

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 771**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2012 PCT/IL2012/000109**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2012 WO12120500**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2012 E 12713786 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2683821**

54 Título: **Líneas de células con bajo nivel de fucosa y sus usos**

30 Prioridad:

**06.03.2011 IL 21158311
27.12.2011 IL 21721611**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.10.2018

73 Titular/es:

**MERCK SERONO SA (100.0%)
Centre Industriel
1267 Coinsins, Vaud, CH**

72 Inventor/es:

**HELMAN, DANIEL;
TOISTER-ACHITUV, MIRA y
BAR-SHIMON, MEIRAV**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 687 771 T3

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

DESCRIPCIÓN

Líneas de células con bajo nivel de fucosa y sus usos

Campo y antecedentes de la invención

5 La presente divulgación, en algunas de sus realizaciones, se refiere a las líneas de células de CHO, procedimientos de generación de las mismas y sus usos.

Los anticuerpos terapéuticos recombinantes desempeñan una función importante en el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades. Se estima que aproximadamente un 30 % de los próximos nuevos fármacos probablemente se basarán en anticuerpos en la próxima década. Treinta anticuerpos recombinantes y la fusión Fc fueron aprobados para la comercialización con ventas en 2008 que alcanzaban los 35 mil millones de dólares.

10 Los anticuerpos contienen una región diana específica del antígeno que se compone de las regiones variables de cadenas tanto pesadas como ligeras. Esta parte del anticuerpo puede unir y neutralizar un antígeno soluble o una diana ligada a membrana.

15 La porción Fc es responsable de las funciones efectoras a través del mecanismo de la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC), el complejo dependiente del complemento (CDC) y el receptor neonatal FcRn. Ésas funciones efectoras son mediadas por la interacción de las moléculas efectoras con las regiones de bisagra y CH2 de la Fc. El dominio CH2 contiene un oligosacárido localizado en el sitio de N-glicosilación en la posición 297 del anticuerpo que se sabe que desempeña una función importante en la unión a las células efectoras. El oligosacárido se compone generalmente de un tipo diantenario complejo con una considerable heterogeneidad, tal como un núcleo heptasacárido junto con residuos de azúcar externos variables adicionales.

20 La ADCC es uno de los mecanismos críticos de la destrucción de los anticuerpos que unen ligandos en la membrana de las células diana. Los FcγR expresados en leucocitos unen el dominio CH2 de los anticuerpos y después se inicia la unión y creación de complejos inmunitarios con antígenos en la activación de las células diana de los leucocitos. La activación puede incluir fagocitosis y liberación de mediadores celulares que conducen a la permeabilización y muerte celular. La actividad de la ADCC depende del isotipo IgG, por un lado, y en un FcγR específico, por otro lado. Mientras que IgG1 e IgG3 pueden inducir esta actividad, IgG4 no lo hace. El FcγR que une el IgG y es importante para la activación del mecanismo de la ADCC se conoce como FcγRIIIa y se expresa en las células agresoras naturales (NK) y macrófagos. En muchos casos, la actividad de la ADCC obtenida en la unión de la célula NK a la célula diana no es lo suficientemente eficiente como para realizar la destrucción de la célula diana. La razón es que la afinidad del FcγRIIIa a la IgG1 es baja.

30 Se encontró un aumento de la actividad de la ADCC en pacientes que expresan el alotipo de alta afinidad FcγRIIIa-158Val encontrado en 10-15 % de la población en comparación con pacientes que expresan FcγRIIIa-158Phe. También se obtenía ADCC elevada por manipulaciones realizadas en la Fc de IgG. Se usaron algoritmos de diseño por ordenador para modificar genéticamente anticuerpos y seleccionar alta afinidad mediante cribado de alto rendimiento. Este trabajo produjo anticuerpos que presentan >2 órdenes de mejora de la magnitud de la función efectora in vitro (Lazar, Dang y col., 2006), aunque se detectó una disminución de la termoestabilidad del IgG1 mutado (IgG1 con las mutaciones S239D, A330I e I332E). Otro enfoque para obtener anticuerpos con ADCC mejorada es producirlos con bajos niveles de fucosa en su oligosacárido en la posición 297. Previamente, se encontró que los residuos de fucosa en el oligosacárido interfieren con la Fc que se une FcγRIIIa (Shinkawa, Nakamura y col., 2003). Una forma de obtener anticuerpos con bajos niveles de fucosa es aprovechar las células con dicha capacidad natural, como las células YB2/0 de hibridoma de Rata (Shinkawa, Nakamura y col., 2003), aunque las proteínas recombinantes producidas en estas células tienen niveles variables del contenido de fucosa. Otras diversas posibilidades de células de no mamíferos incluyen las células aviares de Vivalis, la planta acuática Lemna de ingeniería genética de Biolex (Cox, Sterling y col., 2006) y la variante del musgo Physcomitrella patens de Igeneon (Nechansky, Schuster y col., 2007). Además, GlycoFi generó varias líneas de células Pichia Pastoris con capacidades para diversas soluciones de glicosilación, incluyendo ADCC mejorada (Hamilton, Davidson y col., 2006). También diversas células de mamíferos se utilizan para la producción de anticuerpos con varias soluciones de glicosilación en general y ADCC mejorada en particular. Glycotope creó varias líneas de células de glicoingeniería humanas para glico-optimizar la glicosilación bio-terapéutica. Glycart, adquirida por Roche, diseñó genéticamente una línea celular que produce anticuerpos recombinantes con nivel de fucosa reducido introduciendo beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una glicosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos bisecados que se han visto implicados en la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) (Umana, Jean-Mairet y col., 1999). Biowa generó una desactivación en el gen fucosiltransferasa 8 (Fut8) de DG44 de CHO con el fin de disminuir los niveles de fucosa (Yamane-Ohnuki, Kinoshita y col., 2004).

55 Una reciente investigación demostró que la expresión heteróloga de la enzima procariota GDP-6-desoxi-D-liso-4-hexulosa-reductasa dentro del citosol puede bloquear la transformación del intermedio GDP-4-ceto-6-desoximanosa en un producto sin salida que normalmente no aparecen en células de vertebrados. Por lo tanto, las células de CHO que fueron modificadas de esta manera secretaron anticuerpos que carecían del núcleo fucosa (von Horsten, Ogorek y col.). Otro enfoque fue la creación de mutantes resistentes a las lectinas que sobreviven en presencia de

lectinas tóxicas específicas de fucosa. LEC13 es una línea celular basada en CHO que se desarrolló por incubación de células de CHO en presencia de lectina tóxica específica de fucosa de guisante (Ripka y Stanley 1986). LEC13 es deficiente en la actividad de la GDP-manosa 4,6-deshidratasa que da como resultado la expresión de IgG1 humanas que son deficientes en fucosa (Shields, Lai y col., 2002).

5 La solicitud de patente de EE.UU. N.º 2010/0081150 enseña la mutación de células de CHO por tratamiento con productos químicos y seleccionando las células que muestran un modelo variante de glicosilación que incluye una disminución en la fucosilación al destruir células con alto nivel de fucosa, con el fin de generar células útiles para expresar anticuerpos.

10 La solicitud de patente de EE.UU. N.º 2010/0304436 enseña líneas de células de CHO con fucosilación reducida por mutación en la proteína Fx y controlando la disponibilidad de una fuente externa de fucosa con el fin de dirigir la capacidad de las células a los polipéptidos fucosilados.

Kanda y col. (Kanda, Imai-Nishiya y col., 2007) divulgan las líneas de células anfitrionas desactivadas de GMD y FUT8. Las células desactivadas de GMD tienen una eliminación genómica correspondiente a las regiones de los exones 5, 6 y 7 de la GMD.

15 Ripka y col. (Ripka y Stanley 1986) divulgan cuatro células mutantes de CHO resistentes a las lectinas. Las mutaciones fueron efectuadas por incubación con N-metil-N-nitrosoguanidina.

Shields y col. (Shields, Lai y col., 2002) divulgan que la IgG1 producida por la línea de células Lec13 (CHO deficiente en fucosa) aumentaba la unión a FcγRIIIA hasta 50 veces y también aumentaba la ADCC.

20 Kanda y col. (Kanda, Yamane-Ohnuki y col., 2006) divulgan que Lec13 produce 50-70 % de anticuerpo fucosilado; sin embargo esta conocida línea de células no podría producir de forma estable el anticuerpo. Así, la línea de células Lec13 no es adecuada como línea de la producción de células.

WO 2010/036443 divulga diversos medios para generar células que produzcan glicoproteínas, como los anticuerpos, con patrones variantes de la glicosilación.

25 Chow y col. (MUTATION RESEARCH 413 (1998), 251-264) divulga un tratamiento de baja mortalidad de la línea de células 3T3 NIH de ratón con metotrexato (MTX).

Hoffmann y col. (GRAEFE'S ARCH CLIN EXP OPHTHALMOL., vol. 236 (1998), pág. 779-784) y Jackson y col. (JOURNAL OF CELL SCIENCE, vol. 96 (1990), pág. 257-262) describen el aislamiento rápido de diferentes tipos de células basado en microesferas magnéticas acopladas con lectina.

30 Ripka y col. (ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, vol. 249 (1986), pág. 533-545) es un informe que identifica GDP-manosa-4,6-deshidratasa (GMD) de ser el factor que lleva a la deficiente glicosilación de fucosa en células de ovario de hámster chino (CHO) Lec13 y Lec13a; se informa que las células de Lec13 son totalmente deficientes en la actividad de la GMD.

35 Kanda y col. (BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 94 (2006), pág. 680-688) compara tres diferentes líneas de células deficientes en fucosilación, siendo una de las líneas celulares (Lec13 A4) deficiente en GMD, siendo las otras dos líneas de células defectuosas en la expresión de FUT8 (YB2/0 que tiene una expresión reducida, siendo la línea celular Ms704 una FUT8 desactivada).

Sumario de la invención

40 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un procedimiento de selección de células de CHO útiles como células anfitrionas para expresar proteínas recombinantes, comprendiendo el procedimiento:

- a. introducir mutaciones genéticas en una población de células de CHO poniendo en contacto las células con un metotrexato (MTX),
- b. poner en contacto la población de células de CHO que comprende células mutadas con un agente no tóxico de unión a fucosa durante un período de tiempo que permite la unión del agente de unión a fucosa a un resto de fucosa en una membrana celular de la población de células, en donde el período de tiempo no permite la destrucción de las células; y
- c. eliminar de la población de células que comprenden las células mutadas, una subpoblación de células que unen el agente de unión a fucosa, seleccionando así células útiles como las células anfitrionas para expresar proteínas recombinantes, teniendo las células seleccionadas cero contenido de fucosa.

50 Según un aspecto de algunas realizaciones se proporciona una célula CHO aislada generada según el procedimiento de la presente invención como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

- Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona una célula de CHO aislada que está genéticamente modificada para expresar una GDP-manosa-4,6-deshidratasa (GMD) mutada que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en las SEQ ID NO: 23 y/o 24.
- 5 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención allí se proporciona una línea celular de CHO que comprende la célula aislada de la presente invención (CNCM 1-4449).
- Según un aspecto de algunas realizaciones se proporciona un cultivo celular que comprende la célula de CHO aislada de la presente invención y un medio de cultivo celular carente de xenocontaminantes.
- 10 Según un aspecto de algunas realizaciones se proporciona un procedimiento para la producción de una proteína recombinante que comprende la transfección de la célula de CHO aislada de la presente invención con un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína recombinante, cultivando la célula de CHO transfectada en condiciones apropiadas para la expresión de la proteína recombinante, y aislando la proteína.
- 15 Según un aspecto de algunas realizaciones se proporciona una célula de CHO aislada que es genéticamente modificada de manera que una cantidad de fucosilación de una proteína expresada en dicho lugar es linealmente dependiente de una concentración de fucosa externa.
- Según algunas realizaciones de la invención, el agente de unión a fucosa no es tóxico para la población mutada de las células de CHO.
- Según algunas realizaciones de la invención, el agente de unión a fucosa se une a un resto detectable o a un resto de afinidad.
- 20 Según algunas realizaciones de la invención, la introducción de mutaciones genéticas en la población de células de CHO se efectúa poniendo en contacto las células con un mutágeno que causa una mutación en la GDP-manosa-4,6-deshidratasa, un gen de la vía de síntesis de fucosa.
- Según algunas realizaciones de la invención, el período de tiempo durante el cual la población celular mutada se pone en contacto con un agente de unión a fucosa es no mayor de 60 minutos.
- 25 Según algunas realizaciones de la invención, cuando el agente de unión a fucosa se une a un resto de afinidad, el procedimiento comprende además poner en contacto la población mutada de células de CHO con un agente adicional, comprendiendo dicho agente adicional un resto de unión a cognado del resto de afinidad.
- Según algunas realizaciones de la invención, el resto de afinidad comprende biotina.
- Según algunas realizaciones de la invención, el resto de unión a cognado se une a un resto detectable.
- 30 Según algunas realizaciones de la invención, el resto detectable comprende un resto fluorescente o un resto magnético.
- Según algunas realizaciones de la invención, la eliminación se efectúa por clasificación mediante FACS.
- Según algunas realizaciones de la invención, la eliminación se efectúa por separación magnética.
- 35 Según algunas realizaciones de la invención, la eliminación se efectúa mediante al menos tres rondas de eliminación secuencial.
- Según algunas realizaciones de la invención, las células de CHO se seleccionan de CHO-S, CHO-K1, DUXB11, CHO/DG44 y Pro-5.
- Según algunas realizaciones de la invención, el agente de unión a fucosa es lectina Aleuria aurantia (AAL) o lectina Aspergillus oryzae (AOL) específica de 1-fucosa.
- 40 Según algunas realizaciones de la invención, la célula de CHO aislada expresa una fucosiltransferasa-8 (Fut8) de tipo salvaje.
- Según algunas realizaciones de la invención, la célula de CHO aislada expresa una GDP-ceto-6-desoximanosa-3,5-epimerasa-4-reductasa (FX) de tipo salvaje.
- 45 Según algunas realizaciones de la invención, el GMD mutado tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en las SEQ ID NO: 23 y/o 24.
- Según algunas realizaciones de la invención, la célula de CHO aislada expresa una GDP-manosa-4,6-deshidratasa (GMD) mutada.
- Según algunas realizaciones de la invención, las células aisladas tienen un fenotipo estable de fucosa para al menos

370 duplicaciones de la población.

Según algunas realizaciones de la invención, la célula de CHO aislada expresa una proteína recombinante de interés.

Según algunas realizaciones de la invención, el medio de cultivo celular comprende fucosa.

- 5 Según algunas realizaciones de la invención, el medio de cultivo celular está desprovisto de fucosa.

Según algunas realizaciones de la invención, la transfección se efectúa en presencia de fucosa exógena.

Según algunas realizaciones de la invención, el procedimiento comprende además el cultivo de la célula de CHO aislada de la presente invención en un medio de cultivo que comprende fucosa tras la transfección.

Según algunas realizaciones, la proteína recombinante es un anticuerpo.

- 10 Según algunas realizaciones, la proteína recombinante es una proteína Fc de fusión.

Según algunas realizaciones, los anticuerpos han mejorado la ADCC.

Según algunas realizaciones, la célula de CHO aislada se modifica genéticamente para expresar una GDP-manosa-4,6-deshidratasa (GMD) mutada.

Según algunas realizaciones, al menos un alelo de la GMD lleva al menos una pérdida de mutación de la función.

- 15 Según algunas realizaciones, cada alelo de la GMD lleva al menos una pérdida de mutación de la función.

Según algunas realizaciones, cuando la concentración de fucosa externa es cero, la cantidad de fucosilación de la proteína es cero.

Según algunas realizaciones, la célula de CHO aislada tiene una concentración integral de células viables (IVCC) un 20 % mayor que las células de CHO no-mutadas.

- 20 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y/o científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que normalmente entiende el experto normal en la técnica al que pertenece la invención. Aunque los procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento pueden ser utilizados en la práctica o prueba de las realizaciones de la invención, los procedimientos ejemplares y/o materiales se describen a continuación. En caso de conflicto, prevalecerá la memoria descriptiva de la patente, incluidas las definiciones.
- 25

Breve descripción de los dibujos

- 30 Algunas realizaciones de la invención se describen, en el presente documento, solo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos y a las imágenes que se adjuntan. Con referencia específica ahora a los dibujos detalladamente, se subraya que la información mostrada se da a modo de ejemplo y con el fin de un análisis ilustrativo de las realizaciones de la invención. En este sentido, la descripción tomada con los dibujos hace evidente para los expertos en la técnica de cómo se pueden poner en práctica las realizaciones de la invención.

En los dibujos:

La Fig. 1 es un diagrama de flujo del enfoque experimental que se usó para obtener células que expresan polipéptidos con cero o bajos niveles de fucosa.

- 35 La Fig. 2 es un diagrama de flujo de los procesos de purificación del mAb anti-EGFR intacto y del monómero.

La Fig. 3 es un modelo de ejemplo de un análisis cinético mediante Octet.

- 40 La Fig. 4 es un diagrama que ilustra una estrategia de ejemplo para el aislamiento de las células ITL-LF1 de poca fucosa (cero fucosa, en ausencia de fucosa externa). Las células de CHO-S fueron incubadas con el agente mutagénico metotrexato (MTX) después de dos rondas de selección de células de poca fucosa etiquetando las células con lectina biotinilada (AAL biotinilada) específica de fucosa y aislamiento de células que no se unen con microesferas magnéticas revestidas de estreptavidina. Esta etapa fue seguida por otra ronda de selección en la que las células se etiquetaron con lectina biotinilada (AAL biotinilada) específica de fucosa y estreptavidina fluorescente y la selección de las células de baja fluorescencia se realizó mediante FACS.

