamina, vitamina B12 y ácido ascórbico); factores lipídicos, tales como cloruro de colina, tartrato de colina, ácido linoleico, ácido oleico y colesterol (preferiblemente, cloruro de colina); fuentes de energía, tales como glucosa, galactosa, manosa y fructosa (preferiblemente, glucosa); reguladores osmóticos, tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio y nitrato de potasio (preferiblemente, cloruro de sodio); fuentes de hierro, tales como EDTA-hierro, citrato férrico, cloruro ferroso, cloruro férrico, sulfato ferroso, sulfato férrico y nitrato férrico (preferiblemente, cloruro férrico, EDTA-hierro y citrato férrico); y tamponadores de pH tales como hidrogenocarbonato de sodio, cloruro de calcio, dihidrogenofosfato de sodio, HEPES y MOPS (preferiblemente, hidrogenocarbonato de sodio). Los medios que contienen uno cualquiera de estos componentes se pueden proporcionar como ejemplos.

Además de los componentes anteriores, por ejemplo, se pueden añadir los siguientes componentes: oligoelementos

metálicos, tales como sulfato de cobre, sulfato de manganeso, sulfato de zinc, sulfato de magnesio, cloruro de níquel, cloruro de estaño, cloruro de magnesio y subsilicato de sodio (preferiblemente, sulfato de cobre, sulfato de cinc y sulfato de magnesio); tensioactivos tales como Tween 80 y Pluronic F68; cofactores de crecimiento, tales como insulina recombinante, IGF-1 recombinante, EGF recombinante, FGF recombinante, PDGF recombinante, TGF-α recombinante, hidrocloruro de etanolamina, selenito de sodio, ácido retinoico y clorhidrato de putrescina (preferiblemente, selenito de sodio, hidrocloruro de etanolamina, IGF-1 recombinante y clorhidrato de putrescina); nucleósidos tales como desoxiadenosina, desoxicitidina, desoxiguanosina, adenosina, citidina, guanosina y uridina; y similares. Es de señalar que en los ejemplos preferidos de los medios anteriores puede estar contenido un antibiótico tal como estreptomicina, penicilina G potasio o gentamicina o un indicador de pH tal como Rojo Fenol.

El pH del medio varía dependiendo de la célula que se vaya a cultivar. Generalmente es apropiado un pH de 6,8-7,6 y en muchos casos es apropiado un pH de 7,0-7,4.

También es posible utilizar un medio comercialmente disponible para el cultivo de células animales, tal como D-MEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco), Mezcla de D-MEM/F-12 1:1 (Medio de Eagle modificado por Dulbecco:Mezcla de nutrientes F-12) , RPMI1640, CHO-S-SFM II (Invitrogen), CHO-SF (Sigma-Aldrich), EX-CELL 301 (JRH Biosciences), CD-CHO (Invitrogen), IS CHO-V (Irvine Scientific) o PF-ACF-CHO (Sigma-Aldrich).

El medio puede ser un medio libre de suero.

Cuando la célula anfitriona es una célula CHO, se puede utilizar un método conocido por el experto para cultivar las células CHO. Por ejemplo, las células CHO se pueden cultivar generalmente en una atmósfera de fase gaseosa a una concentración de CO_2 de 0 a 40%, preferiblemente 2 a 10%, de 30 a 39°C, preferiblemente a aproximadamente 37°C.

Un período de cultivo apropiado para la producción de un polipéptido deseado es normalmente de 1 día a 3 meses, preferiblemente de 1 día a 2 meses, más preferentemente de 1 día a 1 mes.

En cuanto a los diversos dispositivos de cultivo para el cultivo de células animales, se pueden utilizar los siguientes dispositivos para el cultivo: por ejemplo, dispositivos de cultivo en tanques de tipo fermentador, dispositivos de cultivo de tipo bomba de aire, dispositivos de cultivo de tipo matraz de cultivo, dispositivos de cultivo de tipo matraz de agitación, dispositivos de cultivo de tipo microportadores, dispositivos de cultivo de tipo lecho fluidificado, dispositivos de cultivo de tipo fibra hueca, dispositivos de cultivo de tipo botella rodadora y dispositivos de cultivo de tipo de lecho denso.

El cultivo se puede realizar por cualquier método tal como el cultivo discontinuo, el cultivo alimentado por lotes o el cultivo continuo. Entre ellos, se prefiere el cultivo de alimentación por lotes o el cultivo continuo, y es más preferido el cultivo de alimentación por lotes.

El polipéptido obtenido puede ser aislado desde el interior de una célula anfitriona o desde su exterior (p. ej., medios) y purificado a un polipéptido sustancialmente puro y homogéneo. El aislamiento y la purificación del polipéptido se pueden realizar utilizando un método de aislamiento y purificación común en la purificación de polipéptidos, y no está limitado de ninguna manera. Por ejemplo, los polipéptidos pueden ser aislados y purificados por la selección y la combinación de columnas cromatografía, filtros, ultrafiltración, precipitación por adición de sal, precipitación de disolvente, extracción con disolvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, isoelectroenfoque, diálisis, recristalización, y similares apropiados.

Los ejemplos de la cromatografía incluyen cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía de adsorción, y similares (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed. Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Estas cromatografías se pueden llevar a cabo utilizando la cromatografía en fase líquida tal como HPLC o FPLC. La presente invención también abarca polipéptidos altamente purificados por estos métodos de purificación.

Se debe observar que antes o después de la purificación de polipéptidos, también es posible realizar modificaciones opcionales o eliminar un péptido parcial permitiendo que una enzima de modificación del polipéptido apropiada actúe sobre el polipéptido. Los ejemplos de las enzimas de modificación de polipéptidos incluyen tripsina, quimotripsina, lisil endopeptidasa, proteína quinasa, glucosidasa, y similares.

(7) Productos farmacéuticos

Cuando el polipéptido producido por el método de la presente invención tiene una actividad biológica que puede ser utilizada como un medicamento, el polipéptido puede ser mezclado con un portador o aditivo farmacéuticamente aceptable y formulado para producir un producto farmacéutico.

Los ejemplos del portador o aditivo farmacéuticamente aceptables incluyen agua, disolventes orgánicos farmacéuticamente aceptables, colágeno, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, polímeros de carboxivinilo, carboximetil celulosa de sodio, poli(acrilato de sodio), alginato de sodio, dextrano soluble en agua, sal de sodio de carboximetil almidón, pectina, metilcelulosa, etil celulosa, goma de xantana, goma arábiga, caseína, agar, polietilenglicol, diglicerina, glicerina, propilenglicol, vaselina, parafina, alcohol estearílico, ácido esteárico, albúmina de suero humano (HSA), manitol, sorbitol, lactosa, tensioactivos aceptables como aditivos farmacéuticos, y similares.

El aditivo real se selecciona entre los aditivos anteriores, ya sea solos o en una combinación apropiada, de acuerdo con la forma de dosificación del agente terapéutico de la presente invención, pero el aditivo real definitivamente no se limita al mismo. Por ejemplo, en caso de utilizarlo como una formulación para inyección, se puede utilizar un material que se obtiene disolviendo el polipéptido purificado en un disolvente tal como solución salina fisiológica, una solución tampón o una solución de glucosa y añadiendo después a la solución resultante un inhibidor de la adsorción tal como Tween 80, Tween 20, gelatina o albúmina de suero humano. Alternativamente, se puede utilizar un material secado por congelación para preparar una forma de dosificación que se disuelve y se reconstituye antes de su uso, y un excipiente que se puede utilizar para el secado por congelación es, por ejemplo, un alcohol de azúcar o un azúcar, tal como manitol o glucosa.

La cantidad eficaz de la administración del polipéptido se selecciona apropiadamente de acuerdo con el tipo de polipéptido, el tipo de enfermedades que se vaya a tratar o prevenir, la edad de los pacientes, la gravedad de las enfermedades, y similares. Por ejemplo, cuando el polipéptido es un anticuerpo anti-glipicano, la cantidad eficaz de administración se selecciona en el intervalo de 0,001 mg a 1000 mg por kg de peso corporal por administración. Alternativamente, se puede seleccionar una cantidad de administración de 0,01 a 100.000 mg/organismo por paciente. Sin embargo, la cantidad eficaz no se limita a estos intervalos.

El polipéptido se puede administrar por vía oral o parenteral, pero se prefiere la administración parenteral. Los ejemplos específicos incluyen la inyección (p. ej., la administración sistémica o local por medio de inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea o similares), la administración transnasal, la administración transpulmonar, la administración percutánea y similares.

(8) Supresión de la expresión de NfkBia

De acuerdo con la presente invención, en el método de producción de un polipéptido deseado mediante el cultivo de una célula animal en la que se ha introducido un ADN que codifica el polipéptido, la cantidad de producción del polipéptido deseado se puede aumentar al disminuir el nivel de expresión del inhibidor α del factor nuclear kappa β (NfkBia) en la célula anfitriona. El gen de NfkBia es un gen esencial, y la supresión completa del gen conduce a la muerte celular. Por lo tanto, es concebible que la supresión de la expresión del gen de NfkBia moderadamente sea importante en el método de la presente invención.

Por estas razones, la presente descripción incluye el método de producción de un polipéptido deseado mediante el cultivo de una célula animal en la que se ha introducido un ADN que codifica el polipéptido, que comprende la etapa de disminuir el nivel de expresión de NfkBia en la célula a un nivel más bajo que el de una célula parental en la que aún no se ha introducido el gen de anticuerpo.

Como un método para disminuir la expresión de NfkBia, la expresión puede ser inhibida por la inhibición de la transcripción del gen de NfkBia, la degradación del ARNm, la inhibición de la traducción del ARNm, o la inhibición de la función (unión) del producto de la traducción. En comparación con los casos en los que no se utiliza este método para disminuir la expresión NfkBia, el nivel de expresión de NfkBia se controla a 70% o menos, preferiblemente 60% o menos, más preferiblemente 50% o menos, lo que da como resultado el aumento de la cantidad de producción del polipéptido deseado. En otras palabras, el nivel de expresión del gen de NfkBia necesario para evitar la muerte celular es, por ejemplo, 20% o más, preferiblemente 30% o más.

Se considera que un medio específico para la inhibición de la expresión de NfkBia es la utilización de un oligonucleótido antisentido, una ribozima o una molécula de ácido nucleico que provoca la interferencia del ARN (ARNi), tal como ARNdh, ARNip, ARNhc o miARN. También se pueden utilizar ARN no codificantes de tipo ARNm que se denominan "ARN no codificantes largos intergénicos (o intermedios) grandes (ARNlnci)", otros ARN no codificantes de tipo ARNm, oligos de señuelo o aptámeros. Estas moléculas de ácido nucleico comprenden cada una una secuencia homóloga o complementaria al ARNm que codifica NfkBia, y se pueden unir al gen o al ARNm de NfkBia e inhibir su expresión. APES (o PPES) es una de tales moléculas de ácido nucleico.

La molécula de ácido nucleico que se puede utilizar para inhibir la expresión de NfkBia es, por ejemplo, un ARN pequeño de 19 a 25 nucleótidos de longitud que comprende la secuencia complementaria a una parte del ARNm de NfkBia, o un ARN pequeño que tiene una secuencia idéntica a la secuencia a excepción de un nucleótido y tiene la función de inhibir la expresión de NfkBia.

Al expresar en una célula anfitriona semejante ARN pequeño que inhibe la expresión de NfkBia, el nivel de expresión del inhibidor α del factor nuclear kappa B (NfkBia) puede disminuir. Un método típico para la expresión en una célula anfitriona del ARN pequeño que inhibe la expresión de NfkBia puede ser la introducción de un vector que comprende un ADN que codifica semejante ARN pequeño en la célula.

También es posible inhibir la expresión de NfkBia mediante la introducción en la célula de un ARNdh formado por la unión de un ARN efector y un ARN antisentido contra NfkBia, ARNm o una secuencia parcial del mismo entre sí.

Antes de medir el nivel de expresión de NfkBia, se tiene que determinar la secuencia del ARNm de NfkBia que se ha expresado en una célula diana y que puede ser cuantificada mediante un método TaqMan. Por ejemplo, las secuencias parciales de NfkBia (SEQ ID NO: 19 y 28) y el conjunto de sondas TaqMan (SEQ ID NO: 20-22) que se utilizaron en este estudio se pueden mostrar en la Figura 12. Estas sondas TaqMan pueden ser diseñados utilizando Primer Express(R) Software (Applied Biosystems) o similar. La secuencia parcial de NfkBia anterior (SEQ ID NO: 28) también se confirmó como una secuencia de tipo inhibidor alfa de NF-kappa-B en células CHO K1 y coincidía con la secuencia en la clonación por PCR de los autores de la presente invención. En la secuencia, se puede cuantificar la expresión de la región entre los 64 nucleótidos aguas arriba y los 132 nucleótidos aguas arriba del codón de parada TGA (907-909).

Un aparato de medición típico es, por ejemplo, el Sistema de Detección de Secuencias 7900HI producido por Applied Biosystems (ABI), y todos los kits y reactivos se pueden adquirir. Por lo tanto, la cuantificación se puede llevar a cabo de acuerdo con el protocolo recomendado por ABI.

Ejemplos

La presente invención se describe concretamente a continuación con referencia a los Ejemplos mostrados más abajo. Debe tenerse en cuenta que estos Ejemplos se proporcionan para ilustrar la presente invención, no para limitar el alcance de la presente invención.

