

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 191**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12	(2006.01)
C12N 15/13	(2006.01)
C12N 15/53	(2006.01)
C12N 9/02	(2006.01)
C07K 14/47	(2006.01)
C12P 21/02	(2006.01)
C07K 16/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.02.2010 PCT/GB2010/000234**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.08.2010 WO10092335**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2010 E 10703495 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2396410**

54 Título: **Método para producir proteínas**

30 Prioridad:

10.02.2009 GB 0902180

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.08.2017

73 Titular/es:

**UCB BIOPHARMA SPRL (100.0%)
Allée de La Recherche 60
1070 Brussels, BE**

72 Inventor/es:

**CAIN, KATHARINE, LACY;
PETERS, SHIRLEY, JANE y
STEPHENS, PAUL, EDWARD**

74 Agente/Representante:

ELZABURU SLP, .

ES 2 628 191 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).

DESCRIPCION

Método para producir proteínas

La presente invención se refiere a una célula huésped recombinante capaz de mejorar la producción de una proteína de interés. La invención también se refiere a un método para mejorar la capacidad de una célula para producir una proteína de interés y un método para producir una proteína de interés en dicha célula.

Antecedentes de la invención

Una de las funciones más importantes del sistema de Golgi-Retículo Endoplásmico (ER) es facilitar las modificaciones postraduccionales, incluyendo el plegamiento de proteínas. El plegamiento correcto de las proteínas recién traducidas es esencial para asegurar que las proteínas extracelulares secretadas y las proteínas de la membrana puedan funcionar correctamente. El plegamiento de proteínas permite que un polipéptido se pliegue en su estructura tridimensional característica y funcional. El plegamiento de proteínas implica la formación de enlaces no covalentes y covalentes. Generalmente en las células eucariotas, las proteínas chaperonas del RE intervienen en el plegamiento de las proteínas en el RE rugoso.

La proteína isomerasa disulfuro (PDI) es una proteína chaperona que cataliza la formación e isomerización de enlaces disulfuro entre dos residuos de cisteína en los polipéptidos. La formación de enlaces disulfuro es una reacción redox. Las proteínas se oxidan mediante PDI cuando están en un estado oxidado, lo que produce un enlace disulfuro en la proteína y hace que PDI se encuentre en un estado reducido que comprende grupos sulfhidrilo libres.

La proteína oxidoreductasa 1 del RE (Ero1) es un componente esencial de la maquinaria del plegamiento oxidativo. Ero1 es una enzima dependiente del dinucleótido de flavina y adenina (FAD) que facilita la formación de enlaces disulfuro en las subunidades de inmunoglobulina mediante la oxidación selectiva de PDI (Mezghrani et al., 2001, EMBO Journal, 20 (22), 6288-6296). En los seres humanos se han identificado dos isoformas denominadas Ero1-L α y Ero1-L β humanas.

El documento US6361964 describe sistemas de expresión que hacen uso de Ero1 para aumentar la formación de enlaces disulfuro y por lo tanto aumentar el rendimiento de las proteínas recombinantes plegadas correctamente.

La respuesta de las proteínas mal plegadas (UPR) permite que las células respondan a un aumento de la demanda en la capacidad de plegamiento de las proteínas del RE mediante la coordinación de la regulación a la baja de la síntesis de proteínas, con el aumento de la expresión de diversas proteínas incluyendo las proteínas chaperonas residentes del RE y las enzimas de plegamiento que permiten el plegamiento de las proteínas (Gunn et al., 2004, Molecular Immunology, 41, 919-9927). La UPR también puede causar el crecimiento del ER con el fin de proporcionar una mayor capacidad de plegamiento de las proteínas.

El documento WO99/07727 describe sistemas de expresión que hacen uso de Ero1 para mejorar la formación de puentes disulfuro e incrementar la producción de proteínas recombinantes plegadas adecuadamente. También describe polipéptidos Ero1 recombinantes, ácidos nucleicos, vectores y células para expresar tales polipéptidos recombinantes.

El documento WO2008115596 describe métodos para producir proteínas heterólogas mediante: (a) proporcionar una célula huésped que comprende un primer gen recombinante que codifica una proteína que comprende la secuencia de una primera proteína chaperona, un segundo gen recombinante que codifica una proteína que comprende la secuencia de una segunda proteína chaperona diferente de la primera proteína chaperona y un tercer gen, tal como un tercer gen recombinante, que codifica una proteína heteróloga, donde la primera y la segunda chaperonas son diferentes; y (b) cultivar la célula huésped en un medio de cultivo para obtener la expresión de los genes primero, segundo y tercero.

Se sabe que la Proteína 1 de Unión a la Caja X (XBP1) es un regulador clave de la respuesta de las proteínas mal plegadas. XBP1 es un factor de transcripción que está implicado en la diferenciación de células B, en la expansión del RE mediante la estimulación de la actividad de las enzimas implicadas en la biosíntesis de lípidos y que regula el gen que codifica las proteínas chaperonas residentes en el RE implicadas en la UPR (Lee et al., 2003, Molecular and Cellular Biology, 23 (21), 7448-7459). Se cree que XBP1 causa el desarrollo del RE mediante la regulación al alza o la activación de las enzimas, incluyendo la citidiltransferasa de colina (CCT). CCT es la enzima limitante de la velocidad en la ruta de la CDP-colina para la producción de fosfatidilcolina (PtdCho), que es el fosfolípido primario de la membrana del RE.

En Tigges M et al. "Xbp1-based engineering of secretory capacity enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells" (Metabolic Engineering, 2006 vol. 8, nº 3, páginas 264-272) se describe la expansión del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi de las líneas celulares derivadas de CHO-K1 transgénicas con el resultado de un incremento general de la capacidad de producción. Los cuellos de botella secretores construidos con Xbp-1 muestran que Xbp-1 era compatible con una variedad de distintas configuraciones génicas promotor-productor.

El uso de XBP1 en métodos para la producción de proteínas en los que una proteína de interés se expresa conjuntamente con XBP1 se describe en los documentos WO2004/111194, WO2006/028889 y US2005/0250182.

5 Por consiguiente, se conocen métodos para mejorar el rendimiento de los sistemas de expresión de proteínas usando un componente de la ruta de UPR. Sin embargo, todavía existe la necesidad de proporcionar métodos mejorados para aumentar el rendimiento de las proteínas en los sistemas de expresión.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una célula huésped recombinante capaz de mejorar el rendimiento de una proteína de interés. Los presentes inventores han demostrado que un aumento de Ero1 y XBP1 en una célula proporciona medios mejorados para proporcionar una proteína de interés.

10 Por lo tanto, la presente invención proporciona una célula huésped recombinante, en donde la célula se modifica para incluir una secuencia de polinucleótidos exógena que codifica Ero1 que comprende una secuencia de polipéptidos dada en SEQ ID NO: 3 o una variante de la misma que sustancialmente retiene la función de Ero1; y una secuencia polinucleotídica exógena que codifica XBP1 que comprende la secuencia polipeptídica dada en la SEQ ID NO: 1 o una variante de la misma que sustancialmente retiene la función de XBP1 y dicha célula huésped
15 modificada tiene niveles de expresión aumentados de Ero1 y XBP1 con respecto a los niveles de expresión de Ero1 y XBP1 en una célula no modificada.

La célula proporcionada por la presente invención es ventajosa porque en una realización aumenta el rendimiento de una proteína de interés. En una realización adicional, el presente método aumenta la capacidad de la célula para realizar modificaciones postraduccionales. El presente método puede iniciar o regular al alza la ruta de UPR.
20 Además, la proteína de interés expresada por la célula de acuerdo con la presente invención puede tener sustancialmente las mismas propiedades que cuando la proteína se expresa en una célula no modificada.

La presente invención también proporciona un método que comprende modificar una célula para aumentar de ese modo la capacidad de la célula para incrementar los niveles de expresión de Ero1 y XBP1 en relación con los niveles de expresión de Ero1 y XBP1 en una célula no modificada.

25 En un aspecto de la presente invención, el método sirve para expresar una proteína de interés. Los presentes inventores han encontrado que la sobreexpresión de Ero1 y XBP1 mejora significativamente la capacidad de la célula para expresar una proteína de interés lo que da como resultado mayores rendimientos de la proteína de interés.

La presente invención también proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica Ero1 o una variante de la misma que sustancialmente retiene la función de Ero1; y una secuencia polinucleotídica que codifica XBP1 o una variante de la misma que sustancialmente retiene la función de XBP1.
30

Breve descripción de las figuras.

En los siguientes dibujos se describen formas de realización específicas de la presente invención únicamente a modo de ejemplo, en las que:

35 La Figura 1a muestra la secuencia de aminoácidos de la forma empalmada de XBP1 humano (hXBP1s) (SEQ ID NO: 1). El * indica un codón de parada.

La Figura 1b muestra la secuencia de ácido nucleico de la forma empalmada de XBP1 humano (hXBP1s) (SEQ ID NO: 2).

La Figura 2a muestra la secuencia de aminoácidos de Ero1α humano (hEro1α) (SEQ ID NO: 3).

40 La Figura 2b muestra la secuencia de ácido nucleico de Ero1α humano (hEro1α) (SEQ ID NO: 4).

La Figura 3a muestra la expresión del ARNm de hEro1α y la Figura 3b muestra la expresión del ARMm de los hXBP en clones de células CHOSXE (17, 25, 77, 18, 78, 70, 103, 85, 87, 67, 176, 36, 173, 30, 76, 89, 86, 94 y 101), CHOSX y CHOK1E con respecto a CHOS después de una primera etapa de selección de clones de células CHOSXE.

45 La Figura 4 muestra la expresión de ARMm de hEro1α y hXBPs después de la selección de 2 clones de células CHOSXE en clones de células CHOSXE (23, 64, 19, 22, 11, 69, 53, 72, 16, 62, 13, 63, 25, 45, 10, 55, 20, 71, 52, 49 y 57), CHOSX y CHOK1E con respecto a CHOS, después de una segunda etapa de selección de clones de células CHOSXE.

50 La Figura 5 muestra el aumento relativo de la expresión de los anticuerpos 632 y 497 en los clones de células de una línea celular CHOS transfectada con hEro1α y hXBP1 (CHOSXE) y una línea celular CHOS transfectada con

hXBP1 (CHOSX) en comparación con la expresión de los anticuerpos 632 y 497 en una línea celular CHOS.

5 La Figura 6 muestra el aumento relativo de la expresión de anticuerpos 146 y 240 a partir de clones celulares de una línea celular CHOS transfectada con hEro1 α y hXBP1 (CHOSXE), una línea celular CHOS transfectada con hXBP1 (CHOSX) y una línea celular CHOK1 transfectada con hEro1 α (CHOK1E) en comparación con la expresión de los anticuerpos 146 y 240 a partir de una línea celular CHOS.

La Figura 7 muestra una curva de crecimiento de las líneas celulares CHOS, CHOSX, CHOSXE, CHOK1 y CHOK1E.

La Figura 8 muestra el aumento relativo en la expresión de los anticuerpos 42, 61 y 164 en CHOSXE y CHOSX en comparación con la expresión de 42, 61 y 164 en células CHOS.

10 La Figura 9 muestra la productividad específica de las líneas celulares CHOS, CHOSX y CHOSXE entre el día 4 y el día 7 para los anticuerpos 42, 61 y 164.

La Figura 10 muestra la expresión relativa del ARMm de cadena ligera y de cadena ligera kappa para los anticuerpos 42, 61 y 164 expresados en las líneas celulares CHOSX y CHOSXE en comparación con la línea celular CHOS.

15 La Figura 11 muestra el % de agregación de los anticuerpos 42, 61 y 164 expresados en CHOK1, CHOS, CHOSX y CHOSXE.

La Figura 12a muestra una SDS PAGE del anticuerpo 42 expresado en CHOS, CHOSX, CHOSXE y CHOK1; la Figura 12b muestra una SDS PAGE del anticuerpo 61 expresado en CHOS, CHOSX, CHOSXE y CHOK1; y la Figura 12c muestra una SDS PAGE del anticuerpo 164 expresado en CHOS, CHOSX, CHOSXE y CHOK1.

20 La Figura 13 muestra los resultados de un ensayo de ThermoFluor de los anticuerpos 42, 61 y 164 expresados en CHOS y CHOSXE.

La Figura 14 muestra los perfiles de glicosilación de los anticuerpos 42, 61 y 164 expresados en CHOS y CHOSXE.

La Figura 15 muestra los resultados de un ensayo de unión a antígeno de 164 expresado en CHOS y CHOSXE.

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención proporciona una célula huésped recombinante que tiene capacidad mejorada para producir una proteína de interés debido a la modificación de la célula para aumentar la expresión de Ero1 y XBP1. Los presentes inventores han encontrado que un aumento de Ero1 y XBP1 en una célula huésped mejora significativamente el rendimiento proteico comparado con una célula no modificada. Preferiblemente, la célula de acuerdo con la presente invención tiene una productividad específica de una proteína de interés del 80% o más, 85% o más, 90% o más, 100% o más, 150% o más, 200% o más, 300% o más, 400% o más, 500% o más, 600% o más, 700% o más o 800% o más con respecto a las células de control que no han sido modificadas para aumentar Ero1 y XBP1. Más preferiblemente, la célula de acuerdo con la presente invención tiene una productividad específica de una proteína de interés del 100% al 1000%, más preferiblemente del 200% al 1000%, aún más preferiblemente del 500% al 1000% con respecto a las células de control que no han sido modificadas para aumentar Ero1 y XBP1.

30 Además, los presentes inventores han encontrado que la célula de acuerdo con la presente invención tiene un rendimiento proteico mejorado en comparación con una célula que sobreexpresa Ero1 o XBP1 con la proteína de interés.

40 En una realización, la célula de acuerdo con la presente invención tiene una productividad específica de una proteína de interés mayor que la productividad celular combinada de una proteína de interés de una célula modificada para aumentar la expresión de Ero1, pero no de XBP1 y una célula modificada para aumentar XBP1 pero no Ero1. Preferiblemente, la célula de acuerdo con la presente invención tiene una productividad específica de una proteína de interés del 5% o más, 6% o más, 10% o más, 20% o más, 30% o más, 40% o más, 50% o más, 60% o más, 70% o más, 80% o más, 90% o más, 100% o más, 110% o más, 120% o más, 130% o más, 140% o más, 150% o más, más preferiblemente del 5% al 150%, del 6% al 130%, del 10% al 130% o del 50% al 130% con respecto a la productividad celular combinada de una proteína de interés de una célula modificada para aumentar la expresión de Ero1 pero no de XBP1 y una célula modificada para aumentar XBP1 pero no Ero1.

45 Preferiblemente, la célula de acuerdo con la presente invención tiene una productividad específica de una proteína de interés de 2 o más $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células/día, preferiblemente 3 o más $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células/día, más preferiblemente más de 3 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células/día, aún más preferiblemente 3,2 o más $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células/día, más preferiblemente de 3,2 a 6,5 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células/día.

50 El experto en la técnica podría fácilmente probar un clon de una célula candidata para ver si tiene el rendimiento deseado de una proteína de interés usando métodos bien conocidos en la técnica, tales como ELISA.

En una realización adicional, la co-expresión de Ero1 y XBP1 proporciona un rendimiento mejorado de proteínas correctamente plegadas de la célula, en relación con células no modificadas. El experto en la materia podría fácilmente probar la proteína secretada para ver se pliega correctamente usando métodos bien conocidos en la técnica, tales como HPLC de proteína G, difracción circular, RMN y cristalografía de rayos X.

5 Sin querer limitarse a la teoría, se cree que la expresión mejorada de la proteína se debe al aumento de la capacidad de la célula para plegar las proteínas. Específicamente, el aumento de la expresión de Ero1 aumenta la capacidad de la célula para formar enlaces disulfuro en las proteínas del RE. Además, el aumento de la expresión de XBP1 causa la regulación al alza de la expresión de la proteína chaperona del RE y puede aumentar el tamaño del RE. La célula proporcionada por la presente invención puede proporcionar también un aumento en el
10 rendimiento de la proteína en relación con las células no modificadas debido a la mayor capacidad de la célula para plegar todas las proteínas expresadas por la célula, lo que incrementa de este modo todas las vías celulares incluyendo la transcripción, la traducción, el plegamiento de proteínas y las rutas de secreción. Además, debido al aumento de Ero1 y XBP1 el incremento de la capacidad de la célula para procesar proteínas recién traducidas, cualquier control de realimentación de la transcripción del ARNm y/o de la traducción de proteínas puede causar un
15 aumento en la transcripción y/o traducción de proteínas.

En una realización adicional, la co-expresión tanto de Ero1 como de XBP1 en la célula de la invención proporciona un crecimiento celular y/o una estabilidad y/o una reproducción mejorada en relación con las células no modificadas. Preferiblemente, las células proporcionadas por la presente invención tienen una densidad celular aumentada después del mismo período de cultivo del 30% o más, 50% o más, 60% o más, 70% o más, 80% o más, 90% o más,
20 100 % o más, 130% o más, 150% o más, 170% o más, o 190% o más en comparación con la densidad celular de un cultivo de células de control que no han sido modificadas para aumentar Ero1 y XBP1.

El experto en la técnica podría fácilmente seleccionar células que tengan un crecimiento celular y/o una estabilidad y/o una reproducción mejorada, por ejemplo, midiendo la densidad celular y/o la viabilidad celular de un cultivo celular después de un período de cultivo fijo. Los métodos adecuados conocidos de la técnica incluyen el sistema de
25 recuento de células automatizado CEDEX (Innovatis) basado en el método de exclusión de Blue Trypan muy establecido en la determinación de la viabilidad celular. La manipulación de las muestras, la tinción, el recuento de células y el análisis gráfico de los resultados se realizan automáticamente mediante el sistema CEDEX.

Sin pretender limitarse a la teoría, se cree que el crecimiento y/o la estabilidad celular mejorada se deben a la mayor capacidad de la célula para procesar todas las proteínas que requieren modificaciones postraduccionales en el RE,
30 lo que incrementa las rutas celulares. Por consiguiente, la producción de proteínas correctamente plegadas necesarias para el crecimiento y la reproducción de la célula pueden aumentarse, mejorando de este modo las rutas celulares que regulan el crecimiento y/o la estabilidad y/o la reproducción.