- 45 La Fig. 5 es un diagrama que ilustra una estrategia de ejemplo para el aislamiento de células de ITL-LF1 de poca fucosa. Las células de CHO-S fueron incubadas con el agente mutagénico MTX seguido de cuatro rondas de etiquetado de células con lectina biotinilada (AAL biotinilada) específica de fucosa y estreptavidina fluorescente, y clasificación de las células de baja fluorescencia mediante FACS.

- La Fig. 6 es un gráfico que ilustra el análisis mediante FACS de los niveles de fucosa en las células de CHO tratadas y no tratadas con MTX después de la separación en microesferas magnéticas. Las células de CHO-S incubadas o no con MTX se etiquetaron con AAL biotinilada y se mezclaron con microesferas magnéticas revestidas con estreptavidina. Las células se separaron con un imán y las células que no unieron al imán se reprodujeron posteriormente. El análisis mediante FACS se llevó a cabo etiquetando las células con AAL biotinilada seguido por tinción con estreptavidina fluorescente. Células de CHO-S tratadas con MTX, no etiquetadas (\square), CHO-S incubadas con MTX y etiquetadas con AAL (\circ), células de CHO-S de poca fucosa incubadas en MTX y clasificadas con microesferas (Δ), CHO-S clasificadas con microesferas (\diamond).
- La Fig. 7A es un gráfico que ilustra el análisis mediante FACS de los niveles de fucosa en células de ITL-LF1 aisladas mediante microesferas magnéticas y FACS. Las células de CHO-S incubadas con MTX se etiquetaron con AAL biotinilada y se mezclaron con microesferas magnéticas revestidas con estreptavidina. Las células se separaron con un imán y las células que no se unieron al imán se reprodujeron posteriormente. Esta etapa se repitió dos veces. Después, las células se etiquetaron con AAL biotinilada y estreptavidina fluorescente y las células de baja fluorescencia se clasificaron mediante FACS y se reprodujeron posteriormente. El análisis mediante FACS se llevó a cabo etiquetando las células con AAL biotinilada y estreptavidina fluorescente. Células de CHO-S tratadas con MTX, no etiquetadas (\square), células de CHO-S tratadas con MTX (\circ), células de CHO tratadas con MTX después de una sola separación en microesferas (Δ), células de CHO-S tratadas con MTX después de dos ciclos de separación en microesferas (\diamond), células de CHO-S tratadas con MTX después de dos ciclos de separación en microesferas y un único ciclo de clasificación mediante FACS (\blacktriangledown).
- La Fig. 7B es un gráfico que ilustra el análisis mediante FACS de los niveles de fucosa en las células seleccionadas utilizando lectina *Aspergillus oryzae* (AOL) específica de 1-fucosa. Células de CHO-S, no etiquetadas (\square), células de CHO-S (\circ), células de CHO-S tratadas con MTX seguido por una sola separación en microesferas (Δ), células de CHO-S tratadas con MTX después de dos ciclos de separación en microesferas (\diamond), células de CHO-S tratadas con MTX después de dos ciclos de separación en microesferas y un único ciclo de selección mediante FACS (\blacktriangledown).
- La Fig. 8A es un gráfico que ilustra el análisis mediante FACS de los niveles de fucosa en ITL-LF1 en varios medios. Células ITL-LF1 reproducidas en ProCHO5 y C6614 y analizadas mediante FACS después del etiquetado de las células con AAL biotinilada y estreptavidina fluorescente. CHO-S tratadas con MTX, no etiquetadas (\square), CHO-S en ProCHO5 (\circ), ITL-LF1 en ProCHO5 (Δ), ITL-LF1 en C6614 (\diamond).
- La Fig. 8B es un gráfico que ilustra el análisis mediante FACS de los niveles de fucosa en células de CHO-S tratadas con MTX aisladas mediante microesferas magnéticas y FACS. Las células de CHO-S incubadas con MTX se etiquetaron con AOL biotinilada y se mezclaron con microesferas magnéticas revestidas con estreptavidina. Las células se separaron con un imán, y las células que no se unieron al imán se reprodujeron posteriormente. Esta etapa se repitió dos veces. Después, las células se etiquetaron con AOL biotinilada y estreptavidina fluorescente, y las células de baja fluorescencia se clasificaron mediante FACS y se reprodujeron posteriormente. El análisis mediante FACS se llevó a cabo etiquetando las células con AOL biotinilada y estreptavidina fluorescente. Células de CHO-S, no etiquetadas (\square), células de CHO-S (\circ), células de CHO-S tratadas con MTX después de una única separación en microesferas (Δ), células de CHO-S tratadas con MTX después de dos ciclos de separación en microesferas (\diamond), células de CHO-S tratadas con MTX después de dos ciclos de la separación en microesferas y un único ciclo de selección FACS (\blacktriangledown).
- La Fig. 9 es un gráfico que ilustra el análisis mediante FACS de los niveles de ácido siálico en células de ITL-LF1 en varios medios. Las células de ITL-LF1 se analizaron para conocer los niveles de ácido siálico en los medios ProCHO5 y C6614. Las células se etiquetaron con lectina (MAA) específica de lectina de unión a ácido siálico conjugado con FITC y analizadas mediante FACS. Células de CHO-S, no etiquetadas (\square), células de CHO-S etiquetadas con MAA-FITC (\circ), células de ITL-LF1 en ProCHO5 etiquetadas con MAA-FITC (Δ), células de ITL-LF1 en C6614 etiquetadas con MAA-FITC (\diamond).
- La Fig. 10 es un gráfico que ilustra la evaluación de la estabilidad de las células de ITL-LF1 de fucosa. Las células de ITL-LF1 se analizaron mediante FACS el nivel de fucosa en la superficie de la célula en diversos puntos temporales después de la finalización del proceso de separación, para evaluar la estabilidad de la expresión de poca fucosa. Para el análisis, las células se etiquetaron con AAL biotinilada y estreptavidina fluorescente.
- La Fig. 11 es un gráfico que ilustra la evaluación de la tasa de crecimiento de las células de ITL-LF1. Las células de ITL-LF1 se reprodujeron a lo largo de 363 duplicaciones de la población (PDL) y la tasa de crecimiento se determinó después de cada paso.
- La Fig. 12 es un gráfico que ilustra el análisis mediante FACS de las células de ITL-LF2 aisladas mediante clasificación por FACS consecutivas. Las células de CHO-S incubadas con MTX se etiquetaron con AAL biotinilada y estreptavidina fluorescente. Las células de baja fluorescencia se clasificaron mediante FACS y se reprodujeron posteriormente. Este procedimiento se repitió cuatro veces. El análisis mediante FACS se llevó a cabo etiquetando las células con AAL biotinilada y estreptavidina fluorescente. Células de CHO-S tratadas con MTX, no etiquetadas (\square), células de CHO-S tratadas con MTX (\circ), células de CHO-S tratadas con MTX después de la primera clasificación (Δ), células de CHO-S tratadas con MTX después de la segunda clasificación (\diamond), células de CHO-S

tratadas con MTX después de la tercera clasificación (▼), células de CHO-S tratadas con MTX después de la cuarta clasificación (■).

5 La Fig. 13 es un gráfico que ilustra el análisis mediante FACS de los niveles de fucosa en las células de ITL-LF2 en varios medios. Células ITL-LF2 reproducidas en ProCHO5 y C6614, y analizadas mediante FACS después de etiquetar las células con AAL biotinilada y estreptavidina fluorescente. CHO-S, no etiquetada (□), CHO-S en ProCHO5 (○), ITL-LF2 en ProCHO5 (Δ), ITL-LF2 en C6614 (◇).

10 La Fig. 14 es un gráfico que ilustra el análisis mediante FACS de los niveles de ácido siálico en las células de ITL-LF2. Las células de ITL-LF se analizaron para conocer los niveles del ácido siálico en medio ProCHO5. Las células se etiquetaron con lectina (MAA) de unión a ácido siálico conjugada con FITC y se analizaron mediante FACS. Células de CHO-S, no etiquetadas (□), células de CHO-S etiquetadas con MAA-FITC (○), células de ITL-LF2 en ProCHO5 etiquetadas con MAA-FITC (Δ).

15 La Fig. 15 es un gráfico que ilustra el análisis mediante FACS de las células de ITL-LF2 para analizar el nivel de fucosa en la superficie celular en diferentes puntos temporales después de la finalización del proceso de separación, con el fin de evaluar la estabilidad de la expresión de poca fucosa. Para el análisis, las células se etiquetaron con AAL biotinilada y estreptavidina fluorescente.

La Fig. 16 es un gráfico que ilustra la tasa de crecimiento de las células de ITL-LF2. Las células de ITL-LF2 se reprodujeron a lo largo de 370 PDL y la tasa de crecimiento se determinó después de cada paso.

20 La Fig. 17 es un gráfico que ilustra la evaluación de la concentración máxima de células de las células ILA-LF2 en ProCHO5. Las células se sembraron a $0,2 \times 10^6$ en un proceso por lotes y el número de células se determinó cada dos días. Células de CHO-S (○) y células de ITL-LF2 (Δ).

La Fig. 18 es un gráfico que ilustra el efecto de fucosa exógena sobre el nivel de fucosilación de las células ITL-LF2. Las células de ITL-LF2 se sembraron en medio ProCHO5 a una concentración de $0,2 \times 10^6$ células/ml con diferentes concentraciones de L-fucosa y se incubaron a 37 °C en incubadora con agitador a 320 rpm con CO₂.

25 La Fig. 19A es un gráfico que ilustra la viabilidad de ITL-LF2 y CHO-S en un proceso por lotes. Las células se sembraron a una concentración de $0,2 \times 10^6$ células/ml en ProCHO5 con suplementos en un proceso por lotes y se analizó la viabilidad de las células a lo largo del proceso. Células de CHO-S (○) y células de ITL-LF2 (Δ).

30 La Fig. 19B es un gráfico que ilustra la concentración de células viables de ITL-LF2 y de CHO-S en un proceso por lotes. Las células se sembraron a una concentración de $0,2 \times 10^6$ células/ml en ProCHO5 con suplementos en un proceso por lotes y el número de células se analizó a lo largo del proceso. Células de CHO-S (○) y células de ITL-LF2 (Δ).

35 La Fig. 19C es un gráfico que ilustra la concentración integral de células viables (IVCC) de ITL-LF2 y CHO-S en un proceso por lotes. Las células se sembraron a una concentración de $0,2 \times 10^6$ células/ml en ProCHO5 con suplementos en un proceso por lotes. La concentración de células viables se midió a lo largo del proceso. La IVCC se calculó basándose en la medida de la concentración de células. Células de CHO-S (○) y células de ITL-LF2 (Δ). Debe señalarse que tanto las líneas CHO-S como ITL-LF2 son congruentes, pero las células de CHO-S alcanzan sólo hasta el día 9 mientras que las células de ITL-LF2 alcanzan el día 12.

La Fig. 19D es un gráfico que ilustra la concentración de lactato de ITL-LF2 y CHO-S en un proceso por lotes.

La Fig. 20 es un diagrama que ilustra las vías de fucosilación de las proteínas y las enzimas potenciales para el análisis del ARNm (marcada en cuadrados).

40 La Fig. 21 es una fotografía que ilustra el análisis mediante RT-PCR de los genes de las vías de fucosilación. El ARN total se aisló de las células de CHO-S (C) y de ITL-LF2 (LF) y se sometió a la RT-PCR utilizando polidT seguido por cebadores específicos del gen. Los productos resultantes se pasaron sobre gel de agarosa y se detectaron bajo la luz UV mediante tinción de SyberSafe®. Tamaños esperados: Fut8-1,7 kb; GMD-1,1 kb; FX-1,2 kb; PPFV-1,7 kb; M-marcador de tamaño del ADN.

45 Las Fig. 22A-B son comparaciones de secuencias proteicas entre GMD de longitud completa y variantes de empalme. Los ADNc preparados por RT PCR a partir de ARN extraído de las células de CHO-S e ITL-LF2 se pasaron sobre geles, se aislaron y se secuenciaron. La secuencia del ADN se tradujo entonces a proteína por el software CloneManager®. La secuencia de la proteína de la variante 1 de empalme (SV1; Figura 22A; SEQ ID NO: 23) y de la variante de empalme 2 (SV2; Figura 22B, SEQ ID NO: 24) se compararon con el gen GMD de longitud completa (SEQ ID NO: 25). Las líneas discontinuas indican áreas de eliminación. El texto indica qué exones se eliminan en cada variante de empalme.

Las Fig. 23A-B ilustran el análisis enzimático de restricción de las dos variantes de empalme de GMD. Figura 23A- Ubicación de los sitios enzimáticos de restricción únicos dentro de las variantes de empalme de GMD; Figura 23B- Gel de agarosa que muestra las bandas después de la restricción. Los tamaños y su explicación se detallan en la

Tabla 7 de la siguiente sección de Ejemplos.

La Fig. 24 es un gráfico que ilustra el análisis de los niveles de expresión génica de la vía de fucosilación en células de ITL-LF2 frente a células de CHO-S mediante la Q-PCR. El ADNc se preparó a partir de ARN de ITL-LF2 y de CHO-S (control) y se sometió al análisis mediante Q-PCR utilizando cebadores específicos del gen y sondas que estén situadas en los exones 5-6 (que están presentes en el ARNm de GMD de longitud completa y ambas variantes de empalme). Los resultados de cada gen se obtuvieron a partir de cuatro extracciones de ARN separadas, a partir de células en placas en cuatro fechas diferentes. De cada fecha de extracción, los ADNc se prepararon y utilizados para la detección de todos los genes mediante Q-PCR. Todas las muestras se pasaron por triplicado y se normalizaron frente a un control endógeno de Beta-Actina. Los números encima de las barras indican los valores de P de cada gen según se calcula utilizando el análisis estadístico de la prueba T emparejada. La significancia se indica mediante valores $P < 0,05$.

RQ-Veces de cambio de la expresión del control.

La Fig. 25 es una vista esquemática del vector MB-129 (pCMV-P-GMD). El ADNc de la GMD de longitud completa a partir de CHO-S wt se clonó en el vector pCMV-P. pCMVpr - promotor CMV humano. IVS - intrón A del gen IE de hCMV IE. PAC - gen de resistencia a la puromicina.

La Fig. 26 es un gráfico que ilustra que ITL-LF2 recupera fucosilación tras la transfección con ADNc de GMD de tipo salvaje. Las células de ITL-LF2 eran transfectadas con el vector que contenía ADNc de GMD (pCMV-P-GMD) en el medio C6614 en presencia de fucosa. Las células transfectadas fueron transferidas al medio ProCHO5 en ausencia de fucosa. Las células fueron analizadas mediante FACS después de etiquetar con AAL biotinilada y estreptavidina fluorescente. CHO-S, no etiquetado (\square), CHO-S (\circ), ITL-LF2 (Δ), células de ITL-LF2 transfectadas con GMD (\diamond).

La Fig. 27 es un diagrama que ilustra el mAb anti-EGFR que contiene el tándem plásmido-PGL3 anti-EGFR mAb-EMCV-PAC1-DHFR. El plásmido lineal que contenía la LC y HC del mAb anti-EGFR fue utilizado para la transfección de CHO-S y de ITL-LF2. mCMV - promotor del citomegalovirus de murino, virus de la encefalomiocarditis EMCV, IRES - sitio de entrada del ribosoma interno, PAC - puromicina N-acetiltransferasa, DHFR - dihidrofolato reductasa, HC - cadena pesada, LC - cadena ligera, SV40 - virus 40 de simio, pA - poliadenilación.

La Fig. 28 es un diagrama que ilustra la expresión estable de mAb anti-EGFR en las agrupaciones de ITL-LF2 y CHO-S. ITL-LF2 y CHO-S fueron transfectadas con el vector (tándem PGL3 anti-EGFR mAb EMCV-PAC1-DHFR) que contenía mAb anti-EGFR. Después de la recuperación, la productividad se evaluó en las agrupaciones.

La Fig. 29 es un gráfico que ilustra el análisis mediante FACS de los niveles de fucosa en las células de ITL-LF2 transfectadas con mAb anti-EGFR. Análisis de los niveles de fucosa en la membrana de las células transfectadas con mAb anti-EGFR reproducidas en medio C6614 antes y después de la eliminación de fucosa. CHO-S, no etiquetada (\square), CHO-S en ProCHO5 (\circ), ITL-LF2 en C6614 (\diamond), ITL-LF2 transfectadas con mAb anti-EGFR en C6614 en presencia de fucosa (\blacktriangledown), ITL-LF2 transfectadas con mAb anti-EGFR en C6614 en ausencia de fucosa (Δ).

La Fig. 30 es un gráfico que ilustra el análisis mediante FACS de los niveles de ácido siálico en las células de ITL-LF2 transfectadas con mAb anti-EGFR. Análisis de los niveles de ácido siálico en la membrana de las células transfectadas con mAb anti-EGFR reproducidas en medio ProCHO5. Las células se etiquetaron con lectina (MAA) de unión a ácido siálico conjugada con FITC y se analizaron mediante FACS. CHO-S, no etiquetadas (\square), CHO-S (\circ), ITL-LF2 (\diamond), CHO-S transfectadas con mAb anti-EGFR (\blacktriangledown), ITL-LF2 transfectadas con mAb anti-EGFR (Δ).