[Ejemplo 1] Experimento GeneChip para el análisis de diversas células CHO con un gen introducido

Se llevó a cabo un experimento GeneChip de acuerdo con un procedimiento común utilizando una matriz de oligonucleótidos producida por AFFYMETRIX, Inc. (Affymetrix MOUSE430_2), a condición de que, puesto que no se había comercializado ninguna matriz de hámster, se utilizaba Mouse Genome 430 2.0 Array. La optimización de las condiciones de hibridación dio como resultado la detección de las llamadas presentes en 8 de 16 sondas de genes de ratón en la Matriz del Ensayo 3, y se hizo posible cuantificar la expresión del transcrito en hámsters cuando la homología de la secuencia de nucleótidos con secuencias de ratón fue de aproximadamente 90% o más.

A partir de las células que muestran la fuerte expresión de diversos genes, se preparó un ARN total de alta pureza y, a continuación, se sintetizó el ADNc utilizando el ARN total y un cebador oligo dT que contenía una secuencia promotora de T7 (T7 (T)24). A continuación, se sintetizó un ARNc marcado con biotina a partir del ADNc a través de una reacción de transcripción utilizando Bio-11 CTP, Bio-16 UTP y Kit Megascript T7 (Ambion). Después el ARNc se sometió a purificación en columna, el ARNc de alta calidad resultante cuyo peso molecular, confirmado mediante electroforesis, correspondía al de ARNr de 18s a 28s fue fragmentado para preparar muestras GeneChip de un tamaño uniforme. A las muestras GeneChip antes de su uso, se les añadió una solución de muestra de hibridación, seguido por la crioconservación a -80°C. La solución de muestra se trató con calor inmediatamente antes de su uso, se centrifugó y se aplicó a Mouse Genome 430 2.0 Array. La incubación se realizó a 45°C durante 16 horas en un horno especializado para la hibridación, mientras que se hacía rotar las matrices. Las muestras se recuperaron, y las matrices se lavaron varias veces, se tiñeron con estreptavidina R-ficoeritrina y luego se sometieron a barrido.

Los valores de señal de GeneChip de los transcritos en las matrices (aproximadamente 45.000) se compararon, y como resultado, se identificó un ARN no codificante de tipo ARNm UG_GENE = AI462015 (Affymetrix MOUSE430_2, 1420088_AT) como un transcrito cuya expresión era de alta intensidad y aumentaba notablemente en el genoma de ratón en una célula DG44 subcultivada que producía al menos 900 mg/L de MAb1 (anticuerpo anti-IL-6R; tocilizumab, Nombre del producto: Actemra) el 10º día de cultivo de alimentación por lotes en una jarra de 1L y que expresaba fuertemente MAb1 (anticuerpo anti-IL-6R), TAUT y CSAD (Figura 1: la secuencia del transcrito AI462015).

AI462015 es un ARN no codificante de tipo ARNm de 437 nucleótidos y su secuencia existe en la hebra complementaria cerca de la región no traducida 3' (56590831-56590397) del ARNm de NfkBia en el genoma 12 de ratón. Había posibilidades de que el transcrito AI462015 pudiera actuar directamente sobre la región no traducida del ARNm de NfkBia e inhibiera la traducción o que una parte de la secuencia de 437 nucleótidos funcionara como un ARN pequeño y degradara el ARNm de NfkBia.

Por ejemplo, la secuencia de 52 nucleótidos que es la secuencia entre la A en el nucleótido 40 y la A en el nucleótido 91 desde el extremo 5' (AAGTACCAAAATAATTACCAACAAAATACAACATATACAACATTTACAAGAA: SEQ ID NO: 7) en la secuencia de AI462015 se correspondía con la hebra complementaria de la región no traducida 3' del ARNm de NfkBia de rata (1478-1529, ID GEN: 25493 NfkBia) excepto por un nucleótido (la A en el nucleótido 61 del extremo 5' en AI462015). Adicionalmente, la secuencia de 24 nucleótidos que comprende la secuencia entre la A en el nucleótido 40 y la A en el nucleótido 63 (AAGTACCAAAATAATTACCAACAA: SEQ ID NO: 9) en AI462015 es la hebra complementaria de la secuencia parcial de la región no traducida 3' del ARNm de NfkBia humano (TTGTTGGTAATTATTTTGGTACTT, 1490-1513: SEQ ID NO: 24). A la luz de estos puntos, se predijo que de 19 a 25 nucleótidos que forman parte de los 52 nucleótidos actuarían sobre el ARNm de NfkBia de las células CHO, sirviendo como un microARN, o que las secuencias parciales actuarían sobre el ARNm de NfkBia de las CHO células, sirviendo como ARN antisentido.

Adicionalmente, de acuerdo con la información actualizada (Ejemplo 8), por ejemplo, la secuencia de 85 nucleótidos que es la secuencia entre la T en el nucleótido 7 y la A en el nucleótido 91 a partir del extremo 5' (la parte subrayada mostrada en las Figuras 23 y 24; SEQ ID NO: 29) (TGTAAAAATCTGTTTAATAAATATACATCTTAGAAGTACCAAAATAATTACCAA CAAAATACAACATATACAACATTTACAAGAA) en la secuencia de AI462015 se correspondía con la hebra complementaria de la región no traducida 3' del ARNm de NfkBia de rata (1478-1562, ID GEN: 25493 NfkBia, SEQ ID NO: 31) a excepción de un nucleótido (la A en el nucleótido 70 desde el extremo 5' en AI462015) (Coincidencia = 84/85, Figura 25b). Del mismo modo, se confirmó que la secuencia era homóloga a las secuencias de ser humano (Coincidencia = 75/85, Figura 25a, SEQ ID NO: 30), chimpancé (Coincidencia = 75/85, Figura 25c, SEQ ID NO: 32), mono rhesus (Coincidencia = 74/85, Figura 25d, SEQ ID NO: 33), y ganado vacuna (Coincidencia = 76/85, Figura 25e, SEQ ID NO: 34). Por lo tanto, se estima que de 19 a 25 nucleótidos que forman parte de los 85 nucleótidos (Secuencia Conservada 7-91) actúan sobre las células animales o las células de mamífero independientemente de la especie, sirviendo como un microARN, o que las secuencias parciales actúan sobre las células animales o las células de mamífero, independientemente de la especie, sirviendo como ARN antisentido. Por lo tanto, se predijo que también actuarían sobre el ARNm de NfkBia de las células animales cultivadas, preferiblemente células de mamífero tales como las células CHO.

[Ejemplo 2] Identificación del transcrito expresado en un mayor nivel en las células altamente productoras de anticuerpos

En el Ejemplo 1, el nivel de expresión del transcrito de AI462015 aumentó en la célula DG44 productora de MAb1 (anticuerpo anti-IL-6R; tocilizumab, Nombre del producto: Actemra) a un nivel alto (Figura 2). Del mismo modo, cuando se produjo un anticuerpo diferente (MAb2: anticuerpo anti-glipicano 3; GC33 (remitirse al documento WO 2006/006693)) se produjo a un alto nivel en una célula anfitriona diferente (CHO-DXB11s), se observó el aumento de la expresión del transcrito de AI462015 (Figura 3).

Como se muestra en la Figura 2, cuando se expresaba fuertemente el gen del transportador de taurina (TauT), el gen de la ácido cistein-sulfínico descarboxilasa (CSAD) se expresó fuertemente (datos no mostrados), y TauT y CSAD fueron fuertemente co-expresados, en una célula CHO-DG44 en cada caso, los niveles de expresión del transcrito AI462015 fueron todos comparables. Por el contrario, en una célula en la que TauT y CSAD eran fuertemente co-expresados y adicionalmente MAb1 (anticuerpo anti-receptor de IL-6) se expresaba fuertemente, se observaba un aumento aberrante de AI462015 (7 veces más altos que en la célula anfitriona), y el nivel de expresión también fue mostrado por un valor de GeneChip altamente aberrante (10.000 o más). Teniendo en cuenta que las intensidades de expresión de GAPDH como control fueron comparables entre las células, se encontró que el aumento de la expresión del transcrito de AI462015 era específico en la célula productora de anticuerpo MAb1 a un nivel alto. Lo mismo se aplica para el caso mostrado en la Figura 3; cuando el gen MAb2 (anticuerpo anti-glipicano 3) se expresaba fuertemente en una célula CHO-DXB11s, el aumento de la expresión de la secuencia AI462015 (13 veces mayor que el valor promedio entre las células que expresaban cada una fuertementeTauT, CSAD o AE1) se encontró que era específico en la célula productora de anticuerpo MAb2 a un nivel alto.

Los resultados anteriores muestran que las células altamente productoras de anticuerpos, que crecieron de manera estable el tercer día de subcultivo en un aparato de sacudimiento expresan la secuencia AI462015 a niveles aberrantemente altos.

En condiciones de cultivo de producción el 3er día de un cultivo en jarra de 1L, también se observó un aumento aberrante de la expresión de la secuencia AI462015. Como se muestra en la Figura 4, dos tipos de células altamente productoras de anticuerpos que producían aproximadamente de 1200 a 1400 mg/L de MAb1 (anticuerpo anti-IL-6R) el 10º día de un cultivo de alimentación por lotes en una jarra de 1L mostraban valores de señal GeneChip elevados de 5.000 o más. Debido a las diferencias en las condiciones de cultivo, los valores de señal GeneChip medidos el tercer día del cultivo de alimentación por lotes en una jarra de 1L fueron aproximadamente 50% del valor en el cultivo en un aparato de sacudimiento. Sin embargo, el día 13 en la última etapa del cultivo de alimentación por lotes en una jarra de 1L, se encontró que la intensidad de la expresión de la secuencia AI462015 se

había incrementado a un nivel comparable al del subcultivo en el aparato de sacudimiento, mostrando valores de la señal aberrantemente elevados (Figura 5). Por otra parte, una célula DXB11s que producía poco anticuerpo y expresaba fuertemente MAb1 (300 mg/L o menos el 7º día de cultivo en un aparato de sacudimiento libre de producto hidrolizado; 500 mg/L o menos, incluso en cultivo con producto hidrolizado añadido) no presentaba un aumento de la expresión de la secuencia AI462015 el 3er día de cultivo en una jarra de 1L incluso en condiciones en las que se añadía un producto hidrolizado que contribuía a una mayor producción (Hy-Fish o Procine Lysate) (Figura 6).

Los resultados experimentales demuestran la alta cantidad de anticuerpo producido en la célula DG44 de expresa fuertemente MAb1, TauT y CSAD que mostró un elevado valor de señal en la Figura 2 (la cantidad fue de 640 mg/L el 7º día de cultivo en un aparato de sacudimiento libre de producto hidrolizado), la elevada cantidad de anticuerpo producido en la célula DXB11s que expresaba fuertemente MAb2 que mostró un elevado valor de señal en la Figura 3 (la cantidad fue de 640 mg/L el 7º día de cultivo en un aparato de sacudimiento libre de producto hidrolizado), y no se observó ningún aumento del valor de señal ni siquiera cuando se añadió un producto hidrolizado que contribuía a una producción de anticuerpos más alta como se muestra en la Figura 6. A la luz de estos resultados experimentales, se consideró que "una célula que expresa un alto nivel de la secuencia de AI462015 tiene un elevado potencial de producción de anticuerpo".

[Ejemplo 3] Ejemplo de la mayor producción resultante de la fuerte expresión de APES en células productoras de anticuerpos

Para demostrar que el nivel de expresión de la secuencia de AI462015 se correlaciona con el nivel de potencial productor de anticuerpos, los plásmidos que expresaban una parte de la secuencia de AI462015 se introdujeron cada uno en la célula DXB11s que mostraba un bajo potencial de producción de anticuerpo y una fuerte expresión de MAb1 en la Figura 6 y, a continuación, se indujo una fuerte expresión y se compararon los potenciales de producción de anticuerpos.

De la secuencia del transcrito derivadoi de genoma de ratón AI462015 (Figura 1; 437 nucleótidos), las secuencias parciales (que contenían una secuencia de sonda de AI462015 de Affymetrix GeneChip): la secuencia entre la G en el nucleótido 4 del extremo 5' y la T en el extremo 3' fue nombrada como APES434 y la secuencia entre la G el nucleótido 4 y la C en el nucleótido 168 del extremo 5' fue nombrada como APES165. De ese modo se prepararon dos tipos de unidades de expresión (APES es la abreviatura de Secuencia Potenciadora de la Producción de Anticuerpo). Se sintetizaron unidades de expresión con la secuencia de Kozak añadida para la construcción de pHyg-APES434 (Figura 7) y pHyg-APES165 (Figura 8) cada uno de los cuales se expresaba a altos niveles bajo el promotor de CMV, y pHyg-null (Figura 9).

Se utilizó Nucleofector, que es un sistema para introducción de genes producido por Amaxa (actualmente, LONZA), para introducir los plásmidos de expresión en las células DXB11s que expresaban fuertemente MAb1, que eran cepas de bajas producción de anticuerpos en la Figura 6. Después de seleccionar todas las cepas de células que crecían enormemente en una placa de 96 pocillos en presencia de un medio de selección que contenía higromicina (200 µg/mL), se expandieron a placas de 24 pocillos, y se compararon las cantidades de producción de anticuerpos. Los números de las cepas seleccionadas son los siguientes: pHyg-APES434 (N = 38), pHyg-APES165 (N = 60) y pHyg-null (N = 11), y se esperaba que a partir de estos números de cepas que se produjera un efecto positivo por la introducción de los plásmidos que expresaban fuertemente APES. Puesto que no se observó crecimiento celular el 13º día de un cultivo estático en la placa de 24 pocillos que contenía 1 mL de medio de subcultivo, se midieron las cantidades de la producción de anticuerpos y el número de células. Los valores promedio de las cantidades de la producción de anticuerpos eran pHyg-APES434 (44,3 mg/L), pHyg-APES165 (41,2 mg/L) y pHyg-null (21,9 mg/L), y el número de células (valores medios) fueron pHyg -APES434 (9,27 x 10^5 células/mL), pHyg-APES165 (11,39 x 10^5 células/mL) y pHyg-null (7,76 x 10^5 células/mL). La célula con pHyg-APES434 introducido y la célula con pHyg-APES165 introducido eran estadísticamente superiores a pHyg-null como control (prueba de la t, $p < 0{,}001$, Figura 10).