Estos hallazgos son inesperados, sobre todo porque XBP1 y Ero1 no están vinculadas a la ruta de UPR. La UPR es extremadamente compleja e implica numerosas rutas diferentes. Aunque se puede esperar que la co-expresión de
35 XBP1 o Ero1 con componentes o moduladores adicionales de la misma ruta de UPR mejore la expresión de la proteína, es sorprendente que la co-expresión de dos proteínas no conectadas proporcione un sistema de expresión de proteínas significativamente mejorado.

La presente invención se describirá ahora con más detalle.

40 Los términos "proteína" y "polipéptido" se usan indistintamente en este documento, a menos que el contexto indique lo contrario. "Péptido" se refiere a 10 o menos aminoácidos.

Los términos "polinucleótido" incluyen un gen, ADN, ADNc, ARN, ARNm, etc. a menos que el contexto indique lo contrario.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "que comprende" en el contexto de la presente memoria descriptiva debe interpretarse como "que incluye".

45 En un aspecto de la presente invención se proporciona una célula huésped recombinante modificada para comprender una secuencia polinucleotídica exógena que codifica Ero1, que comprende la secuencia polipeptídica dada en la SEQ ID NO: 3 o una variante de la misma que sustancialmente retiene la función de Ero1; y una secuencia polinucleotídica exógena que codifica XBP1, que comprende la secuencia polipeptídica dada en la SEQ ID NO: 1 o una variante de la misma que sustancialmente retiene la función de XBP1, y dicha célula huésped
50 modificada tiene niveles de expresión aumentados de Ero1 y XBP1 con respecto a los niveles de expresión de Ero1 y XBP1 en una célula no modificada.

La célula o célula de control no modificada en el contexto de la presente invención significa una célula del mismo tipo que la célula huésped, en donde la célula no ha sido modificada para aumentar/regular al alza /sobreexpresar los niveles de expresión de Ero1 y XBP1, por ejemplo, la célula no modificada puede derivarse de una población de células huéspedes antes de la modificación para aumentar/ regular al alza /sobreexpresar los niveles de expresión de Ero1 y XBP1.
55

- 5 En una realización, la célula comprende una secuencia polinucleotídica recombinante exógena que codifica Ero1 o una variante de la misma que sustancialmente retiene la función de Ero1; y un polinucleótido recombinante exógeno que codifica XBP1 o una variante del mismo que sustancialmente retiene la función de XBP1. En esta realización, la célula puede comprender un polinucleótido que codifica tanto Ero1 como XBP1 y/o la célula puede comprender polinucleótidos separados que codifican Ero1 y XBP1.
- Tal y como se usa en el presente documento, se pretende que "el polinucleótido que codifica Ero1", "el polinucleótido que codifica XBP1" y "el polinucleótido que codifica Ero1 y XBP1" se refieran a todos los aspectos y realizaciones de la presente invención en los que Ero1 y XBP1 pueden estar codificados por los mismos y/o por polinucleótidos separados, a menos que se indique lo contrario.
- 10 Por consiguiente, la célula de acuerdo con la presente invención puede comprender un polinucleótido exógeno Ero1 y XBP1 que comprende tanto una secuencia polinucleotídica que codifica Ero1 como una secuencia polinucleotídica que codifica XBP1. La célula de acuerdo con la presente invención puede comprender también un polinucleótido de este tipo en forma de un casete de expresión o un vector.
- 15 Alternativamente o adicionalmente, la célula de acuerdo con la presente invención comprende un polinucleótido Ero1 exógeno que comprende la secuencia polinucleotídica que codifica Ero1 y un polinucleótido XBP1 exógeno separado que comprende la secuencia polinucleotídica que codifica XBP1. Por consiguiente, la célula de acuerdo con la presente invención puede comprender un casete o un vector de expresión de Ero1 que comprende el polinucleótido Ero1 y un casete o un vector de expresión XBP1 separado que comprende el polinucleótido XBP1.
- 20 En una realización adicional, la expresión aumentada de Ero1 y XBP1 es resultado de la modulación de los polinucleótidos endógenos que codifican Ero1 y XBP1 en la célula de acuerdo con la presente invención. En esta realización, la célula se modifica para aumentar la transcripción y la traducción de los genes endógenos de Ero1 y XBP1.
- 25 La célula de acuerdo con la presente invención puede comprender además una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés. La secuencia polinucleotídica que codifica la proteína de interés puede ser exógena o endógena. La secuencia polinucleotídica que codifica la proteína de interés puede integrarse en el cromosoma del huésped o puede estar no-integrada en un episoma.
- 30 En la realización en donde la secuencia polinucleotídica que codifica la proteína de interés es exógena y la célula comprende uno o más polinucleótidos exógenos que codifican Ero1 y XBP1, la secuencia polinucleotídica que codifica la proteína de interés puede formar parte de uno o más de los polinucleótidos codificantes exógenos Ero1 y/o XBP1. Por consiguiente, la secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés puede estar en la misma secuencia polinucleotídica que XBP1 y Ero1. Alternativamente o adicionalmente, la secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés puede estar la misma secuencia polinucleotídica que la secuencia polinucleotídica de Ero1 separada y/o que la secuencia polinucleotídica de XBP1 separada.
- 35 Las células adecuadas para utilizar en la invención incluyen células eucariotas, por ejemplo células vegetales, células de insectos, células de levaduras, células animales tales como células de mamífero, en particular células CHO, células de mieloma, células viro, células MRC5, células HEK, células NSO, células SP2 y similares.
- 40 Se ha descubierto que las células CHO son particularmente útiles para la expresión de mamíferos porque las proteínas expresadas en células CHO tienen glicofomas que son generalmente compatibles y bioactivas en seres humanos. Por consiguiente, en un aspecto la invención emplea una célula de mamífero tal como una célula CHO, por ejemplo una célula CHOS (Invitrogen Cat. No. 11619-012, Deaven, L.L. et al, 1973, Chromasoma 41, 129, D'Anna, J.A. et al., 1996, Methods in Cell Science 18, 115, D'Anna, J.A. et al., 1997, Radiation Research 148, 260) o la célula CHOK1 (Puck, T. et al., 1967, Genetics of Somatic Mammalian Cells IV Properties of Chinese Hamster Cell Mutants With Respect To The Requirement For Proline; Genetics; 55; 513-524, March 1967), o un derivado de la misma.
- 45 En una realización, la célula proporcionada por la presente invención es la cepa de la célula CHOS modificada. Nombre del Depósito: CHOSXE (Identificación Completa del Depósito: CHOS.Xbp1.Ero1a), depositada el 10 de Febrero de 2010 por UCB Celltech, filial de UCB Pharma S.A. en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC), HPA, Reino Unido, con el Número de las Colecciones de Cultivos de HPA: Q8515 y Número de Acceso: 10021001 de conformidad con el Tratado de Budapest.
- 50 Como se usa en la presente memoria, "Ero1" significa un polipéptido que tiene la actividad de facilitar la formación de enlaces disulfuro oxidando PDI. El polipéptido Ero1 se denominaba anteriormente Sec81.
- Puede utilizarse cualquier forma adecuada de Ero1 de cualquier fuente adecuada en la presente invención incluyendo Ero1 α y Ero1 β . Normalmente se pueden usar Ero1-L α y/o Ero1-L β humanas en la presente invención.
- 55 En una realización, el polinucleótido que codifica Ero1 utilizado en la presente invención codifica un polipéptido variante de la forma endógena de Ero1 que sustancialmente retiene la actividad de PDI oxidante.

Un polipéptido variante en el contexto de la presente memoria descriptiva pretende referirse a una secuencia que tiene una o más sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos en comparación con el polipéptido endógeno pero que retiene toda o sustancialmente toda la función tal como 80% o más, en particular 90% o más, por ejemplo 95% o más, o 100% de la actividad del polipéptido endógeno.

5 La secuencia polinucleotídica que codifica Ero1 utilizada en la presente invención codifica una secuencia polipeptídica de Ero1 α que comprende la secuencia polipeptídica mostrada en la SEQ ID NO: 3. Los aminoácidos 1 a 23 de la SEQ ID NO: 3 codifican un péptido señal. Por consiguiente, la secuencia polinucleotídica que codifica Ero1 utilizada en la presente invención puede o no comprender el péptido señal y, por tanto, puede comprender los aminoácidos 1 a 468 o los aminoácidos 24 a 468. Se entiende que se pueden hacer una o más sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos en SEQ ID NO: 3 sin alterar significativamente la actividad de Ero1. El efecto de cualquier sustitución, inserción o deleción de aminoácidos puede ser fácilmente probado por un experto en la técnica por cualquier método adecuado. Por ejemplo, se puede usar un anticuerpo anti-Ero1 para determinar la presencia de Ero1 y puede comprobarse el entorno redox de la célula para determinar la actividad de Ero1. Por consiguiente, en una realización, la secuencia polinucleotídica que codifica Ero1 de la presente invención codifica una secuencia polipeptídica que tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en SEQ ID NO: 3.

La "identidad", tal como se utiliza en el presente documento, indica que en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es idéntico entre secuencias. La "similitud", tal como se utiliza en el presente documento, indica que, en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es de un tipo similar entre secuencias. Por ejemplo, la leucina puede sustituirse por isoleucina o valina. Otros aminoácidos que a menudo pueden ser sustituidos entre sí incluyen pero no se limitan a:

- fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas);
- lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas);
- aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas);
- 25 - asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales amida); y
- cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre).

Los grados de identidad y similitud se pueden calcular fácilmente (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991).

Se considerará que puede usarse cualquier secuencia polinucleotídica adecuada que codifique un polipéptido Ero1. En una realización, la secuencia polinucleotídica que codifica Ero1 comprende la secuencia polinucleotídica mostrada en SEQ ID NO: 4. La secuencia polinucleotídica mostrada en SEQ ID NO: 4 puede tener una o más sustituciones, inserciones o deleciones de nucleótidos sin alterar significativamente la actividad de Ero1. Por consiguiente, en una realización, la secuencia polinucleotídica que codifica Ero1 comprende una secuencia que tiene al menos una identidad o similitud del 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% con la secuencia dada en SEQ ID NO: 4. En una realización adicional, la invención abarca el uso de polinucleótidos que son complementarios, antisentido o que hibridan en condiciones rigurosas con el polinucleótido descrito en el presente documento.

40 El Ero1 empleado en la presente invención puede derivarse de cualquier fuente adecuada, por ejemplo humana, de ratón, hámster o levadura.

Como se utiliza en la presente memoria, "XBP1" significa un polipéptido que tiene actividad de activación de la transcripción para uno o más genes de la UPR incluyendo las proteínas chaperonas de RE.

Existen dos isoformas de XBP-1 como resultado de eventos de empalme alternativos. El gen XBP-1 se transcribe en un ARNm que codifica una versión no empalmada de XBP-1 y también se genera un ARNm de empalme más corto que carece de exones. El ARNm de XBP-1 se empalma en respuesta al estrés del RE, tal como la acumulación de proteína desplegada en el RE. Se ha demostrado que sólo la forma empalmada de XBP-1 puede activar eficazmente la ruta de la UPR (Yoshida et al., 2001, Cell, 107, 881-891). Por consiguiente, el polinucleótido de acuerdo con la presente invención codifica preferiblemente la forma empalmada de XBP1.

50 En una realización, el polinucleótido que codifica XBP1 utilizado en la presente invención codifica un polipéptido variante de la forma endógena de XBP1 que sustancialmente retiene la actividad transactivadora de XBP1.

La secuencia polinucleotídica que codifica XBP1 utilizada en la presente invención codifica preferiblemente una secuencia polipeptídica que comprende la secuencia polipeptídica mostrada en la SEQ ID NO: 1. Se considerará que se pueden hacer una o más sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos en la SEQ ID NO: 1 sin

alterar significativamente la actividad de XBP1. El efecto de cualquier sustitución, inserción o delección de aminoácidos puede ser fácilmente comprobado por un experto en la técnica. Por ejemplo, se puede usar un método de tinción BODIPY para medir el tamaño del RE porque la actividad XBP1 aumenta el tamaño del RE. La actividad de la citidiltransferasa alfa colina (CCTalpha) también puede usarse para determinar la actividad de XBP1 porque la actividad de CCT alfa se incrementa por la sobreexpresión de XBP1.

En una realización, la secuencia polinucleotídica que codifica XBP1 de la presente invención codifica una secuencia polipeptídica que tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1.

Se considerará que puede usarse cualquier secuencia polinucleotídica adecuada que codifique un polipéptido XBP1. En una realización, la secuencia polinucleotídica que codifica XBP1 comprende la secuencia polinucleotídica mostrada en la SEQ ID NO: 2, en donde la SEQ ID NO: 2 es la forma empalmada de XBP1. La secuencia polinucleotídica mostrada en la SEQ ID NO: 2 puede tener una o más sustituciones, inserciones o delecciones de nucleótidos sin alterar significativamente la actividad de XBP1. Por consiguiente, en una realización, la secuencia polinucleotídica que codifica XBP1 comprende una secuencia que tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en SEQ ID NO: 2. En una realización adicional, la invención abarca el uso de polinucleótidos que son complementarios, antisentido o que hibridan en condiciones rigurosas con el polinucleótido descrito en el presente documento.

La XBP1 empleada en la presente invención puede derivarse de cualquier fuente adecuada, por ejemplo humana, de ratón, hámster o levaduras.

En una realización, la célula modificada de acuerdo con la presente invención expresa una proteína de interés. "Proteína de interés" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un polipéptido para la expresión, usualmente un polipéptido recombinante. Sin embargo, la proteína de interés puede ser una proteína endógena expresada a partir de un gen endógeno en la célula huésped.

Como se usa en la presente memoria, un "polipéptido recombinante" se refiere a una proteína que se construye o produce usando tecnología de ADN recombinante. La proteína de interés puede ser una secuencia exógena idéntica a la proteína endógena o una versión mutada de la misma, por ejemplo con actividad biológica atenuada, o un fragmento de la misma, expresado a partir de un vector exógeno. Alternativamente, la proteína de interés puede ser una proteína heteróloga, no expresada normalmente por la célula huésped.

La proteína de interés puede ser cualquier proteína adecuada que incluya una proteína terapéutica, profiláctica o de diagnóstico.

La proteína de interés expresada por las células de acuerdo con la invención puede ser, por ejemplo, una proteína inmunogénica, una proteína de fusión que comprende dos proteínas heterólogas o un anticuerpo. Los anticuerpos para uso como proteína de interés incluyen anticuerpos monoclonales, multivalentes, multi-específicos, humanizados, completamente humanos o quiméricos. El anticuerpo puede ser una molécula completa de anticuerpo que tiene cadenas pesadas y ligeras de longitud completa o un fragmento de la misma, p. ej. VH, VL, VHH, Fab, Fab modificado, Fab', F(ab')₂, Fv o fragmentos de scFv.

Después de la expresión, los fragmentos de anticuerpos pueden procesarse adicionalmente, por ejemplo mediante conjugación con otra entidad o, por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden PEGilarse para generar un producto con las propiedades requeridas, por ejemplo similar a los anticuerpos completos, si se requiere.

La célula y uno o más polinucleótidos empleados en la presente invención pueden comprender también secuencias de polinucleótidos adicionales que codifican una o más proteínas de interés adicionales.

Los polinucleótidos empleados en la presente invención pueden incorporarse a la célula huésped utilizando cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Normalmente, cada polinucleótido se incorpora como parte de un casete de expresión que puede estar integrado en el cromosoma o genoma de la célula huésped o introducido a través de un vector de expresión no integrado.

El casete de expresión empleado en la presente invención comprende normalmente una o más secuencias codificantes de proteínas y una o más secuencias de expresión reguladoras. Una o más de las secuencias de expresión reguladoras pueden incluir un promotor. Una o más de las secuencias de expresión reguladoras también pueden incluir una región 3' no traducida tal como una secuencia de poliadenilación u otras secuencias de terminación.

En una realización, cada casete de expresión comprende un promotor, una secuencia que codifica la proteína y una secuencia de poliadenilación. Los promotores adecuados se discuten con más detalle a continuación.

En la realización en donde el casete de expresión comprende dos o más secuencias polinucleotídicas que codifican proteínas seleccionadas de Ero1, XPBI y la proteína de interés, cada secuencia codificante está operativamente unida a una o más secuencias de expresión reguladoras adecuadas para permitir la expresión de cada proteína.

La secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés puede estar en el mismo vector que XBP1 y Ero1. Alternativamente o adicionalmente, la secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés puede estar en el mismo vector que la secuencia polinucleotídica de Ero1. Alternativamente o adicionalmente, la secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés puede estar en el mismo vector que la secuencia polinucleotídica de XBP1. Alternativamente o adicionalmente, la célula puede comprender además un vector separado que comprende la secuencia polinucleotídica que codifica la proteína de interés.

El vector para uso en la presente invención puede producirse insertando un casete de expresión como se ha definido anteriormente en un vector adecuado. Alternativamente, las secuencias de expresión reguladoras para dirigir la expresión de cada secuencia polinucleotídica que codifica una proteína, pueden estar contenidas en el vector y por lo tanto solamente se requerirá la región de codificación de uno o más polinucleótidos para completar el vector.

Los promotores empleados en la presente invención pueden estar ligados al polinucleótido relevante directamente o situados alternativamente en una posición apropiada, por ejemplo en un vector de tal manera que cuando el polipéptido relevante se inserta, el promotor relevante puede actuar sobre el mismo. Se puede emplear un promotor para todas las secuencias codificadas, pero generalmente se obtienen mayores niveles de expresión cuando cada polipéptido codificado tiene un promotor específico.

Por lo tanto, en una realización se emplean uno, dos, tres o más promotores.

En una realización, se localizan uno o más promotores en el polinucleótido empleado en la invención.

En una realización, el promotor se localiza antes del fragmento de codificación del polinucleótido en el que actúa, por ejemplo un promotor relevante antes de cada fragmento de codificación del polinucleótido. "Antes", como se usa en la presente memoria, pretende implicar que el promotor está situado en el extremo 5 prima con respecto al fragmento polinucleotídico que codifica.

Los promotores empleados en la presente invención pueden ser iguales o diferentes para cada polinucleótido. Los promotores pueden ser endógenos o exógenos a las células huésped. Los promotores adecuados incluyen CMV tal como hCMV (por ejemplo, adecuado como promotor cuando el polipéptido es un anticuerpo), promotores LTR víricos y el promotor SV40.