Las Fig. 31A-B son ilustraciones de vectores construidos para transfección transitoria en células ITL-LF2. Los vectores MB-127 y MB-128 fueron construidos en el esqueleto del vector pTT5. Anti-EGFR mAb - LC-cadena ligera de mAb EGFR; anti-EGFR mAbANTI EGFR MAB-HC - cadena pesada de mAb EGFR.

La Fig. 32 es un gráfico de barras que ilustra la expresión transitoria de mAb anti-EGFR en células de ITL-LF2 y de CHO-S. Las células de ITL-LF2 y de CHO-S eran transfectadas de forma transitoria con mAb anti-EGFR que contenía el vector PTT5 en el medio ProCHO5. Las condiciones de transfección fueron específicas del tipo de células. Las células de ITL-LF2 fueron complementadas con VPA y transferidas a 31 °C y las CHO-S fueron complementadas con VPA y refuerzo con células 24 horas después de transfección.

La Fig. 33 es una ilustración que representa el análisis mediante FACS de los niveles de residuo de azúcar en los anticuerpos. Las muestras de anticuerpos de la cosecha en crudo o purificadas fueron mezcladas con las microesferas magnéticas cubiertas con la proteína G seguidas de unión a lectina etiquetada de forma fluorescente. Los niveles de fucosa se determinaron mediante FACS según la fluorescencia.

La Fig. 34 es un gráfico que ilustra el análisis mediante FACS de los niveles de fucosa en mAb anti-EGFR expresados de forma transitoria en ITL-LF2 y CHO-S. Las muestras en crudo de la cosecha fueron mezcladas con las microesferas magnéticas cubiertas con proteína G después de unir a la mezcla de AAL biotinilada y estreptavidina fluorescente. Los niveles de fucosa se determinaron mediante FACS según los niveles de fluorescencia. Microesferas magnéticas (\square), anti-EGFR a partir de células CHO-S transfectadas (\circ), anti-EGFR de

células ITL-LF2 transfectadas (Δ).

- 5 La Fig. 35 es un gráfico que ilustra el análisis mediante FACS de los niveles de fucosa en cosecha en crudo de mAb anti-EGFR expresado de forma estable en cultivos de ITL-LF2 y CHO-S. Las muestras en crudo de la cosecha fueron mezcladas con microesferas magnéticas con proteína G mediante unión a la mezcla de AAL biotinilada y estreptavidina fluorescente. Los niveles de fucosa se determinaron mediante FACS según niveles de la fluorescencia. Microesferas magnéticas (\square), mAb anti-EGFR de células CHO-S transfectadas (\circ), mAb anti-EGFR de células ITL-LF2 transfectadas (Δ).
- 10 La Fig. 36 es un gráfico que ilustra el análisis mediante FACS de los niveles de ácido siálico en la cosecha en crudo de mAb anti-EGFR expresado de forma estable en cultivos de ITL-LF2 y CHO-S. Las muestras en crudo de la cosecha fueron mezcladas con las microesferas magnéticas con proteína G seguido de unión a MAA conjugada con FITC. Los niveles de ácido siálico se determinaron mediante FACS según los niveles de fluorescencia. Microesferas magnéticas (\square), cosecha en crudo de las células de CHO-S transfectadas (\circ), cosecha en crudo de las células de ITL-LF2 transfectadas.
- 15 La Fig. 37 es un gráfico que ilustra el análisis mediante FACS de los niveles de fucosa en mAb anti-EGFR expresados de forma estable en ITL-LF2 y CHO-S. Las muestras purificadas del anticuerpo fueron mezcladas con las microesferas magnéticas con proteína G seguido de unión a mezcla de AAL biotinilada y estreptavidina fluorescente. Los niveles de fucosa se determinaron mediante FACS según los niveles de fluorescencia. Microesferas magnéticas (\square), mAb anti-EGFR de células de CHO-S transfectadas (\circ), mAb anti-EGFR de células de ITL-LF2 transfectadas (Δ).
- 20 La Fig. 38 es un gráfico que ilustra el análisis mediante FACS de los niveles de ácido siálico en mAb anti-EGFR expresados de forma estable en ITL-LF2 y CHO-S. Las muestras purificadas del anticuerpo fueron mezcladas con las microesferas magnéticas con proteína G después de la unión a MAA conjugada con FITC. Los niveles de ácido siálico se determinaron mediante FACS según los niveles de fluorescencia. Microesferas magnéticas (\square), anti-EGFR de las células de CHO-S transfectadas (\circ), anti-EGFR de las células de ITL-LF2 transfectadas (Δ).
- 25 La Fig. 39 es una lectura del análisis por Octet de los niveles de fucosa en el mAb anti-EGFR intacto purificado. Los productos purificados del mAb anti-EGFR de CHO-S y de ITL-LF2-225 $\mu\text{g/ml}$ por D.O. 280 se unieron a AAL Biotinilada (2 $\mu\text{g/ml}$) que se unió previamente a biosensores recubiertos previamente con estreptavidina. El gráfico representa la etapa de asociación del análisis cinético por el sistema Octet QK. Cada curva representa una muestra específica marcada por una flecha.
- 30 La Fig. 40 es una lectura del análisis por Octet de los niveles de ácido siálico en el mAb anti-EGFR intacto purificado. Los productos purificados de mAb anti-EGFR de las células de CHO-S e ITL-LF2-115 $\mu\text{g/ml}$ por D.O. 280 se unieron a MAA Biotinilada (10 $\mu\text{g/ml}$) que se unió previamente a biosensores revestidos previamente con estreptavidina. El gráfico representa la etapa de asociación del análisis cinético por el sistema Octet QK. Cada curva representa una muestra específica marcada por una flecha.
- 35 La Fig. 41 es un gráfico del análisis de los niveles de fucosa en el monómero Fc anti-EGFR purificado por Octet. La fracción Fc del mAb anti-EGFR de las células de CHO-S y de las células de ITL-LF2 40 $\mu\text{g/ml}$ por D.O. 280 se unieron a AAL Biotinilada (1 $\mu\text{g/ml}$) que se unió previamente a los biosensores revestidos con estreptavidina. El gráfico representa la etapa de asociación del análisis cinético por el sistema Octet QK. Cada curva representa una muestra específica marcada por una flecha.
- 40 La Fig. 42 es un gráfico del análisis de los niveles de ácido siálico en el monómero Fc anti-EGFR purificado por Octet. La fracción Fc de mAb anti-EGFR de las células de CHO-S y de las células ITL-LF2-250 $\mu\text{g/ml}$ por D.O. 280 se unen a MAA biotinilada (10 $\mu\text{g/ml}$) que se une previamente a biosensores recubiertos previamente con estreptavidina. El gráfico representa la etapa de asociación del análisis cinético por el sistema Octet QK. Cada curva representa una muestra específica marcada por una flecha.
- 45 La Figura 43 es un gráfico que muestra los resultados del análisis del perfil de carga del producto purificado mAb anti-EGFR por iCE280. Productos purificados de mAb anti-EGFR de las células de CHO-S (\blacksquare) y de las células de ITL-LF2 (\blacktriangle) - 0,4 mg/ml por D.O. 280 fueron analizados por iCE280. Los puntos representan % del área máxima de las isoformas en el perfil iCE280 (obsérvese que las líneas en la figura no representan funciones continuas y se agregaron sólo para facilitar el seguimiento de las isoformas del mismo producto).
- 50 La Fig. 44 es una tabla que proporciona perfiles de glicano para fracciones Fc anti-EGFR.
- La Fig. 45 es un gráfico que ilustra el efecto que la fucosa exógena tenía sobre el nivel de fucosilación de las células ITL-LF2 transfectadas con mAb EGFR. Las células de ITL-LF2 transfectadas con mAb anti-EGFR se sembraron en medio ProCHO5 en una concentración de $0,2 \times 10^6$ células/ml con diferentes concentraciones de L-fucosa y se incubaron a 37 °C en incubadora con agitador a 320 rpm con CO₂.
- 55 La Fig. 46 es un gráfico que ilustra el efecto que la fucosa exógena tenía en el nivel de fucosilación de mAb EGFR.

La Fig. 47 es una curva de calibración del nivel de fucosilación en mAb anti-EGFR según la fucosa externa añadida.

5 Las Fig. 48A-B son curvas de calibración de los niveles de fucosa en monómero Fc anti-EGFR purificado por Octet. Las muestras se prepararon mezclando producto de la fracción de monómero Fc de mAb anti-EGFR de las células de CHO-S y de las células de ITL-LF2 40 µg/ml por D.O. 280. Las muestras se unieron a AAL Biotinilada (1 µg/ml) que se unió previamente a biosensores recubiertos con estreptavidina. El gráfico representa la etapa de asociación del análisis cinético por el sistema Octet QK. Cada curva corresponde a un % específico de fucosa en la muestra (A). Representación lineal de la curva (B).

10 La Fig. 49 es un análisis de fracciones de monómero Fc anti-EGFR parcialmente fucosilado por Octet. La fracción de monómero Fc del mAb anti-EGFR de células de CHO-S y de células de ITL-LF2 40 µg/ml por D.O. 280 se unieron a AAL biotinilada (1 µg/ml) que se unió previamente a biosensores recubiertos con estreptavidina. El gráfico representa la etapa de asociación del análisis cinético por el sistema Octet QK. Cada curva corresponde a una muestra específica.

Descripción de las realizaciones específicas de la invención

15 La presente divulgación en algunas de sus realizaciones, se refiere a células y líneas de células de CHO con cero fucosa, procedimientos de generar las mismas y usos de las mismas.

20 Para reducir los niveles de fucosilación de proteínas recombinantes, p. ej., anticuerpos para obtener ADCC mejorada, los autores de la presente invención desarrollaron líneas de células de CHO-S que fueron modificadas para expresar patrones variantes de glicosilación en su superficie celular. Esto se efectuó por incubación de células en presencia de un MTX seguido por una eficiente selección de células con los niveles fucosa más bajos en la membrana de las células.

La selección se realizó por aislamiento en microesferas magnéticas y clasificación mediante FACS (Figuras 7A-B) o solo por selección mediante FACS (Figura 12) utilizando lectinas específicas de fucosa que tienen una alta afinidad hacia el residuo α Fuc1-6GlcNA presente en el sitio de glicosilación de Fc de un anticuerpo (p. ej., lectina Aleuria aurantia (AAL) o lectina *Aspergillus oryzae* (AOL) específica de 1-fucosa).

25 Aunque la selección de las células que expresan cero fucosa se realizó según los niveles de fucosa en la membrana de las células, los mismos niveles de fucosa se encontraron en el anticuerpo recombinante (mAb anti-EGFR) expresado en estas células, según lo analizado por diversos procedimientos (Figuras 33-41).

30 Al incubar las células en medio que comprende fucosa, los autores de la presente invención mostraron que el nivel de fucosilación en la proteína recombinante expresado en ella es regulable. Se demostró que este resultado era reproducible (Figura 49).

Además, se encontró que el fenotipo de las células de la presente invención era estable en 370 PDL ensayadas (Figura 15). Así, dichas células se prestan como células de producción para proteínas recombinantes, donde se requieren más de 100 PDL.

35 La tasa de crecimiento de las células que expresan cero fucosa (células designadas ITL-LF2) se determinó durante el ensayo de estabilidad de la fucosa y se encontró que daba como resultado un tiempo de duplicación de la población (PDT) de aproximadamente 15-20 horas (Figura 11), similar a las CHO-S, de las que se derivan las ITL-LF2.

40 El análisis de las proteínas clave que se sabe están involucradas en la fucosilación reveló que el tamaño del ARNm de la GDP-manosa-4,6-deshidratasa (GMD) en las células seleccionadas de la presente invención era más corto que en sus contrapartes de tipo salvaje (Figura 20) y la secuencia reveló dos variantes de empalme. Las moléculas del ARNm extraídas de las células carecían de los exones tercero y cuarto, o del octavo y noveno (Figuras 21A-B y Figuras 22A-B).

45 Los autores de la presente invención proponen que el procedimiento divulgado en el presente documento para generar e identificar tipos de células de atributos particulares puede ser aprovechado para seleccionar tipos de células útiles adicionales.

Así, según un aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de selección de células de CHO útiles como células anfitrionas para expresar proteínas recombinantes, comprendiendo el procedimiento:

- (a) introducir mutaciones genéticas en una población de células de CHO poniendo en contacto las células con MTX,
- 50 (b) poner en contacto la población de células de CHO que comprende células mutadas con un agente de unión a fucosa durante un período de tiempo que permita la unión del agente de unión a fucosa a un resto de fucosa en una membrana celular de la población de células, en donde el período de tiempo no permite la destrucción de las células; y

- (c) eliminar de la población de células, una subpoblación de células que unen el agente de unión a fucosa, seleccionando de ese modo células útiles como células anfitrionas para expresar proteínas recombinantes, teniendo las células seleccionadas un contenido cero de fucosa.

5 Una célula o línea de células de CHO derivadas de tejido de ovario de hámster chino adecuada según la presente invención es cualquier célula que sea una línea celular establecida a partir de un tejido ovárico de hámster chino (*Cricetulus griseus*). Los ejemplos incluyen células de CHO descritas en documentos tales como *Journal of Experimental Medicine*, 108, 945 (1958); *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.*, 60, 1275 (1968); *Genetics*, 55, 513 (1968); *Chromosoma*, 41, 129 (1973); *Methods in Cell Science*, 18, 115 (1996); *Radiation Research*, 148, 260 (1997); *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.*, 77, 4216 (1980); *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 60, 1275 (1968); *Cell*, 6, 121 (1975); *Molecular Cell Genetics*, Apéndices I y II (pág. 883-900); y similares. Además, CHO-K1 (ATCC CCL-61), DUXB11 (ATCC CCL-9096) y Pro-5 (ATCC CCL-1781) registradas en ATCC (The American Type Culture Collection), así como las líneas de CHO-S (Life Technologies, Cat. n.º 11619) o subcelulares obtenidas mediante la adaptación de las líneas de células utilizando varios medios pueden emplearse también en la presente invención.

En algunas realizaciones, la célula anfitriona es un clon CHO-1E5, CHO-S, CHO/DG44, CHO-3F o CHO-2,6.

15 El mutágeno MTX provoca una mutación en un gen o polipéptido implicado en la vía de la síntesis de la fucosa.

Como se mencionó, el procedimiento se efectúa poniendo en contacto una población mutada de células de CHO con un agente de unión a fucosa para permitir su unión a las membranas celulares de las células mutadas.

20 Como se usa en el presente documento, la frase "agente de unión a fucosa" se refiere a cualquier agente (p, ej., lectina) que sea capaz de unirse a restos de fucosa en la superficie de la célula con una Kd de al menos 1×10^{-5} . Según una realización, el agente de unión a fucosa se une a los residuos de α Fuc1-6GlcNA con una Kd de al menos 1×10^{-3} (Matsumura, Higashida y col. 2009), p. ej., una Kd de al menos 1×10^{-4} , una Kd de al menos 1×10^{-5} , una Kd de al menos 1×10^{-6} o una Kd de al menos 1×10^{-7} .

Según una realización, el agente de unión a fucosa es un polipéptido, p. ej., una lectina.

25 Las lectinas de ejemplo contempladas por la presente invención incluyen pero no se limitan a lectina Aleuria aurantia (AAL) o lectina *Aspergillus oryzae* (AOL) específica de 1-fucosa y *Ulex europaeus* agglutinin (UEA) y las divulgadas en Oda, Senaha y col., 2003; Tateno, Nakamura-Tsuruta y col., 2009.

Como se mencionó, el contacto se efectúa en condiciones que permiten la unión de los agentes de unión a fucosa a la fucosa en las membranas celulares. Según una realización, la unión se efectúa en condiciones que no permiten que la lectina cause la muerte de las células (es decir, la eliminación de la célula) a la que se une.

30 Según una realización específica, la unión se efectúa en condiciones que no permiten que la lectina cause la muerte de más del 50 % de las células a las que se une.

Según una realización específica, la unión se efectúa en condiciones que no permiten que la lectina cause la muerte de más del 40 % de las células a las que se une.

35 Según una realización específica, la unión se efectúa en condiciones que no permiten que la lectina cause la muerte de más del 30 % de las células a las que se une.

Según una realización específica, la unión se efectúa en condiciones que no permiten que la lectina cause la muerte de más del 20 % de las células a las que se une.

Según una realización, la unión se efectúa durante no más de 3 horas, preferentemente no más de 2 horas e incluso más preferentemente no mayor de una hora.

40 Según una realización, el agente de unión a fucosa de este aspecto de la presente invención está unido a un resto funcional que permite la eliminación (directa o indirectamente) de la población celular que se une al agente.

Por ello, el agente de unión a fucosa se puede unir a un resto detectable que incluye pero no se limita a un resto fluorescente o a un resto magnético.

45 Los restos fluorescentes de ejemplo pueden incluir la fluoresceína o sus derivados, tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC), Verde Oregón, Verde Tokio, SNAFL, carboxinaftofluoresceína (CFSE), éster succinimidil de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA-SE), DyLight 488, Alexa Fluor 488, proteína fluorescente verde (GFP), ficoeritrina (PE), proteína Peridinin Chlorophyll (PerCP), PE-Alexa Fluor 700, PE-Cy5 (TRI-COLOR), PE-Cy5.5, PE-Alexa Fluor 750, PE-Cy7, alofocianina (APC), APC-Cy7 y sus derivados.

Alternativamente, el agente de unión a fucosa puede unirse a un resto de afinidad.