Los resultados anteriores muestran que la fuerte expresión de la secuencia de ácido nucleico que comprende 165 pb 5' del transcrito AI462015 (p. ej., APES165, que es el transcrito de ADN del SEQ ID NO: 2, o APES434, que es el transcrito de ADN del SEQ ID NO: 3) aumentó el potencial de producción de anticuerpos de las células.

[Ejemplo 4] Supresión de la expresión de NfkBia en células CHO altamente productoras de anticuerpos

Como se describe en el Ejemplo 1, la secuencia de AI462015 existe en la hebra complementaria cerca de la región no traducida 3' (los 78 pb 3') del gen de NfkBia en el genoma del ratón 12; los 22 nucleótidos (AAGTACCAAAATAATTACCAAC; SEQ ID NO: 10) contenidos en la secuencia de AI462015 son una secuencia idéntica a la de la hebra complementaria de la región no traducida 3' (1492-1513) del gen de NfkBia humano y se conservan independientemente de la especie tal como rata, mono rhesus, perro y caballo, y por lo tanto, hay una posibilidad de que los 22 nucleótidos causen la interferencia en el ARN y degraden el ARNm de NfkBia, sirviendo

como un microARN; o los 21 nucleótidos (CATATACAACATTTACAAGAA; SEQ ID NO: 15) desde la C en el nucleótido 71 del extremo 5', que corresponden a la primera parte de la región de secuencia de la sonda específica (42 pb) (CATATACAACATTTACAAGAAGGCGACACAGACCTTAGTTGG; SEQ ID NO: 16) en una matriz de oligonucleótidos AFFYMETRIX (Affymetrix MOUSE430_2) que es capaz de cuantificar la expresión de AI462015, son la secuencia complementaria a la secuencia entre los nucleótidos 1478 y 1498 del ARNm de NfkBia de rata. A la luz de lo anterior, existe la posibilidad de que la molécula de ácido nucleico derivada de la secuencia de AI462015 interfiera en el ARNm de NfkBia (ARN de interferencia), suprima su expresión y de ese modo mantenga la homeostasis de las células CHO altamente productoras de anticuerpos (Letalidad de ratones con un gen inactivado: postnatal) (Nota: se encontró más tarde que el transcrito AI462015 se correspondía con la hebra complementaria de 513 nucleótidos de la región no traducida 3' del gen de NfkBia de ratón. Remitirse al Ejemplo 8. Adicionalmente, se confirmó que la secuencia entre los nucleótidos 71 y 112 (SEQ ID NO: 16) de AI462015 que se cuantificaba con GeneChip de ratón era un transcrito en células CHO).

En relación con estas cuestiones, los autores de la presente invención intentaron un procedimiento para cuantificar el nivel de expresión de ARNm de NfkBia en las células que expresaban enormemente AI462015 que tenían un alto potencial de producción de anticuerpos, para confirmar la supresión de la expresión del ARNm de NfkBia.

Puesto que se desconocía la secuencia del ARNm de NfkBia en células CHO, se diseñaron sondas (5' ACTTGGTGACTTTGGGTGCT y 5' GCCTCCAAACACACAGTCAT) (SEQ ID NO: 17 y 18, respectivamente) utilizando secuencias conservadas en las regiones codificantes de aminoácidos de ratón y de rata (para ambas regiones, 942 nucleótidos: 314 aminoácidos) para producir productos de PCR de 325 pb. Se considera que los 325 pb sometidos a clonación por PCR son una secuencia parcial del ARNm de NfkBia derivado de células CHO, en vista de la homología de secuencia (Figura 11).

La expresión del ARNm de NfkBia no pudo ser cuantificada con Mouse Genome Array 430 2.0 (Ejemplo 1), posiblemente debido a que la secuencia de la sonda corresponde a una secuencia específica de la especie de células CHO. Mientras tanto, la comparación de los productos de PCR de 325 pb mostró que la expresión del ARNm de NfkBia fue suprimida en las células altamente productoras de anticuerpos, que mostraban un aumento de la expresión de la secuencia de AI462015 (Calles 3 y 4) en comparación con las células que expresaban fuertemente el gen que no había producido anticuerpos (Calles 1 y 2). Adicionalmente, se diseñó un conjunto de sondas TaqMan capaz de cuantificar una secuencia parcial de 325 pb (Figura 12) y la cuantificación se realizó por medio de RT-PCR. Como resultado, se encontró que la expresión del ARNm de NfkBia en las células altamente productoras de anticuerpos era suprimida en aproximadamente 50% con respecto al nivel en las células que no habían producido anticuerpos (Figura 13).

A la luz de estos resultados, se considera que la expresión del ARNm de NfkBia era suprimida en las células altamente productoras de anticuerpos y por lo tanto incrementaba el potencial de producción de anticuerpos. En las regiones promotoras/potenciadoras de los plásmidos de expresión utilizados por los autores de la presente invención para la expresión de genes de anticuerpos, existe realmente por lo menos una pluralidad de sitios de unión a NFkB (Figura 14; los sitios de unión a NFkB en el promotor IE2 de CMV de ratón). Estas regiones potenciadoras son esenciales para la alta expresión de genes de anticuerpos. Por lo tanto, se considera que un factor de la alta producción de anticuerpos es que el NfkB activado por la supresión de la expresión de NfkBia se transloque al núcleo, seguido de la mejora de la actividad del promotor.

[Ejemplo 5] Análisis del aumento de microARN en células CHO altamente productoras de anticuerpos

Como se ilustra en la Figura 15, se utilizó Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis Kit (Clontech) para analizar el microARN. A los extremos 3' de los ARN pequeños preparados a partir de las siguientes células se les añadieron colas de poli(A): una célula DXB11s altamente productora de MAb1 (anticuerpo anti-IL-6R) y una célula DXB11s altamente productora de MAb1 (anticuerpo anti-IL-6R) y que expresa fuertemente TAUT, ambas las cuales habían estado en subcultivo, y una célula anfitriona DXB11s en la que aún no se había introducido el gen del anticuerpo. Después de eso, se sometió un adaptador que tenía un oligo dT en el extremos 3' y una secuencia de cebador de PCR (cebador mRQ 3') en los extremos 5' a cebado para sintetizar las primeras hebras del ADNc. Se llevó a cabo la qPCR utilizando los ADNc resultantes como moldes, el cebador mRQ 3' y un cebador específico de microARN derivado de la secuencia de APES esperado (cebador 40-61 5' APES o cebador 71-91 5' APES) y, adicionalmente, cebador ARNnp U6 5' como un control positivo (30 ciclos de 95°C durante 5 segundos, 60°C durante 20 segundos). Los líquidos de reacción de PCR obtenidos se purificaron y luego se sometieron a electroforesis sobre gel de agarosa al 3%. Como se ilustra en la Figura 16, las bandas de tamaño previsto se detectaron mediante la PCR utilizando el cebador 40-61 5' APES y el cebador ARNnp U6 5'. Como se muestra en las Calles 1, 2 y 3, los 22 nucleótidos de APES 40-61 (AAGTACCAAAATAATTACCAAC; SEQ ID NO: 10) se expresaron a altos niveles en las células altamente productoras de MAb1 (anticuerpo anti-IL-6R). El nivel de expresión del ARNnp U6 (Calle 4) como un control positivo fue comparable en cualquiera de las células, y la presencia de APES 71-91 (CATATACAACATTTACAAGAA; SEQ ID NO: 15) no se confirmó (datos no mostrados). Basándose en estos resultados, se consideró que la secuencia 40-61 APES (22 nucleótidos) se conservaba independientemente de que

la especie contribuyera como microARN a una producción más alta de anticuerpos.
[Ejemplo 6] Ejemplo de un mayor crecimiento resultante de la fuerte expresión de APES en una célula anfitriona para la producción de anticuerpos

A partir de una célula anfitriona para la producción de anticuerpos DXB11/TAUT, se obtuvo una célula altamente productora de anticuerpos (DXB11/TAUT/MAb1) que produjo 3,9 g/L de MAb1 (anticuerpos anti-IL-6R) el día 14 de un cultivo de alimentación por lotes en una jarra de 1L. La capacidad de la TAUT para mantener la tasa de supervivencia ayudó a la producción de 8,1 g/L el 31º día de cultivo, pero era necesario aumentar la densidad de células más alta (4,1 x 10e6 células/mL) para lograr una alta producción el 14º día de cultivo, teniendo en cuenta la producción real. Si la expresión del ARNm de NfkBia suprimida como resultado de la fuerte expresión de APES (Ejemplo 4) promueve la activación de NfkB, la expresión del gen relacionado con el crecimiento se incrementaría, y por lo tanto, la densidad celular más alta posiblemente aumentaría. Se introdujeron un plásmido para la co-expresión de APES y un plásmido para la co-expresión de ALT1 que contribuía a la producción más alta de anticuerpos como es el caso de APES (pPur-APES165, pPur-ALT1, respectivamente; Figura 17) en la célula altamente productora de anticuerpo anterior DXB11/TAUT/MAb1 (cepa parental). Se seleccionaron las tres mejores cepas con mayor crecimiento para los dos tipos y se sometieron a un cultivo de alimentación por lotes en un aparato de sacudimiento. Como resultado, se obtuvo el valor medio de la densidad celular más alta fue (11,5 ± 1,7) x 10e6 células/mL para la célula que expresaba fuertemente APES165, mostrando que las células con mayor crecimiento que la célula que expresaba fuertemente ALT1 ((8,9 ± 1,8) x 10e6 células/mL). Adicionalmente, los valores medios de las cantidades de producción de anticuerpos el 14º día del cultivo de alimentación por lotes en un aparato de sacudimiento fueron de 4,4 ± 0,6 g/L para la célula que expresaba fuertemente APES y de 4,0 ± 0,6 g/L para la célula que expresaba fuertemente ALT1, los cuales fueron superiores a los 3,4 g/L para la célula DXB11/TAUT/MAb1 en la que aún no se había introducido un plásmido. Este resultado muestra que el efecto de la fuerte expresión de APES se produjo positivamente de una manera independiente del efecto de la fuerte expresión de TAUT (Figura 18). El efecto positivo resultante de la fuerte expresión de APES se observó claramente en un cultivo de alimentación por lotes en una jarra de 1L. La comparación de las células que crecían enormemente en el cultivo de alimentación por lotes en un aparato de sacudimiento reveló el mayor crecimiento de la cepa que expresaba fuertemente APES, que mostró su ventaja en la alta productibilidad en un cultivo a corto plazo, con un valor de 5,3 g/L el 12º día de cultivo en comparación con 3,2 g/L para la cepa parental y 4,4 g/L para la cepa que expresaba fuertemente ALT1 (Figura 19). Basándose en los resultados anteriores, los autores de la presente invención decidieron modificar la célula anfitriona para la producción de anticuerpos DXB11/TAUT en una célula anfitriona que exhibe un mayor crecimiento, y prepararon una célula anfitriona que expresaba fuertemente APES165 DXB11/TAUT/APES. La introducción de genes se realizó mediante la introducción de pPur-APES165 en el anfitrión DXB11/TAUT por medio de electroporación. Para las nueve cepas anfitrionas candidato que eran buenas tanto en la tasa de supervivencia como en el crecimiento después de la selección de fármacos, se cuantificaron sus niveles de expresión de ARNnp de APES (ARN no codificante pequeño) en subcultivo. La cepa anfitriona candidato DXB11/TAUT/APES que expresaba APES a un nivel alto tenía una alta densidad de células viables durante el cultivo y mostraba una correlación (R^2= 0,70) (Figura 20).

[Ejemplo 7] Ejemplo 2 de producción mayor como resultado de la fuerte expresión de APES en células productoras de anticuerpos

Como en el caso del Ejemplo 3, los plásmidos que expresaban secuencias parciales del extremo 5' del transcrito AI462015 se introdujeron en células DXB11s que expresaban fuertemente MAb1, y se compararon sus potenciales de producción de anticuerpo.

Además de APES4-168 (APES 165), se prepararon unidades de expresión de APES4-68 (SEQ ID NO: 5) y APES69-133 (SEQ ID NO: 6), cada una de los cuales consistía en una secuencia parcial de APES4-168, para estudiar los potenciales de producción de anticuerpos de las células. En comparación con la fuerte expresión del vector nulo (null), APES4-68 y APES69-133 mostraron una alta producción de anticuerpo con diferencias significativas de $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente (prueba de la t, $P < 0,001$, Figura 21).

La Figura 22 muestra qué regiones de las respectivas secuencias parciales que tienen actividad APES que fueron identificadas en los Ejemplos 3 y 7 correspondían al transcrito AI462015 de ratón. Las secuencias parciales que mostraban actividad APES comprendían al menos 23 nucleótidos de la secuencia complementaria de NfkBia.