Uno o más de los promotores empleados pueden ser promotores inducibles.

En una realización, el polinucleótido empleado en la presente invención comprende una secuencia señal de poliadenilación, por ejemplo, asociada con cada secuencia polinucleotídica que codifica una proteína seleccionada de Ero1, XBP1 y de la proteína de interés según sea conveniente, tal como al final (por ejemplo en el extremo C-terminal (3 prima)) de cada polinucleótido codificador. Los vectores de expresión, en particular, pueden requerir secuencias señal que codifiquen una cola de poliadenilación. La secuencia señal de poliadenilación provoca que se añada una cola de poliadenilación al final del pre-ARNm transcrito, la cual puede proteger al ARNm de las exonucleasas, estabilizando así al ARNm y pudiendo terminar la transcripción.

Ejemplos de colas de poliadenilación incluyen SV40poli A, BgH poliA y cola de poliA sintética, en particular SV40 poli A.

En una realización, el polinucleótido empleado en la presente invención comprende uno o más intrones. En una realización, la secuencia polinucleotídica comprende un intrón antes del codón de iniciación, es decir, en el extremo 5 prima. En una realización, la secuencia polinucleotídica comprende un intrón después del codón de parada, es decir, en el extremo 3 prima. En una realización, la secuencia polinucleotídica comprende 1, 2 o 3 intrones. En una realización, la secuencia polinucleotídica comprende un intrón antes del codón de iniciación y después del codón de parada. El intrón puede derivarse de cualquier gen, particularmente de un gen del que deriva la secuencia codificada.

En una o más realizaciones, el polinucleótido empleado en la presente invención comprende una secuencia Kozak asociada con cada secuencia polinucleotídica que codifica una proteína seleccionada entre Ero1, XBP1 y la proteína de interés según sea conveniente. Aunque no se desea estar limitado por la teoría, se cree que la secuencia de Kozak es un sitio de unión al ribosoma óptimo.

Las realizaciones de la invención descritas en la presente memoria descriptiva con referencia al polinucleótido se aplican igualmente a las realizaciones alternativas de la invención, por ejemplo a los vectores, casetes de expresión y/o células huésped que comprenden los componentes utilizados en la misma, en tanto que el aspecto relevante se pueda aplicar a los mismos.

La presente invención también proporciona un método que comprende modificar una célula para aumentar la capacidad de la célula de aumentar los niveles de expresión de Ero1 y XBP1 en relación con los niveles de expresión de Ero1 y XBP1 en una célula no modificada en el que el método comprende transfectar la célula con uno o mas polinucleótidos, como se define en el presente documento.

El incremento de Ero1 y XBP1 se puede realizar utilizando cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la célula puede transfectarse con uno o más polinucleótidos, uno o más casetes de expresión y/o uno o más vectores que codifican:

5 una secuencia polinucleotídica exógena que codifica Ero1 o una variante de la misma que sustancialmente retiene la función de Ero1; y

una secuencia polinucleotídica exógena que codifica XBP1 o una variante de la misma que sustancialmente retiene la función de XBP1.

10 En esta realización, el uno o más polinucleótidos, uno o más casetes de expresión y/o uno o más vectores son como se describieron anteriormente. Por consiguiente, el método de acuerdo con la presente invención puede emplear el polinucleótido de acuerdo con la presente invención en el que el polinucleótido comprende una secuencia polinucleotídica que comprende Ero1 y una secuencia polinucleotídica que comprende XBP1. Adicionalmente o alternativamente, el método de acuerdo con la presente invención emplea polinucleótidos separados que codifican Ero1 y XBP1, como se ha descrito anteriormente.

15 El uno o más polinucleótidos empleados en la presente invención, preferiblemente en forma de uno o más casetes de expresión, o de uno o más vectores, se pueden incorporar en una célula de varias maneras. En una realización, el uno o más polinucleótidos están integrados en un cromosoma o en el genoma de la célula para permitir la expresión estable. En una realización adicional de la invención, la célula es transfectada transitoriamente utilizando, por ejemplo, un vector no integrante.

20 En la realización en donde la secuencia polinucleotídica de Ero1 y la secuencia polinucleotídica XBP1 están separadas, cada secuencia polinucleotídica, preferiblemente en forma de un casete o vector de expresión, puede introducirse en una célula simultánea o secuencialmente.

25 Se pueden introducir una o más secuencias de polinucleótidos en una célula usando técnicas estándar, por ejemplo empleando electroporación, o métodos basados en lípidos (lipotransfección), transfección aniónica, transfección catiónica tales como empleo de fosfato de calcio, choque térmico, magnetofección, agentes de transfección tales como lipofectamina, dendrímeros, transfección con DEAE-dextrano, transducción empleando un virus. En una realización, se emplea la transfección catiónica que utiliza fosfato cálcico.

30 El método según la presente invención también puede emplear un sistema de selección para facilitar la selección de células estables que han sido transfectadas con éxito con el uno o más polinucleótidos. El sistema de selección emplea normalmente la co-transfección de una secuencia polinucleotídica que codifica un marcador de selección. En una realización, cada polinucleótido transfectado en la célula comprende además una secuencia polinucleotídica que codifica uno o más marcadores de selección. Por consiguiente, la transfección del uno o más polinucleótidos de la presente invención y del uno o más polinucleótidos que codifican el marcador ocurre conjuntamente y el sistema de selección puede ser empleado para seleccionar aquellas células que producen las proteínas deseadas.

35 Las células capaces de expresar uno o más marcadores son capaces de sobrevivir/crecer/multiplicarse bajo determinadas condiciones impuestas artificialmente, por ejemplo la adición de una toxina o un antibiótico, debido a las propiedades otorgadas por el componente polipéptido/gen o polipéptido del sistema de selección incorporado en ellas (por ejemplo, resistencia a los antibióticos). Aquellas células que no pueden expresar el uno o más marcadores no son capaces de sobrevivir/crecer/multiplicarse en las condiciones impuestas artificialmente. Se pueden elegir que las condiciones artificialmente impuestas sean más o menos vigorosas, según se requiera.

40 Se puede emplear cualquier sistema de selección adecuado en la presente invención. Normalmente, el sistema de selección puede basarse en incluir en el vector uno o más genes que proporcionan resistencia a un antibiótico conocido, por ejemplo un gen de resistencia a la kanamicina o a la ampicilina. Se pueden seleccionar las células que crecen en presencia de un antibiótico relevante ya que expresan tanto el gen que da resistencia al antibiótico como la proteína deseada. Otros sistemas de selección adecuados incluyen el uso de geneticina, también conocida como G418, que es una toxina que puede ser neutralizada por el producto de un gen resistente a la neomicina; el uso de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), que es esencial para la síntesis *de novo* de la glicina, purina y timidina, opcionalmente en combinación con un inhibidor de DHFR específicamente, metotrexato; y el uso de glutamina sintetasa (GS), que cataliza la formación de glutamina a partir de glutamato y amoníaco, opcionalmente en combinación con un inhibidor de GS, tal como metionina sulfoximina (MSX). También puede emplearse en la
50 presente invención el sistema de selección Zeocin™. Zeocin™ es un antibiótico de Streptomyces y el sistema de selección emplea el uso de una proteína resistente a Zeocin™.

En una realización, el método de acuerdo con la presente invención comprende además la etapa de cultivar la célula transfectada en un medio para expresar los niveles aumentados del polipéptido Ero1 y del polipéptido XBP1 y opcionalmente cualquier marcador de selección.

55 En esta realización, el método de acuerdo con la presente invención puede comprender además las siguientes etapas:

- a) seleccionar uno o más clones de las células modificadas;
- b) medir la cantidad de ARNm de Ero1 y/o de proteína en uno o más clones celulares seleccionados;
- 5 c) medir la cantidad de ARNm de XBP1 y/o de proteína en uno o más clones seleccionados.

Las etapas b y c pueden llevarse a cabo simultánea o secuencialmente en cualquier orden. El experto en la materia será conocedor por el conocimiento general común, un método adecuado para medir los niveles de ARNm y/o proteína de Ero1 o XBP1 en los clones de las células modificadas. Las técnicas para medir el aumento de la expresión de Ero1 y XBP1 incluyen ELISA para cuantificación de proteínas y análisis de PCR cuantitativa Taqman y análisis Northern Blot para la cuantificación de ARNm.

El método preferiblemente comprende además las etapas de:

- d) comparar la cantidad del ARNm de Ero1 y/o proteína y del ARNm de XBP1 y/o proteína con la cantidad de ARNm de Ero1 y/o proteína y de ARNm de XBP1 y/o proteína en un clon celular no modificado; y
- 15 e) seleccionar uno o más clones de células modificadas que tienen una mayor cantidad de ARNm de Ero1 y/o proteína y de ARNm de XBP1 y/o proteína en comparación con el clon de célula no modificada.

En la etapa d se compara la cantidad de ARNm de Ero1 y/o proteína y de ARNm de XBP1 y/o proteína con la cantidad de ARNm de Ero1 y/o proteína y de ARNm de XBP1 y/o proteína en un clon celular no modificado. Alternativamente, la cantidad de ARNm de Ero1 y/o proteína y de ARNm de XBP1 y/o proteína se pueden comparar con la cantidad de ARNm de Ero1 y/o proteína y de ARNm de XBP1 y/o proteína en uno o más clones de células modificadas. En esta realización, la etapa e puede comprender la selección de los clones de células modificadas que muestran una mayor cantidad de ARNm de Ero1 y/o de proteína y de ARNm de XBP1 y/o de proteína en comparación con otros clones de células modificadas.

En la etapa e, se puede seleccionar cualquier número adecuado de clones de células modificadas que tengan mayor cantidad de ARNm de Ero1 y/o de proteína y de ARNm de XBP1 y/o de proteína en comparación con el clon de la célula no modificada. Normalmente se seleccionan uno o más clones de células que tienen la mayor cantidad de ARNm de Ero1 y/o de proteína y de ARNm de XBP1 y/o de proteína. El uno o más clones de células que se seleccionan en la etapa e se pueden seleccionar posteriormente para un crecimiento y uso adicionales para expresar una proteína de interés. El procedimiento puede comprender repetir las etapas b, c, d y e una o más veces.

El experto en la técnica podría identificar fácilmente los clones de las células modificadas que tienen una mayor cantidad de ARNm de Ero1 y de ARNm de XBP1 en comparación con el clon de la célula no modificada, tal como una célula CHOS. Ejemplos de la cantidad relativa adecuada de ARNm de Ero1 y de ARNm de XBP1 comparados con una célula CHOS que no tiene ARNm de Ero1 y ARNm de XBP1 detectables (que se cuenta como 1 con el fin de calcular la cantidad relativa), puede ser para el ARNm de Ero1: un incremento de 5000 o más veces, un incremento de 5000 a 500000 veces, un incremento de 10000 a 400000 veces, un incremento de 30000 a 400000 veces, un incremento de 100000 a 400000 veces; y para el ARNm de XBP1: un incremento de 150 veces o más, un incremento de 150 a 150000 veces, un incremento de 300 a 110000 veces, un incremento de 5000 a 110000 veces.

La presente invención también proporciona uno o más clones de células modificadas producidos por el método descrito anteriormente. Los presentes inventores han encontrado que los clones de células modificadas producidos por el método anterior son capaces de expresar una proteína de interés con un rendimiento más alto en comparación con un clon celular no modificado.

En una realización, el método comprende además transfectar la célula huésped con una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés y expresar la proteína de interés. El método también puede incluir una etapa adicional para medir la cantidad de expresión de la proteína de interés y seleccionar uno o más clones de células que tienen altos niveles de expresión de la proteína de interés. Por consiguiente, la presente invención también proporciona un método para producir una proteína de interés recombinante que comprende expresar la proteína de interés recombinante en una célula huésped modificada en donde los niveles de expresión de XBP1 y de Ero1 están aumentados. XBP1 y Ero1 se describieron anteriormente.

En la realización en donde la célula también es transfectada con una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés que es un polinucleótido separado de el uno o más polinucleótidos de Ero1 y XBP1, la secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés puede introducirse en la célula huésped simultáneamente con el uno o más polinucleótidos de Ero1 y XBP1, en el que las secuencias polinucleotídicas de Ero1 y XBP1 pueden estar en el mismo polinucleótido o en polinucleótidos separados. Alternativamente, la secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés se puede introducir en la célula huésped antes o después de que uno o más polinucleótidos de Ero1 y XBP1 se introduzcan en la célula huésped. En la realización en donde las secuencias polinucleotídicas de Ero1 y XBP1 son polinucleótidos separados, la secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés puede introducirse en la célula huésped antes o después de que uno o de ambos polinucleótidos de

Ero1 y XBP1.

5 En una realización preferida, la secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés se introduce en la célula huésped después de que se han introducido en la célula huésped el uno o más polinucleótidos de Ero1 y XBP1 y, más preferiblemente, la secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés se introduce en la célula huésped después de que se han seleccionado las células modificadas que muestran una expresión aumentada de Ero1 y XBP1.

En la presente invención se puede usar un sistema de expresión inducible para expresar la proteína Ero1 y/o la proteína XBP1 y/o la proteína de interés. Los sistemas de expresión inducibles adecuados son bien conocidos en la técnica.

10 Se puede usar cualquier medio adecuado para cultivar la célula transfectada. El medio puede adaptarse a un sistema de selección específico, por ejemplo, el medio puede comprender un antibiótico, para permitir solamente que las células que han sido transfectadas con éxito crezcan en el medio. El método de acuerdo con la presente invención puede comprender también una etapa de selección de las células en el medio que han sido transfectadas con éxito, tal como seleccionando células que son capaces de crecer en el medio.

15 Las células obtenidas del medio pueden someterse a un cribado y/o purificación adicionales según se requiera. En la realización en donde la célula comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés y la proteína de interés se expresa, el método puede comprender además una o más etapas para extraer y purificar la proteína de interés según se requiera.

20 Se pueden llevar a cabo una o más etapas del método descrito en la presente memoria, en combinación en un recipiente adecuado tal como un biorreactor.

La presente invención también se extiende a cultivos celulares que se transfectan o transducen con uno o más polinucleótidos, como se describe en la presente memoria.

Los presentes inventores han demostrado que la co-expresión tanto de Ero1 como de XBP1 en una célula proporciona medios mejorados para expresar una proteína de interés.

25 Como se ha expuesto anteriormente, con respecto a la célula de acuerdo con la presente invención, en una realización preferida el método de acuerdo con la presente invención aumenta el rendimiento de proteína de interés expresada en la célula, comparado con el rendimiento de proteína de interés expresada en una célula no modificada, que no ha sido modificada para incrementar ni Ero1 ni XBP1, más preferiblemente comparado con el rendimiento de la proteína de interés expresada en una célula que ha sido modificada para incrementar Ero1 o
30 XBP1, y aún más preferiblemente en comparación con el rendimiento combinado de la proteína de interés expresada en una célula modificada para aumentar la expresión de Ero1 pero no XBP1, y una célula modificada para aumentar XBP1 pero no Ero1.

35 Además, como se discutió anteriormente, el método de la presente invención proporciona preferiblemente una célula que tiene un crecimiento celular y/o una estabilidad y/o una reproducción aumentados después del mismo período de cultivo, en relación con las células no modificadas, que no han sido modificadas para incrementar ni Ero1 ni XBP1.

40 La presente invención también proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica Ero1 o una variante del mismo que sustancialmente retiene la función de Ero1; y una secuencia polinucleotídica que codifica XBP1 o una variante del mismo que sustancialmente retiene la función de XBP1. Las secuencias de polinucleótidos adecuadas que incluyen las secuencias preferidas se describen anteriormente con respecto a la célula de acuerdo con la presente invención, en donde tanto Ero1 como XBP1 son parte de la misma secuencia polinucleotídica.

La presente invención también proporciona un casete de expresión y un vector que comprende el polinucleótido de acuerdo con la presente invención.

45 La invención se extiende también a un sistema de expresión que comprende una secuencia polinucleotídica recombinante que codifica Ero1 o una variante de la misma que sustancialmente retiene la función de Ero1; una secuencia polinucleotídica recombinante que codifica XBP1 o una variante de la misma que sustancialmente retiene la función de XBP1; y un medio adecuado.

50 El sistema de expresión puede comprender un polinucleótido que comprende tanto Ero1 como XBP1 o puede comprender polinucleótidos separados que comprenden Ero1 y XBP1. El uno o más polinucleótidos están comprendidos preferiblemente dentro de uno o más casetes de expresión y/o uno o más vectores como se describió anteriormente. El sistema de expresión puede comprender una célula adecuada para transfectar con uno o más polinucleótidos. De este modo, la invención proporciona una composición que comprende un polinucleótido de acuerdo con la invención y una célula complementaria a la misma, por ejemplo en una mezcla, y/o en la que el
55 polinucleótido relevante está localizado dentro de la célula. En una realización, el sistema de expresión comprende

una célula que comprende uno o más polinucleótidos como se ha definido anteriormente.

El sistema de expresión puede comprender además uno o más polinucleótidos que codifican diferentes proteínas de interés.

5 La invención se extiende también al uso de una secuencia polinucleotídica recombinante que codifica Ero1 y una secuencia polinucleotídica recombinante que codifica XBP1 para expresar una proteína de interés.

10 En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una secuencia polinucleotídica recombinante que codifica Ero1 y una secuencia polinucleotídica recombinante que codifica XBP1 en uno o más casetes de expresión, uno o más vectores, o una o más células como se ha descrito anteriormente para expresar una proteína de interés. La presente invención también proporciona un polinucleótido como se ha definido anteriormente, un casete de expresión como se ha definido anteriormente, un vector tal como se ha definido anteriormente, una célula tal como se ha definido anteriormente o un sistema de expresión tal como se ha definido anteriormente para uso como medicamento.

15 La presente invención también abarca una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido como se ha definido anteriormente, un casete de expresión como se ha definido anteriormente, un vector tal como se ha definido anteriormente, una célula tal como se ha definido anteriormente o un sistema de expresión tal como se ha definido anteriormente.

En una realización adicional, en donde se emplea una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés en la presente invención, la proteína de interés puede ser una proteína terapéutica o profiláctica adecuada para el tratamiento de un ser humano o de un animal no humano que lo necesite.