50 Como se usa en el presente documento, el término "fracción de afinidad" se refiere a una molécula capaz de interacción selectiva con un resto de la unión cognado, tal como, por ejemplo, biotina/avidina, ligando/receptor, y

similares.

Los protocolos detallados para unir agentes de unión a fucosa a restos de afinidad o detectables se pueden encontrar en la siguiente sección Ejemplos en el presente documento.

5 Se comprenderá que si el agente de unión a fucosa se fija a un resto fluorescente (ya sea directamente, o indirectamente a través de una molécula de unión a cognado), la población celular mutada se puede eliminar de las células no deseadas utilizando procedimientos de selección de células conocidas como mediante el uso de un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS).

10 Una multitud de citómetros de flujo están disponibles comercialmente, incluyendo, p. ej., Becton Dickinson FACScan y FACScaliber (BD Biosciences, Mountain View, CA). Los anticuerpos que se pueden utilizar para el análisis mediante FACS se enseñan en Schlossman S, Boumell L, y col., [Leucocyte Typing V. Nueva York: Oxford University Press; 1995] y están comercialmente ampliamente disponibles.

Si el agente de unión a fucosa está unido a un resto magnético (ya sea directa o indirectamente a través de una molécula de unión a cognado), la población celular mutada puede ser eliminada de células no deseadas mediante la separación magnética de las células activadas.

15 Si el agente de unión a fucosa está unido a un resto de afinidad, la población celular mutada puede ser eliminada de las células no deseadas mediante purificación por afinidad con la molécula de unión a cognado. Así, por ejemplo, si el agente de unión a fucosa está unido a biotina, la población celular mutada puede ser eliminada de células no deseadas por purificación con microesferas o columna de estreptavidina. Si, por ejemplo, el agente de unión a fucosa se fija a un anticuerpo o a una Fc de un anticuerpo, la población celular mutada puede ser eliminada de las
20 células no deseadas por purificación con microesferas o columna de proteína A.

Como se mencionó anteriormente en el presente documento, la molécula de unión a cognado se puede unir a un resto detectable y la eliminación puede efectuarse, seguido de la adición de la molécula de unión a cognado, a través de FACS o MACS.

25 Se comprenderá que la eliminación de las poblaciones de células no deseadas puede efectuarse en un número de rondas (p. ej., dos, tres o más rondas) de eliminación secuencial. Además, las etapas de eliminación pueden comprender un número de rondas de eliminación secuencial utilizando el mismo procedimiento (p. ej., únicamente separación basada en FACS) o pueden combinar un número de diferentes procedimientos (p. ej., la separación de base magnética, seguida por la separación basada en fluorescencia).

30 Según una realización, el número de rondas de eliminación y el procedimiento específico se seleccionan de manera que las células que unen el agente de unión a fucosa son sustancialmente retiradas.

El término "sustancialmente retiradas" pretende querer decir la retirada de al menos 50 % o más del tipo de células en particular, tal que al menos aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, o aproximadamente 97 %, incluyendo al menos el 99 %, el 99,5 %, el 99,9 % o más del tipo particular de células.

35 Según una realización particular, las células que unen el agente de unión a fucosa son sustancialmente retiradas y solamente se conservan las células que tienen cero fucosa en la membrana celular.

Si la fucosa externa se agrega a las células después de la retirada anterior, pueden obtenerse las diversas células que tienen una cierta cantidad de contenido de fucosa, dependiendo de la cantidad de fucosa agregada.

40 Así, según otra realización, se obtuvieron células de CHO que tenían menos del 50 % de fucosa en su membrana celular en comparación con las células de tipo salvaje (es decir, anterior al tratamiento con metotrexato).

Según otra realización, se obtuvieron células de CHO que tenían menos de 40 % de fucosa en su membrana celular en comparación con las células de tipo salvaje (es decir, antes del tratamiento con metotrexato).

Según otra realización, se obtuvieron células de CHO que tenían menos del 30 % de fucosa en su membrana celular en comparación con las células de tipo salvaje (es decir, antes del tratamiento con metotrexato).

45 Según otra realización, se obtuvieron células de CHO que tenían menos del 20 % fucosa en su membrana celular en comparación con las células de tipo salvaje (es decir, antes del tratamiento con metotrexato).

Según otra realización, se obtuvieron células de CHO que tenían menos del 10 % de fucosa en su membrana celular en comparación con las células de tipo salvaje (es decir, antes del tratamiento con metotrexato).

50 Después del aislamiento de las poblaciones celulares de la presente invención, se pueden desarrollar en cultivos, y en cualquier aparato que puede utilizarse para el cultivo de cultivos, incluidos fermentadores o biorreactores. Pueden cultivarse como monocapas o unirse a una superficie. Como alternativa, las poblaciones de células aisladas pueden ser cultivadas en suspensión.

Las células pueden cultivarse en un medio de cultivo exento de suero. Los medios pueden ser un medio comercialmente disponible, tal como, pero no limitado a, ProCHO5 (Lonza, Catálogo n.º BE12-766Q), medio de DHFR de CHO en polvo (SAFC Biosciences, Catálogo n.º C6614) u Opti-CHO (Invitrogen, Catálogo n.º 12681) complementado con glutamina, tal como L-glutamina 8 mM.

- 5 Según una realización, el medio está desprovisto de xenocontaminantes, es decir, exento de componentes derivados de animales.

Según otra realización, las células se cultivan en un cultivo celular en condiciones (p. ej., medio y espacio) que permitan la proliferación indefinida, es decir, una línea celular.

- 10 Las células de CHO aisladas pueden mantener su modelo variante de glicosilación (es decir, baja expresión de fucosa) para un gran número de pases en cultivo, es decir, tienen una alta estabilidad. Se encontró según una realización que la célula anfitriona de CHO modificada puede mantener su modelo variante de glicosilación incluso después de 370 pases.

- 15 Los autores de la presente invención han encontrado que las células de CHO seleccionadas según los procedimientos descritos en el presente documento tienen un fenotipo particular, p. ej., expresión de un GDP-manosa-4, 6-deshidratasa (GMD) mutada, que es responsable de la baja fucosilación de su membrana celular.

Las células, después de mutagénesis, pueden comprender al menos un alelo de GMD que tiene una pérdida de mutación de la función.

- 20 El término "alelo", como se usa en el presente documento, se refiere a una cualquiera o más formas alternativas de un locus génico, todos los cuales los alelos se refieren a un rasgo o característica. En una célula u organismo diploide, los dos alelos de un gen dado ocupan los loci correspondientes en un par de cromosomas homólogos.

- 25 Una "mutación de pérdida de función" es una mutación en la secuencia de un gen, que causa que la función del producto génico, habitualmente una proteína, se reduzca o desaparezca totalmente. Una mutación de pérdida de función puede, por ejemplo, ser causada por el truncamiento del producto génico debido a una mutación del marco de lectura o sin sentido. Un fenotipo asociado a un alelo con una mutación de pérdida de función es habitualmente recesivo pero puede también ser dominante.

- 30 Se comprenderá que la presente divulgación también contempla células en donde ambos alelos de GMD acarrean una mutación de pérdida de función. En tales casos, el GMD puede estar en una forma homocigótica o en una forma heterocigótica. Según esta realización, la homocigoticidad es una condición donde ambos alelos en el locus GMD se caracteriza por la misma secuencia de nucleótidos. La heterocigoticidad se refiere a diferentes condiciones del gen en el locus GMD.

Específicamente, los autores de la presente invención han encontrado que las células de CHO después de la mutagénesis y del procedimiento de selección de la presente invención pueden expresar dos formas variantes de GMD según lo establecido en las SEQ ID NO: 23 y 24, que corresponden a eliminaciones de los exones 3 y 4, y 8 y 9 del gen de GMD, respectivamente.

- 35 Así, según otro aspecto de la presente invención se ha proporcionado una célula de CHO aislada que está genéticamente modificada para expresar una GDP-manosa-4,6-deshidratasa (GMD) mutada que tiene una secuencia de aminoácidos según lo establecido en las SEQ ID NO: 23 y/o 24.

- 40 Se encontró que las células de este aspecto de la presente invención expresan una funcional fucosiltransferasa-8 (Fut8). La Fut8 funcional puede ser una Fut8 de tipo salvaje que tiene una secuencia polipeptídica según se establece en la SEQ ID NO: 29.

Además, las células de la presente invención expresan una funcional GDP-ceto-6-desoximanosa-3,5-epimerasa-4-reductasa (FX). El FX funcional puede ser un FX de tipo salvaje que tiene una secuencia de polipéptidos como se establece en la SEQ ID NO: 30.

- 45 Los autores de la presente invención han demostrado que las células de CHO que se han generado según los procedimientos descritos en el presente documento pueden ser utilizadas para producir glicoproteínas, p. ej., anticuerpos o proteínas de fusión Fc, que pueden ser cosechadas o recolectadas. Las glicoproteínas pueden ser secretadas, mostrar un modelo variante de fucosilación, y/o tener un uso terapéutico, según lo descrito posteriormente en el presente documento. Dichas glicoproteínas pueden ser, p. ej., anticuerpos, tal como un anticuerpo con un aumento de la actividad de ADCC en comparación con un anticuerpo correspondiente producido en una célula anfitriona parental no modificada, según lo descrito más adelante en el presente documento.

"Citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo" (ADCC), como se utiliza en el presente documento, se refiere a una reacción mediada por células en las que las células efectoras que expresan FcR (p. ej., células agresoras naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido a una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana. Las células primarias para la mediación de ADCC comprenden

células NK, monocitos, y macrófagos. Las células NK típicamente expresan Fc.gamma.RIII predominantemente, mientras que los monocitos expresan Fc.gamma.RI, Fc.gamma.RII y Fc.gamma.RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991).

5 "Células efectoras" son leucocitos que expresan una o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan al menos Fc.gamma.RIII y realizan la función efectora de la ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células agresoras naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; prefiriéndose las células PBMC y NK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa de la misma, p. ej., de sangre o PBMC como se describe en el presente documento, o pueden reproducirse in vitro utilizando procedimientos conocidos en la técnica.

10 En una realización, un anticuerpo producido a partir de una línea de células de CHO de la presente invención media la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) en presencia de células efectoras humanas más eficazmente que un anticuerpo correspondiente producido por células anfitrionas parentales, cuando los anticuerpos sujetos se aplican en cantidades comparables. Generalmente, la actividad de ADCC puede ser comprobada utilizando los ensayos divulgados en el presente documento, pero se contemplan otros ensayos o
15 procedimientos para determinar la actividad de la ADCC, p. ej., en un modelo animal, etc. El anticuerpo obtenido a partir de la línea celular de CHO de la presente invención es más eficaz en mediar la ADCC que el anticuerpo parental, p. ej., en sistemas de ensayo in vivo o in vitro como se describe además en la publicación de patente de EE.UU. n.º 2010/0081150.

20 Por consiguiente, las poblaciones de las células aisladas o las líneas de células de la presente divulgación previamente modificada para producir modelos variantes de fucosilación pueden ser modificadas además de manera que comprenda una secuencia heteróloga de polinucleótidos. Dichas secuencias pueden comprender una región codificante o no codificante de un gen o fragmento de gen, ARN mensajero (ARNm), ARN transferente, ARN ribosómico, ribozimas, etc. Las secuencias heterólogas pueden codificar un resto proteínico, que se refiere a
25 proteínas, polipéptidos, péptidos, secuencias de aminoácidos, que abarca polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. Las secuencias heterólogas de polinucleótidos se enlazan de forma típicamente operativa a los promotores (es decir, en vectores de expresión) para permitir la expresión del polipéptido recombinante.

Según una realización, la transfección de las células de CHO de la presente invención se efectúa en presencia de fucosa exógena. Las concentraciones contempladas de fucosa incluyen 1-20 µg/ml, p. ej., 10 µg/ml.

30 Como se ilustra en las Figuras 45 y 48, la cantidad de fucosilación del polipéptido recombinante puede ser controlada incubando las células transfectadas en fucosa. Las concentraciones contempladas de fucosa incluyen 1-10 µg/ml tal como 2,5-5 µg/ml, p. ej., 3,5 µg/ml.

35 Así, se proporciona una población de células de CHO que no son fucosiladas en su membrana celular y son capaces de expresar proteínas de diferentes grados de fucosilación, siendo la cantidad de fucosilación dependiente de la cantidad de fucosa en el medio de cultivo en el momento de la transfección y después de la misma. La cantidad de fucosilación del polipéptido recombinante puede variar de cero a 100 %.

Además de contener los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada, la construcción de expresión empleada también puede incluir secuencias modificadas genéticamente para mejorar la estabilidad, la producción, la purificación, el rendimiento o la toxicidad del péptido expresado. Por ejemplo, puede modificarse genéticamente la expresión de una proteína de fusión o de una proteína de fusión segmentable
40 que comprende la proteína de algunas realizaciones y una proteína heteróloga. Dicha proteína de fusión se puede diseñar de modo que la proteína de fusión pueda ser aislada fácilmente mediante cromatografía de afinidad; por ejemplo, por inmovilización en una columna específica de la proteína heteróloga. Cuando un sitio de escisión se modifica genéticamente entre la proteína y la proteína de fusión segmentable, la proteína de fusión segmentable se puede liberar de la columna cromatográfica por tratamiento con una enzima o agente apropiados que interrumpa el
45 sitio de escisión [p. ej., véase, Booth y col. (1988) *Immunol. Lett.* 19:65-70; y Gardella y col. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:15854-15859].

Según una realización, la purificación se lleva a cabo en ausencia de fucosa exógena.

50 La preparación de los ácidos nucleicos puede ser llevada a cabo por diversas técnicas recombinantes y procedimientos sintéticos de rutina. El ADN recombinante estándar y las técnicas de clonación molecular son bien conocidas en la técnica y son descritas por Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (1989) (Maniatis) y por T. J. Silhavy, M. L. Bannan, y L. W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N.Y. (1984) y por Ausubel, F. M. y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, pub. por Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience (1987). En resumen, los ácidos nucleicos sujetos pueden ser preparados fragmentos genómicos
55 de ADN, ADNc y ARN, todos los cuales pueden ser extraídos directamente de una célula o producidos de forma recombinante por diversos procesos de amplificación incluyendo pero sin limitarse a PCR y RT-PCR.

Según lo mencionado, las células de CHO de la presente invención se pueden utilizar como células anfitrionas para la producción de anticuerpos. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo inhibidor. El anticuerpo inhibidor puede inhibir una o más actividades biológicas del antígeno al que se une el anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo inhibidor puede regular a la baja la transducción de la señal del antígeno correspondiente inhibiendo la actividad del antígeno o inhibir la expresión del antígeno. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo neutralizante. Un anticuerpo neutralizante reduce o elimina alguna actividad biológica de un antígeno soluble o de un microorganismo vivo, tal como un agente infeccioso. Los anticuerpos neutralizantes pueden competir con el ligando o receptor natural por su antígeno. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo estimulador o de activación. Un anticuerpo estimulador o de activación puede ser un anticuerpo agonista que puede activar la transducción de la señal del antígeno correspondiente después de la unión del antígeno, activando o regulando al alza de ese modo la actividad del antígeno, o regulando al alza la expresión del antígeno al que se une el anticuerpo.

El término "anticuerpo", tal como se utiliza en esta invención, incluye moléculas intactas, así como fragmentos funcionales de las mismas, tal como las proteínas de fusión Fc, definidas de la siguiente manera: moléculas modificadas por ingeniería genética que contienen la región constante de la cadena pesada que se enlaza directamente, o a través de un enlazador polipéptido adecuado, a otro polipéptido o proteína.

Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) son moléculas quiméricas de inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor son sustituidos por los residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del entramado Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados pueden también comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o de entramado importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y típicamente de dos, dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las de las regiones FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de forma óptima al menos una porción de una región constante (Fc) de la inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana [Jones y col., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)].

En una realización, las cadenas ligera y pesada pueden ser transformadas en cultivos independientes de células anfitrionas modificadas, bien de la misma o de diferentes especies. En una realización alternativa, los plásmidos independientes para cadena ligera y pesada pueden ser utilizados para co-transformar un único cultivo de células anfitrionas modificadas. En otra realización, un único plásmido de expresión que contiene ambos genes y capaz de expresar los genes para cadena tanto ligera como pesada puede transformarse en un único cultivo de células anfitrionas modificadas.

Cuando las cadenas pesadas y ligeras se coexpresan en la misma anfitriona, el procedimiento del aislamiento se diseña para recuperar el anticuerpo reconstituido. Esto puede lograrse mediante procedimientos convencionales de purificación de anticuerpos como, por ejemplo, sefarsa-proteína A, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía por afinidad.

Los anticuerpos recombinantes que se pueden producir en las células de la presente invención tienen un modelo de fucosilación variante para aumentar la función efectora del anticuerpo. Preferentemente los anticuerpos recombinantes tienen bajos niveles de fucosa en el monómero Fc, que es el residuo de fucosa relevante de ADCC, aumentando de ese modo la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) de un anticuerpo.

Según una realización, los anticuerpos producidos son anticuerpos de tipo IgG1 o IgG3.

El anticuerpo con los modelos de fucosilación variantes y/o producido por las células anfitrionas de CHO modificadas de la presente divulgación puede unirse a un antígeno tal como un antígeno del cáncer. El antígeno del cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en HER2, receptor II Fc de la inmunoglobulina épsilon, Alk-1, CD20, receptor de EGF, receptor de VEGF, receptor de FGF, receptor de NGF, receptor de PDGF, EpCam, CD3, CD4, CD11a, CD19, CD22, CD30, CD33, CD38, CD40, CD51, CD55, CD80, CD95, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CTLA-4, Mucina 1, Mucina 16, Endoglina, receptor de Mesotelina, receptor Nogo, receptor de folato, CXCR4, receptor del factor de crecimiento de tipo insulina, Gangliósido GD3, y las integrinas alfa y beta.