[Ejemplo 8] Análisis de genes relacionados con APES

Basándose en la información genética en el momento de presentar esta solicitud, se indica en el Ejemplo 1 que "AI462015 es un ARN no codificante de tipo ARNm de 437 nucleótidos y su secuencia existe en la hebra complementaria cerca de la región no traducida 3' (56590831- 56590397) del gen de NfkBia en el genoma de ratón 12". Sin embargo, la actualización de la información posterior propuesta por GeneBank reveló que los 437 nucleótidos, que son el transcrito AI462015, corresponden a la hebra complementaria de la región no traducida 3' (513 nucleótidos) del gen de NfkBia de ratón (Figura 23). Como se muestra en la Figura 24, hay una secuencia

homóloga a AI462015 en la secuencia del genoma de las células CHO-K1 que se publicó después de la presentación de esta solicitud (SEQ ID NO: 25: AI462015; SEQ ID NO: 26-27: genoma de CHO-K1). Adicionalmente, se observó la supresión de la expresión de NfkBia en células CHO altamente productoras de anticuerpos (Ejemplo 4). Por lo tanto, es concebible que la secuencia homóloga de AI462015 se exprese a un alto nivel en células CHO y funcione en las mismas.

La presente invención se puede aplicar a cualquier célula que produce un anticuerpo recombinante.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Chugai SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Procedimiento para producir polipéptido recombinante

<130> FA0001-12022

<150> JP 2011-082002
<151> 2011-04-01

<160> 35

<170> PatentIn Versión 3.1

<210> 1
<211> 437
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 1
```
tttgtctgta aaaatctgtt taataaatat acatcttaga agtaccaaaa taattaccaa     60

caaaatacaa catatacaac atttacaaga aggcgacaca gaccttagtt gggggcgact    120

tttaagcaca tgccactgaa cacctggctc ttacatggga ggacacactg ggctcactta    180

ctaggtctat ggtggttcaa tcaaaagcac aataaataaa acgtggtcct ttcattaggt    240

tctggaaaat cacctccccc ccccccaaaa aaaatcccac aaacatgaac cttaagagac    300

attttctttg aatttcagtg atctgtttcc ccggatttca caaagacaac agccgaatca    360

ccccagtaaa atgcctgggt ctaggcgctg tgtggtgtgg tgctaagtat acccttttctc   420

atttttttc tttttct                                                    437
```

<210> 2
<211> 165
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> APES165

<400> 2
```
gtctgtaaaa atctgtttaa taaatataca tcttagaagt accaaaataa ttaccaacaa     60

aatacaacat atacaacatt tacaagaagg cgacacagac cttagttggg ggcgactttt    120

aagcacatgc cactgaacac ctggctctta catgggagga cacac                    165
```

<210> 3
<211> 434
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> APES434

<400> 3

gtctgtaaaa atctgtttaa taaatataca tcttagaagt accaaaataa ttaccaacaa 60

aatacaacat atacaacatt tacaagaagg cgacacagac cttagttggg ggcgactttt 120

aagcacatgc cactgaacac ctggctctta catgggagga cacactgggc tcacttacta 180

ggtctatggt ggttcaatca aaagcacaat aaataaaacg tggtcctttc attaggttct 240

ggaaaatcac ctcccccccc cccaaaaaaa atcccacaaa catgaacctt aagagacatt 300

ttctttgaat ttcagtgatc tgtttccccg gatttcacaa agacaacagc cgaatcaccc 360

cagtaaaatg cctgggtcta ggcgctgtgt ggtgtggtgc taagtatacc ctttctcatt 420

ttttttcttt ttct 434

<210> 4
<211> 130
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> APES130

<400> 4
gtctgtaaaa atctgtttaa taaatataca tcttagaagt accaaaataa ttaccaacaa 60

aatacaacat atacaacatt tacaagaagg cgacacagac cttagttggg ggcgactttt 120

aagcacatgc 130

<210> 5
<211> 65
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> APES 4-68

<400> 5
gtctgtaaaa atctgtttaa taaatataca tcttagaagt accaaaataa ttaccaacaa 60

aatac 65

<210> 6
<211> 65
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> APES 69-133

<400> 6
aacatataca acatttacaa gaaggcgaca cagaccttag ttgggggcga cttttaagca 60

catgc 65

<210> 7
<211> 52
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> APES 40-91

<400> 7
aagtaccaaa ataattacca acaaaataca acatatacaa catttacaag aa 52

<210> 8
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> APES 40-68

<400> 8
aagtaccaaa ataattacca acaaaatac 29

<210> 9
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> APES 40-63

<400> 9
aagtaccaaa ataattacca acaa 24

<210> 10
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> APES 40-61

<400> 10
aagtaccaaa ataattacca ac 22

<210> 11
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> APES 69-91

<400> 11
aacatataca acatttacaa gaa 23

<210> 12
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> APES 84-104

<400> 12
tacaagaagg cgacacagac c 21

<210> 13
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> APES 99-119

<400> 13
acagacctta gttgggggcg ac 22

<210> 14
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> APES 101-121

<400> 14
gaccttagtt gggggcgact t 21

<210> 15
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> APES 71-91

<400> 15
catatacaac atttacaaga a 21

<210> 16
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> APES 71-112

<400> 16
catatacaac atttacaaga aggcgacaca gaccttagtt gg 42

<210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> sonda

<400> 17
tttgggtgct acttggtgac 20

<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> sonda

<400> 18
gcctccaaac acacagtcat 20

<210> 19
<211> 145
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Parte del ARNm de NfkBia de hámster

<400> 19
agtacccgga tacagcagca gctgggccag ctgacccggg aaaatcttca gatgctgccc 60

gagagtgagg atgaggagag ctacgacaca gagtcagaat tcacggagga tgagctgccc 120

tatgatgact gtgtgtttgg aggca 145

<210> 20
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> sonda

<400> 20
cagctgaccc gggaaaatc 19

<210> 21
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> sonda

<400> 21
tgactctgtg tcgtagctct cctc 24

<210> 22
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> sonda

<400> 22
tcagatgctg cccgagagtg agga 24

<210> 23
<211> 1394
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 23
ctctgggctc gaatggcatg ggggacagct tttatatggt taactccgcc cgttttatga 60

ctagaaccaa tagtttttaa tgccaaatgc actgaaatcc cctaatttgc aaagccaaac 120

gccccctatg tgagtaatac ggggactttt tacccaattt cccaagcgga aagcccccta 180

atacactcat atggcatatg aatcagcacg gtcatgcact ctaatggcgg cccataggga 240

ctttccacat agggggcgtt caccatttcc cagcataggg gtggtgactc aatggccttt 300

acccaagtac attgggtcaa tgggaggtaa gccaatgggt ttttcccatt actggcaagc 360

acactgagtc aaatgggact ttccactggg ttttgcccaa gtacattggg tcaatgggag 420

gtgagccaat gggaaaaacc cattgctgcc aagtacactg actcaatagg gactttccaa 480

tgggtttttc cattgttggc aagcatataa ggtcaatgtg ggtgagtcaa tagggacttt 540

ccattgtatt ctgcccagta cataaggtca ataggggggtg aatcaacagg aaagtcccat 600

tggagccaag tacactgcgt caatagggac tttccattgg gttttgccca gtacataagg 660

tcaatagggg atgagtcaat gggaaaaacc cattggagcc aagtacactg actcaatagg 720

gactttccat tgggttttgc ccagtacata gggtcaatag ggggtgagtc aacaggaaag 780

ttccattgga gccaagtaca ttgagtcaat agggactttc caatgggttt tgcccagtac 840

ataaggtcaa tgggaggtaa gccaatgggt ttttcccatt actggcacgt atactgagtc 900

attagggact ttccaatggg ttttgcccag tacataaggt caatagggggt gaatcaacag 960

gaaagtccca ttggagccaa gtacactgag tcaataggga ctttccattg ggttttgccc 1020

agtacaaaag gtcaataggg ggtgagtcaa tgggtttttc ccattattgg cacgtacata 1080

aggtcaatag gggtgagtca ttgggttttt ccagccaatt taattaaaac gccatgtact 1140

ttcccaccat tgacgtcaat gggctattga aactaatgca acgtgacctt taaacggtac 1200

tttcccatag ctgattaatg ggaaagtacc gttctcgagc caatacacgt caatgggaag 1260

tgaaagggca gccaaaacgt aacaccgccc cggttttccc ctggaaattc catattggca 1320

cgcattctat tggctgagct gcgttctacg tgggtataag aggcgcgacc agcgtcggta 1380

ccgtcgcagt cttg 1394

<210> 24
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 24
ttgttggtaa ttattttggt actt 24

<210> 25
<211> 433
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 25

tgtctgtaaa aatctgttta ataaatatac atcttagaag taccaaaata attaccaaca 60

aaatacaaca tatacaacat ttacaagaag gcgacacaga ccttagttgg gggcgacttt 120

taagcacatg ccactgaaca cctggctctt acatgggagg acacactggg ctcacttact 180

aggtctatgg tggttcaatc aaaagcacaa taaataaaac gtggtccttt cattaggttc 240

tggaaaatca cctccccccc ccccaaaaaa aatcccacaa acatgaacct taagagacat 300

tttctttgaa tttcagtgat ctgtttcccc ggatttcaca aagacaacag ccgaatcacc 360

ccagtaaaat gcctgggtct aggcgctgtg tggtgtggtg ctaagtatac cctttctcat 420

tttttttctt ttt 433

<210> 26
<211> 414
<212> ADN
<213> Cricetulus griseus

<400> 26
tgtctgtaaa aatctgttta ataaatatac atcttagaag taccaaaata attaccaaca 60

aaatacacca tatacaacat ttacaagagg gtaacaaaaa cctcagtcgg gagtgactag 120

cacataccac tcaacacctg gttctacatg tgaggacata ccaggctcag ctaccagatc 180

taccgttcag tcaaaagcac aataaataga atgtggtccc tttcatcagt ctggaaaacc 240

acctcccaaa acctcacgaa tgtgagcttt aaaagacatt ttctttgaat tccaatgatc 300

tgtttcccca tttcacaaaa ataacaatct gccatcacca gagtaagatg cttgggggca 360

ggctgtgtgc agtgtggtgg taagtatatc cctttctttc tttttttct tctt 414

<210> 27
<211> 414
<212> ADN
<213> Cricetulus griseus

<400> 27
aagaagaaaa aaaagaaaga aagggatata cttaccacca cactgcacac agcctgcccc 60

caagcatctt actctggtga tggcagattg ttatttttgt gaaatgggga aacagatcat 120

tggaattcaa agaaaatgtc ttttaaagct cacattcgtg aggttttggg aggtggtttt 180

ccagactgat gaaagggacc acattctatt tattgtgctt ttgactgaac ggtagatctg 240

gtagctgagc ctggtatgtc ctcacatgta gaaccaggtg ttgagtggta tgtgctagtc 300

actcccgact gaggtttttg ttaccctctt gtaaatgttg tatatggtgt attttgttgg 360

taattatttt ggtacttcta agatgtatat ttattaaaca gatttttaca gaca 414

<210> 28
<211> 134
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Parte del ARNm de Nfkbia de hámster (134 pb)

<400> 28

agtacccgga tacagcagca gctgggccag ctgacccggg aaaatcttca gatgctgccc 60

gagagtgagg atgaggagag ctacgacaca gagtcagaat tcacggagga tgagctgccc 120

tatgatgact gtgt 134

<210> 29
<211> 85
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia Conservada 7-91

<400> 29
tgtaaaaatc tgtttaataa atatacatct tagaagtacc aaaataatta ccaacaaaat 60

acaacatata caacatttac aagaa 85

<210> 30
<211> 83
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 30
tgtaaaaatc tgtttaataa atatacatca taaaagtacc aaaataatta ccaacaatac 60

attatgtaca ccatttacag gag 83

<210> 31
<211> 85
<212> ADN
<213> Rattus norvegicus

<400> 31
tgtaaaaatc tgtttaataa atatacatct tagaagtacc aaaataatta ccaacaaaat 60

acaccatata caacatttac aagaa 85

<210> 32
<211> 89
<212> ADN
<213> Pan troglodytes

<400> 32
tgtaaaaatc tgtttaataa atatacatca taaaagtacc aaaataatta ctaacaatac 60

attatgtaca tcatttacag gagggtaac 89

<210> 33
<211> 89
<212> ADN
<213> Macaca mulatta

<400> 33
tggaaaaatc tgtttaataa atatacataa taaaagtacc aaaataatta ccaacaatac 60

actatgtaca ccatttacag aagggtaac 89

<210> 34
<211> 90
<212> ADN
<213> Bos taurus

<400> 34
tgtaaaaatc tgtttaataa atatacatct taaaagtacc aaaataatta ctgacaaaat 60

acactatgta cactatttac aggaggggaa 90

<210> 35
<211> 10
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> motivo kB

<400> 35
gggactttcc 10

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de un anticuerpo que comprende cultivar una célula que expresa una secuencia potenciadora de la producción de anticuerpos (APES) que se ha introducido artificialmente en la célula y en la que se ha introducido un ADN exógeno que codifica un anticuerpo deseado, produciendo de esta manera el anticuerpo deseado; y en donde la APES es una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que puede unirse al ADN o ARNm de gen de NfkBia (inhibidor α del factor nuclear κB) derivado de ser humano, ratón, rata o hámster mediante emparejamient de bases y puede suprimir la expresión del gen de NfkBia.

2. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde la APES es un pequeño ARN de a lo sumo 30 nucleótidos de longitud que comprende una secuencia de 19 a 25 nucleótidos de longitud que se puede unir a una porción del ARNm de NfkBia mediante emparejamiento de bases y en donde la secuencia de 19 a 25 nucleótidos de longitud es cualquier secuencia parcial en la secuencia de nucleótidos representada por el SEQ ID NO: 2.

3. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde la APES es un ARN no codificante de tipo ARNm de a lo sumo 561 nucleótidos de longitud que comprende una secuencia de 19 a 25 nucleótidos de longitud que se puede unir a una porción del ARNm de NfkBia mediante emparejamiento de bases y en donde la secuencia de 19 a 25 nucleótidos de longitud es cualquier secuencia parcial en la secuencia de nucleótidos representada por el SEQ ID NO: 2.

4. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde la APES es un ARN de tipo ARNm no codificante de 561 a 1579 nucleótidos de longitud que comprende una secuencia de 19 a 25 nucleótidos de longitud que se puede unir a una porción del ARNm de NfkBia mediante emparejamiento de bases y en donde la secuencia de 19 a 25 nucleótidos de longitud es cualquier secuencia parcial en la secuencia de nucleótidos representada por el SEQ ID NO: 2.

5. El método de acuerdo con la Reivindicación 4, en donde la APES se selecciona entre moléculas de ácido nucleico que comprenden cada una cualquiera de las siguientes secuencias de nucleótidos:

(a) un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 16 y 29;
(b) un ADN que comprende la secuencia del apartado (a) anterior y es una secuencia parcial de la región no traducida 3' del gen de NfkBia;
(c) un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos idéntica a la secuencia de los apartados (a) o (b) anteriores a excepción de uno o varios nucleótidos;
(d) un ARN que es una transcripción de los apartados (a), (b) o (c) anteriores; y
(e) un ADN o ARN que consiste en la secuencia que se puede unir a la secuencia del apartado (a) anterior mediante emparejamiento de bases.

6. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde la célula es una célula que expresa fuertemente APES.

7. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde la célula en la que la APES se ha introducido artificialmente es una célula transfectada con la APES.

8. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde la célula en la que la APES se ha introducido artificialmente es una célula en la que se ha activado la transcripción de APES endógena.

9. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde se ha introducido adicionalmente en la célula un ADN que codifica un transportador de taurina.

10. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde se ha introducido adicionalmente en la célula un ADN que codifica una ácido cisteinsulfínico descarboxilasa.

11. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde se ha introducido adicionalmente en la célula un ADN que codifica una alanina transferasa.

12. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde la célula es una célula de ovario de hámster chino.

13. Un método de producción de un producto farmacéutico que comprende la producción de un anticuerpo de acuerdo con el método de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 12, y la formulación de dicho anticuerpo en una composición farmacéutica.

14. Una molécula de ácido nucleico que consiste en cualquiera de las siguientes secuencias de nucleótidos y tiene actividad APES:

(a) un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los SEQ ID NO: 2, 4 a 16 y 29;
(b) un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos idéntica a la secuencia de cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 16 y 29, a excepción de un nucleótido; o
(c) un ARN que es un transcrito de los apartados (a) o (b) anteriores.

15. El uso de un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la Reivindicación 14 o una molécula de ácido nucleico que comprende cualquiera de las siguientes secuencias de nucleótidos y tiene actividad APES:

(a) un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los SEQ ID NO: 2 a 16 y 29;
(b) un ADN que comprende la secuencia del apartado (a) anterior y es una secuencia parcial de la región no traducida 3' del gen de NfkBia;
(c) un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos idéntica a la secuencia de cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 16 y 29 o la secuencia del apartado (b), a excepción de uno o varios nucleótidos;
(d) un ARN que es un transcrito de los apartados (a), (b) o (b) anteriores; o
(e) un ADN o ARN que consiste en la secuencia que se puede unir a la secuencia del apartado (a) anterior mediante emparejamiento de bases.

en un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 13.

16. El uso de una célula en la que se ha introducido artificialmente la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la Reivindicación 14 o el vector de acuerdo con la Reivindicación 15 en un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 13.

Figura 1

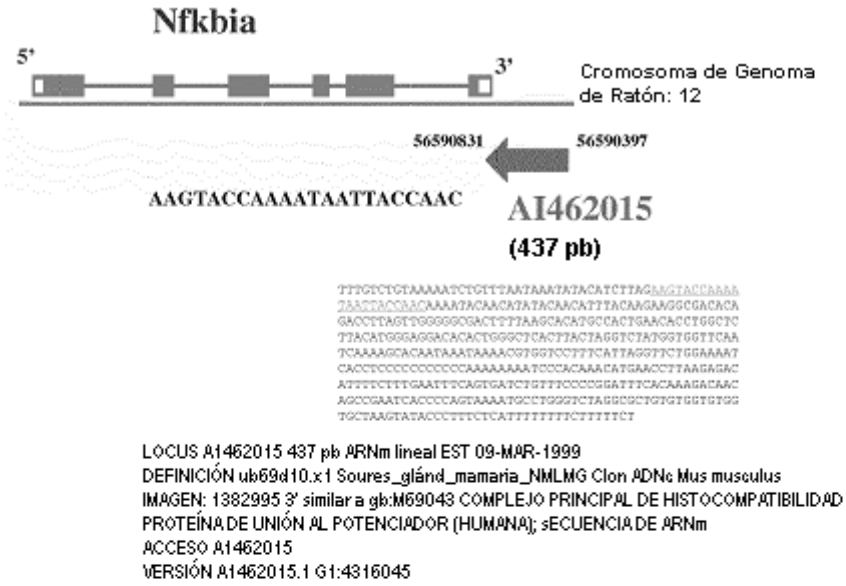


Figura 2

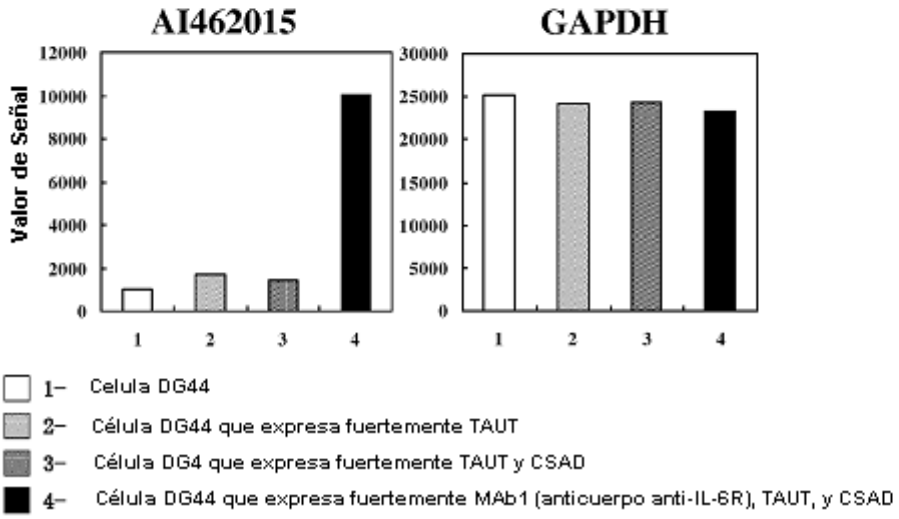


Figura 3

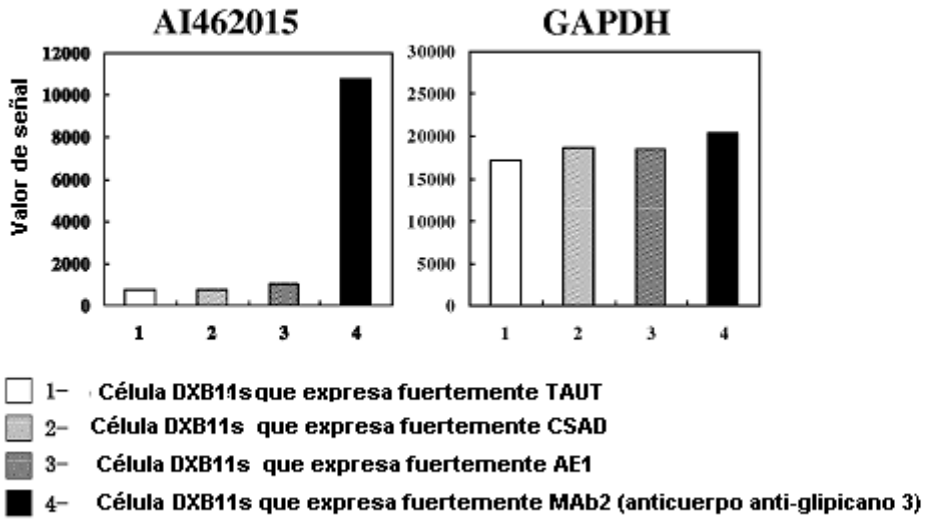


Figura 4

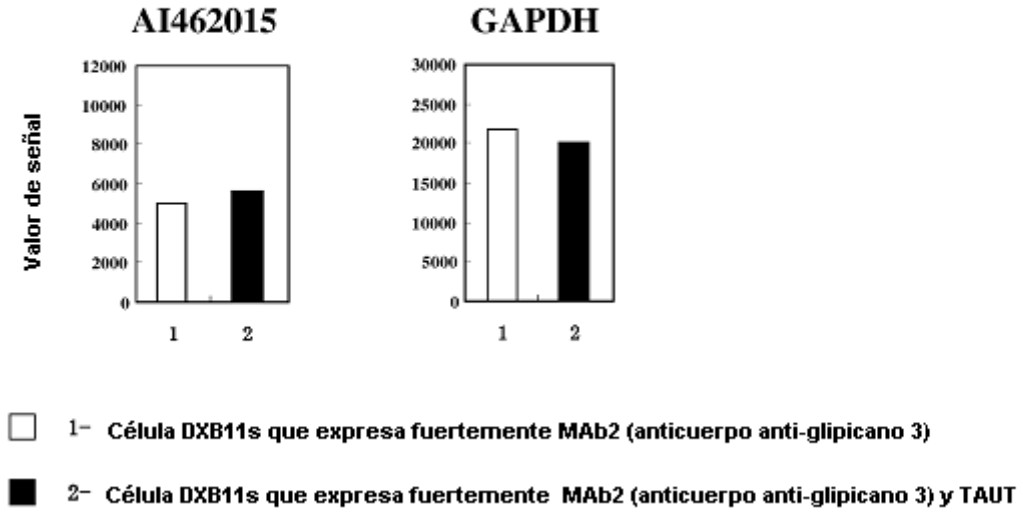
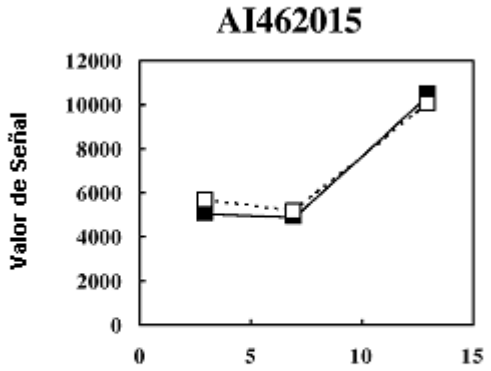


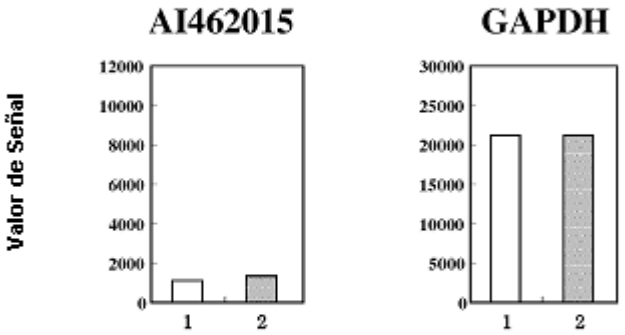
Figura 5



■ 1- Célula DXB11s que expresa fuertemente MAb2 (anticuerpo anti-glipicano 3)

□ 2- Célula DXB11s que expresa fuertemente MAb2 (anticuerpo anti-glipicano 3) y TAUT

Figura 6



□ 1- Célula DXB11s que expresa fuertemente MAb1 (anticuerpo anti-IL-6R) (Hy-Fish añadido)

▒ 2- Célula DXB11s que expresa fuertemente MAb1 (anticuerpo anti-IL-6R) (Producto lisado Porcino añadido)