20 Una o más realizaciones de la invención descritas en el presente documento pueden combinarse a menos que sean técnicamente incompatibles.

Se describen las realizaciones específicas de la invención que comprenden ciertas entidades. La invención también se extiende a realizaciones separadas que consisten o consisten esencialmente en dichos elementos.

La invención se ilustrará ahora con referencia a los siguientes ejemplos.

25 Ejemplos

Manipulación del ADN y métodos generales

Se utilizaron células CHOS (Invitrogen) y CHOK1 (ATCC) para la transformación y el cultivo de crecimiento de rutina. Se obtuvieron enzimas de restricción y modificación de DNA de New England Biolabs.

Se utilizaron las formas empalmadas de XBP1 humano (SEQ ID NO: 2) y de Ero1 α humano (SEQ ID NO: 4).

30 Las secuencias de nucleótidos para Ero1 α y XBP1 se sintetizaron químicamente por Entelechon.

Los vectores pCDNA3.1 (+) que comprenden el gen de interés, se transfectaron en las células huésped usando electroporación (para células CHOSX y CHOK1E) o lipofectamina (para células CHOSXE).

35 En los ejemplos 2 y 3, los vectores de expresión de mamíferos utilizados contenían secuencias que codifican la cadena pesada y ligera de un anticuerpo. Estas secuencias estaban bajo el control del promotor de CMV. El plásmido también incluía colas de poliA de SV40E y el marcador de selección de glutamato sintetasa.

En los ejemplos 5 y 6 se usaron vectores de un solo gen que contenían secuencias que codifican la cadena pesada o la cadena ligera del anticuerpo monoclonal. Ningún marcador de selección estaba presente en el plásmido. Los vectores de gen único se co-transfectaron en una proporción de 1: 1.

40 Las transfecciones de lipofectamina se realizaron usando Lipofectamina2000 (Invitrogen). Se diluyeron 12,5 μ l de Lip2000 en 125 μ l de un medio de Eagle modificado de Dulbecco libre de suero (SF DMEM, Invitrogen). Se diluyeron 4 μ g de mAb del ADN del vector de expresión en 125 μ l de DMEM de SF. Se mezclaron ADN y Lip2000 y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 500 μ l de DMEM de SF a la mezcla que luego se añadió a las células para incubarse a 37°C durante cuatro horas. Después de la incubación, los medios que contenían la mezcla de ADN/reactivo se reemplazaron por 3 ml de medio CDCHO fresco (Invitrogen). Las transfecciones de MAb se realizaron por duplicado.

45 Los anticuerpos utilizados en los ejemplos eran anticuerpos IgG de los siguientes isotipos que se muestran en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1:

mAb	Especie	Isotipo	Coefficiente de Extinción
146	Ratón	IgG1	
632	Ratón	IgG2a	
497	Humano	IgG4	
240	Humano	IgG4	
42	Ratón	IgG1	1,6
61	Ratón	IgG1	1,62
164	Ratón	IgG1	1,6

Los niveles de expresión de los anticuerpos se determinaron mediante ELISA a menos que se indique lo contrario.

- 5 Se midió la densidad celular y la viabilidad celular utilizando el sistema de recuento de células automatizado CEDEX (Innovatis) basado en el método de exclusión Blue Trypan muy establecido para determinar la viabilidad celular. La manipulación de las muestras, la tinción, el recuento de células y el análisis gráfico de los resultados se realizan automáticamente mediante el sistema CEDEX.

Ejemplo 1 Transfección de células CHO con Ero1 α y/o XBP1

Línea celular CHOSX

- 10 La forma empalmada de XBP1 humana [hXBP1(s)] se clonó en el vector pcDNA3.1(+), este vector también contenía el sistema de selección G418 que comprendía el gen de resistencia a la neomicina, que generó el vector pcDNA3.hXBP1(s). Las células CHOS se transfectaron con el vector pcDNA3.hXBP1(s) y se seleccionaron líneas celulares estables en presencia de geneticina (1 mg/ml) para producir una línea celular CHOSX que expresaba hXBP1(s).

- 15 *Línea celular CHOK1E*

Ero1 α humana (hEro1 α) se clonó en el vector pcDNA3.1(+) y las células CHOK1 se transfectaron con pcDNA3.hEro1 α para producir una línea celular CHOK1E que expresa Ero1 α humano. Las células CHOK1E se seleccionaron usando el sistema de selección G418.

Línea celular CHOSXE

- 20 Se clonó Ero1 α humano (hEro1 α) en el vector pcDNA3.1(+)(zeo) (Invitrogen) y la línea celular CHOSX se supertransfectó posteriormente con el vector pcDNA3(zeo).hEro1 α para producir la línea celular CHOSXE que expresaba tanto hEro1 α como hXBP1(s). Se usó tanto el sistema de selección G418 (gen de resistencia a la neomicina) como el sistema de selección de zeocina (gen de resistencia a la zeocina) para seleccionar células CHOSXE transfectadas con éxito. Las células se cultivaron en 100-300 μ g/ml de zeocina y 1 mg/ml de geneticina.

- 25 *Selección de clones de CHOSXE*

Selección 1:

Dos semanas después de la transfección se realizó una primera selección de 177 clones de los cuales 85 clones eran positivos para la expresión de ARNm de los transgenes hEro1 α y hXBP1(s) según se evaluó mediante RT-PCR y PCR en célula única.

- 30 Posteriormente se rellenaron placas de 6 pocillos con 24 de los 85 clones positivos. Se determinaron los niveles relativos de ARNm de hXBP1(s) y de hEro1 α por Taqman. Los resultados de este análisis se muestran en las Figuras 3a y 3b donde los niveles relativos de ARNm de hXBP1(s) y de hEro1 α en los clones CHOSXE se comparan con las células CHOS (las células CHOS no mostraron expresión pero se contaron como 1 para calcular las cantidades relativas de ARNm). Utilizando los resultados mostrados en las Figuras 3a y 3b, se seleccionaron 3 clones (70, 77 y 103) que expresan hEro1 α bajo, 3 clones (76, 88 y 173) que expresan hEro1 α medio y 3 clones (86, 94 y 101) que expresan hEro1 α alto para su análisis posterior.

- 35 clones (70, 77 y 103) que expresan hEro1 α bajo, 3 clones (76, 88 y 173) que expresan hEro1 α medio y 3 clones (86, 94 y 101) que expresan hEro1 α alto para su análisis posterior.

Selección 2:

Otras dos semanas después de haberse realizado la selección 1 se seleccionaron 72 clones más, de los cuales 29

clones eran positivos para la expresión del ARNm de hXBP1(s) y de hEro1 α como se evaluó mediante RT-PCR y PCR.

Posteriormente placas de 6 pocillos se rellenaron con los 29 clones positivos y se determinaron los niveles relativos de ARNm de hXBP1(s) y de hEro1 α como en la selección 1. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 4 donde los niveles de ARNm de hXBP1(s) y de hEro1 α expresados en los clones CHOSXE se comparan con las células CHOS (las células CHOS no mostraron expresión pero se contaron como 1 para calcular las cantidades relativas de mRNA). El análisis de ARNm adicional del clon 71 (datos no mostrados) mostró niveles de ARNm con un incremento de hXBP1(s) de 5000 veces y un incremento de hEro1 α de 110000 veces en comparación con las células CHOS (las células CHOS no mostraron expresión pero se contaron como 1 para calcular las cantidades ARNm relativo). Utilizando los resultados mostrados en la Figura 4, se seleccionaron para su posterior análisis 3 clones (19, 23 y 64) que expresan hEro1 α bajo, 3 clones (13, 16 y 62) que expresan hEro1 α medio y 3 clones que expresaban hEro1 α alto (49, 57 y 71).

El Clon 71 fue depositado con el Nombre de Depósito: CHOSXE (Identificación del Depósito Completa: CHOS.XBP1.Ero1a), el 10 de Febrero de 2010 por UCB Celltech, filial de UCB Pharma SA en la Colección Europea de (ECACC), HPA, Reino Unido, con Número de referencia de Cultivos Celulares HPA: Q8515 y número de acceso: 10021001 según el Tratado de Budapest.

Ejemplo 2: Transfección de células CHOSXE con anticuerpos monoclonales (mAbs)

Se transfectaron los clones seleccionados de la selección 1 (70, 76, 77, 86, 88, 94, 101, 103 y 173) con ADN de los mAb 146 y 632 como se describe en los métodos y se determinó la expresión de mAb a partir del sobrenadante del cultivo. Se seleccionaron los 3 clones de CHOSXE que expresan mAb más altos para análisis adicionales (clones 70, 88 y 103). Los tres clones seleccionados de la selección 1 (70, 88 y 103) se combinaron entonces con los clones seleccionados de la selección 2 (13, 16, 19, 23, 49, 57, 62, 64 y 71) y se transfectaron con ADN para MAb 632 y 497 como se describe en la sección de métodos generales anterior. Se tomó la muestra del sobrenadante del cultivo el día 4 para determinar la concentración de anticuerpos.

Los anticuerpos monoclonales 632 y 497 también se transfectaron en las células CHOS y CHOSX usando el mismo método de transfección que se describe en la sección de métodos generales anterior.

Los datos del incremento relativo de la expresión de los mAbs 632 y 497 de las células CHOSXE y CHOSX en comparación con la expresión de mAbs 632 y 497 de las células CHOS se muestran en la Figura 5. Los datos indican que todos los clones de CHOSXE, excepto el clon 13 y los clones 23, produjeron niveles de expresión de mAb aumentados de mAb 632 en comparación con el clon de CHOS, y todos los clones de CHOSXE produjeron una expresión aumentada de mAb 497 en comparación con los clones de CHOS y de CHOSX, excepto el clon 23 que expresaba menos mAb 497 que CHOSX.

Ejemplo 3 Transfección de células CHOSXE con los anticuerpos Ab240 y Abl46

Los clones que expresan mAb más altos (16, 19, 57, 62, 71 y 88) producidos en el Ejemplo 2 se recogieron para realizar más transfecciones de mAb. El experimento se escaló a cultivos de matraz T25 y se utilizaron los mAb 240 y 146. La transfección se realizó como se ha descrito anteriormente en la sección de métodos generales, pero se diluyeron 18,75ul de Lip2000 en 1,875 ml de medio OPTI_MEM (Invitrogen). Se diluyeron 7,5 μ g de ADN de anticuerpo en 1,875 ml de medio OPTI_MEM. Se añadieron 3,75 ml de medio OPTI_MEM a la mezcla para añadir a las células. Después de la incubación a 37 $^{\circ}$ C, se añadieron 3,375 ml de medio CD CHO al matraz. Este método de transfección se usó para las células CHOSXE, células CHOSX, células CHOK1E y células CHOS.

Los datos del aumento en la expresión de los mAbs 240 y 146 de las células CHOSXE, CHOSX y CHOK1E en comparación con la expresión de los mAbs 240 y 146 de las células CHOS se muestran en la Figura 6. En la Figura 6, los clones 16, 19, 57, 62, 71 y 88 son clones de CHOSXE. Los datos indican que todos los clones de CHOSXE produjeron una expresión aumentada de ambos anticuerpos en comparación con las células CHOS, células CHOSX y células CHOK1E.

El clon 71 se seleccionó para su análisis posterior y se denomina CHOSXE en los Ejemplos 4 a 7.

Ejemplo 4: Medición de las Características de la línea celular en las líneas celulares CHOSXE, CHOSX y CHOS

Se sembraron 2×10^5 /ml de células de las líneas celulares CHOSXE, CHOSX y CHOS en 50 ml de medio CD CHO y se cultivaron durante 7 días en una plataforma de agitación. Como se muestra en la Figura 7, la línea celular CHOSXE superó a las líneas celulares CHOS, CHOSX, CHOKI y CHOK1E al alcanzar mayores densidades de células viables.

Ejemplo 5: Electroporación de los anticuerpos 42, 61 y 164 en las líneas celulares CHOSXE, CHOSX y CHOS

Se transfectaron 400ug de ADN de un anticuerpo en 3 líneas celulares diferentes CHOS, CHOSX y CHOSXE. Las células fueron cambiadas a 32 $^{\circ}$ C en el día 1, y se añadieron 3 μ M de NaBu el día 4 después de la transfección. Los

tres anticuerpos utilizados se etiquetaron como mAbs 42, 61 y 164. Los recuentos celulares y las viabilidades celulares se midieron los días 1, 4, 7 y 10. Se tomaron muestras del sobrenadante del cultivo los días 4, 7 y 10 para determinar la productividad específica de las células.

Tabla 2: % de viabilidad celular y densidad de células viables (VCD) en el día 1 después de la transfección.

Anticuerpo	Línea Celular	VDC células x10 ⁵ /ml (día 1)	% viabilidad (día 1)
42	CHOS 42	22,7	96,7
42	CHOSX 42	23,85	96,8
42	CHOSXE 42	23,05	97,1
61	CHOS 61	23,4	96,8
61	CHOSX 61	20,14	96,9
61	CHOSXE 61	23,54	97,8
164	CHOS 164	20,92	97,5
164	CHOSX 164	22,04	96,5
164	CHOSXE 164	23,73	97,5

5

Se puede ver en la Tabla 2 que las líneas celulares CHOSXE tenían igual o mayor viabilidad comparada con CHOS y CHOSX y que CHOSXE tenía densidades de células viables comparables en relación con CHOS y CHOSX.

La Figura 8 muestra el incremento relativo en la expresión de los mAb 42, 61 y 164 de CHOSXE y CHOSX en comparación con la expresión de los mAbs 42, 61 y 164 de las células CHOS. Está claro que la expresión de los tres anticuerpos fue mayor en CHOSXE en comparación bien con CHOSX o con CHOS.

10

También se calculó la tasa de productividad específica (SPR) de cada línea celular. La Figura 9 muestra la SPR de las líneas celulares CHOS, CHOSX y CHOSXE en $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células/día entre el día 4 y el día 7. La tasa de productividad específica por célula fue claramente superior en CHOSXE en comparación con ambas líneas celulares CHOS o CHOSX.

15

Los niveles relativos de ARMm de las cadenas pesadas y ligeras kappa de los mAb 42, 61 y 164 también se midieron mediante PCR en tiempo real (Taqman). Los resultados se muestran en la Figura 10, se puede ver que CHOSXE produjo mayores niveles de ARMm de la cadena pesada y ligera en comparación con CHOS y CHOSX.

Ejemplo 6: Electroporación de anticuerpos en las líneas celulares CHOSXE, CHOSX, CHOS y CHOK1 y posterior purificación

20

Las células CHOS, CHOSX, CHOSXE y CHOK1 se transfectaron como se ha descrito en el ejemplo 5.

25

La cuantificación de MAb se realizó mediante cromatografía de afinidad líquida de alto rendimiento (HPLC) utilizando Proteína G como ligando. Se generó una curva estándar inyectando cantidades conocidas de IgG purificada y analizando los picos de elución. El eluato de mAb se monitorizó a 280 nm y se extrapola a partir de la curva estándar para calcular las concentraciones de mAbs usando sus respectivos coeficientes de extinción (concentración= absorbancia/coeficiente de extinción) (Tabla 1)

30

Los mAbs se purificaron usando columnas MabSelect Sure. El ligando MabSelect Sure derivado de la proteína-A, deriva de E. coli y ha sido diseñado para crear un medio de afinidad con estabilidad alcalina mejorada y alta capacidad de unión para IgG. En este punto se realizó una HPLC de traza para determinar el porcentaje de agregado de las fracciones agrupadas purificadas por afinidad. El grado de agregación exhibido por los mAbs expresados en CHOSXE fue comparable al de CHOS, CHOSX y CHOK1 (véase la figura 11). Después de MabSelect Sure, los anticuerpos se purificaron adicionalmente usando HPLC de exclusión por tamaño. Se determinó también el rendimiento del mAb total post-purificación leyendo la absorbancia del mAb a 280 nm y calculando la concentración como anteriormente.

35

La Tabla 3 muestra los incrementos de la concentración del anticuerpo en relación con las células CHOS después de HPLC de prot G y purificación de proteínas.

Tabla 3:

		Incremento de plegamiento	
		HPLC Prot G	Producción después de purificación
Ab42	CHOS	1,00	1,00
	CHOSX	1,09	0,83
	CHOSXE	6,28	7,22
	CHOK1	1,65	2,70
Ab61	CHOS	1,00	1,00
	CHOSX	2,39	3,30
	CHOSXE	5,36	5,24
	CHOK1	1,58	2,35
Ab164	CHOS	1,00	1,00
	CHOSX	2,68	2,44
	CHOSXE	5,94	6,14
	CHOK1	1,94	2,80

Puede verse en la Tabla 3 que las células CHOSXE produjeron una cantidad significativamente mayor de anticuerpos en comparación con las células CHOS, CHOSX y CHOK1.

5 Ejemplo 7: Análisis de calidad de los anticuerpos

Los mAbs purificados de las células CHOSXE se analizaron en cuanto a calidad y actividad como se describe a continuación.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS PAGE)

10 Los MAb 42, 61 y 164 se analizaron mediante SDS PAGE para determinar si el anticuerpo expresado era del tamaño esperado. El análisis de SDS PAGE se llevo a cabo mediante la aplicación de 5 µg de proteína reducida y no reducida en un gel de gradiente Bis-Tris 4-12% pre-envasado (Invitrogen) 50mA durante 45 minutos. Las Figuras 12a, b y c muestran los resultados de la SDS PAGE, puede observarse que los anticuerpos expresados a partir de CHOS, CHOSX, CHOSXE o CHOK1 eran del mismo tamaño.

Ensayo de Thermofluor

15 Se analizó la termoestabilidad de los MAb 42, 61 y 164 en un ensayo de Thermofluor. Este ensayo permite determinar a qué temperatura se despliega la estructura de la proteína. Se utilizó un colorante fluorescente sensible al medio ambiente para monitorizar el proceso de despliegue térmico de las proteínas. El colorante se une a las regiones hidrofóbicas que se exponen al desplegarse y cambian su espectro de emisión. Se colocaron en un pocillo de una placa de PCR de 384 pocillos ópticos 1 µl de muestra a 1 mg/ml, 1 µl de colorante 30x y 8 µl de tampón (las muestras se realizaron en cuadruplicado). El sistema de PCR en tiempo real rápido 7900HT contiene un dispositivo de calentamiento para el control preciso de la temperatura fijado de 20° C a 99° C, un dispositivo CCD controla simultáneamente los cambios de fluorescencia en los pocillos. Las desviaciones estándar fueron inferiores a 0,5° C, en los datos del ensayo de Thermofluor presentados. Los resultados del ensayo de Thermofluor se muestran en la Figura 13 donde se puede ver que no había diferencias significativas en las propiedades de estabilidad térmica de los mAbs que se expresan a partir de CHOS o de CHOSXE.