Los anticuerpos de ejemplo producidos en las células de la presente invención incluyen pero no se limitan a adalimumab (Humira®), alemtuzumab (Campath®), basiliximab (Simulect®), bevacizumab (Avastin®), cetuximab (Erbix®), daclizumab (Zenapax®), dacetuzumab, efalizumab (Raptiva®), epratuzumab, ibritumomab (Zevalin®), tiuxetan, infliximab (Remicade®), muromonab-CD3 (OKT3), omalizumab (Xolair®), palivizumab (Synagis®), oregovomab (OvaRex®), rituximab (Rituxan®), trastuzumab (Herceptin®), Ocrelizumab, Pertuzumab, hu M195Mab, anti-Abeta, anti-CD4, anti-oxLDL, trastuzumab-DM1, apomab, rhuMab, GA101, anti-OX40L, ipilimumab, ustekinumab, golimumab, ofatumumab, zalutumumab, motavizumab, ecromeximab, MDX010, 4B5, TNX-901, IDEC-114 y cualquiera de los fragmentos de anticuerpos Fc específico de antígenos y capaz de inducir ADCC.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$

Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "que incluye pero no se limita a".

5 A lo largo de esta aplicación, se pueden presentar varias realizaciones en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es simplemente para comodidad y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible sobre el alcance de la divulgación. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo está divulgando específicamente todos los posibles subintervalos, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 está divulgando específicamente subintervalos, tal como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo.

15 Siempre que, en el presente documento, se indique un intervalo numérico, se pretende incluir cualquier valor numérico citado (fraccionario o entero) dentro del intervalo indicado. Las frases "variando/que varía/varía entre" un primer número determinado y un segundo número determinado y "variando/que varía/varía" de un primer número determinado "a" un segundo número determinado se utilizan en el presente documento indistintamente y pretenden incluir el primero y el segundo números determinados y todos los valores numéricos fraccionarios y enteros entre ellos.

20 Como se usa en el presente documento, el término "procedimiento" se refiere a los modos, medios, técnicas y procedimientos para lograr una tarea dada que incluye pero no se limita a esos modos, medios, técnicas y procedimientos conocidos o desarrollados fácilmente a partir de modos, medios, técnicas y procedimientos conocidos por profesionales de las técnicas química, farmacológica, biológica, bioquímica y médicas.

Varias realizaciones y aspectos de la presente invención como las definidas en lo que antecede y según la sección de reivindicaciones de más adelante encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

25 Ahora, se hace referencia a los ejemplos siguientes, que junto con las anteriores descripciones ilustran algunas realizaciones de la invención.

30 Generalmente, la nomenclatura utilizada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican a fondo en la documentación. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Sambrook y col. (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel y col., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson y col., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren y col. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se muestran en las patentes de EE.UU. N.º 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", volúmenes I-III Cellis, J. E., Ed. (1994); "Culture of Animal Cells – A Manual of Basic Technique" por Freshney, Wiley-Liss, N.Y. (1994), Tercera edición; "Current Protocols of Immunology" volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites y col. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la patente y documentación científica, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B. (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak y col., "Strategies for Protein Purification and Characterization – A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). A lo largo de este documento se proporcionan otras referencias generales. Los procedimientos en ellos se cree que son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para comodidad del lector.

50 Materiales generales

Células:

Se establecieron células CHO-S (GibcoBRL, Cat. n.º 11619), adaptadas al medio de cultivo Sigma C6614.

CHO-S en C6614 cultivadas en MTX 200 nM.

CHO-Dukx en C6614.

ES 2 687 771 T3

CHO-S1 en ProCHO-5.

Plásmidos: Tándem PGL3 anti-EGFR mAb EMCV-PAC1-DHFR -872; vector pTT5; pCMV-P.

Reactivos

- ADN polimerasa AccuPrime Pfx de Invitrogen Cat. n.º 12344-024;
- 5 Agarosa para Biología Molecular, Certificada, Agarosa de IBI, Cat. n.º IB70042;
Solución de fracción de albúmina bovina (BSA), 7,5 %, Sigma, Cat. n.º A8412;
Lectina Aleuria Aurantia AAL: 1 mg/ml, cat.: L-1390, Vector;
Lectina Aspergillus Oryzae AOL, 5 mg/ml Cat. L0169, EY
Ampicilina-Sigma Cat. n.º A9518;
- 10 Anticuerpos para ELISA: *Captura:* IgG (H + L) anti-humana de cabra, Jackson Immuno Research Cat. n.º 109-005-088 (EE.UU.). *Detección:* Fc de IgG anti-humana de cabra (Fab2), Jackson Immuno Research Cat. n.º 109-036-098 (EE.UU.);
Prueba de Actina beta, a petición (sonda y cebadores para Q-PCR)-Abi Cat. n.º RN00667869_m1;
Biotina (EZ-Link® NHS-PEG4-Biotina, Formato No-Weigh®, cat.: 21329, Thermo Cat. n.º 21329;
- 15 AAL Biotinilada, 1 mg de conjugado activo, Vector, Cat. n.º B-1395;
MAL Biotinilada, 1 mg, EY, Cat. n.º BA-7801-2;
Seroalbúmina bovina (BSA), Bovostar. Bovogen Cat. n.º BSAS.01;
Refuerzo de Células, HyClone, Cat. n.º SH30866.01;
CHO CD EfficientFeed® A, Invitrogen, Cat. n.º A10234-01
- 20 CHO CD EfficientFeed® B, Invitrogen, Cat. n.º A 10240-01
Ácido cítrico, Sigma Cat. n.º C-1909;
Sulfato de dextrano, sal sódica, Sigma, Cat. n.º D4911;
DH5 α , bacterias competentes-Life-Technologies Cat. n.º 18263-012;
DMSO, Merck, Cat. n.º 1.02931.1000;
- 25 Escalera de ADN: escalera de 1 kb de ADN-BioLabs Cat. n.º 3232L;
Escalera de ADN: escalera de 100 pb de ADN-BioLabs Cat. n.º 3231L;
DTT, Cat.: D9779, Sigma;
AEDT, Sigma, Cat. n.º E7889;
Etanol, Merck Cat. n.º 00983.1000;
- 30 EZ-Link® NHS-PEG4-Biotin, Formato No-Weigh®, cat.: 21329, Thermo Fisher Scientific Inc. EE.UU.;
FACS Accudrop Beads, Becton Dickinson, Cat. n.º MAB345249;
Fucosa, Sigma, Cat. n.º F2252;
Glucosa, Sigma, Cat. n.º G7021;
Glutamina, Biological Industries, Cat. n.º 03-020-1A;
- 35 Glutamina, Sigma, Cat. n.º G5972;
Glicina, Merck, Cat. n.º 4201;
Guanidina-HCl, cat.: G3272, Sigma;

ES 2 687 771 T3

- Hepes 1 M, Invitrogen, Cat. n.º 15630-056;
- Kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad, Applied Biosystems Cat. n.º 4368814;
- HTX50, Biological Industries, Cat. n.º 03-085-1C;
- Ácido hidroclicóric, Merck, Cat. n.º UN-1789 1.00317.2500;
- 5 Metil celulosa al 1 % iCE 280, Cat. n.º 102220 y 101876, Convergent Biosciences (Canadá);
Farmalito 3-10 iCE 280, Cat. n.º 10-0456-01, GE Healthcare (Alemania);
Marcadores pl 6,14 y 9,5 iCE 280, Cat. n.º 102220 y 101996, respectivamente, Convergent Biosciences (Canadá);
Kit de adecuabilidad del sistema iCE 280, Cat. n.º 102093-j, Convergent Biosciences (Canadá);
- 10 Kit de IEF iCE280, Convergent Biosciences;
Tampón IMag, Becton Dickinson, Cat. n.º 552362;
IMag, SA Particles Plus-DM, Becton Dickinson, Cat. n.º 557812;
Yodoacetamida, cat.: I1149, Sigma;
ITSX100, Invitrogen, Cat. n.º 51500-056;
- 15 Placas de LB + ampicilina-HY-Labs Cat. n.º PD178;
L-Cisteína, Cat.: C7352, Sigma;
LipofectAmine, Invitrogen, Cat. n.º 50470;
Aglutinina Maackia amurensis 1 mg/ml, cat.: L8025, Lote: 036k4075 Sigma;
MAA-FITC, 2 mg en tampón de 2 ml, EY, Cat. n.º F-7801-2;
- 20 Maleimida, cat.: 129585, Lote: S56783-278 Sigma;
Na₂PO₄ 2H₂O, Merck, Cat. n.º 6580;
NaH₂PO₄·H₂O, Merck, Cat. n.º 6346;
Sistema Octet QK, tampón Kinetics ×10, cat. n.º 18-5032 Fortebio. Fortebio Inc., EE.UU.;
- 25 %; Papaína, Cat.: P3125, Sigma. Suministrado en acetato de sodio 0,05 M, pH 4,5 que contiene timol al 0,05
Rojo fenol, Sigma, Cat. n.º P0290;
Pluronic F-68, Sigma Cat. n.º P5556;
Polvo de Polietilenimina lineal, de PM 25.000, Polysciences, Cat. n.º 23966;
Coctel de inhibidor de proteasa, Sigma Cat. n.º P8340;
- 30 Inhibidor de proteasa, Sigma, Cat. n.º P8340;
Sefarosa-Proteína A-Mab Select Xtra, Cat. n.º 17-5269-07, Lote n.º 10011545;
Microesferas magnéticas con proteína G, BioLabs, Cat. n.º S1430;
Puromicina, Invitrogen, Cat. n.º Ant-pr 5;
Puromicina, Sigma Cat. n.º P8833;
- 35 Muestra de referencia: solución de 5 mg/ml de ERBITUX® para la infusión de MERCK SERONO lote n.º 7820907;
Las enzimas de restricción se compraron de New England BioLabs;
Estreptavidina conjugada con R-Ficoeritrina (SA-PE) 0,2 mg/ml, Biolegend, Cat. n.º 405203;

ES 2 687 771 T3

- Estreptavidina conjugada con R-Ficoeritrina (SA-PE), Jackson, Cat. n.º 016-110-084;
Leche descremada en polvo, Fluka. Cat. n.º 70166;
Bicarbonato sódico, Merck, Cat. n.º 6329;
Carbonato sódico, Merck, Cat. n.º 6392;
5 Cloruro sódico, Merck, Cat. n.º 6404;
Hidróxido sódico en lentejas, Merck Cat. n.º 1.06498.5000;
Kit de síntesis de ADNc CellsDirect Superscript® III, Invitrogen Cat. n.º18080-051;
Tinción en gel de ADN SYBR Safe, 10.000x en DMSO, Invitrogen, Cat. n.º S33102;
Solución TMB, Cat.: 1928, Savyon Diagnostics;
10 Kit de reactivos TransIT-PRO, Mirus, Cat. n.º Mir5700;
Tris-HCl, cat.: T3038, Lote: 037K8402, Sigma;
Tween20, cat.: 8.17072, Merck;
Ácido valproico, sal sódica, Sigma, Cat. n.º P4543.

Soluciones

- 15 Mezcla AAL Biotinilada -SA-PE: AAL biotinilada 20 µg/ml y SA-PE 2 µg/ml en PBS + ácido plurónico 0,1;
Lejía 1 %-FACS Clean, Becton Dickinson, Cat. n.º 340345;
Tampón de ensayo ELISA- leche desnatada en polvo 1 % en PBS;
Solución de bloqueo ELISA-BSA al 1%/Tween-20 al 0,05% en PBS;
20 Solución de captura (revestimiento) ELISA-IgG (H+L) antihumana de cabra se diluyó 1:900 hasta una concentración final de 2 µg/ml en tampón carbonato 0,1 M pH 9,6;
Muestras de la curva patrón ELISA: La muestra de referencia Erbitux (EMD Lote-7820907, 5,0 mg/ml) se diluyó con tampón de ensayo a 100 ng/ml, seguida de dos veces de dilución seriada hasta 1,56 ng/ml. Para cada concentración de punto patrón se preparó un volumen final de al menos 1 ml;
Tampón de lavado ELISA –Tween-20 al 0,05 % en PBS;
25 Tampón de formulación: Cloruro de sodio 11,7 gr (100 mM); Ácido cítrico 4,2 gr (10 mM); Glicina 15 g (100 mM); Hidróxido de sodio a pH 5,8 y se completó el volumen hasta 2 litros con WFI;
Solución patrón de migración iCE 280: 70 µl de metil-celulosa al 1 %, 1 µl de marcador pl de 6,14 y 9,5, 8 µl de farmalitos (pH 3-10) y añadir 100 ml de WFI;
30 Tampón de escisión de papaína: Tris-HCl 0,1 M, AEDT 4 mM, Cisteína 5 mM, pH 7,6. La Cisteína debe estar recién preparada cada vez. Diluir Papaína a 1 mg/ml con el tampón según instrucciones del fabricante;
PBS (solución salina tamponada de fosfato) – fosfato sódico 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 7,2 preparado por dilución 1:10 de 10x PBS;
PBS con Pluronic 0,1 %;
PBS (preparación de ITL, BR R0450V01);
35 PBS-Tween 20 al 0,05 %: 0,5 ml de Tween 20 se mezclaron con 1 l PBSx1;
Tampón de fosfato 20 mM: pH 7,5: 1,8 g de Na₂PO₄·2H₂O y 1,38 g de NaH₂PO₄·H₂O en 1 l de agua;
Proteína-Tampón de elución: ácido acético 20 mM pH = 3,2;
Proteína A-equilibrio/Tampón lavado 2: Acetato de sodio de 50 mM, pH = 6,8;
Proteína A-Tampón de lavado 1: acetato de sodio 50 mM + cloruro de sodio 1,5 M, pH = 6,8;
40 Reducir el tampón ×2: Guanidina-HCl 8 M, Tris-HCl 100 mM, DTT 10 mM, pH = 8,8 (recién preparado cada

vez).

Medios de cultivo

- Patrón 6 de refuerzo celular al 3,5 %;
- Medio de clonación de CHO, Cat. n.º C6366, Sigma;
- 5 Medio de DHFR^r CHO en polvo, SAFC Biosciences, Cat. n.º C6614 (preparación de ITL R0461V01);
DMEM-F/12 1:1 X1, Invitrogen, Cat. n.º 21331-020;
- Medio FEME ((DMEM/F-12 (1:1) (Invitrogen Cat. n.º 32 500_043) complementado con 8 ml/l ITS-X (Invitrogen Cat. n.º 51500-056);
- Medio esencial mínimo de Eagle, Sigma, Cat. n.º M2279;
- 10 ProCHO5, Lonza, Cat. n.º BE12-766Q;
- Select CD1000, Becton Dickinson, Cat. n.º 215204;
- Patrón de sal sódica de VPA, 100 mM.