Figura 7

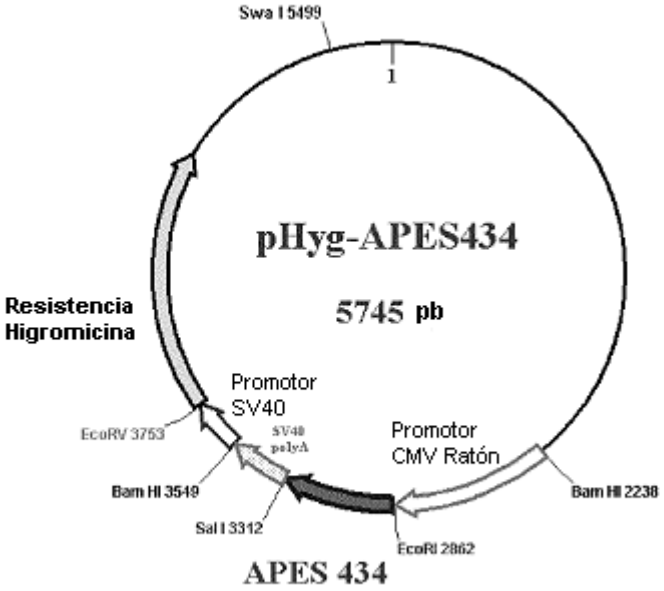


Figura 8

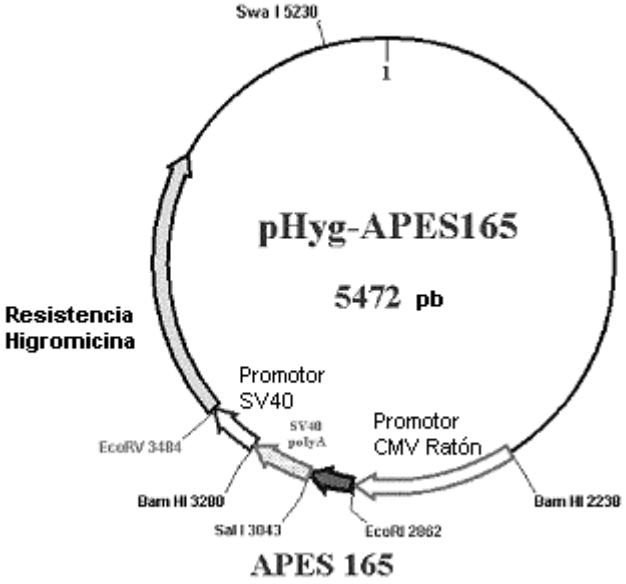


Figura 9

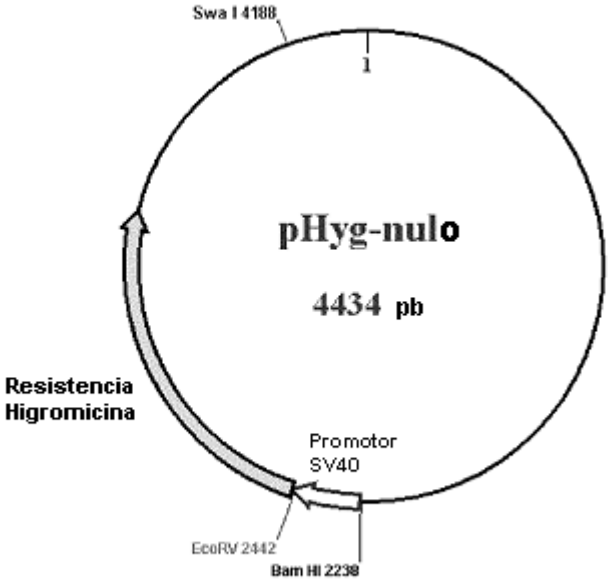


Figura 10

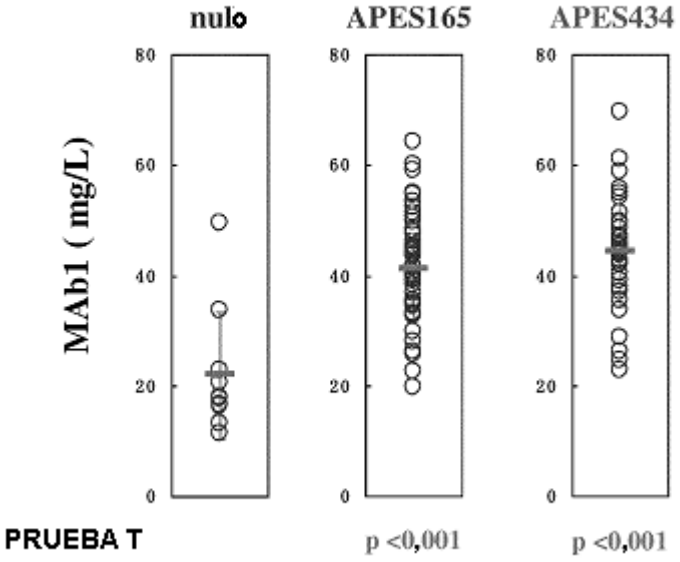
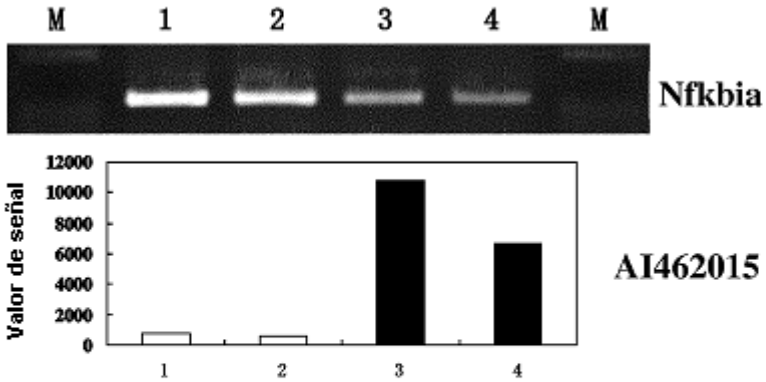


Figura 11



M- Marcador PM ADN (λ/HindIII + øX174/HaeIII)
1- Célula DXB11s que expresa fuertemente TAUT
2- Célula DXB11s que expresa fuertemente CSAD
3- Célula DXB11s que expresa fuertemente MAb2 (anticuerpo anti-glipicano 3)
4- Célula DXB11s que expresa fuertemente MAb2 (anticuerpo anti-glipicano 3) y TAUT

Figura 12

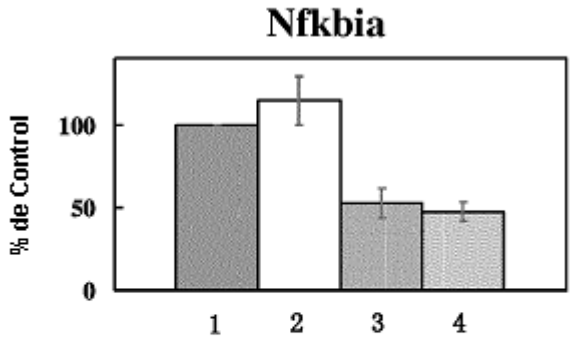
Una porción de ARNm de Nfkbia de hámster (134 pb)

```
          10         20         30         40         50
agtacccggatacagcagcagctgggccagctgacccgggaaaatcttca

          60         70         80         90        100
gatgctgcccgagagtgaggatgaggagagctacgacacagagtcagaat

         110        120        130
tcacggaggatgagctgccctatgatgactgtgt
```

Conjunto de sondas TaqMan para ARNm de Nfkbia de hámster

5'- cagctgacccgggaaaatc	Tm 59℃	19 unidades
5'- tgactctgtgtcgtagctctcctc	Tm 59℃	24 unidades
5'- FAM-tcagatgctgcccgagagtgagga-TAMRA	Tm 68℃	24 unidades

Figura 13



1- **Célula DXB11s que expresa fuertemente TAUT**

2- **Célula DXB11s que expresa fuertemente CSAD**

3- **Célula DXB11s que expresa fuertemente MAb2 (anticuerpo anti-glipicano 3)**

4- **Célula DXB11s que expresa fuertemente MAb2 (anticuerpo anti-glipicano 3) y TAUT**

Figura 14

ctctgggctcgaatggcatgggggacagcttttatatggttaactccgcccgttttatgactagaaccaatagtttttaatgccaaa
tgcactgaaatcccctaatttgcaaagccaaacgcccccctatgtgagtaatacggggacttttacccaatttcccaagcggaaa
gcccccctaatacactcatatggcatatgaatcagcacggtcatgcactctaatggcggcccatagggactttccacatagggg
gcgttcaccatttcccagcataggggtggtgactcaatggcctttacccaagtacattgggtcaatgggaggtaagccaatgg
gtttttcccattactggcaagcacactgagtcaaatggactttccactgggttttgcccaagtacattgggtcaatgggaggtga
gccaatgggaaaaacccattgctgccaagtacactgactcaatagggactttccaatgggttttccattgttggcaagcatata
aggtcaatgtgggtgagtcaatagggactttccattgtattctgcccagtacataaggtcaatagggggtgaatcaacaggaaa
gtcccattggagccaagtacactgcgtcaatagggactttccattgggttttgcccagtacataaggtcaatagggggatgagtc
aatgggaaaaacccattggagccaagtacactgactcaatagggactttccattgggttttgcccagtacatagggtcaatagg
gggtgagtcaacaggaaagttccattggagccaagtacattgagtcaatagggactttccaatgggttttgcccagtacataag
gtcaatgggaggtaagccaatgggttttcccattactggcacgtatactgagtcattagggactttccaatgggttttgcccagt
acataaggtcaatagggggtgaatcaacaggaaagtcccattggagccaagtacactgagtcaatagggactttccattgggtt
tgcccagtacaaaaggtcaatagggggtgagtcaatgggttttcccattattggcacgtacataaggtcaatagggggtgagtc
attgggtttttccagccaatttaattaaaacgccatgtactttcccaccattgacgtcaatgggctattgaaactaatgcaacgtga
cctttaaacggtactttcccatagctgattaatgggaaagtaccgttctcgagccaatacacgtcaatgggaagtgaaagggca
gccaaaacgtaacaccgccccggtttcccctggaaattccatattggcacgcattctattggctgagctgcgttctacgtgggt
ataagaggcgcgaccagcgtcggtaccgtcgcagtcttg

Figura 15

Método para el análisis de la expresión de microARN

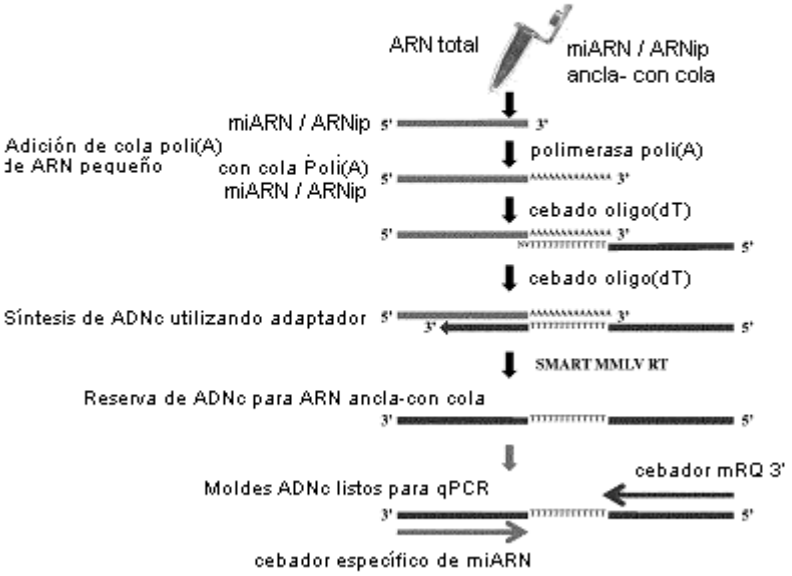


Figura 16

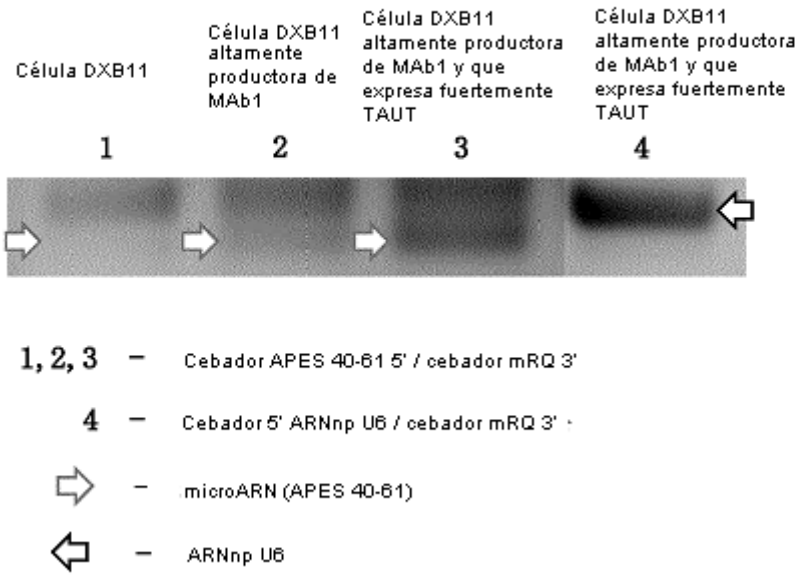
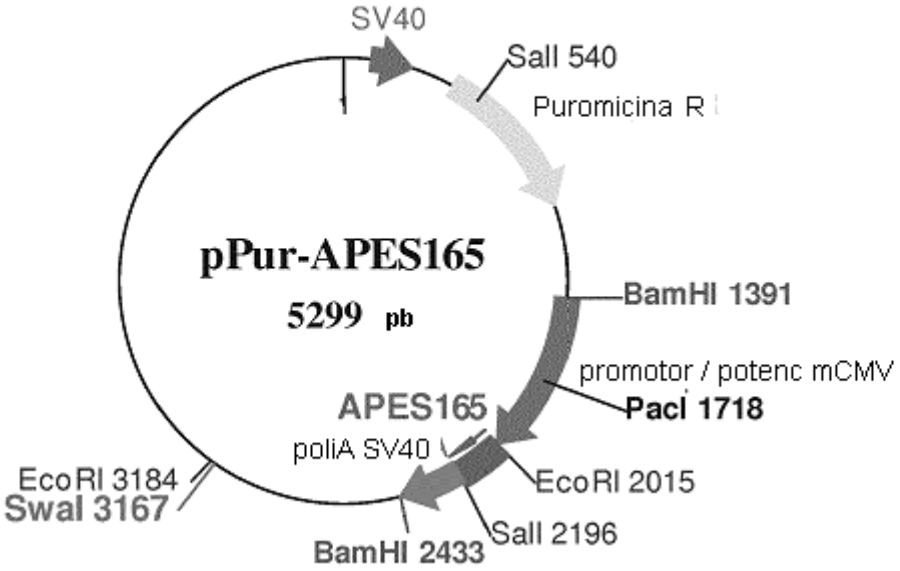