Enfoque iso-eléctrico

30 Se analizaron los MAb 42, 61 y 164 por enfoque isoeléctrico para determinar si los anticuerpos expresados tenían la misma carga neta. Se aplicó un alto voltaje a través del capilar usando ánodos y cátodos, que fueron sumergidos en pequeños depósitos que contenían catolito (OH) y anolito (H). Las muestras se prepararon con anfólitos transportadores y con la aplicación de alto voltaje las moléculas de proteína migraron y se enfocaron de acuerdo con sus respectivos pI. El sistema utilizado fue el iCE 280 de Convergent biosciences (Isogen en Europa), que es un instrumento de isoelectroforesis capilar capturada para determinar los pI de varias muestras de proteínas y sus

especies relacionadas. Los resultados no mostraron diferencias importantes entre los anticuerpos cargados expresados en CHOK1SV, CHOS y CHOSXE.

Espectrometría de masas

5 Los perfiles de glicosilación de los mAb 42, 61 y 164 se analizaron mediante espectrometría de masas. Se trataron 100 µg de cada muestra con PNGasa en condiciones nativas para liberar N-glicanos. Se separó el glicano de la proteína desglicosilada por SEC y se analizó la fracción de glicano mediante MALDI Mass Spec. Este análisis determinó si los anticuerpos expresados tenían los mismos perfiles de glicosilación y si se habían unido a los anticuerpos restos de azúcares desfavorables. Los resultados de los perfiles de glicosilación que se muestran en la Figura 14 demuestran que no hubo diferencias significativas entre los perfiles de glicosilación de los anticuerpos expresados por CHOS y CHOSXE.

Ensayo de unión al antígeno

15 Se analizó el mAb 164 en un ensayo de unión al antígeno para determinar si el anticuerpo expresado tenía la misma afinidad de unión al antígeno. Los esplenocitos de BALB/C que expresan el antígeno diana del mAb 164 se trataron con una titulación del mAb 164. Las células se lavaron y se trataron con una IgG1 anti-ratón marcada con PE. Se determinó la tinción de fluorescencia de las células usando FACS. Los resultados del ensayo se muestran en la Figura 15 donde "Geo mean" es el valor geométrico promedio de la fluorescencia de unión al anticuerpo. MOPC21 es un anticuerpo anti-IgG1 de ratón y se usa como control negativo. La Figura 15 muestra que el mAb 164 expresado por CHOSXE no tenía una actividad de unión al antígeno significativamente diferente en comparación con el anticuerpo expresado por CHOS.

20 En vista de lo anterior, está claro que los anticuerpos expresados por CHOSXE no presentaron grandes diferencias con los anticuerpos expresados por las otras líneas celulares. Por consiguiente, la célula de acuerdo con la presente invención, es capaz de expresar una proteína de interés, tal como un anticuerpo, que tiene las mismas propiedades en comparación con la proteína que se expresa en otras células, específicamente en células que no han sido modificadas para sobre-expresar Ero1 y XBP1.

25 Se comprenderá, por supuesto, que la presente invención se ha descrito únicamente a modo de ejemplo, que no tiene por qué ser limitativa y que pueden realizarse modificaciones de detalles dentro del alcance de las reivindicaciones que se muestran a continuación. Las características preferidas de cada realización de la invención son aplicables a las otras realizaciones *mutatis mutandis*. Todas las publicaciones citadas en esta memoria descriptiva, que incluyen pero que no se limitan a las patentes y solicitudes de patente, se incorporan en la presente descripción como referencia, como si cada publicación individual estuviera específicamente e individualmente indicada para ser incorporada como referencia en este documento.

Listado de secuencias

<110> UCB Pharma SA

<120> Método para expresar proteínas

5 <130> G0080_Wo01

<150> GB0902180.9

<151> 10-02-2009

10 <160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

15 <211> 376

<212> PRT

<213> XBP1 Humana

<400> 1

20

```

Met Val Val Val Ala Ala Ala Pro Asn Pro Ala Asp Gly Thr Pro Lys
1          5          10          15

Val Leu Leu Leu Ser Gly Gln Pro Ala Ser Ala Ala Gly Ala Pro Ala
20          25          30

Gly Gln Ala Leu Pro Leu Met Val Pro Ala Gln Arg Gly Ala Ser Pro
35          40          45

Glu Ala Ala Ser Gly Gly Leu Pro Gln Ala Arg Lys Arg Gln Arg Leu
50          55          60

Thr His Leu Ser Pro Glu Glu Lys Ala Leu Arg Arg Lys Leu Lys Asn
65          70          75          80

Arg Val Ala Ala Gln Thr Ala Arg Asp Arg Lys Lys Ala Arg Met Ser
85          90          95

Glu Leu Glu Gln Gln Val Val Asp Leu Glu Glu Glu Asn Gln Lys Leu
100         105         110

Leu Leu Glu Asn Gln Leu Leu Arg Glu Lys Thr His Gly Leu Val Val
115         120         125

Glu Asn Gln Glu Leu Arg Gln Arg Leu Gly Met Asp Ala Leu Val Ala
130         135         140

Glu Glu Glu Ala Glu Ala Lys Gly Asn Glu Val Arg Pro Val Ala Gly
145         150         155         160

Ser Ala Glu Ser Ala Ala Gly Ala Gly Pro Val Val Thr Pro Pro Glu
165         170         175
    
```

ES 2 628 191 T3

His Leu Pro Met Asp Ser Gly Gly Ile Asp Ser Ser Asp Ser Glu Ser
 180 185 190

Asp Ile Leu Leu Gly Ile Leu Asp Asn Leu Asp Pro Val Met Phe Phe
 195 200 205

Lys Cys Pro Ser Pro Glu Pro Ala Ser Leu Glu Glu Leu Pro Glu Val
 210 215 220

Tyr Pro Glu Gly Pro Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Ser Leu Ser Val
 225 230 235 240

Gly Thr Ser Ser Ala Lys Leu Glu Ala Ile Asn Glu Leu Ile Arg Phe
 245 250 255

Asp His Ile Tyr Thr Lys Pro Leu Val Leu Glu Ile Pro Ser Glu Thr
 260 265 270

Glu Ser Gln Ala Asn Val Val Val Lys Ile Glu Glu Ala Pro Leu Ser
 275 280 285

Pro Ser Glu Asn Asp His Pro Glu Phe Ile Val Ser Val Lys Glu Glu
 290 295 300

Pro Val Glu Asp Asp Leu Val Pro Glu Leu Gly Ile Ser Asn Leu Leu
 305 310 315 320

Ser Ser Ser His Cys Pro Lys Pro Ser Ser Cys Leu Leu Asp Ala Tyr
 325 330 335

Ser Asp Cys Gly Tyr Gly Gly Ser Leu Ser Pro Phe Ser Asp Met Ser
 340 345 350

Ser Leu Leu Gly Val Asn His Ser Trp Glu Asp Thr Phe Ala Asn Glu
 355 360 365

Leu Phe Pro Gln Leu Ile Ser Val
 370 375

<210> 2
 <211> 1132
 <212> ADN
 <213> XBP1 Humana

<400> 2

aatggtggtg gtggcagccg cgccgaaccc ggccgacggg acccctaaag ttctgcttct
 60

gtcggggcag cccgcctccg ccgccggagc cccggccggc caggccctgc cgctcatggt
 120

gccagcccag agaggggcca gcccgaggc agcgagcggg gggctgcccc aggcgcgcaa
 180

5

10

ES 2 628 191 T3

gcgacagcgc ctcacgcacc tgagccccga ggagaaggcg ctgaggagga aactgaaaa
240
cagagtagca gctcagactg ccagagatcg aaagaaggct cgaatgagtg agctggaaca
300
gcaagtggta gatttagaag aagagaacca aaaacttttg ctagaaaatc agcttttacg
360
agagaaaact catggccttg tagttgagaa ccaggagtta agacagcgct tggggatgga
420
tgccctggtt gctgaagagg aggcggaagc caaggggaat gaagtgaggc cagtggccgg
480
gtctgtgag tccgcagcag gtgcaggccc agttgtcacc cctccagaac atctcccat
540
ggattctggc ggtattgact cttcagattc agagtctgat atcctgttgg gcattctgga
600
caacttggac ccagtcattg tcttcaaagt cccttcccc gagcctgcca gcctggagga
660
gctcccagag gtctaccag aaggaccag ttccttacca gcctcccttt ctctgtcagt
720
ggggacgtca tcagccaagc tggaagccat taatgaacta attcgttttg accacatata
780
taccaagccc ctagtcttag agataccctc tgagacagag agccaagcta atgtgtagt
840
gaaaatcgag gaagcacctc tcagcccctc agagaatgat caccctgaat tcattgtctc
900
agtgaaggaa gaacctgtag aagatgacct cgttccggag ctgggtatct caaatctgct
960
ttcatccagc cactgcccc agccatcttc ctgcctactg gatgcttaca gtgactgtgg
1020
atacgggggt tccctttccc cattcagtga catgtcctct ctgcttggtg taaaccattc
1080
ttgggaggac acttttgcca atgaactctt tccccagctg attagtgtct aa
1132

<210> 3
<211> 468
5 <212> PRT
<213> Ero1alfa Humana

<400> 3

Met Gly Arg Gly Trp Gly Phe Leu Phe Gly Leu Leu Gly Ala Val Trp
1 5 10 15

Leu Leu Ser Ser Gly His Gly Glu Glu Gln Pro Pro Glu Thr Ala Ala
20 25 30

10 Gln Arg Cys Phe Cys Gln Val Ser Gly Tyr Leu Asp Asp Cys Thr Cys

ES 2 628 191 T3

35					40					45					
Asp	Val	Glu	Thr	Ile	Asp	Arg	Phe	Asn	Asn	Tyr	Arg	Leu	Phe	Pro	Arg
	50					55					60				
Leu	Gln	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Asp	Tyr	Phe	Arg	Tyr	Tyr	Lys	Val	Asn
	65					70					75				80
Leu	Lys	Arg	Pro	Cys	Pro	Phe	Trp	Asn	Asp	Ile	Ser	Gln	Cys	Gly	Arg
				85					90					95	
Arg	Asp	Cys	Ala	Val	Lys	Pro	Cys	Gln	Ser	Asp	Glu	Val	Pro	Asp	Gly
			100					105					110		
Ile	Lys	Ser	Ala	Ser	Tyr	Lys	Tyr	Ser	Glu	Glu	Ala	Asn	Asn	Leu	Ile
		115					120						125		
Glu	Glu	Cys	Glu	Gln	Ala	Glu	Arg	Leu	Gly	Ala	Val	Asp	Glu	Ser	Leu
	130					135							140		
Ser	Glu	Glu	Thr	Gln	Lys	Ala	Val	Leu	Gln	Trp	Thr	Lys	His	Asp	Asp
	145					150					155				160
Ser	Ser	Asp	Asn	Phe	Cys	Glu	Ala	Asp	Asp	Ile	Gln	Ser	Pro	Glu	Ala
				165					170					175	
Glu	Tyr	Val	Asp	Leu	Leu	Leu	Asn	Pro	Glu	Arg	Tyr	Thr	Gly	Tyr	Lys
			180					185						190	
Gly	Pro	Asp	Ala	Trp	Lys	Ile	Trp	Asn	Val	Ile	Tyr	Glu	Glu	Asn	Cys
		195					200						205		
Phe	Lys	Pro	Gln	Thr	Ile	Lys	Arg	Pro	Leu	Asn	Pro	Leu	Ala	Ser	Gly
	210					215					220				
Gln	Gly	Thr	Ser	Glu	Glu	Asn	Thr	Phe	Tyr	Ser	Trp	Leu	Glu	Gly	Leu
	225					230					235				240
Cys	Val	Glu	Lys	Arg	Ala	Phe	Tyr	Arg	Leu	Ile	Ser	Gly	Leu	His	Ala
				245					250					255	
Ser	Ile	Asn	Val	His	Leu	Ser	Ala	Arg	Tyr	Leu	Leu	Gln	Glu	Thr	Trp
			260					265						270	
Leu	Glu	Lys	Lys	Trp	Gly	His	Asn	Ile	Thr	Glu	Phe	Gln	Gln	Arg	Phe
		275					280						285		
Asp	Gly	Ile	Leu	Thr	Glu	Gly	Glu	Gly	Pro	Arg	Arg	Leu	Lys	Asn	Leu
	290					295					300				

ES 2 628 191 T3

Tyr Phe Leu Tyr Leu Ile Glu Leu Arg Ala Leu Ser Lys Val Leu Pro
 305 310 315 320
 Phe Phe Glu Arg Pro Asp Phe Gln Leu Phe Thr Gly Asn Lys Ile Gln
 325 330 335
 Asp Glu Glu Asn Lys Met Leu Leu Leu Glu Ile Leu His Glu Ile Lys
 340 345 350
 Ser Phe Pro Leu His Phe Asp Glu Thr Ser Phe Phe Ala Gly Asp Lys
 355 360 365
 Lys Glu Ala His Lys Leu Lys Glu Asp Phe Arg Leu His Phe Arg Asn
 370 375 380
 Ile Ser Arg Ile Met Asp Cys Val Gly Cys Phe Lys Cys Arg Leu Trp
 385 390 395 400
 Gly Asn Leu Gln Thr Gln Gly Leu Gly Thr Ala Leu Lys Ile Leu Phe
 405 410 415
 Ser Glu Lys Leu Ile Ala Asn Met Pro Glu Ser Gly Pro Ser Tyr Glu
 420 425 430
 Phe His Leu Thr Arg Gln Glu Ile Val Ser Leu Phe Asn Ala Phe Gly
 435 440 445
 Arg Ile Ser Thr Ser Val Lys Glu Leu Glu Asn Phe Arg Asn Leu Leu
 450 455 460

Gln Asn Ile His
 465

<210> 4
 <211> 1407
 <212> ADN
 <213> Ero1alfa Humana

<400> 4

atgggccgcg gctggggatt cttgtttggc ctctggggcg ccgtgtggct gctcagctcg
 60

ggccacggag aggagcagcc cccggagaca gcggcacaga ggtgcttctg ccaggttagt
 120

ggttacttgg atgattgtac ctgtgatggt gaaaccattg atagatttaa taactacagg
 180

ctttcccaa gactacaaaa acttcttgaa agtgactact ttaggtatta caaggtaaac
 240

ctgaagaggc cgtgtccttt ctggaatgac atcagccagt gtggaagaag ggactgtgct
 300

5

10

ES 2 628 191 T3

gtcaaaccat gtcaatctga tgaagttcct gatggaatta aatctgcgag ctacaagtat
360
tctgaagaag ccaataatct cattgaagaa tgtgaacaag ctgaacgact tggagcagtg
420
gatgaatctc tgagtgagga aacacagaag gctgttcttc agtggaccaa gcatgatgat
480
tcttcagata acttctgtga agctgatgac attcagtccc ctgaagctga atatgtagat
540
ttgcttctta atcctgagcg ctacactggt tacaagggac cagatgcttg gaaaatatgg
600
aatgtcatct acgaagaaaa ctgttttaag ccacagacaa ttaaaagacc tttaaatcct
660
ttggcttctg gtcaagggac aagtgaagag aacacttttt acagttggct agaaggtctc
720
tgtgtagaaa aaagagcatt ctacagactt atatctggcc tacatgcaag cattaatgtg
780
catttgagtg caagatatct tttacaagag acctgggttag aaaagaaatg gggacacaac
840
attacagaat ttcaacagcg atttgatgga attttgactg aaggagaagg tccaagaagg
900
cttaagaact tgtatcttct ctacttaata gaactaaggg ctttatccaa agtgttacca
960
ttcttcgagc gcccagattt tcaactcttt actggaaata aaattcagga tgaggaaaac
1020
aaaatgttac ttctggaaat acttcatgaa atcaagtcatt ttcctttgca ttttgatgag
1080
acttcatttt ttgctgggga taaaaaagaa gcacacaaac taaaggagga ctttcgactg
1140
cattttagaa atatttcaag aattatggat tgtgttggtt gttttaaatg tcgtctgtgg
1200
ggaaatcttc agactcaggg tttgggcact gctctgaaga tcttattttc tgagaaattg
1260
atagcaaata tgccagaaag tggacctagt tatgagttcc atctaaccag acaagaaata
1320
gtatcattat tcaacgcatt tggaagaatt tctacaagtg tgaaagaatt agaaaacttc
1380
aggaacttgt tacagaatat tcattaa
1407