Consumibles

- Tubos de centrifuga de 14 ml, Greiner, Cat. n.º 187261;
- 15 Tubos de centrifuga de 15 ml, Corning, Cat. n.º 430052;
- Placas de 24 pocillos, Nunc, Cat. n.º 142475;
- Tubo de poliestireno de fondo redondo de 5 ml, Becton Dickinson, Falcon, Cat. n.º 352054;
- Tubo de poliestireno de fondo redondo de 5 ml, Becton Dickinson, Falcon, Cat. n.º 352054;
- Placas de 96 pocillos, Costar, Cat. n.º 3595;
- 20 Placas de 96 pocillos, Falcon, Cat. n.º 353072;
- Láminas adhesivas ópticas ABI PRISM® 100/Envase, aplicada Biosystems, Cat. n.º 4311971
- Viales criotubos de 2 ml, Grenier, Cat. n.º 126-263;
- Filtro Acrodisc de 0,2 µm, Gelman, Cat. n.º 4192;
- Amicon Ultra 15 ml, 10 kDa, Cat.: UFC901024, Millipore;
- 25 Amicon Ultra 3 kDa, Cat.: UFC900324, Millipore;
- Amicon ultra, unidad de filtración de centrifuga, Millipore, Cat. n.º UFC801024;
- Recipiente de criocongelación a 1 °C, Nalgene Cat. n.º 5100-0001;
- Filtro de 0,22 µm desechable para la esterilización en PBS o agua, Nalgene, Cat. 1270020;
- 30 Filtro de 0,2 µm desechable para esterilización en ACFM (membrana GP Express plus), Millipore, Cat. n.º SCGPU05RE o SCGPU11RE;
- Filtro desechable de 0,45 µm para la esterilización FACS Clean, Nalgene, Cat. n.º 4500045;
- Tamiz desechable de 40 µm estéril para células, Becton Dickinson, Falcon, Cat. n.º 352340;
- Tubo de poliestireno desechable de 5 ml con copa de tamiz de células de 35 µm, Becton Dickinson, Falcon, Cat. n.º 352235;
- 35 Copa de filtración estéril desechable de 70 µm (o 35 µm) Filcon, Becton Dickinson, Falcon, Cat. n.º 340634;
- Copa de filtración desechable de 10 µm Filcon, Becton Dickinson, Cat. n.º 340732;
- Copa de filtración desechable de 30 µm Filcon, Becton Dickinson, Cat. n.º 340625;
- DynaMag, Dynal, Invitrogen. Cat. n.º 123.01D;

ES 2 687 771 T3

- DynaMag, Dynal, Invitrogen, Cat. n.º 123.21D;
- ELISA, placas de microtitulación MaxiSorp F96, cat.: NUNC;
- Erlenmeyer de 1.000 ml, Triforest, Cat. n.º TF FPC1000S;
- 5 Matracas Erlenmeyer: 125 ml, Corning, Cat. n.º WI-431143, 250 ml, Corning, Cat. n.º WI-431144, 500 ml, Corning, Cat. n.º WI-431145, 2L, Corning, Cat. n.º WI-431255;
- Tubos de FACS, Falcon Cat. n.º 352235 con tapón de filtro azul;
- Tubos de FACS, BD Falcon, Cat. n.º 352235;
- Filtro de 10" 0,1 µm, Durapore, Millipore, Cat. n.º MILLIPAK200;
- Tubos de Filtración 50, TPP, Cat. n.º 87050;
- 10 Cartucho de Capilares iCE, Cat.: Revestimiento FC (PN:101700), Convergent Biosciences;
- Microinyectores capilares de transferencia iCE 280, Cat: PN:102019, Convergent Biosciences;
- IMagnet, Becton Dickinson, Cat. n.º 552311;
- Kova Glasstic Slide 10 con rejillas, Hycor, Cat. 87144;
- Tubos de microcentrifuga (1,7 ml), Costar, Cat. n.º 3207;
- 15 Sistema Octet QK, microplaca negra de 96 pocillos, cat.: 655209, Greiner bio-one, Alemania;
- Placas ópticas de ciclo térmico rápido de 96 pocillos con código de barras 20/Envase, Applied Biosystems, Cat. n.º 4346906, puntas de pipeta, Sorenson, Cat. n.º 14200 y 14220;
- Puntas de pipeta, Sorenson, Cat. n.º 14200 y 14220;
- Puntas de pipeta 0-200 µl, Costar, Cat. n.º 4864;
- 20 Casete de diálisis Slide-A-Lyzer® G2 2 kDa: cat.: 87718, Thermo;
- Tubos de diálisis SnakeSkin® 10 kDa, cat.: 68100, Lote: JJ127549, Thermo HiTrap MabSelect Xtra 1 ml, Cat.: 4082-28-58, GE;
- Unidad de filtración de 0,1 µm Stericup de 1 l, Millipore, Cat. n.º SCGPU05RE;
- Unidad de filtración de 0,2 µm Stericup de 1 l, Millipore, Cat. n.º SCGPU11RE;
- 25 Unidad de filtración de 50 ml, 0,22 µm, Steriflip de Millipore, Cat. n.º SCGP00525;
- Placas estériles de 24 pocillos, Nunc, Cat. n.º 143982;
- Placas estériles de 6 pocillos, Costar, Cat. n.º 3506;
- Tubos de centrifuga estériles: 15 ml, Becton Dickinson, Falcon, Cat. n.º 2097 y Corning, Cat. n.º 430055, de 50 ml Corning, Cat. n.º 430290, de 250 ml Corning, Cat. n.º 430776, de 500 ml Corning, Cat. n.º 431123;
- 30 Tubos estériles para FACS, Becton Dickinson, Falcon, Cat. n.º 352054;
- Pipetas estériles: 10 ml Sterillin Cat. n.º 47110, 1 ml Sterillin, Cat. n.º 40105, 2 ml Sterillin, Cat. n.º 40102, Corning de 5 ml, Cat. n.º 4011, Corning de 50 ml, Cat. n.º 4501, Falcon de 25 ml, Cat. n.º 35-7525;
- Frascos estériles de cultivo de tejidos: 25 cm², (T-25), Nunc, Cat. n.º 163371;
- Puntas de biosensores de estreptavidina cat.: 18-5019, Fortebio Inc, EE.UU.;
- 35 Jeringa de 2,5 ml estéril, Medi-Plus, Cat.;
- TCF 175 cm², Nunc, Cat. n.º 156502;
- TCF 25 cm², Nunc, Cat. n.º 136196;
- TCF 80 cm², Nunc, Cat. n.º 153732 TCF.

Equipo

ES 2 687 771 T3

- Explorador AKTA 100, cat.: 1112-18-41, GE (Alemania);
Cellavista-Innovatis, Roche;
Centrífuga-Cat. n.º 5417R-Eppendorf;
Centrífuga-Cat. n.º 5417R-Eppendorf;
- 5 Centrífuga-Tipo RC 3C Plus-Sorvall (EE.UU.);
Baño de agua circulante, Modelo F3/K, Haake (Finlandia);
Conductímetro ORION, Modelo 150, ORION Research Inc.;
Contador Coulter-Modelo Z1, Coulter Electronics (Inglaterra);
Recipiente de Criocongelación de 1 °C, Nalgene, Cat. n.º No. 5100-0001;
- 10 Lector de placas de ELISA Sunrise basic, Cat. n.º 16039400, TECAN;
Lavador Columbus de placas de ELISA, Cat. n.º 6040834, TECAN;
Robot de ELISA Genesis RSP 150/8, Cat. n.º 611408, TECAN;
ELISA, incubadora iEMS, Cat. n.º 5112200, Thermo;
Centrífuga Eppendorf, serie 5417R, Eppendorf (Alemania);
- 15 Citómetro de flujo FACSAria, Beckton Dickinson;
Finnpipette, Cat. n.º 4540000 LabSystems (Finlandia);
Regulador programable de la serie 90-70 de Fanuc GE -General Electric Ltd. (EE.UU.);
GeneAmp® PCR System 9700, PE Applied Biosystems (EE.UU.);
Sistema de Electroforesis en Horizon Gel, GIBCO-BRL Horizon 58, Cat. n.º 41060;
- 20 Analizador por imagen de la electroforesis capilar iCE 280, Cat. n.º 1241, Convergent Biosciences;
Microinyector PrinCE iCE 280, Cat. n.º 5418074067, Convergent Biosciences;
Software iCE 280 Software iCE280 CFR v.2.3.6 Convergent Biosciences;
Image Master VDS, Cat. n.º 80-6254-80 Pharmacia (Suecia);
Caja Agitadora de Incubación, CERTOMAT® BS-T, B. Braun Biotech International (Alemania);
- 25 Incubadora de 37 °C 5 % de CO₂, temperatura y CO₂ controlados, Tuttnauer (Israel);
Incubadora- Agitador de "n" Pilas, Hybaid, Cat. n.º HBMOVC5T220 (Horno de hibridación);
Campana de flujo laminar (LFH) clase 100-Israflow (Israel);
Microscopio óptico-Modelo TMS N.º 301070-Nikon (Japón);
Incubadora/agitador para microplacas, iEMS, ThermoLabsystem (Finlandia);
- 30 Lavadora de microplacas, Cat. n.º WW015, Applied Quality Services LTD (Reino Unido);
Horno de microondas-Crystal 17L;
Sistema Octet QK, Software de adquisición de datos versión 6.3, Fortebio Inc., EE.UU.;
Sistema Octet QK, Software de análisis de datos versión 6.3, Fortebio Inc., EE.UU.;
Sistema Octet QK, Fortebio Inc., CA, EE.UU.;
- 35 Agitador de plataforma orbital con una amplitud de agitación (órbita) de 25 mm New Brunswick Scientific
(USA);
Bombas peristálticas-Watson Marlow 503S o 505U (Reino Unido);

- Medidor de pH, serie PHM210, Radiometer (Dinamarca);
 Lavadora de placas (SLT 96PW) TECAN;
 Agitadora oscilante de plataforma -Hoefer "Red-Rocker" PR50-250V (Farmacia biotech.);
 Fuente de alimentación, Cat. n.º PS500XT, Hoefer scientific instruments (EE.UU.);
 5 Centrífuga refrigerada, Multifuge 3 S-R, Heraeus;
 Incubadora con Agitador-refrigerada, Innova 4230, New Brunswick Scientific (EE.UU.);
 Procesador de muestras robótico, Modelo RSP 150/8 Genesis, TECAN, (Suiza);
 Agitador, Rotamax, Serie n.º 120 Heidolph (Alemania);
 Software-WIZCON-PC Soft International Ltd. (Israel);
 10 Sistema de PCR inmediata StepOnePlus®, Applied Biosystems, Cat. n.º 4376600;
 Mesa de UV, BTS 20.MS, Uvitec, Cat. n.º M023641;
 Baño de agua-regulador de temperatura, Polysciences, Modelo 9106

PROCEDIMIENTOS GENERALES

Abreviaturas

- 15 AAL- Lectina Aleuria aurantia
 ACF- Exento de componente animal
 ACFM- Medio exento de componente animal
 ADCC- Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos
 mAb anti-EGFR
 20 CHO- Ovario de hámster chino
 DHFR- Dihidrofolato reductasa
 DMEM- Medio de Eagle modificado de Dulbecco
 DMSO- Dimetilsulfóxido
 DTT- Ditiotreitól
 25 AEDT- Ácido etilendiaminotetraacético
 EGFR- Receptor de factor de crecimiento epidérmico
 ELISA Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
 EMCV- Virus de la encefalomiocarditis
 Fab- Las porciones CH1 y V_H de la cadena pesada y de la cadena ligera de la IgG1.
 30 FACS- Clasificador de células activadas por fluorescencia
 Fc- Las porciones CH3 y CH2 de la cadena pesada de la IgG1.
 F-SA- Estreptavidina fluorescente
 Fut8- Fucosiltransferasa 8
 FX GDP-ceto-6-desoximanosa-3,5-epimerasa-4-reductasa
 35 GFT- Transportador de GFT-fucosa
 GMD- GDP-manosa-4,6-deshidratasa
 GOI- Gen de interés

	HC-	Cadena pesada
		hCMV-IE-Promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano
	HRP	Peroxidasa de rábano picante
	ICE	Electroforesis capilar por imagen
5	IgG1	Inmunoglobulina de tipo G1.
	IRES-	Sitio de entrada del ribosoma interno
	LC-	Cadena ligera
	MAA-	Lectina Maackia amurensis
	MCB-	Banco de células Master
10	mCMV-	Promotor de citomegalovirus murino
	MFI-	Intensidad de fluorescencia media
	MS-	Espectrometría de masas
	MTX-	Metotrexato
	NK-	Células agresoras naturales
15	pA-	Poliadenilación
	PAC-	Puromicina N-acetiltransferasa
	PBS	Solución salina de tampón fosfato
	PCD-	Picogramos por célula por día
	PCR-	Reacción en cadena de polimerasa
20	PDL-	Nivel de duplicación de la población
	PDT-	Tiempo de duplicación de la población
	POI-	Proteína de interés
	PreMCB-	Banco de células Pre-master
	RE-	Enzima o enzimas de restricción
25	RT-	Temperatura ambiente
	SA-	Estreptavidina
	SA-PE	Estreptavidina conjugada con R-Ficoeritrina
	SP-	Péptido señal
	SV40-	Virus 40 de simio
30	TM-	Péptido transmembrana
	TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
	VPA-	Acido valproico

35 *Incubación de Células de CHO-S en presencia de MTX:* Las células de CHO-S en C6614 se sembraron a $0,2 \times 10^6$ células/ml en MTX 100 nM y se reprodujeron durante diez días hasta que la viabilidad superaba el 90 %. Entonces, las células eran transferidas a MTX 200 nM durante 27 días y posteriormente las células se congelaron en presencia de MTX 200 nM. Para el aislamiento de las células que expresan cero fucosa las células fueron descongeladas en medio que no contenía MTX.

Selección de células de baja fucosa con microesferas magnéticas con estreptavidina: Las células de CHO-S tratadas con MTX se etiquetaron con AAL biotinilada o mezcla de AOL y estreptavidina ligada a microesferas magnéticas.

Las células se separaron con un imán y células en suspensión, que no se unen al imán (es decir, tenía nivel de fucosa en su superficie), se reprodujeron posteriormente. Este procedimiento se realizó dos veces y después las células se clasificaron mediante FACS.

5 Las células de CHO-S tratadas con MTX 50×10^6 fueron recogidas y se lavaron en PBS + 0,1 % de ácido plurónico (Pluronic F-68, Sigma Cat. n.º P5556). Después, las células se volvieron a suspender en 5 ml de AAL biotinilada (Vector, cat. B-1395, Lote n.º U0922) a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ o con AOL (Cat. L0169, EY) en una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ en PBS + 0,1 % de ácido plurónico durante 30 min a RT. Las células teñidas se lavaron con PBS + 0,1 % de ácido plurónico antes de la adición de 250 μl de BD IMag SA Particles Plus-DM (BD, Cat. n.º 557812) y la incubación durante otros 30 min a RT. Después, se agregaron 2,25 ml de PBS + ácido plurónico al 0,1 % + BSA al 0,5%. Las microesferas se dividieron en tres tubos de 5 ml. Los tubos se colocaron en BD IMagnet (BD, Cat. n.º 552311) y se dejaron durante 8 minutos. El sobrenadante se aspiró y se transfirió a un nuevo tubo de 15 ml. Esta etapa se hizo dos veces y el sobrenadante aspirado se combinó. El sobrenadante se dividió de nuevo en tubos de 5 ml y se colocó en el BD IMagnet (BD, Cat. n.º 552311) durante 8 minutos. El sobrenadante se recogió, se centrifugó y se sembró en medio C6614 (Medio en polvo de DHFR de CHO, SAFC Biosciences Cat. n.º C6614) (preparación de ITL R0461V01). Las células se reprodujeron y después se realizó otra ronda de separación con las microesferas.

Tras la incubación con la lectina, la viabilidad de las células fue 83 % cuando se incuban con AAL y 89 % cuando se incuban con AOL. La viabilidad típica de células después de la incubación con PBS es 85-95 %.

Clasificación mediante FACS de células de poca fucosa

20 *A. Clasificación después de la separación con microesferas magnéticas:* Las células, después de dos rondas de separación con microesferas magnéticas, fueron objeto de clasificación FACS de células que tienen bajos niveles de fucosa en su superficie celular. Se lavaron 40×10^6 células en ácido PBS + ácido plurónico al 0,1 % en frío, se centrifugaron, se suspendieron de nuevo en 10 ml de AAL biotinilada o mezcla de AOL + SA-PE 20 $\mu\text{g/ml}$ y se transfirieron a un matraz de T80 para incubación de 30 minutos con agitación a 45 rpm a 37 °C. Las células se centrifugaron, se lavaron en PBS + ácido plurónico al 0,1 % en frío, se centrifugaron dos veces y se suspendieron de nuevo en PBS + de ácido plurónico al 0,1 % a una concentración final de 10×10^6 células/ml. La fracción fluorescente más baja de la población (1,5 %), fueron clasificadas mediante FACS en 2 ml de Sigma C6614 SFM + HT (Biological Industries Cat. n.º 03-085-1C)/tubo, se centrifugaron, se suspendieron de nuevo en 1,5 ml de SFM C6614 Sigma + HT/tubo y sembrado en un pocillo en una placa de 6 pocillos y se reprodujeron.

30 *B. Clasificación de las células de poca fucosa-cuatro rondas:* Se lavaron 100×10^6 células en PBS + ácido plurónico 0,1 % en frío, se centrifugaron, se suspendieron de nuevo en mezcla de 10 ml de AAL biotinilada (20 $\mu\text{g/ml}$) + SA-PE (1:100) en PBS + ácido plurónico al 0,1 % y se transfirieron a frasco T80 para incubación de 30 minutos con agitación a 45 rpm a 37 °C. Las células se centrifugaron, se lavaron en PBS + ácido plurónico al 0,1 % en frío, se centrifugaron dos veces y se suspendieron de nuevo en PBS + ácido plurónico al 0,1 % para obtener concentración de células de $10 \times 10^6/\text{ml}$ y se filtraron en tubos de FACS. Tras la incubación con AAL la viabilidad de las células fue del 81 %. La viabilidad típica de las células después de la incubación con PBS es 85-95 %. La fracción fluorescente más baja (0,2 % en la primera clasificación, 0,07 % en la segunda, 1 % en la tercera y 2 % en la cuarta) de la población se clasificaron mediante FACS en 2 ml de SFM ProCHO5 Sigma + HT/tubo, se centrifugaron, se suspendieron de nuevo en 1 ml (en las clasificaciones primera y segunda), 3 ml (en las clasificaciones tercera y cuarta) de ProCHO5 + HT/tubo, se sembraron en un pocillo en una placa de 24 pocillos (en las clasificaciones primera y segunda), frasco T25 (en las clasificaciones tercera y cuarta) y se reprodujeron.

45 *Análisis mediante FACS del nivel de fucosa en la membrana de las células:* Se lavaron 2×10^6 células en PBS + ácido plurónico al 0,1 %, se centrifugaron, se suspendieron de nuevo en 500 μl de AAL biotinilada (Cat. B1395, Vector) (diluido a 20 $\mu\text{g/ml}$) o mezcla de AOL (Cat. L0169, EY) (diluido a 5 $\mu\text{g/ml}$) + SA-PE (Cat. 40250, Biolegend) (diluido a 2 $\mu\text{g/ml}$) en PBS + ácido plurónico al 0,1 % y se transfirieron a placas de 24 pocillos para la incubación durante 30 minutos con agitación a 37 °C. Las células se suspendieron de nuevo a fondo y se transfirieron a tubos de 15 ml. Se agregaron 10 ml de PBS + ácido plurónico al 0,1 % y las células se mezclaron, se centrifugaron y se lavaron de nuevo. El sedimento se suspendió de nuevo en 0,5 ml de PBS + ácido plurónico al 0,1 %/tubo y se filtró en tubos FACS para análisis según la fluorescencia de las células.