Figura 17


SV40
SalI 540
Puromicina R
pPur-APES165
5299 pb
BamHI 1391
promotor / potenc mCMV
PacI 1718
APES165
poliA SV40
EcoRI 2015
EcoRI 3184
SwaI 3167
SalI 2196
BamHI 2433

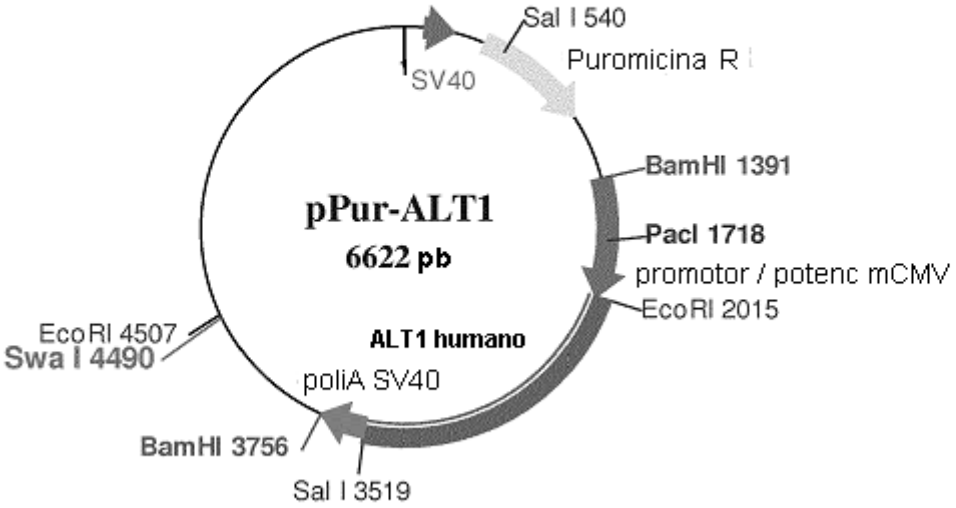

Sal I 540
Puromicina R
SV40
BamHI 1391
pPur-ALT1
6622 pb
PacI 1718
promotor / potenc mCMV
EcoRI 2015
EcoRI 4507
Swa I 4490
ALT1 humano
poliA SV40
BamHI 3756
Sal I 3519

Figura 18

Cepa productora de MAb1	Densidad celular más alta ((x10e6 células/mL)	Cantidad de producción de anticuerpo (g/L/14 días)
Cepa que expresa fuertemente APES165	11,5 ± 1,7	4,4 ± 0,6
Cepa que expresa altamente ALT1	8,9 ± 1,8	4,0 ± 0,6
Cepa parental	4,1	3,4

Cultivo de alimentación por lotes en agitador (n = 3)

Figura 19

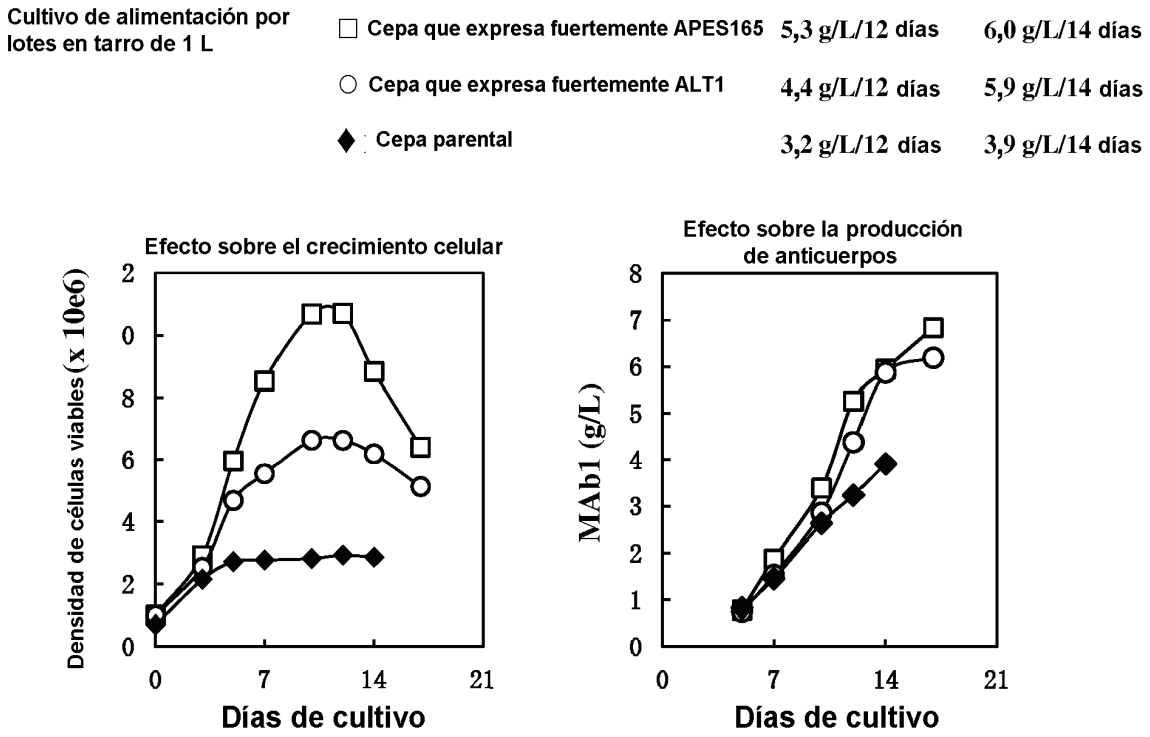


Figura 20

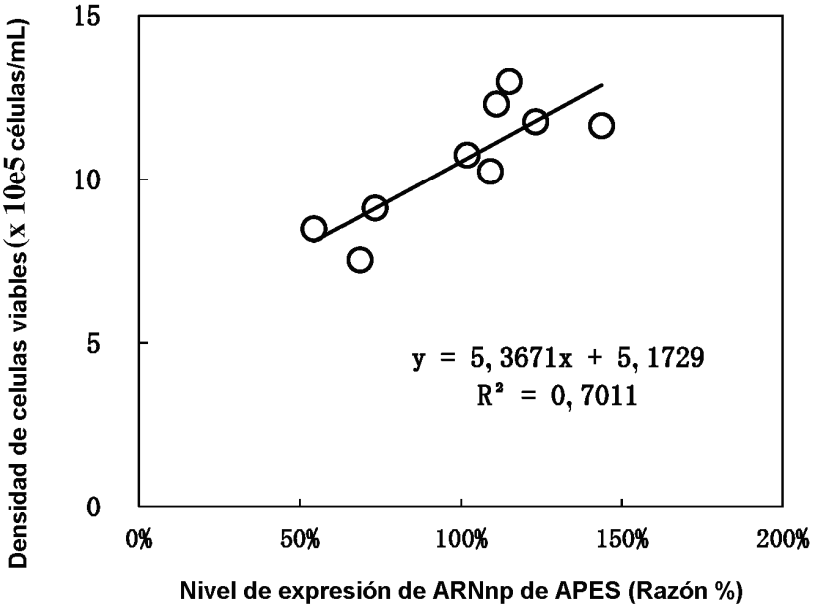


Figura 21

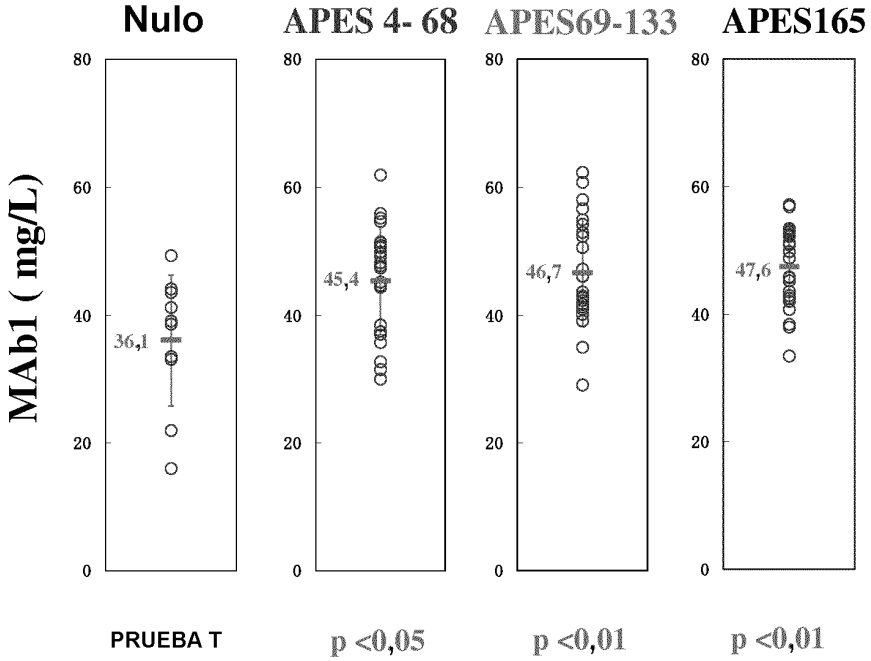
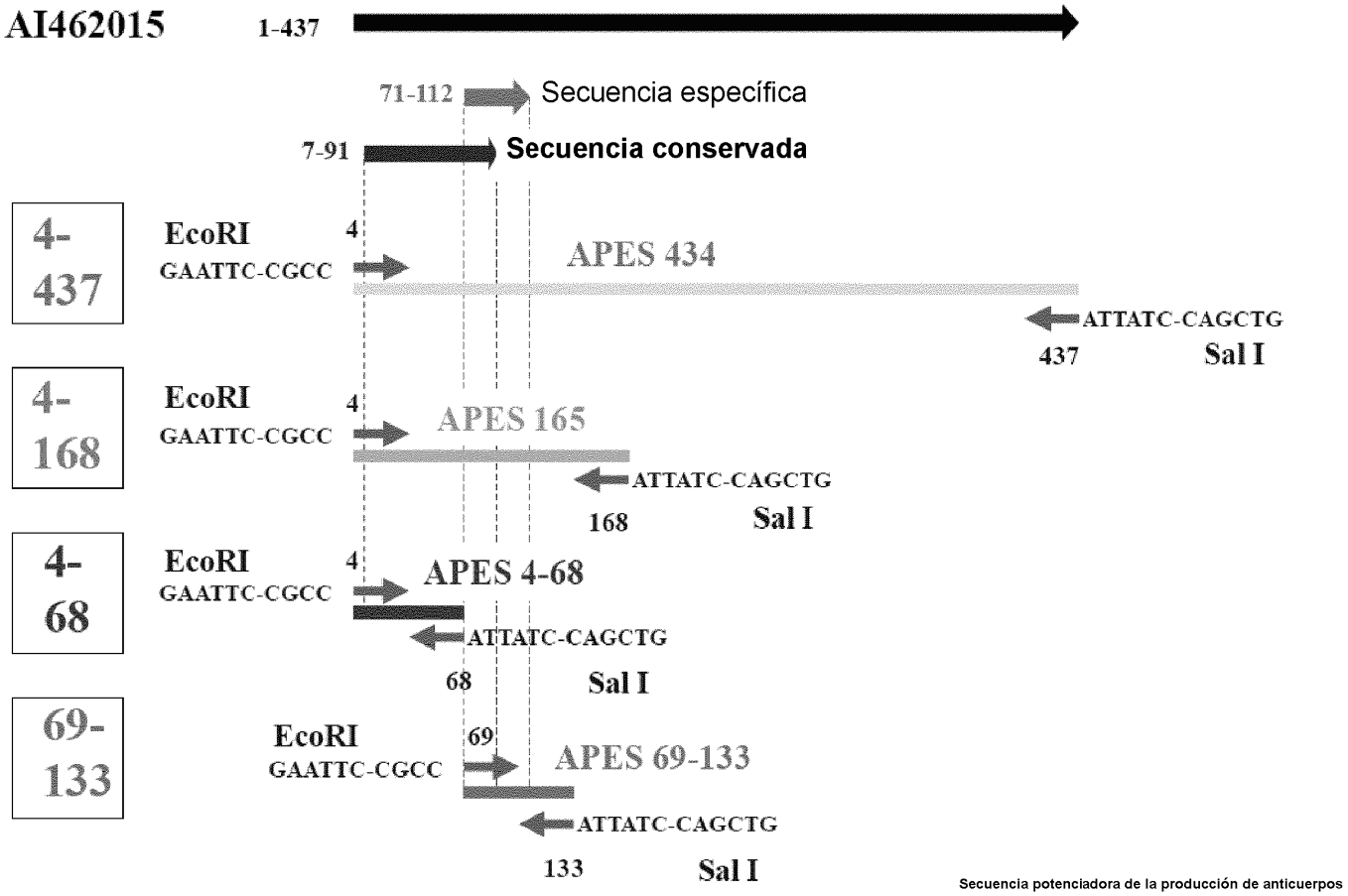