REIVINDICACIONES

1. Una célula huésped recombinante, en donde la célula se modifica para comprender una secuencia polinucleotídica exógena que codifica Ero1 que comprende la secuencia polipeptídica dada en la SEQ ID NO: 3 o una variante de la misma que sustancialmente retiene la función de Ero1; y una secuencia polinucleotídica exógena que codifica XBP1 que comprende la secuencia polipeptídica dada en la SEQ ID NO: 1 o una variante de la misma que sustancialmente retiene la función de XBP1 y dicha célula huésped modificada tiene niveles de expresión aumentados de Ero1 y XBP1 con respecto a los niveles de expresión de Ero1 y XBP1 en una célula no modificada.
2. Una célula según la reivindicación 1, en donde la célula comprende un polinucleótido Ero1 y XBP1 que comprende la secuencia polinucleotídica que codifica Ero1 o una variante de la misma que sustancialmente retiene la función de Ero1; y la secuencia polinucleotídica que codifica XBP1 o una variante de la misma que sustancialmente retiene la función de XBP1.
3. Una célula según la reivindicación 1, en donde la célula comprende un polinucleótido Ero1 que comprende la secuencia polinucleotídica que codifica Ero1 o una variante de la misma que sustancialmente retiene la función de Ero1 y un polinucleótido XBP1 separado que comprende la secuencia polinucleotídica que codifica XBP1 o una variante de la misma que sustancialmente retiene la función de XBP1.
4. Una célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la secuencia polinucleotídica que codifica Ero1 codifica Ero1 de ser humano, ratón o hámster.
5. Una célula según la reivindicación 4, en donde la secuencia polinucleotídica que codifica Ero1 codifica Ero1 humana y es Ero1 α o Ero1 β .
6. Una célula según la reivindicación 5, en donde la secuencia polinucleotídica que codifica Ero1 codifica Ero1 α y comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4.
7. Una célula según la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en donde la secuencia polinucleotídica que codifica Ero1 codifica la secuencia polipeptídica dada en la SEQ ID NO: 3.
8. Una célula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la secuencia polinucleotídica que codifica XBP1 codifica XBP1 humana, de ratón o de hámster.
9. Una célula de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la secuencia polinucleotídica que codifica XBP1 codifica XBP1 humana y comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2.
10. Una célula según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde la secuencia polinucleotídica que codifica XBP1 codifica XBP1 humana y codifica la secuencia polipeptídica dada en la SEQ ID NO: 1.
11. Una célula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la célula comprende además una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés.
12. Una célula según la reivindicación 11, en donde la proteína de interés es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo.
13. Una célula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la célula es una célula de mamífero.
14. Una célula según la reivindicación 13, en donde la célula es una célula CHO.
15. Una línea celular CHOSXE depositada el 10 de febrero de 2010 (Identificación del Depósito Completa: CHOS.Xbp1.Ero1a), en la Colección Europea de (ECACC), HPA, Reino Unido, con Número de referencia de Cultivos Celulares HPA: Q8515 y número de acceso: 10021001 según el Tratado de Budapest.
16. Un método para modificar una célula huésped para aumentar la capacidad de la célula huésped para expresar proteína que comprende aumentar los niveles de expresión del polipéptido Ero1 o de una variante del mismo que sustancialmente retiene la función del polipéptido Ero1 y del polipéptido XBP1 o una variante del mismo que sustancialmente retiene la función de XBP1 en la célula huésped en relación con los niveles de expresión de Ero1 y de XBP1 en una célula no modificada, en donde el método comprende transfectar la célula con uno o más polinucleótidos, como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
17. Un método de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el método comprende una etapa adicional de cultivar la célula modificada en un medio para expresar de este modo niveles incrementados del polipéptido Ero1 o una variante del mismo que sustancialmente retiene la función de Ero1; y el polipéptido XBP1 o una variante del mismo que sustancialmente retiene la función de XBP1 en comparación con una célula no modificada.
18. Un método según la reivindicación 17, en el que el método comprende además las siguientes etapas:
 - a. seleccionar uno o más clones de las células modificadas;

- b. medir la cantidad de ARNm y/o proteína de Ero1 en uno o más clones de células seleccionados;
 - c. medir la cantidad de ARNm y/o proteína XBP1 en uno o más clones seleccionados:
 - d. comparar la cantidad de ARNm y/o proteína de Ero1 y ARNm y/o proteína de XBP1 con la cantidad de ARNm y/o proteína de Ero1 y ARNm y/o proteína de XBP1 en un clon de una célula no modificada; y
- 5 e. seleccionar uno o más clones de células modificadas que tienen una mayor cantidad de ARNm y/o proteína de Ero1 y de ARNm y/o proteína de XBP1 en comparación con el clon de la célula no modificada.
19. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que el método comprende además transfectar la célula huésped con una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés y expresar la proteína de interés.
- 10 20. Un método para producir una proteína recombinante de interés que comprende expresar la proteína recombinante de interés en una célula huésped modificada en donde los niveles de expresión de XBP1 y Ero1 aumentan en relación con los niveles de expresión de Ero1 y XBP1 en una célula no modificada, donde la célula huésped es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15.
- 15 21. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica Ero1 o una variante de la misma que sustancialmente retiene la función de Ero1; y una secuencia polinucleotídica que codifica XBP1 o una variante de la misma que sustancialmente retiene la función de XBP1, donde el polinucleótido es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10.
22. Un polinucleótido aislado según la reivindicación 21, en donde el polinucleótido comprende además una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de interés.
- 20 23. Un casete de expresión que comprende el polinucleótido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 21 a 22.
24. Un vector que comprende el polinucleótido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 21 a 22 o un casete de expresión como se define en la reivindicación 23.
- 25 25. Un sistema de expresión que comprende una secuencia polinucleotídica recombinante que codifica Ero1 o una variante de la misma que sustancialmente retiene la función de Ero1; una secuencia polinucleotídica recombinante que codifica XBP1 o una variante de la misma que sustancialmente retiene la función de XBP1; y un medio; en donde el sistema de expresión comprende un polinucleótido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 21 a 22, un casete de expresión como se define en la reivindicación 23 o un vector según se define en la reivindicación 24.
- 30 26. Un sistema de expresión según la reivindicación 25, en donde el sistema de expresión comprende los polinucleótidos Ero1 y XBP1 como se definen en la reivindicación 3.
27. Un sistema de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 25 ó 26, en donde el sistema de expresión comprende una célula como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
- 35 28. Un polinucleótido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 21 a 22, un casete de expresión como se define en la reivindicación 23, un vector como se define en la reivindicación 24, una célula como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o un sistema de expresión como se define en cualquiera de las reivindicaciones 25 ó 26 para su uso como un medicamento.
- 40 29. Uso de una secuencia polinucleotídica recombinante que codifica Ero1 que comprende la secuencia polipeptídica dada en SEQ ID NO: 3 y una secuencia polinucleotídica recombinante que codifica XBP1 que comprende la secuencia polipeptídica dada en SEQ ID NO: 1 para expresar una proteína de interés.

Figura 1

(a) Secuencia de aminoácidos de la forma empalmada de la XBP1 humana (SEQ ID NO:1)

MVVVAAAPNPADGTPKVLLLSGQPASAAGAPAGQALPLMVPAQRGASPEAASGG
 LPQARKRQRLTHLSPEEKALRRKLNKRVAAQTARDRKKARMSELEQQVVDLEEE
 NQKLLLENQLLREKTHGLVVENQELRQRLGMDALVAEEEEAEAKGNEVRPVAGSA
 ESAAGAGPVVTPPEHLPMDSGGIDSSDSESDILLGILDNLDPMFFKCPSPPEASLEE
 LPEVYPEGPSSLPASLSLSVGTSSAKLEAINELIRFDHIYTKPLVLEIPSETESQANVV
 VKIEEAPLSPSENDHPEFIVSVKEEPVEDDLVPELGISNLLSSSHCPKPSSCLLDAYS
 DCGYGGSLSPFSDMSSLLGVNHSWEDTFANELFPQLISV*

(b) Secuencia de ácido nucleico de la forma empalmada de la XBP1 humana (SEQ ID NO:2)

atggtggtggtggcagccgcgccgaaccggccgacgggaccctaaagttctgcttctgtcggggcagcccgcctccgccgc
 cggagccccggccggccagccctgccgctcatggtgccagcccagagagggggccagcccggaggcagcgagcggggggg
 ctgccccaggcgcgcaagcgacagcgctcacgcacctgagccccgaggagaaggcgctgaggaggaaactgaaaaacaga
 gtagcagctcagactgccagagatcgaagaaggctcgaatgagtgagctggaacagcaagtggtagattagaagaagagaa
 ccaaaaacttttgctagaaaatcagcttttacgagagaaaactcatggccttgtagttgagaaccaggagtaagacagcgcttggg
 gatggatgccctggtgctgaagaggagggcgaagccaaggggaatgaagtgaggccagtggccgggtctgctgagtcgca
 gcaggtgcaggcccagttgacccctccagaacatctccccatggattctggcggtattgactctcagattcagagtctgatalcc
 tgttgggcattctggacaactggaccagtcattcttcaaatgccctccccagagcctgccagcctggaggagctcccagagg
 tctaccagaaggaccagttcttaccagcctccctttctgtcagtggggacgtcatcagccaagctggaagccattaatgaact
 aattcgtttgaccacatatataccaagccctagcttagagataccctctgagacagagagccaagctaagtggtagtgaatac
 gaggaaacacctctcagcccctcagagaatgacacctgaattcattgtctcagtgagggaagaacctgtagaatgacctcgtt
 ccggagctgggtatctcaaatctgcttcatccagccactgcccgaagccatcttctgcctactggatgcttacagtactgtgata
 cgggggttcccttccccattcagtgacatgtcctctctgcttgggtgaaaccattctgggaggacacttttccaatgaactttccc
 cagctgattagtcttaa

Figura 2

(a) Secuencia de aminoácidos de Ero1 alfa humana (SEQ ID NO:3)

MGRGWGFLFGLLGA VWLLSSGHGEEQPPETA AQRCFCQVSGYLDDCTCDVETID
 RFNNYRLF PRLQK LLES DYFRYYK VNLKRPCPF WNDISQCGRRDCA VKPCQSDEV
 PDGIKSASYKYSEEANNLIEECEQAERLGA VDESLSEETQKA VLQWTKHDDSSDNF
 CEADDIQSPEAEYVDLLNPERYTYGKGPDA WKIWNVIYEENC FKPKQTIKRPLNPL
 ASGQGTSEENTFY SWLEGLC VEKRAF YRLISGLHASINVHLSARYLLQETWLEKK
 WGHNITEFQQRFDGILTEGEGPRRLKNLYFLYLIELRALS KVLPPFERPDFQLFTGN
 KIQDEENKMLLLEILHEIKSFPLHFDETSFFAGDKKEAHKLKEDFRLHFRNISRIMD
 CVGCFKCRLWGNLQTQGLGTALKILFSEKLIANMPESGPSYEFHLTRQEIVSLFNAF
 GRISTSVKELENFRNLLQNIH*

(b) Secuencia de ácido nucleico de Ero1 alfa humana (SEQ ID NO:4)

atgggccgcggtggggattctgtttggcctctgggcgccgtgtggctgctcagctgggccacggagaggagcagccccg
 gagacagcggcacagaggtgcttctgccaggttagtggtacttgatgattgtacctgtgatgtgaaaccattgatagatttaataa
 ctacaggctttcccaagactacaaaaacttctgaaagtactcttaggtattacaaggtaaacctgaagaggccgtccttctg
 gaatgacatcagccagtgtggaagaaggactgtgctgtcaaacatgtcaatctgatgaagttcctgatggaattaaatcgcgag
 ctacaagtattctgaagaagccaataatctcattgaagaatgtgaacaagctgaacgactggagcagtgatgaatcctgagtga
 ggaaacacagaaggctgttctcagtgaccaagcatgatgattctcagataacttctgtgaagctgatgacattcagtcacctgaa
 gctgaatatgtagattgcttcttaactctgagcgtactactggtacaaggaccagatgcttgaaaatattggaatgcatctacga
 agaaaactgtttaagccacagacaattaaagaccttaaatccttggcttctggtcaagggacaagtgagaagaacacttttaca
 gttggctagaaggctctgtgtagaaaaagagcattctacagacttatactggcctacatgcaagcattaatgtcattgagtgca
 agatattttacaagagacctggttagaaaaagaaatggggacacaacattacagaattcaacagcgatttgatggaatttgactga
 aggagaaggccaagaaggcttaagaactgtatttctacttaataagaactaagggttatcaaaagtgtaccattctcagagcg
 ccagatttcaactcttactgaaataaaattcaggatgaggaacaaaatgtacttctgaaatactcatgaaatcaagtcattt
 cctttgactttgatgagactcattttgctggggataaaaaagaagcacacaaactaaaggaggacttctgactgacttttagaaat
 attcaagaattatgattgtgtggtgttttaaatgctgctgtggggaaactctcagactcagggttgggcactgctctgaagatctt
 atttctgagaaattgatagcaaatatgccagaaaggacctagtatgattccatctaaccagacaagaatagtatcattatcaa
 cgcatttgaagaatttctacaagtgtgaagaattagaaaaactcaggaactgttacagaatattcattaa