50 *Análisis mediante FACS del contenido de ácido siálico en la membrana de las células:* 2×10^6 células fueron lavadas dos veces en PBS + ácido plurónico al 0,1 %, se centrifugaron, se suspendieron de nuevo en 500 μl de MAA-FITC (diluido a 50 $\mu\text{g/ml}$) en PBS + ácido plurónico al 0,1 % y se transfirieron a placas de 24 pocillos para la incubación durante 30 minutos con agitación a 25 °C. Las células se suspendieron de nuevo a fondo y se transfirieron a tubos de 15 ml. Se agregaron 10 ml de PBS + ácido plurónico al 0,1 % y las células se mezclaron, se centrifugaron y se lavaron de nuevo. El sedimento se suspendió de nuevo en 0,5 ml de PBS + ácido plurónico al 0,1 %/tubo y se filtró en el tubo de la FACS para el análisis según la fluorescencia de las células.

Adición de fucosa exógena al cultivo de células ITL-Lf2: Las células de ITL-LF2, antes o después de la transfección con mAb anti-EGFR, se sembraron en medio de ProCHO5 en una concentración de $0,2 \times 10^6$ células/ml con distintas concentraciones de L-fucosa (Sigma Cat. n.º F2252) y se incubaron a 37 °C en un agitador a 320 rpm con

CO₂. Después de 4 días, se tomaron muestras de células para el análisis mediante FACS según la fluorescencia de las células (como se describe a continuación en el presente documento). Además, las muestras de la cosecha en crudo a partir de las células transfectadas con mAb anti-EGFR se analizaron mediante FACS.

5 *Preparación de los bancos de células pre-Master.* Los cultivos de células para la congelación de células, se extendieron en matraces Erlenmeyer. La cantidad necesaria de células se centrifugó y se suspendió de nuevo en medio de crioconservación compuesto de 92,5 % de una mezcla 1:1 de medio ProCHO5 recién preparado + HT y medio acondicionado (células anfitrionas de ITL-LF2 de crecimiento exponencial) y DMSO al 7,5 %. De cada clon se congelaron sesenta viales en cada Banco de Células pre-Master (pre-MCB), 10 × 10⁶ células por vial de 1,5 ml por vial. Las células se congelaron a -80 °C en recipiente de criocongelación a 1 °C (NALGENE, Cat. n.º 5100-0001) y 10 24 horas más tarde se transfirieron al almacenamiento en nitrógeno líquido en fase de vapor.

Ensayos del Banco de Células: La viabilidad de las células de ampolla congelada en pre-MCB de células ITL-LF2 se analizó 11 días después de la preparación en pre-MCB. Una ampolla se descongeló y se determinó la viabilidad inmediatamente después de descongelar. Las células se reprodujeron a lo largo de tres ciclos de crecimiento y viabilidad se determinó después del tercer ciclo.

15 Los ensayos de esterilidad se realizaron por la técnica de transferencia directa o de inmersión. Las células se ensayaron también para micoplasma.

20 *Clonación mediante FACS ACDU:* La clonación mediante el dispositivo de la Unidad de Deposición Automática de Células (ACDU) del clasificador celular FACS Aria, de células que se desarrollaron en ProCHO5 + HT se realizó por la ACDU, en el modo de precisión de "Célula Única", en placas de 96 pocillos que contienen 200 µl/pocillo de mezcla ACFM de 80 % de C6366 + 20 % de ProCHO5. La concentración de las células fue 0,4 × 10⁶ células/ml. Las placas se fotografiaron mediante Cellavista el día de la clonación (día 0) y, después, ocho días más tarde. Se recogieron varios clones, se reprodujeron y se transfirieron después a frascos matraces T25 que contienen 4 ml de mezcla de 50 % de C6366 y 50 % de ProCHO5 de Sigma. Se añadió ProCHO5 poco a poco durante la reproducción de las células. Estas células se analizaron para la caracterización del ARNm.

25 *Extracción de ARN a partir de las células:* Se aisló ARN total de las células con el kit Rneasy (Qiagen Cat. n.º 74104) según las instrucciones del fabricante.

30 *RT-PCR para la detección de genes vía fucosa:* Se preparó ADNc a partir de ARN total extraído de células de CHO-S o ITL-LF2 utilizando el kit Invitrogen SuperScript III (Cat. n.º 18080-051) y los cebadores Oligo dT proporcionados en el kit. La PCR se realizó después utilizando cebadores específicos del gen. Los cebadores se sintetizaron en Sigma Aldrich. Las secuencias de los cebadores se detallan en la siguiente Tabla 1, en el presente documento. Las bandas resultantes se analizaron en geles de agarosa y se compararon con marcadores del tamaño del ADN.

Tabla 1

Construcción del vector	Molde usado	Fragmento obtenido	Cebador 5'		Cebador 3'	
			N.º	Secuencia*	N.º	Secuencia*
MB-127 (pTT5-anti-EGFR mAb anti-EGFR mAb-HC)	Tándem PGL3 anti-EGFR mAb EMCV-PAC1-DHFR -872	HindIII-anti-EGFR mAbHC-NotI	690-36	SEQ ID NO: 1	691-38	SEQ ID NO: 2
MB-128 (pTT5-anti-EGFR mAb-LC)	Tándem PGL3 anti-EGFR mAb EMCV-PAC1-DHFR -872	HindIII-anti-EGFR mAbLC-NotI	692-36	SEQ ID NO: 3	693-32	SEQ ID NO: 4

35 *Q-PCR (PCR inmediata) para la evaluación de niveles de expresión de ARNm vía fucosa:* El ADNc se preparó utilizando el kit de transcriptasa inversa ADNc de alta capacidad Applied Biosystems y cebadores al azar suministrados en el kit (Applied Biosystems Cat. n.º 4368814).

Cebadores específicos del gen y las sondas MGB TaqMan® se sintetizaron en Applied Biosystems. Las secuencias de los cebadores y las sondas se detallan en la siguiente Tabla 2, en el presente documento.

Tabla 2

Gen	Sonda	Cebador 5'	Cebador 3'
Alfa-1,6-fucosiltransferasa (Fut8)	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7
GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-epimerasa-reductasa (Fx)	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10
GDP-manosa-4,6-deshidratasa (GMD)-cebadores de exones 5-6	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13
GDP-beta-L-fucosa-pirofosforilasa (GFPP)	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16
GDP-transportador de fucosa (GFT)	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 19
VEZT	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22

La Q-PCR se realizó de la siguiente manera:

5 Para cada reacción se agregaron 5 µl de ADNc preparado a una mezcla que contenía: mezcla Master de expresión de genes TaqMan®, cebadores directos e inversos y sonda MGB TaqMan® en un volumen final de 13 µl.

La Q-PCR se realizó en la máquina de PCR inmediata StepOnePlus® en modo "rápido" y los resultados se analizaron utilizando los softwares StepOnePlus® y DataAssist v2.0.

10 *Secuenciación de ADN de fragmentos de ADNc y plásmidos:* La secuenciación del ADN se realizó mediante el Analizador Genético de 16 capilares completamente automático ABI Prism 3100. Las secuencias se analizaron en las instalaciones de la empresa utilizando el software General Sci-Ed (software gestor de clones, versión 7.01 y Align plus 5, versión 5.01).

Construcción de vectores de expresión de ADN: Todos los vectores se construyeron utilizando técnicas estándares de biología molecular.

15 *Preparación de ADN plásmido:* El ADN plásmido se aisló utilizando el kit QIAGEN Hispeed plasmid Maxi según el procedimiento descrito por el fabricante. Para transfecciones estables, el ADN fue linealizado mediante enzimas de restricción específicas y se esterilizó mediante precipitación de ADN en etanol. Se realizaron transfecciones transitorias con ADN circular.

20 *Transfecciones estables de células de ITL-LF2 y de CHO-S:* Las células de ITL-LF2 se adaptaron a medio C6614 exento de suero (medio CHO DHFR^r en polvo, SAFB Biosciences Cat. n.º C6614). Las células se cultivaron en suspensión en tubos de 50 ml (tubos de filtro 50, TPP, Cat. n.º 87050), 37 °C, se humidificaron y se agitaron a 320 rpm. Dos días antes de la transfección, se sembraron 100 ml de las células en una concentración de $0,5 \times 10^6$ células/ml en un Erlenmeyer de 500 ml (Corning, Cat. WI-431145). Las células se transfectaron con vector tándem PGL3 anti-EGFR mAb EMCV-PAC1 DHFR - 872 que contiene secuencia codificante mAb anti-EGFR por LipofectAmine (GibcoBRL Cat. n.º 18324-020). En el día de la transfección, las células se lavaron en repeticiones; se suspendieron de nuevo y se sembraron 10×10^6 células en 4 ml de MEM (Sigma, Cat. n.º M2279) por cada frasco T-25 (Nunc Cat. n.º 163371). Para cada transfección con un solo plásmido, se utilizaron 20 µg de vector linealizado tándem PGL3 anti-EGFR mAb EMCV PAC1 DHFR-872. El volumen final de ADN se ajustó a 100 µl en MEM. Posteriormente, se agregaron 100 µl LipofectAmine y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de ADN-LipofectAmine se añadió después a las células y se incubó durante 4 horas a 37 °C, 5 % de CO₂ en una incubadora con agitación a 50 rpm. Al final de este periodo de incubación, las células se centrifugaron y el medio se reemplazó con 8 ml recién preparados de 50 % de C6614 (Sigma) y 50 % de C6366 (Sigma) complementado con 13,6 mg/l de hipoxantina/3,9 mg/l de timidina (HT, Biological Industries Cat. n.º 03-085-1C) y 10 µg/ml de fucosa (Sigma, Cat. n.º F2252).

35 Los frascos se incubaron a 37 °C en una incubadora con agitación a 50 rpm durante 72 horas. Después, las células se recogieron, se centrifugaron y se suspendieron de nuevo en 10 ml de medio 50 % de C6614 + 50 % de C6366 complementado con 10 mg/ml de fucosa y 5-10 µg/ml de puomicina (para las diferentes repeticiones) y se devolvieron al frasco T-25 original. En estas condiciones selectivas, sólo las células que expresan el gen PAC pudieron sobrevivir. Después de repetir la recuperación de la agrupación, se agregaron poco a poco medio C6614 + 10 µg/ml de fucosa. Cuando las agrupaciones se recuperaron completamente, las células se sembraron en medio C6614 recién preparado sin fucosa. Después, las células se transfirieron a medio ProCHO5 y el nivel de fucosilación en la membrana de las células se detectó como se describe más adelante en el presente documento.

Células de CHO-S se cultivaron en medio ProCHO5 exento de suero (Lonza, Cat. n.º BE12-766Q) complementado con hipoxantina 13,61 mg/l y timidina 3,88 mg/l (HTx1, Biological Industries Cat. n.º 03-085-1B). Las células se cultivaron en suspensión en tubos de filtro de 50 ml Biorreactor (TPP, Cat. n.º 87050), a 37 °C, se humidificaron y se agitaron a 320 rpm. Dos días antes de la transfección, las células se sembraron en una concentración de $0,2 \times 10^6$ células/ml en matraces Erlenmeyer de agitación de 500 ml, con tapón de filtro (Corning, Cat. n.º 431145). En el día de la transfección, las células se centrifugaron y se sembraron 10×10^6 células en 4 ml de MEM (Sigma, Cat. n.º M2279) en frascos de T25 (Nunc, Cat. n.º 163371). Para cada transfección con un solo plásmido, se utilizaron 20 µg de vector linealizado (tándem PGL3 anti-EGFR mAb EMCV PAC1 DHFR-872). El volumen final de ADN se ajustó a 100 µl de MEM. Posteriormente, se agregaron 100 µl de LipofectAmine (GibcoBRL Cat. n.º 18324-020) y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de ADN LipofectAmine se añadió después a las células y se incubó durante 4 horas a 37 °C, 5 % de CO₂ en una incubadora con agitación a 50 rpm. Al final de este período de incubación las células se centrifugaron y el medio se reemplazó con 8 ml de ProCHO5 recién preparado (Lonza, Cat. n.º BE12-766Q) complementado con sulfato de dextrano 0,1 mg/ml, hipoxantina 27,22 mg/l y timidina 7,76 mg/l (HTx2, Biological Industries Cat. n.º 03-085-1B) en un Erlenmeyer de 125 ml con tapón de filtro (Corning, Cat. n.º 431143). El matraz se incubó a 37 °C en una incubadora con agitación a 125 rpm durante 72 horas. Después, las células se recogieron, centrifugaron y suspendieron de nuevo en 20 ml de medio ProCHO5 complementado con 25 µg/ml de puromicina (Invivogen, Cat. n.º ant-pr-1), en estas condiciones selectivas, sólo las células que expresaban el gen PAC pudieron sobrevivir.

Transfecciones transitorias de células ITL-LF2: Dos días antes de la transfección, las células reproducidas en ProCHO5 se sembraron a una concentración de $0,5 \times 10^6$ células/ml en 250 ml en un Erlenmeyer de 1.000 ml (TRIFOREST, Cat. n.º TF FPC1000S) para alcanzar la densidad aproximada de $2,5-3,0 \times 10^6$ células/ml después de 2 días.

Se utilizaron dos protocolos de transfección:

1. Transfección en medio que contiene ProCHO5 (Lonza)

En el día de la transfección, 37,5 µg de ADN (18,75 µg cada uno de la plásmidos HC + LC) se diluyeron en 2,5 ml de medio FEME ((DMEM/F-12 (1:1) (Invitrogen Cat. n.º 32 500_043), NaHCO₃ 29 mM, HEPES 10 mM, 5 g/l de D-glucosa y L-glutamina 7,5 mM) en tubo de 15 ml (Corning Cat. n.º 430052) El matraz Er125 se llenó con un volumen inicial de 10 ml de medio FEME (DMEM/F-12 (1:1) (Invitrogen Cat. n.º 32 500_043) complementado con 8 ml/l de ITS-X (Invitrogen, Cat. n.º 51500-056); 187,5 µg de patrón PEI (Polysciences Inc., Cat. n.º 23966), se agregaron al medio ADN + FEME (ADN:PEI 1:5), los reactivos se mezclaron con vórtice durante 10 segundos y se incubaron durante 10 segundos a temperatura ambiente. En tubos de 50 ml se centrifugaron 60×10^6 células vivas. El sedimento se suspendió de nuevo suavemente con la mezcla de transfección y se transfirió al Erlenmeyer de 125 ml por incubación durante 180 minutos en incubadora con agitación de CO₂, a 37 °C y 160 rpm. Se agregaron 12,5 ml de medio de ProCHO5 para llegar a una concentración final de $2,4 \times 10^6$ células/ml en cultivo de 25 ml.

Veinticuatro horas después de la transfección, las células CHO-S transfectadas se complementaron con 100 µl (concentración final de 0,5 mM) de patrón 100 nM de sal sódica del ácido valproico (VPA) (Sigma, Cat. n.º P4543) y 2 ml de refuerzo celular al 3,5 % (HyClone Cat. n.º SH30866.01). Las células ITL-LF2 se complementaron con 100 µl (concentración final 0,5 mM) de patrón 100 nM de sal sódica de ácido valproico (VPA) (Sigma, Cat. n.º P4543) y se redujo la temperatura de incubación a 31 °C.

Después de 6 días de incubación, se extrajo una muestra de la suspensión celular para analizar el recuento y la viabilidad de las células. Después de la centrifugación, el sobrenadante se extrajo para la evaluación de la expresión transitoria en el ensayo ELISA.

2. Transfección en un segundo medio.

Producción de mAb anti-EGFR mediante células de ITL-LF2 y de CHO-S: Las células a una concentración de $0,5-2 \times 10^6$ se sembraron en 200-600 ml de ProCHO5 que contiene con sulfato de dextrano en matraces Erlenmeyer de 1 o 2 l y se cultivaron durante 4 días a 37 °C en una incubadora con agitador a 320 rpm. La cosecha se centrifugó y se filtró a través de filtro de 0,22 µm. Un cóctel inhibidor de la proteasa (Sigma, Cat. n.º P8340) se agregó posteriormente (1 ml para 1 l de cultivo). La cosecha se mantuvo congelada a -80 °C hasta el comienzo del proceso de purificación.

Análisis del nivel de fucosa de muestra de cosecha en crudo o proteína recombinante purificada mediante FACS: Microesferas magnéticas con proteína G (Cat. S1430S, Biolabs) se suspendieron de nuevo completamente y se transfirieron 25 µl a tubos de 2 ml a temperatura ambiente. El tubo se colocó sobre un imán durante 1 minuto y se aspiró el sobrenadante. Se añadieron 0,5 ml de tampón fosfato 20 mM para volver a suspender las microesferas con proteína G. Esta etapa de lavado se repitió una vez más.

Se agregaron 100 µl de anticuerpo de la muestra (25-37 µg/ml de cosecha en crudo o proteína purificada) a los tubos que contenían las microesferas magnéticas. La mezcla se incubó durante 30 min a 37 °C y se colocó sobre el imán para descartar el sobrenadante. Las microesferas se lavaron dos veces con 0,5 ml de tampón fosfato 20 mM y el tampón fue aspirado sobre el imán. Las microesferas unidas a los anticuerpos de la muestra se suspendieron de

nuevo en 0,5 ml de mezcla de AAL biotinilada-SA-PE (Vector de AAL biotinilada, Cat. B1395, 20 µg/ml y SA-PE, BioLegend, Cat. 40520, 0,2 mg/ml diluido a 2 µg/ml en PBS + ácido plurónico al 0,1 %) y se transfirieron en placas de 24 pocillos (Nunc, Cat. 142475) cubiertas con papel de aluminio y se incubaron 30 min en agitación a 80 rpm y 37 °C. La mezcla se suspendió de nuevo completamente y se transfirió a tubos de 15 ml (Corning, 430052 Cat.) con 10 ml de PBS + ácido plurónico al 0,1 %. Luego se realizaron dos rondas de lavado por adición de 10 ml de PBS + ácido plurónico al 0,1 %, centrifugación y eliminación del sobrenadante. El sedimento se suspendió de nuevo en 0,5 ml de PBS + ácido plurónico al 0,1 %, se filtró a través de un tubo de FACS (Falcon, Cat. 352235) y se analizó mediante FACS.