Figura 22

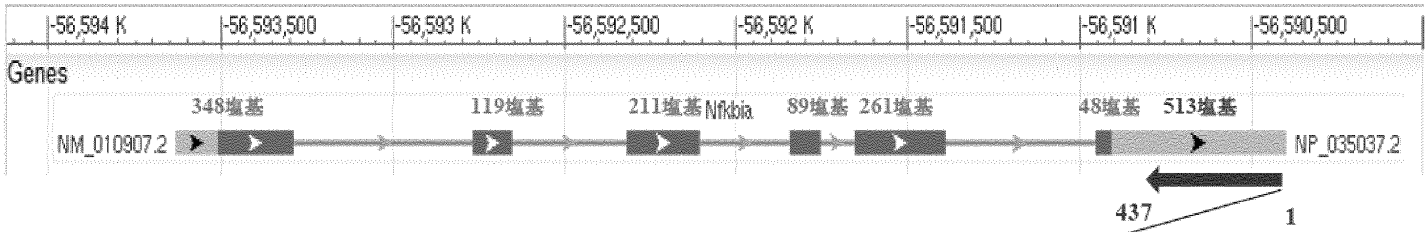
Identificación del transcrito activo de APES



Secuencia potenciadora de la producción de anticuerpos

Figura 23

Cromosoma de genoma de ratón : 12



Factor nuclear de Mus musculus del potenciador del gen del polipéptido ligero kappa en ARNm del inhibidor alfa, (Nfkabia) de células B

1

Secuencia conservada (7-91)

TTTGTCTGTAAAAATCTGTTTAATAAATATACATCTTAGAAGTACCAAAATAATTACCAACAAAATACAACATATACAACATTTACAAGAAGGCGACACA
GACCTTAGTTGGGGGCGACTTTTAAGCACATGCCACTGAACACCTGGCTCTTACATGGGAGGACACACTGGGCTCACTTACTAGGTCTATGGTGGTTCAA
TCAAAAGCACAATAAATAAAACGTGGTCCTTTCATTAGGTTCTGGAAAATCACCTCCCCCCCCCCCAAAAAAAATCCCACAAACATGAACCTTAAGAGAC
ATTTTCTTTGAATTTCAGTGATCTGTTTCCCCGGATTTCACAAAGACAACAGCCGAATCACCCCAGTAAAATGCCTGGGTCTAGGCGCTGTGTGGTGTGG
TGCTAAGTATACCCTTTCTCATTTTTTTTCTTTTTCT

437

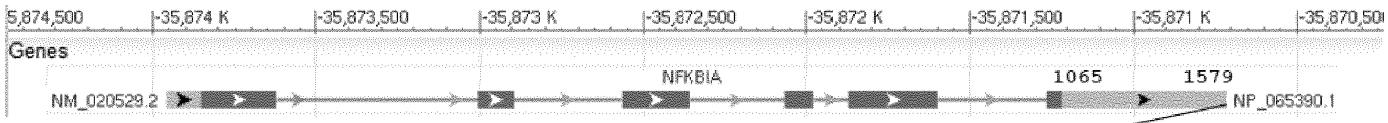
AI422015 (437 nucleótidos)

Figura 24

>gb lJH001217.1l Consulta sobre andamio genómico no ubicado de la línea celular CHO-K1 de Cricetulus griseus andamio 4235, secuencia aleatoria del genoma completo Longitud = 486540, Puntuación = 378 bits (418), Esperada = 3e-102 Identidades = 352/440 (80%), huecos = 33/440 (7%) Hebra más/menos

```
Consulta 3      TGTCTGTAAAAATCTGTTTAATAAATATACATCTTAGAAGTACCAAAATAATTACCAACA 62     (AI462015)
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sujeto   385673 TGTCTGTAAAAATCTGTTTAATAAATATACATCTTAGAAGTACCAAAATAATTACCAACA 385614 (genoma de CHO-K1)

Consulta 63     AAATACAACATATACAACATTTACAAGAAGGCGACACAGACCTTAGTTGGGGGCGACTTT 122    (AI462015)
                ||||||| |||||||||||||||||||| || ||| | |||| ||| ||| | ||||
Sujeto   385613 AAATACACCATATACAACATTTACAAGAGGGTAACAAAAACCTCAGTCGGGAGTGACT-- 385556 (genoma de CHO-K1)

Consulta 123    TAAGCACATGCCACTGAACACCTGGCTCTTACATGGGAGGACACACTGGGCTCACTTACT 182    (AI462015)
                ||||||| ||||| ||||||||| || |||||| ||||||| || |||||| |||
Sujeto   385555 --AGCACATACCACTCAACACCTGGTTC-TACATGTGAGGACATACCAGGCTCAGCTACC 385499 (genoma de CHO-K1)

Consulta 183    AGGTCTATGGTGGTTCAATCAAAAGCACAATAAATAAAACGTGGT-CCTTTCATTAGGTT 241    (AI462015)
                || |||| ||||| |||||||||||||||||| || ||||| |||||||| || |
Sujeto   385498 AGATCTA---CCGTTCAGTCAAAAGCACAATAAATAGAATGTGGTCCCTTTCATCAG--T 385444 (genoma de CHO-K1)

Consulta 242    CTGGAAAATCACCTcccccccccccaaaaaaaaTCCCACAAACATGAACCTTAAGAGACA 301    (AI462015)
                |||||||| |||||||| |||| | ||| || ||| | |||| |||||
Sujeto   385443 CTGGAAAACCACCTCCC------------AAAACCTCACGAATGTGAGCTTTAAAAGACA 385396 (genoma de CHO-K1)

Consulta 302    TTTTCTTTGAATTTCAGTGATCTGTTTCCCCGGATTTCACAAAGACAACA----GCCGAA 357    (AI462015)
                |||||||||||||| || |||||||||||||| |||||||||| | |||| ||| |
Sujeto   385395 TTTTCTTTGAATTCCAATGATCTGTTTCCCC--ATTTCACAAAAATAACAATCTGCC--A 385340 (genoma de CHO-K1)

Consulta 358    TCACCCCAGTAAAATGCCTGGGTCTAGGCGCTGTGTGGTGTGGTGCTAAGTATA-CCCTT 416    (AI462015)
                ||||| ||||| |||| |||| |||| |||| |||||||| |||||||| |||||
Sujeto   385339 TCACCAGAGTAAGATGCTTGGGGGCAGGCTGTGTGCAGTGTGGTGGTAAGTATATCCCTT 385280 (genoma de CHO-K1)

Consulta 417    TC-TCAttttttttcttttt 435
                || |  ||||||||||| ||
Sujeto   385279 TCTTTCTTTTTTTTCTTCTT 385260
```

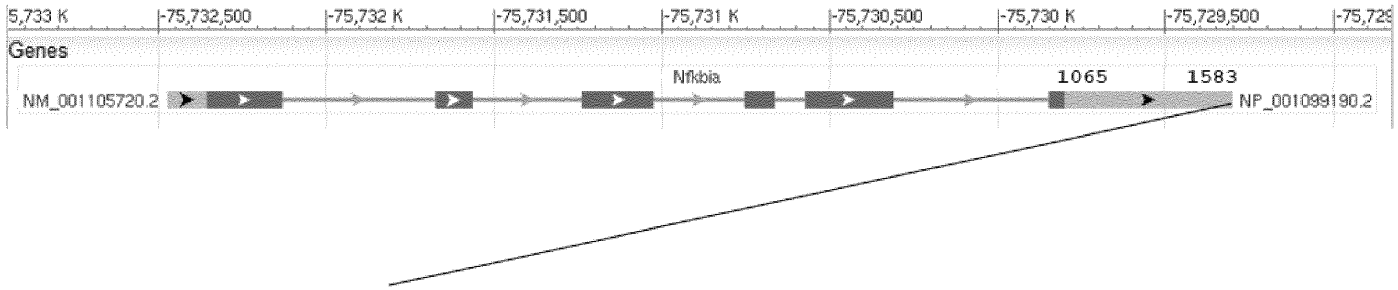
Figura 25a




```
Nfkbia Humano    1562: TGTAAAAATC TGTTTAATAA ATATACATCA TAAAAGTACC AAAATAATTA 1511
                       ********** ********** *********  ** ******* **********
AI462015            7: TGTAAAAATC TGTTTAATAA ATATACATCT TAGAAGTACC AAAATAATTA   56

                 1512: CCAACAA--T ACATTATGTA CACCATTTAC AGGAG 1478
                       *******  * ***  ** ** ** ******* * **
                   57: CCAACAAAAT ACAACATATA CAACATTTAC AAGAA   91
```

Coincidencia = 75/85 (88%)

Figura 25b



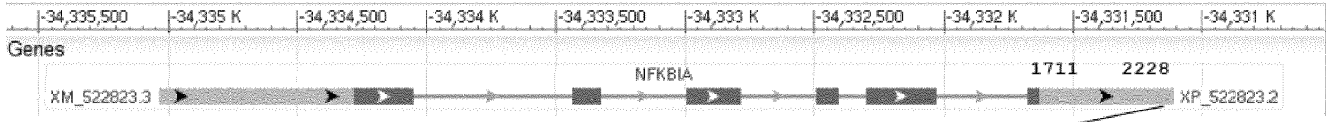
Nfkbia de Rata

AI462015

```
1562: TGTAAAAATC TGTTTAATAA ATATACATCT TAGAAGTACC AAAATAATTA 1511
      ********** ********** ********** ********** **********
   7: TGTAAAAATC TGTTTAATAA ATATACATCT TAGAAGTACC AAAATAATTA   56

1512: CCAACAAAAT ACACCATATA CAACATTTAC AAGAA 1478
      ********** *** ****** ********** *****
  57: CCAACAAAAT ACAACATATA CAACATTTAC AAGAA   91
```

Coincidencia = 84/85 (99%)

Figura 25C



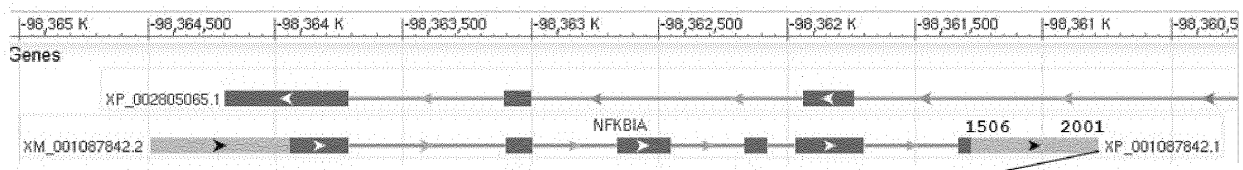
Nfkbia de Chimpancé

AI462015

```
2209: TGTAAAAATC TGTTTAATAA ATATACATCA TAAAAGTACC AAAATAATTA 2158
      ********** ********** *********  ** ******* **********
   7: TGTAAAAATC TGTTTAATAA ATATACATCT TAGAAGTACC AAAATAATTA   56

2159: CTAAC--AAT ACATTATGTA CATCATTTAC AGGAGGGTAA C 2121
      * ***  *** ***  ** ** ** ******* *  **    *
  57 : CCAACAAAAT ACAACATATA CAACATTTAC A--AG----A A   91
```

Coincidencia = 75/85 (88%)

Figura 25d



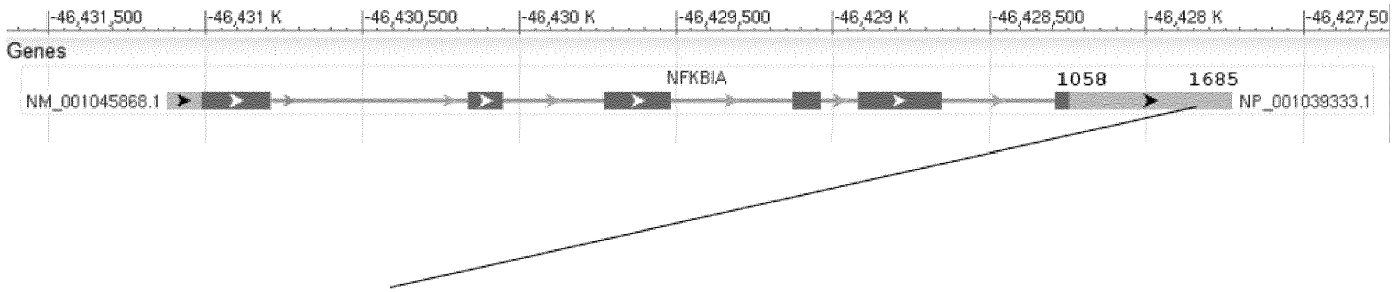
Nfkbia de Mono Rhesus

AI462015

```
1995: TGGAAAAATC TGTTTAATAA ATATACATAA TAAAAGTACC AAAATAATTA 1944
      ** ******* ********** ********   ** ******* **********
   7: TGTAAAAATC TGTTTAATAA ATATACATCT TAGAAGTACC AAAATAATTA   56

1945: CCAAC--AAT ACACTATGTA CACCATTTAC AGAAGGGTAA C 1907
      *****  *** ***  ** ** ** *******   ***    *
  57: CCAACAAAAT ACAACATATA CAACATTTAC --AAG----A A   91
```

Coincidencia = 74/85 (87%)

Figura 25e




```
Nfkbia Bovino   1570: TGTAAAAATC TGTTTAATAA ATATACATCT TAAAAGTACC AAAATAATTA 1519
                      ********** ********** ********** ** ******* **********
AI462015           7: TGTAAAAATC TGTTTAATAA ATATACATCT TAGAAGTACC AAAATAATTA   56

                1520: CTGACAAAAT ACACTATGTA CACTATTTAC AGGAGGGGAA 1481
                      *  ******* ***  ** ** **  ****** *      ***
                  57: CCAACAAAAT ACAACATATA CAACATTTAC A-----AGAA   91
```

Coincidencia = 76/85 (89%)