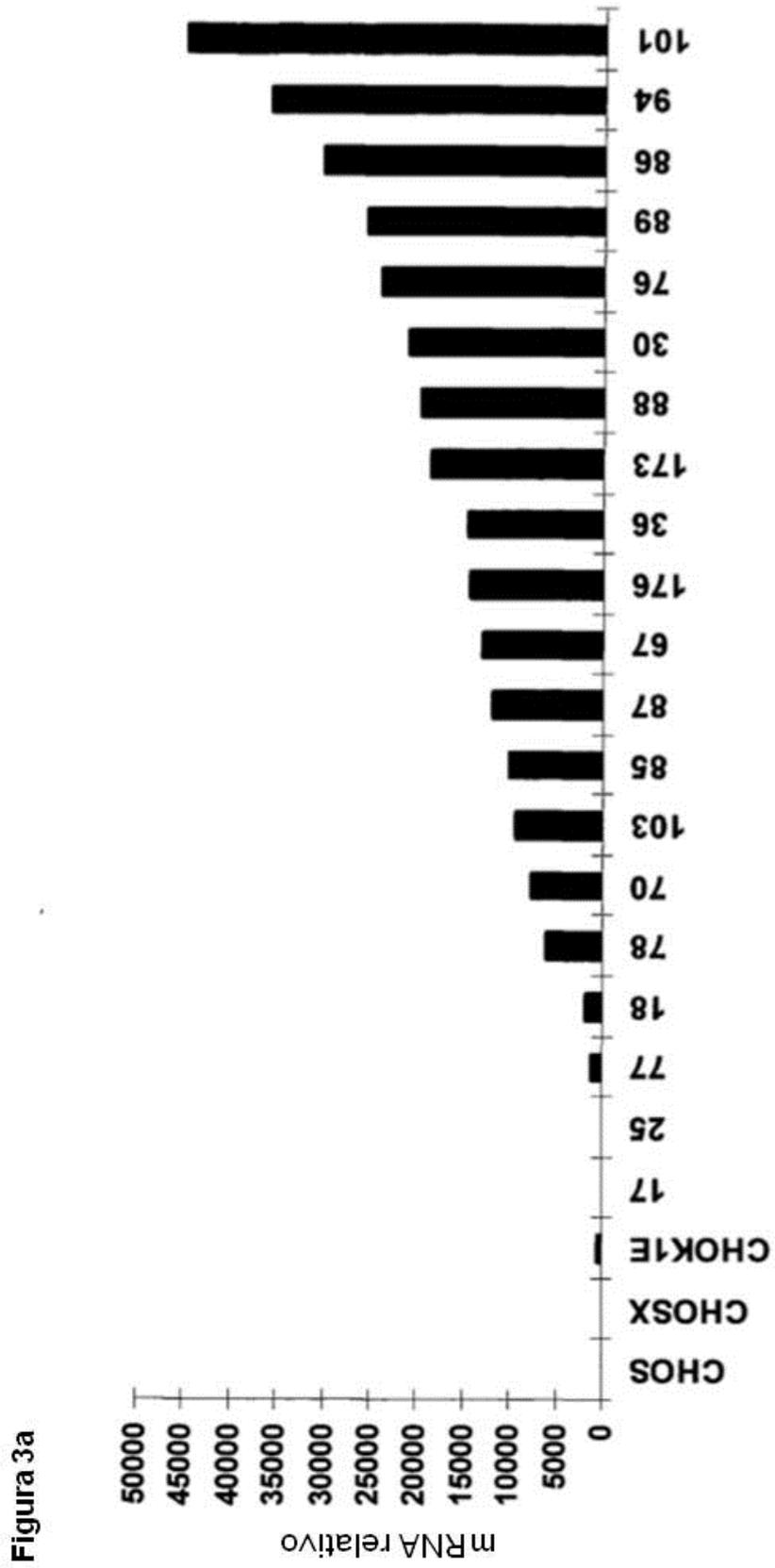




Figura 4

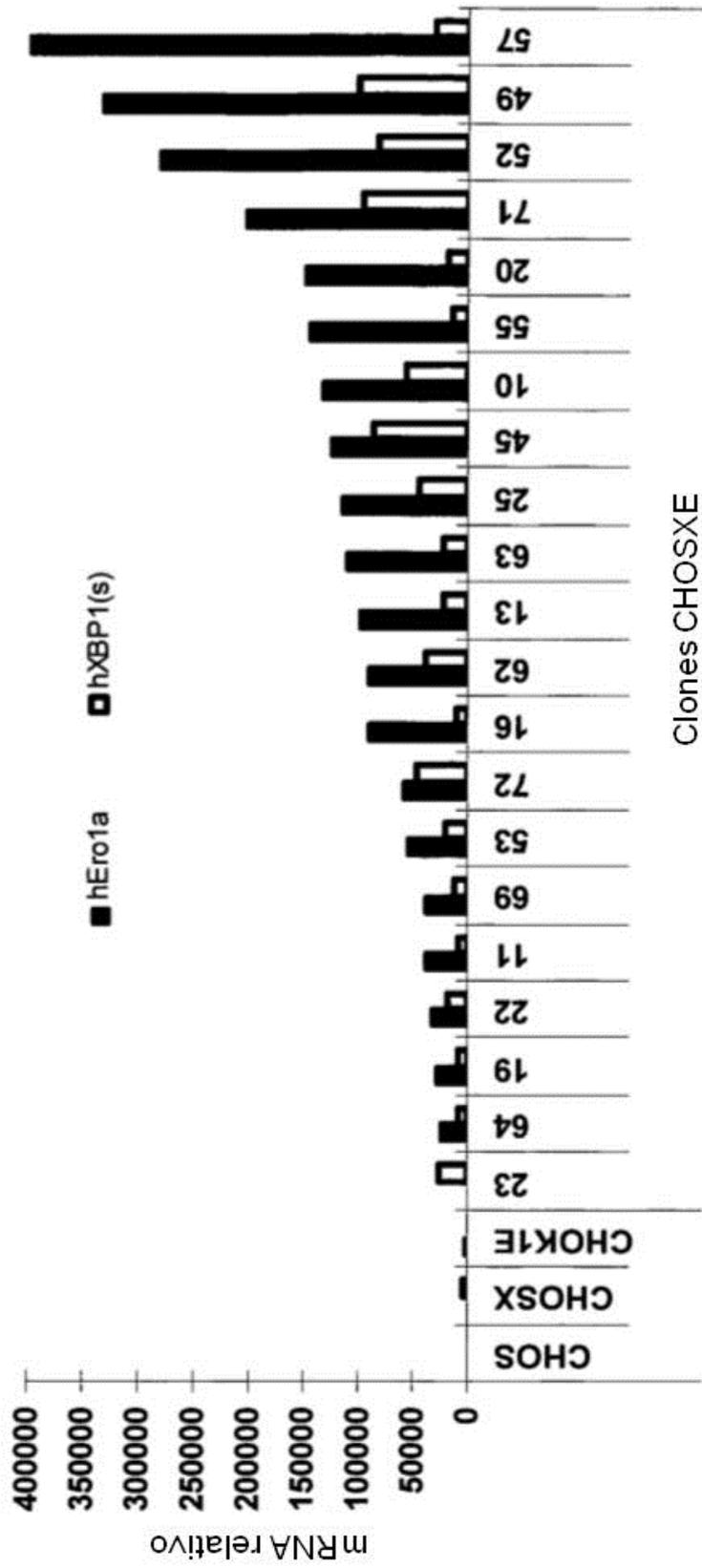
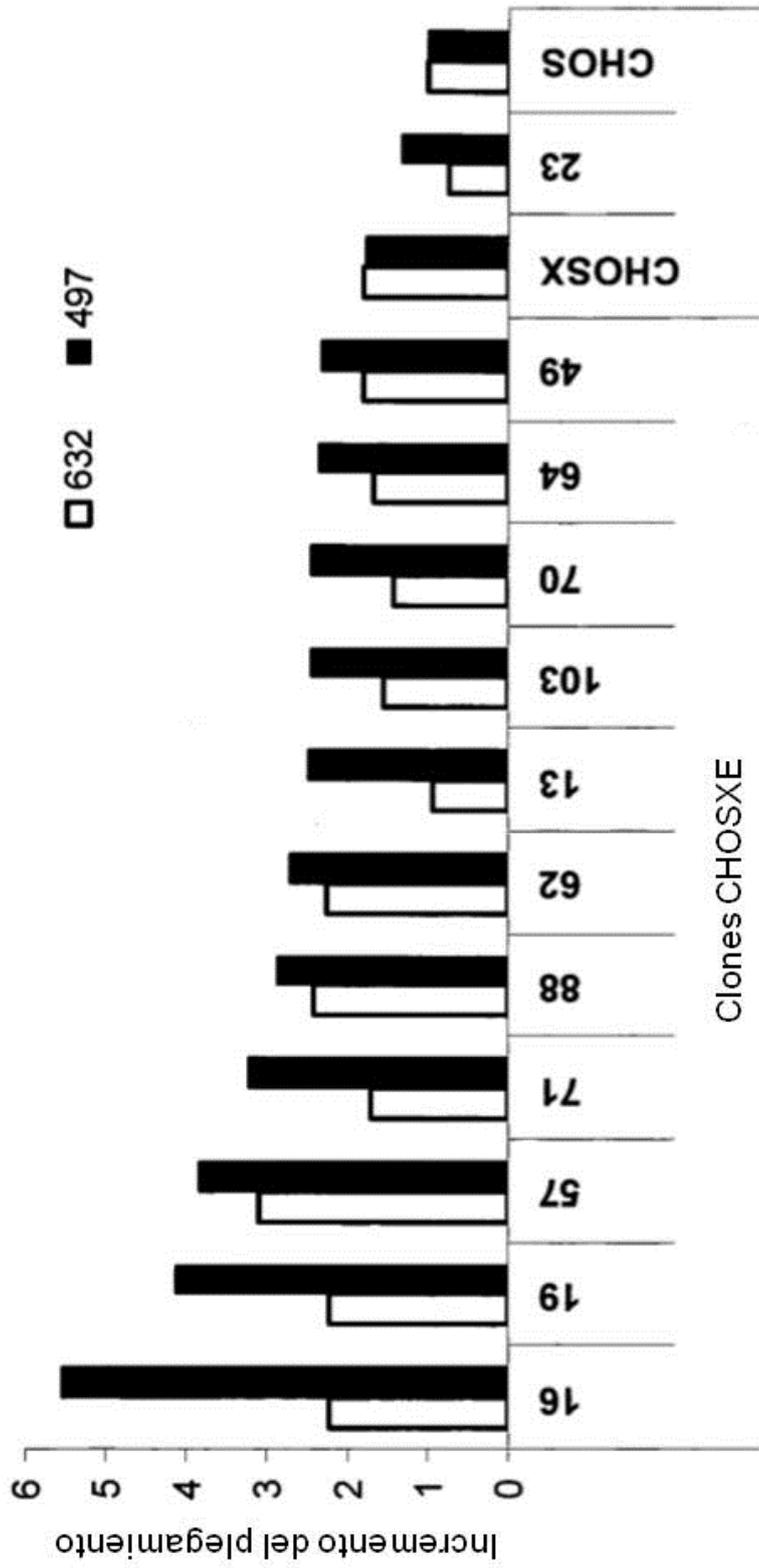


Figura 5



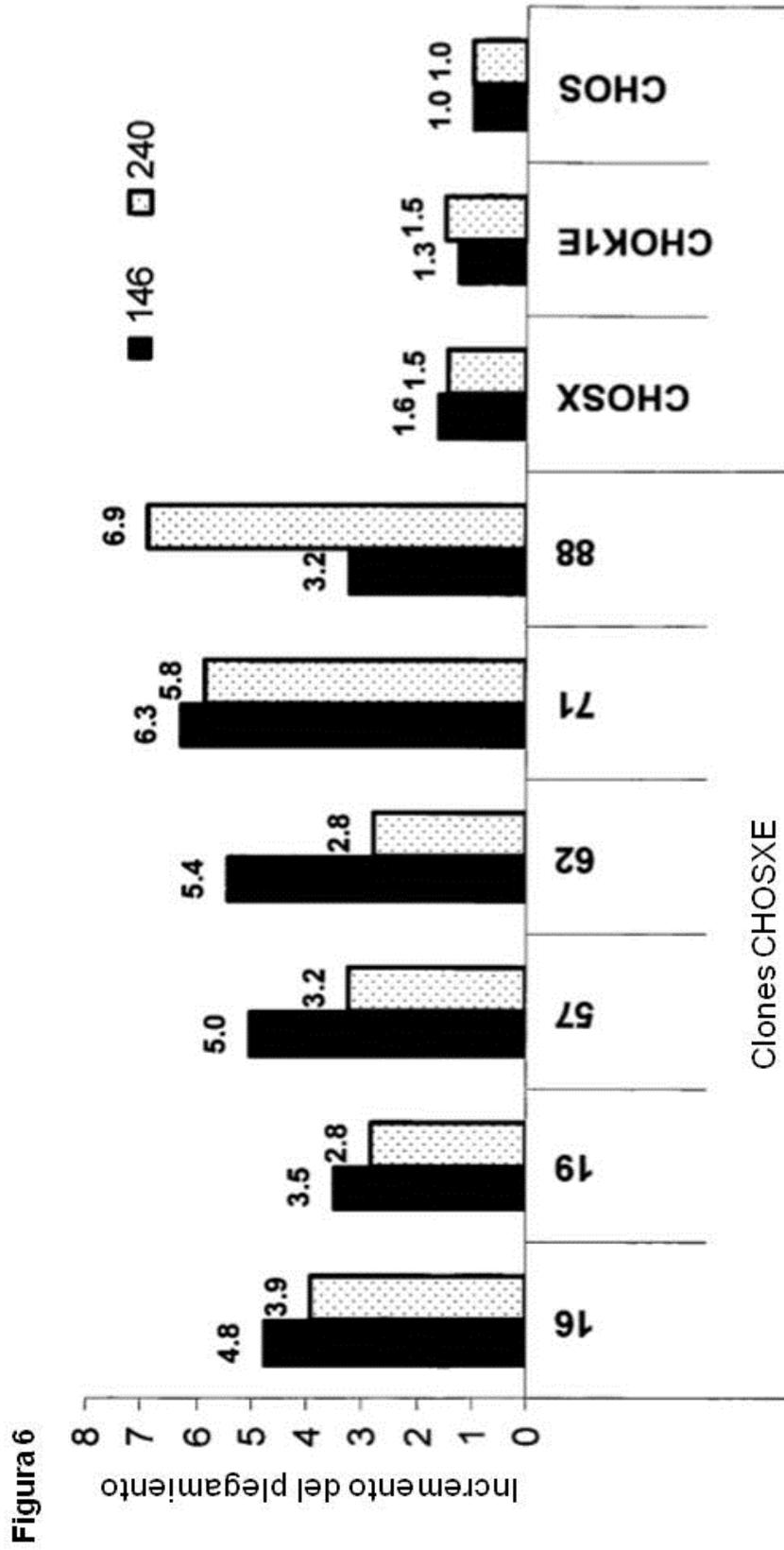


Figura 7

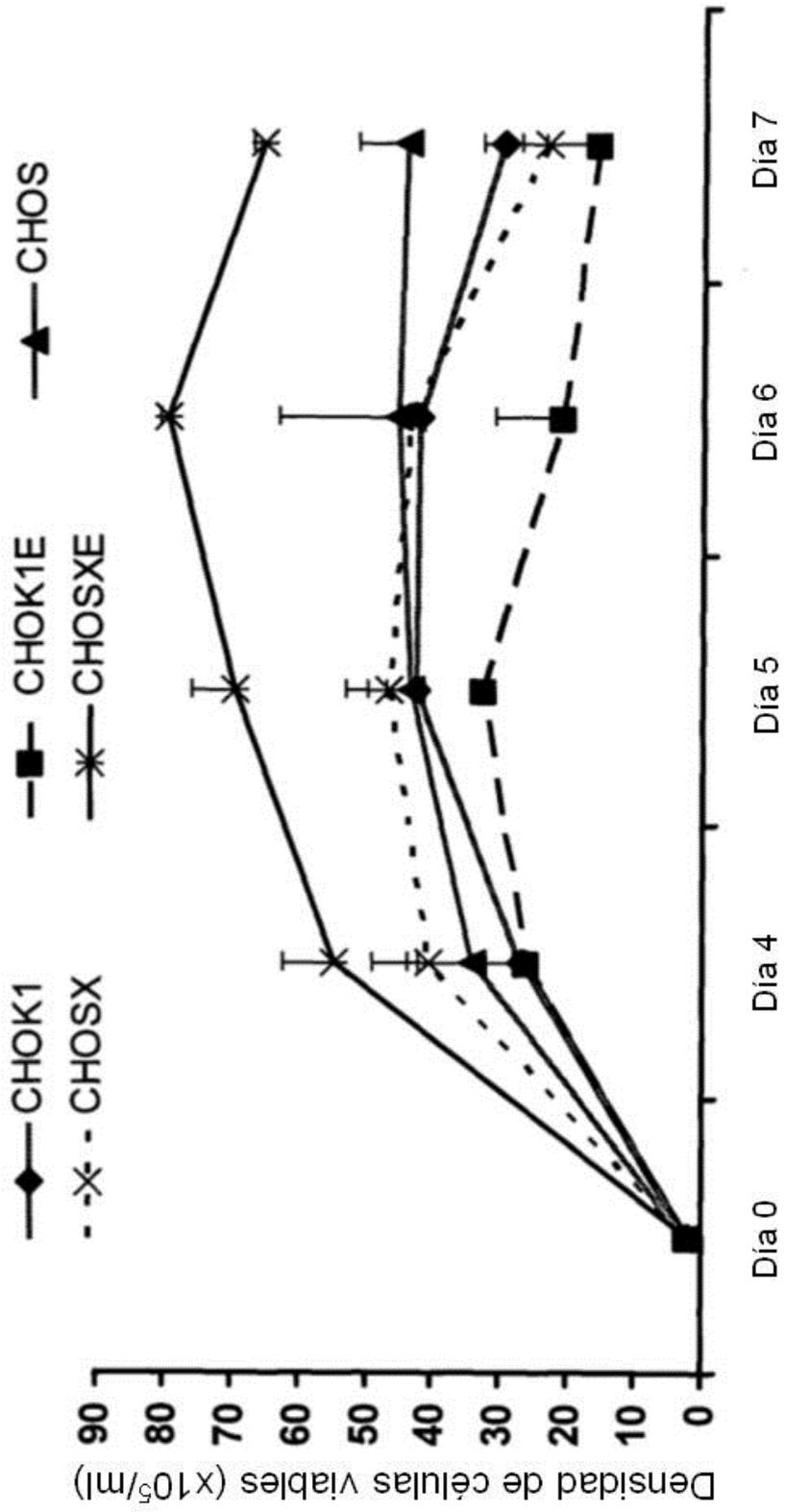
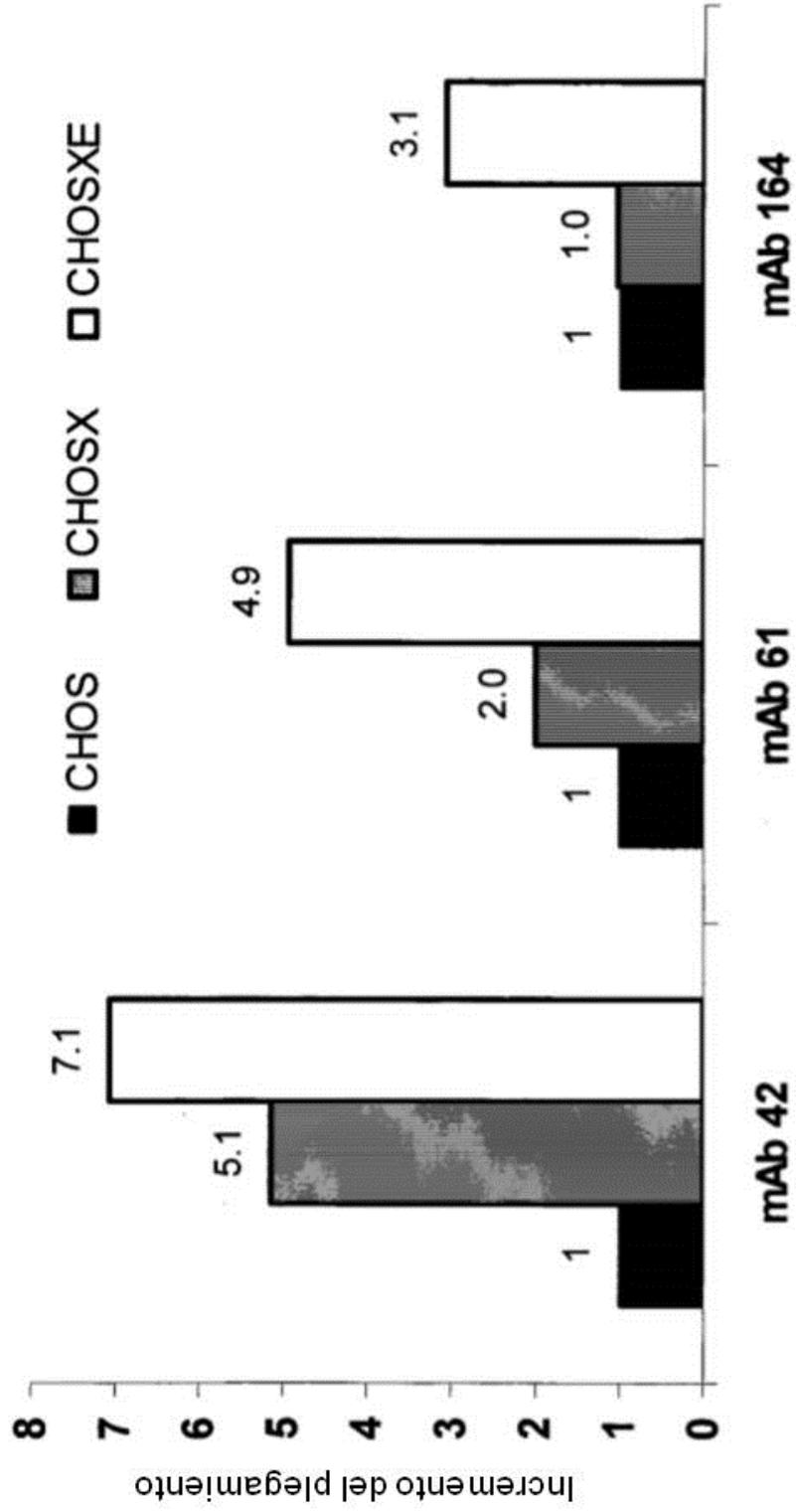


Figura 8



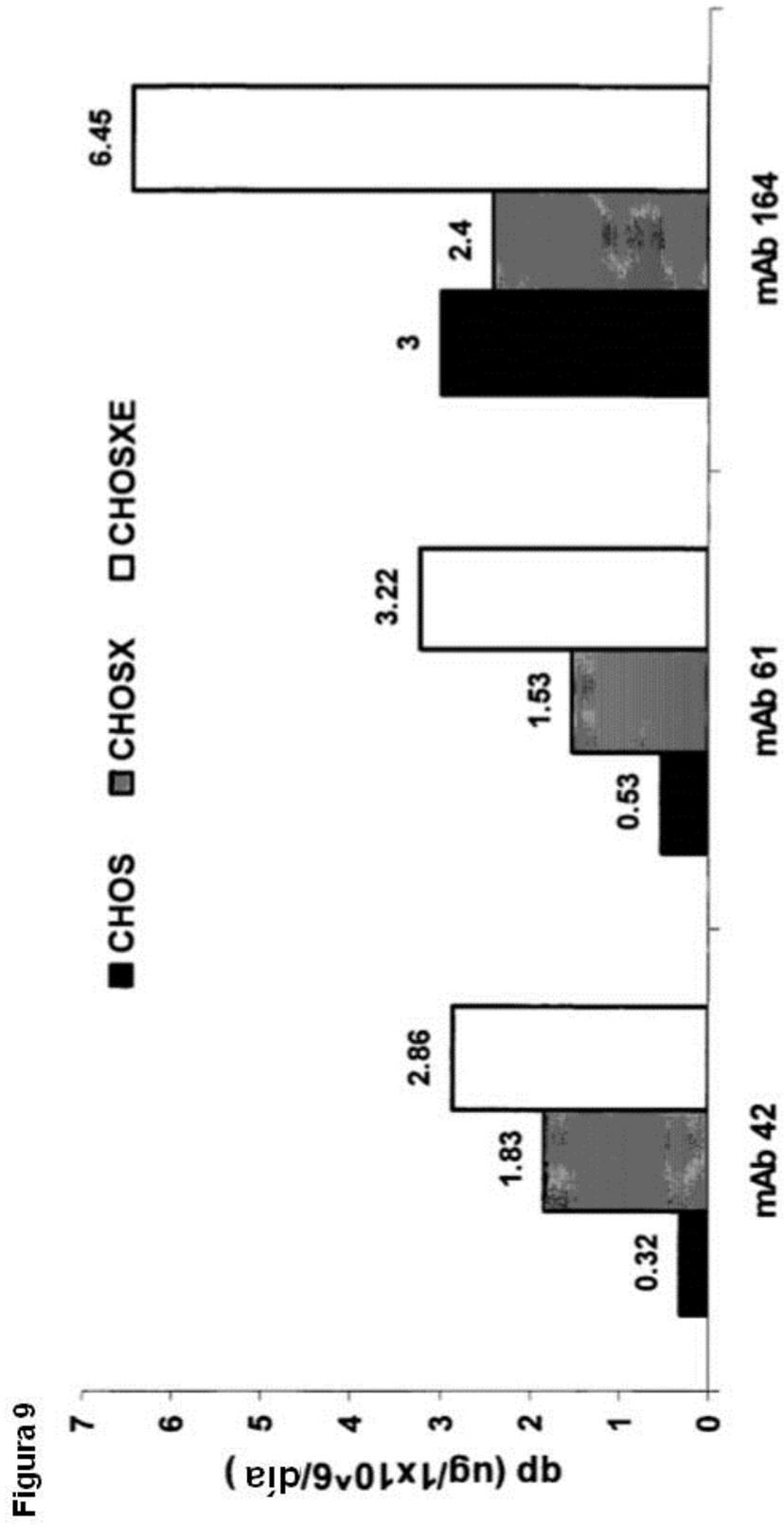


Figura 10

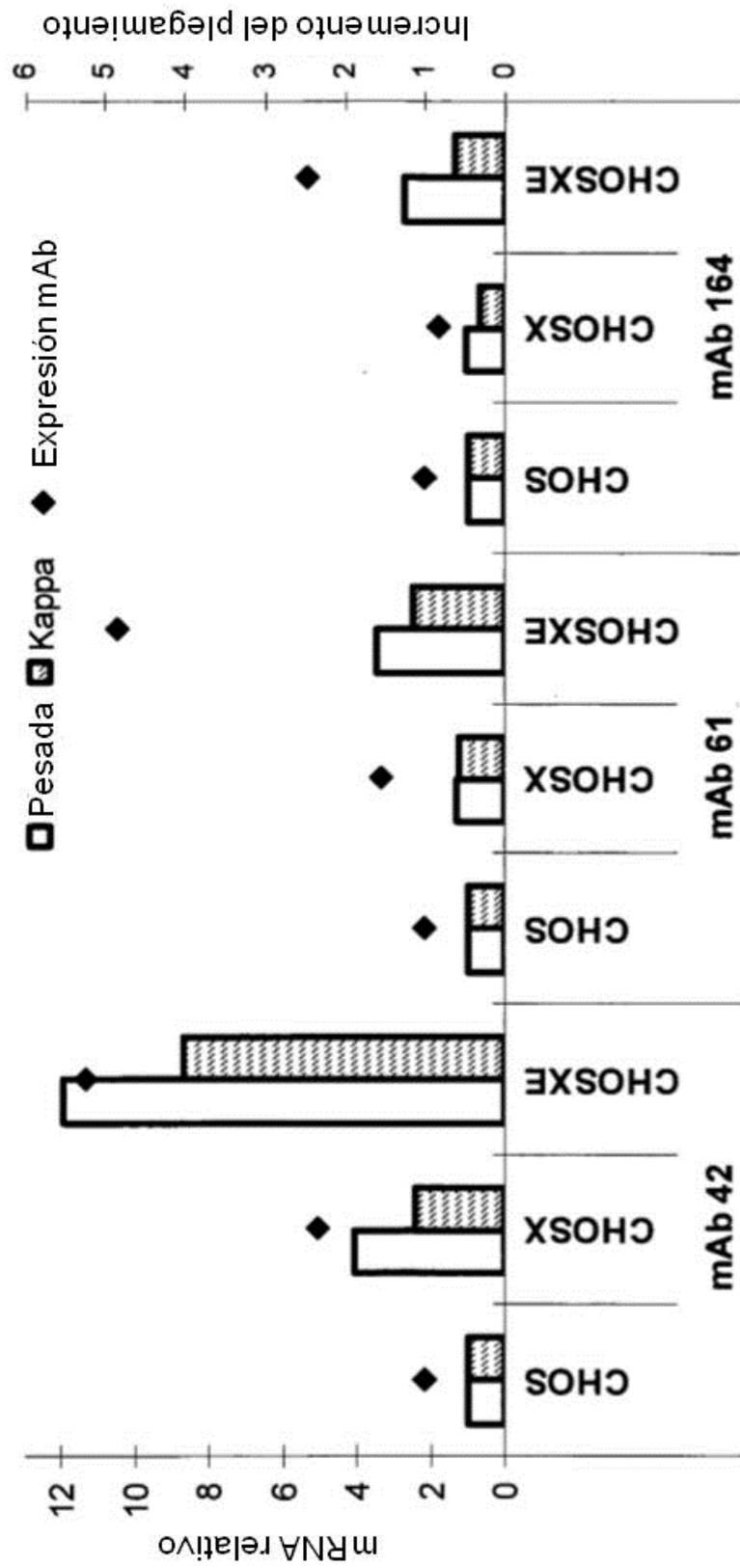


Figura 11

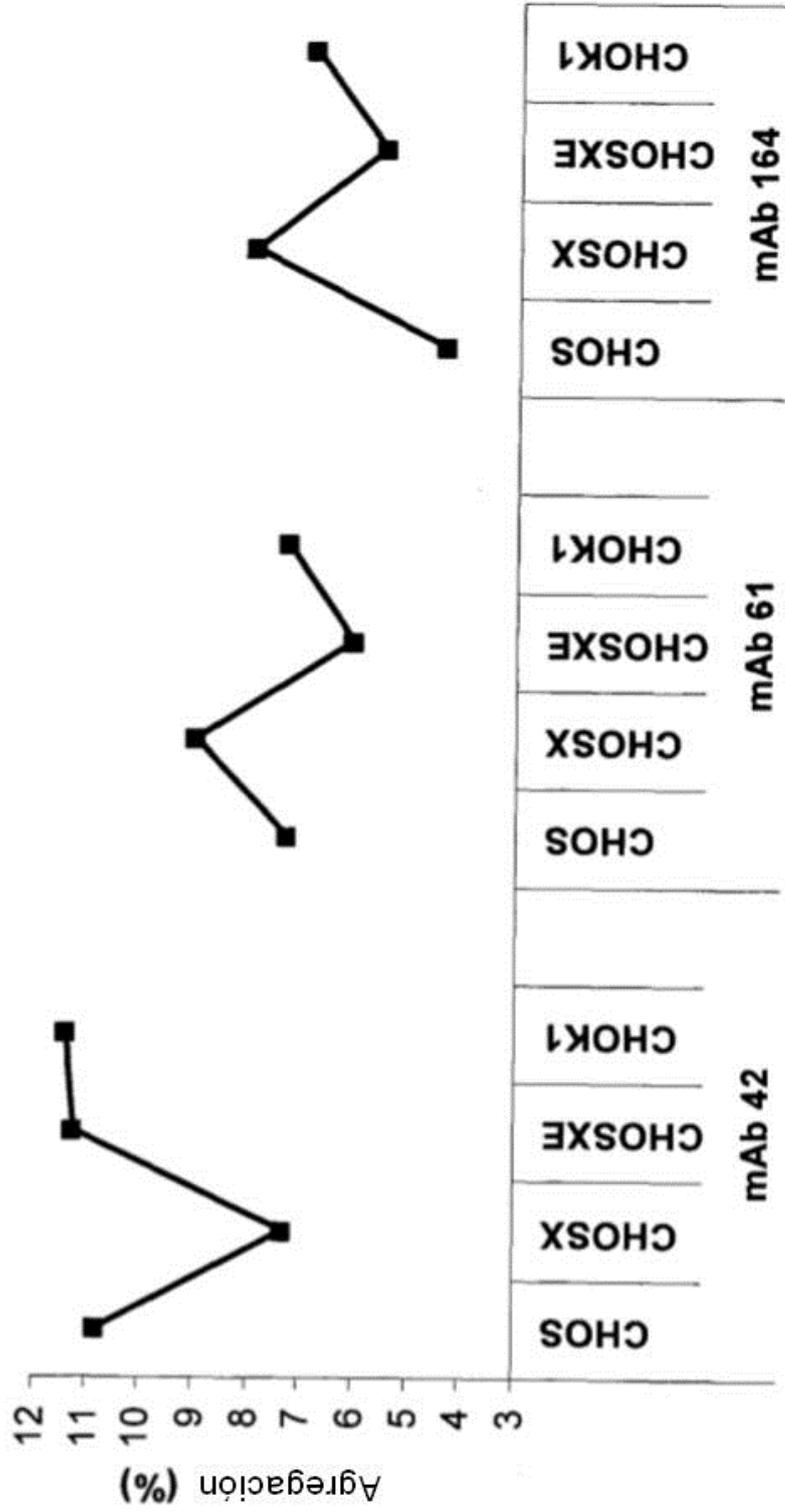


Figura 12a
mAb 42

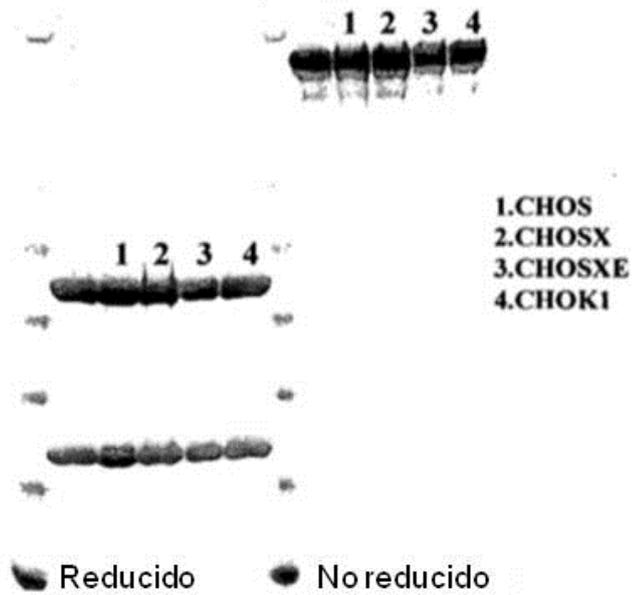


Figura 12b
mAb 61

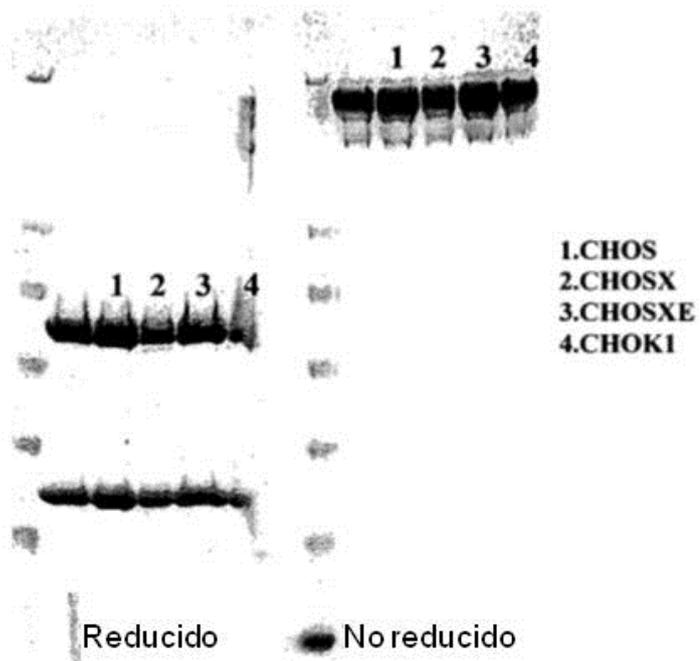


Figura 12c
mAb 164

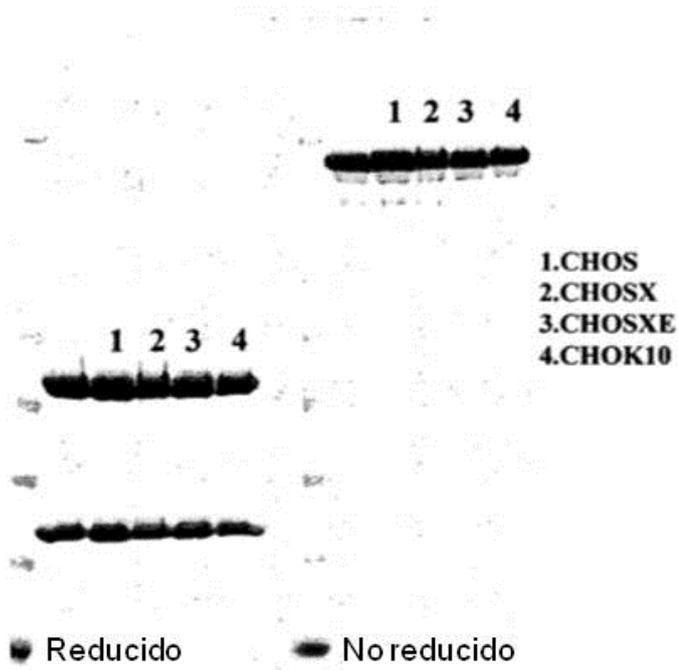


Figura 13

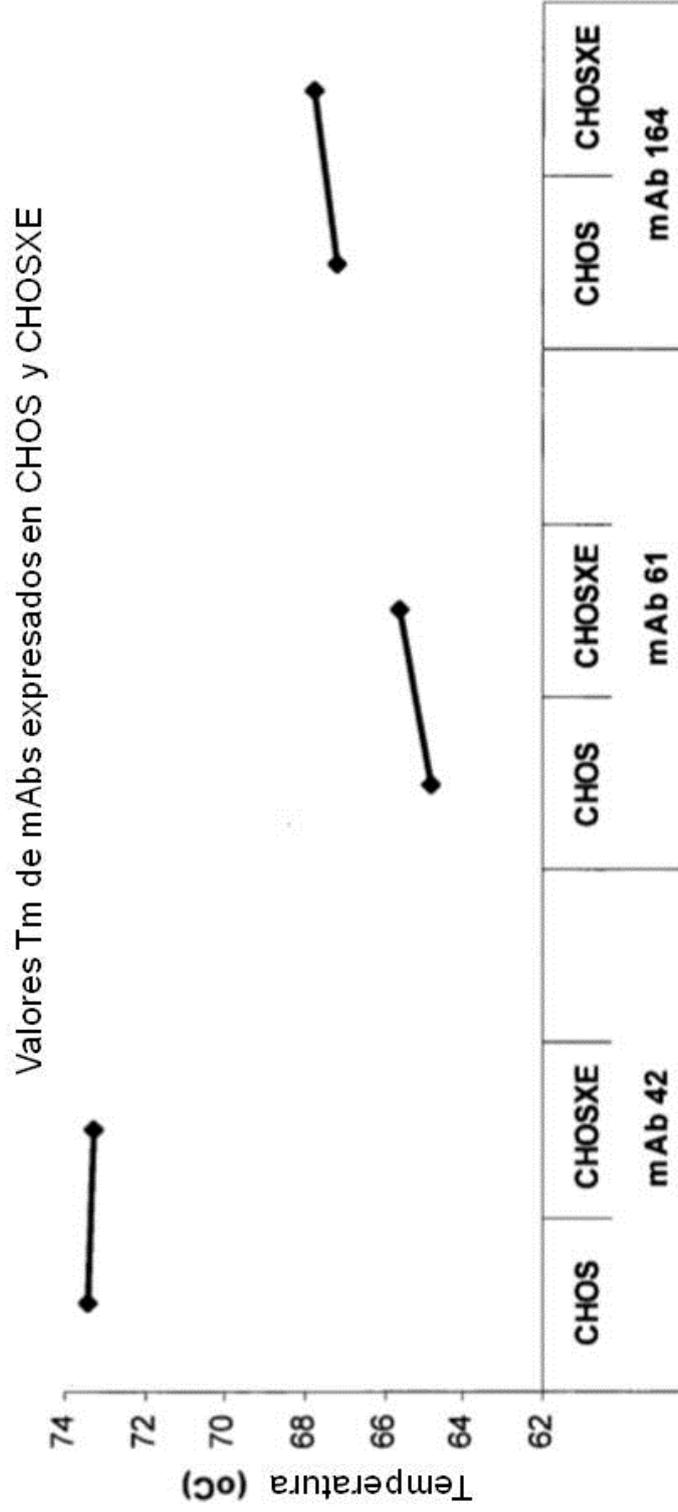


Figura 14

		mAb 42		mAb 61		mAb 164		Promedio	
		CHOS	CHOS XE	CHOS	CHOS XE	CHOS	CHOS XE	CHOS	CHOS XE
	G0F	47	53	37	48	49	50	44	50
	G1F	21	10	17	11	24	18	21	13
	G2F	2	0	1	0	1	1	2	1
	M3N3F	1	1	1	2	1	2	1	2
	M3N2F	1	0	0	0	0	0	0	0
	G0	7	22	11	26	10	16	9	21
	G1	9	5	17	5	6	8	11	6
	G2	0	1	6	1	2	1	3	1
	M3N3	0	3	1	1	0	2	0	2
	M3N2	1	0	1	0	0	0	0	0
	M5	9	5	8	5	6	2	8	4
	M6	2	1	0	0	0	0	1	0
	M7	0	0	0	0	0	0	0	0
	M8	0	0	0	0	0	0	0	0
	M9	0	0	0	0	0	0	0	0
	Fucosilado	72	65	55	62	76	71	68	66
	No fucosilado	17	30	36	33	18	27	24	30
	Manosa Alta	11	5	9	5	6	2	9	4