Análisis del nivel de ácido siálico de la muestra de cosecha en crudo o de la proteína recombinante purificado mediante FACS: Las microesferas magnéticas de la proteína G (Cat. S1430S, Biolabs) se suspendieron de nuevo completamente y se transfirieron 25 µl a tubos de 2 ml a temperatura ambiente. El tubo fue colocado sobre un imán durante 1 minuto y el sobrenadante fue aspirado. Se añadieron 0,5 ml de tampón fosfato 20 mM para volver a suspender las microesferas con proteína G. Esta etapa de lavado se repitió una vez más.

Se agregaron 100 µl de anticuerpo de la muestra (25 µg/ml de cosecha en crudo o proteína purificada) a los tubos que contenían las microesferas magnéticas. La mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se colocó sobre el imán para desechar el sobrenadante. Las microesferas se lavaron dos veces con 0,5 ml de tampón fosfato 20 mM y el tampón fue aspirado en el imán. Las microesferas unidas a los anticuerpos de la muestra se suspendieron de nuevo en 0,5 ml de MAA-FITC (2 mg en 2 ml, EY, Cat. F-7801-1 diluida a 25 µg/ml en PBS + ácido plurónico 0,1) y se transfirieron a placas de 24 pocillos (Nunc, Cat. 142475) cubiertas con papel de aluminio y se incubaron 30 minutos mientras se agitaba a 80 rpm a temperatura ambiente. La mezcla se suspendió de nuevo completamente y se transfirió a tubos de 15 ml (Corning, Cat. 430052) con 10 ml de PBS + ácido plurónico al 0,1 %. Luego se realizaron dos rondas de lavado por adición de 10 ml de PBS + ácido plurónico 0,1 %, con centrifugación y retirada del sobrenadante. El sedimento se suspendió de nuevo en 0,5 ml de PBS + ácido plurónico 0,1 %, se filtró a través de un tubo de FACS (Falcon, 352235 Cat.) y se analizó mediante FACS.

ELISA del anticuerpo anti-EGFR: Se utilizó ensayo ELISA para determinar la concentración de anticuerpo humano en las muestras de ensayo. El ensayo se realizó como se describe a continuación.

Placas de microtitulación se recubrieron con 2 µg/ml de IgG (H+L) anti-humana de cabra en tampón carbonato 0,1 M, pH 9,6, y se incubaron toda la noche a 4 °C. Las placas se lavaron cuatro veces con tampón de lavado (Tween-20 al 0,05 % en PBS). Las placas se bloquearon entonces con tampón de bloqueo (BSA al 1 % en PBS-T al 0,05 %), 200 µl/pocillo, durante 1 hora a RT. Después de bloquear, las placas se lavaron cuatro veces con tampón de lavado (Tween-20 al 0,05 % en PBS). Las placas cubiertas se utilizaron inmediatamente después de la preparación, o se almacenaron a -20 °C hasta su uso (en un plazo de 6 semanas). Las muestras, curva patrón y las muestras de verificación se añadieron a las placas (100 µl/pocillo) y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Las placas se lavaron de nuevo cuatro veces con tampón de lavado y alícuotas de 100 µl de IgG Fab anti-humana de cabra conjugada con HRP diluida a 8 ng/ml en tampón de ensayo (leche descremada en polvo al 1 % en PBS) y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Las placas se lavaron de nuevo cuatro veces con tampón de lavado y 100 µl de solución sustrato (TMB) y se incubaron durante aproximadamente 10 minutos a RT. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de HCl a cada pocillo. La absorbancia se midió a A₄₅₀ nm en un lector ELISA. Las soluciones de referencia se prepararon por diluciones seriadas de la muestra de referencia anti-EGFR (ERBITUX de MerckSerono) para dar un intervalo de curva patrón de 100 a 1,56 ng/ml en tampón de ensayo. Una muestra de producto en crudo de la agrupación 2390 (producido de ITL) se utilizó como una muestra de verificación. El software Magelan 5 calculó los resultados de datos ópticos. Se utilizó la ecuación logística de cuatro parámetros y los resultados de las muestras desconocidas se interpolaron automáticamente de la curva patrón expresada en ng/ml. La dilución de las muestras, preparación de la curva patrón, distribución de muestras en la placa se realizaron mediante un procesador de muestras Robotic.

Purificación de Anti-EGFR intacto y monómero Fc: Los productos anti-EGFR producidos de las agrupaciones (2390 y 2622UN) se purificaron en columna de Proteína A. Los productos purificados se analizaron como IgG intacta o monómero Fc (producido como se describe a continuación). El proceso de purificación se realizó como se indica en la Figura 2 y se llevó a cabo utilizando los sistemas AKTA Explorer.

Purificación de anti-EGFR sobre Proteína A: La columna pre-empaquetada de Sefarosa en Proteína A-MAb Select Xtra (volumen de 5 ml) se equilibró con 5-6 CV de acetato de sodio 50 mM, pH 6,8, a un caudal de 2,0 ml/min. El producto de la agrupación que contenía cosecha en crudo clarificada (~500 ml) se cargó en la columna a un caudal de 2,0 ml/min. La columna se lavó en dos etapas (7-9 CV): primer lavado con NaCl 1,5 M en acetato de sodio 50 mM, pH 6,8, seguido de un segundo lavado con acetato de sodio 50 mM, pH 6,8, un caudal de 2,0 ml/min hasta que se obtuvo la línea de referencia. El producto se eluyó en una fracción con ácido acético 20 mM, pH 3,2, a un caudal de 2,0 ml/min. El funcionamiento de la columna se realizó a RT y se supervisó por UV a 280 y 215 nm. Se ajustó el pH a 6,0 con Tris 1 M. La columna se lavó con ácido acético 0.1 M, pH 2,9, y después se limpió en su lugar con 8 CV de Guanidina HCl 4 M. La columna se volvió a equilibrar con acetato de sodio 50 mM, pH 6,8, y se almacenó en etanol 20 %.

Diálisis y concentración de mAb anti-EGFR intacto: La fracción eluida de la columna de Proteína A Sefarosa-MAB Select Xtra se dializó en tubos de diálisis SnakeSkin (tamaño de poro límite de 10 kDa de PM) dos veces frente a

"Tampón de formulación" (NaCl 100 mM, glicina 100 mM, citrato 10 mM, pH 5,8) toda la noche en relación de volumen de aproximadamente 1:100. Después de la diálisis, la muestra se concentró por ultrafiltración (membrana límite de 10 kDa de PM) en un concentrador Amicon. Esas etapas se realizaron a 2-8 °C. La concentración de producto del producto concentrado se midió por ELISA o por D.O. a 280 nm.

5 *Escisión de anticuerpo con papaína:* La fracción eluida a partir de la columna de Proteína A se dializó en tubos de diálisis SnakeSkin (tamaño de poro límite de 10 kDa de PM) dos veces frente a tampón (Tris-HCl 0,1 M, AEDT 4 mM, pH 7,6) toda la noche a 4 °C en una relación en volumen de 1:100 (proteína:tampón). Después de la diálisis, la muestra se concentró a 1 mg/ml por ultrafiltración (membrana límite de 10 kDa de PM) en un concentrador Amicon. El anti-EGFR se escindió en fracciones Fab y Fc mediante papaína. La escisión se realizó por incubación del anticuerpo a una concentración final de 1 mg/ml en Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6, AEDT 4 mM, cisteína 5 mM. La digestión se inició por la adición de papaína (diluida a 1 mg/ml con agua) para dar una relación final proteína:enzima de 100:1 (peso/peso). La digestión se llevó a cabo durante 2 horas a 37 °C, la escisión se detuvo por la adición de maleimida (33 mM) y se enfrió en hielo. La fracción dímero Fc se purificó a partir de la mezcla de escisión por cromatografía de afinidad en proteína A como se describió anteriormente en este documento. El dímero de Fc purificado se dializó en tubos de diálisis SnakeSkin (tamaño de poro límite de 10 kDa de PM) dos veces frente a PBSx1, pH 7,2, y se concentró a 2 mg/ml por ultrafiltración (membrana límite de 10 kDa de PM) en un concentrador Amicon.

10 *Reducción y alquilación:* La reducción y la alquilación se realizaron utilizando la fracción de dímero Fc en condiciones desnaturalizantes para producir el monómero Fc para la caracterización del nivel de fucosa en el sitio de N-glicosilación en la posición 297 situada en el dominio CH2 de la cadena pesada (véase antecedentes). La fracción del dímero de Fc se diluyó a 1 mg/ml con un tampón (guanidina-HCl 4 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8,8), luego se añadió el Ditiotreitól (DTT, 5 mM) y la mezcla de reacción se colocó a 75 °C durante 5 minutos. La solución de proteína se enfrió después a temperatura ambiente y se agregó solución patrón de yodoacetamida 0,5 M para alcanzar una concentración final de 15 mM. La alquilación se realizó a temperatura ambiente durante 40 minutos en la oscuridad. Después, se agregó una solución patrón de DTT 0,5 M para obtener concentración de 15 mM para ralentizar la alquilación.

15 *Diálisis y concentración de monómero de Fc anti-EGFR:* la fracción eluida de la columna de Proteína A Sefarosa-MAb Select Xtra se dializó en tubos de diálisis SnakeSkin (tamaño de poro límite de 10 kDa de PM) dos veces frente a "Tampón de formulación" (NaCl 100 mM, glicina 100 mM, citrato 10 mM, pH 5,8) toda la noche en relación de volumen de 1:100 (proteína:tampón). Después de la diálisis, la muestra se concentró por ultrafiltración (membrana límite de 10 kDa de PM) en un concentrador Amicon. Las etapas se realizaron a 2-8 °C. La concentración de producto del producto concentrado se midió por ELISA o por D.O. a 280 nm.

20 *Análisis del nivel de fucosa y de ácido siálico en la proteína purificada por Octet:* Este ensayo se utilizó para determinar el nivel de fucosa o de ácido siálico en productos purificados (IgG1 intacta o monómero Fc) por análisis cinético por Octet. El ensayo se realizó como se describe más adelante.

25 El reactivo de NHS-PEG4-biotina se utilizó para la biotilación de AAL o de MAA según las instrucciones del fabricante. La solución de reactivo biotina (1 mM en PBSx1, pH 7,2) se agregó a 1 ml de lectina (1 mg/ml) (1:5 la relación lectina:biotina). La mezcla de reacción se incubó durante 2 horas en hielo. La diálisis de la muestra se realizó frente a PBS pH 7,2 en casete Slide-A-Lyzer (tamaño de poro límite de 10 kDa de PM).

30 Los biosensores de estreptavidina (SA) se incubaron previamente en tampón cinético durante 20 min a 30 °C sin agitación antes de que se inicie el experimento. Los tampones, la lectina biotilada y el producto purificado se prepararon según la concentración requerida y se transfirieron a una placa de 96 pocillos (250 µl/pocillo), todas las etapas se realizaron a 30 °C, velocidad de agitación (1.000 rpm). La carrera se inició colocando los biosensores en los pocillos adecuados y midiendo el cambio en el espesor de la capa (en nanómetros, nm) con el tiempo, todo bajo control por ordenador. En primer lugar, los 1 µg/ml de AAL biotilada (AAL-B) o 10 µg/ml de MAA biotilada (MAA-B) se inmovilizaron sobre la superficie de las puntas de los biosensores de estreptavidina durante 40 minutos (la etapa de carga). Después, las puntas se lavaron en tampón cinético diluido (KB x1) durante 10 minutos (etapa de la línea de referencia). En la etapa de asociación, la proteína purificada se unió a la lectina biotilada durante 40 min, seguido de lavado en el tampón KBx1 para la etapa de disociación. La Figura 3 muestra un perfil típico de un análisis cinético mediante Octet. Los datos se procesaron automáticamente utilizando el software de usuario Octet versión 6.3.

35 *Análisis de perfil de carga de anticuerpo purificado por ICE 280:* El isoelectroenfoco capilar por imagen se realizó utilizando un Analizador iCE280 (Convergent Biosciences). La separación de isoformas se logra en cartuchos capilares (50 mm de longitud, columna de D.I. de 100 µm), capilar de separación que tiene su superficie interior cubierta previamente con compuestos de fluorocarbono.

40 Las muestras de anti-EGFR dializadas y purificadas se concentraron a 4 mg/ml por ultrafiltración (membrana de celulosa límite de 10 kDa de PM) en un Amicon Ultra Centrifugal Filter. La muestra para análisis se preparó mezclando 20 µl de 4 mg/ml de anti-EGFR, 80 µl de la solución patrón de migración. La separación se realiza utilizando NaOH 100 mM como catolito y H₃PO₄ 80 mM como soluciones de anolito. Los electroferogramas se adquieren por absorbancia en UV a 280 nm. Un resumen de las condiciones y concentración finales se dan en la

siguiente Tabla 3 en el presente documento.

Tabla 3

<i>Concentración final de la muestra</i>	Una ronda de 0,4 mg/ml (80 µg de proteína en el volumen final de 200 µl de solución final de muestra de anfolito es suficiente para ejecutar más de tres repeticiones).
<i>Capilar</i>	Revestimiento fluorocarbonado de columna de 50 mm de longitud, y 100 µm de D.I.
<i>Electrolitos</i>	Analito- H ₃ PO ₄ 80 mM; Catolito-NaOH 100 mM en metilcelulosa 0,1 %.
<i>Anfolitos portadores</i>	Farmalito 3-10 (concentración final 4 %)
<i>Aditivo</i>	Metilcelulosa 0,35 %
<i>Marcadores de pl interna</i>	6,14 y 9,5 (concentración final 0,5 %)
<i>Tiempo de enfoque</i>	1+8 minutos
<i>Tensión de enfoque</i>	1 minuto a 1.500 V (300 V/cm), 8 minutos a 3.000 V (600 V/cm)

- 5 *Análisis del perfil de glicosilación en monómero Fc por MS:* El monómero Fc de anticuerpo a EGFR se aisló como se describe anteriormente evaluado adicionalmente para análisis de glicano por MS.

Reproducción y productividad de las células en el ACFM

Mantenimiento de cultivo de células y cálculos de PDT

- 10 Los cultivos celulares se mantuvieron en ACFM como sigue: Las células se sembraron en tubos de 50 ml a una concentración de $0,2 \times 10^6$ células/ml y se incubaron a 37 °C en un agitador orbital a 320 rpm. Dos veces a la semana, se midieron el número y la viabilidad de las células. El cultivo se pasó por centrifugación a 100 g durante 5 minutos a 4 °C y el sedimento de células se suspendió de nuevo luego en el ACFM recién preparado precalentado.

El nivel de duplicación de la población (PDL) y el tiempo de duplicación de la población (PDT) se determinaron según las siguientes ecuaciones:

$$PDL = \frac{\log(Te) - \log(Ti)}{\log(2)}$$

$$PDT = \frac{24 * (días)}{PDL}$$

- 15 Ti- total de células vivas en la siembra

Te- total de células vivas al final

Determinación de la máxima concentración de células: Las células se sembraron en tubos de 50 ml (TPP, Cat. n.º 87050) a una concentración de $0,2 \times 10^6$ células/ml y se incubaron a 37 °C en un agitador orbital a 320 rpm. En diferentes puntos temporales se midieron número y viabilidad de las células.

- 20 *Productividad específica en ACFM:* Para la productividad específica (PCD) en ACFM, las células se sembraron en el ACFM especificado en una concentración de $0,5 \times 10^6$ células/ml en un tubo de 50 ml y se incubaron a 37 °C en una incubadora con agitador (320 rpm) durante 24 horas. Después, se extrajo medio y se determinó la concentración de producto por ELISA. El cálculo se realizó dividiendo los títulos de 24 horas entre la concentración promedio de las células en la siembra y después de 24 horas del experimento.

$$PCD = \frac{T}{\frac{Ci + Ce}{2}}$$

- 25

PCD- pg/célula/día

T- título (pg/ml)

Ci- concentración de células en la siembra (células/ml)

Ce- concentración de células después de 24 horas (células/ml)

- 5 *Crecimiento y productividad en un proceso por lotes:* Crecimiento y productividad en el proceso por lotes de la suspensión de células se realizó a una concentración de siembra de $0,2 \times 10^6$ células/pocillo en 40 ml de medio ProCHO5 y 12 ml de CHO CD EfficientFeed® A, (Invitrogen, Cat. n.º A10234-01) + CHO CD EfficientFeed® B (Invitrogen, Cat. n.º A10240-01) (1:1) en matraces Erlenmeyer de 125 ml: 125 ml (Corning, Cat. n.º WI-431143) agitando a 125 rpm, a 37 °C con 5 % de CO₂ hasta que el nivel de viabilidad disminuyó por debajo del 70 %. Se extrajeron muestras para el análisis del título del producto (por ELISA), concentración de metabolitos, concentración y viabilidad de las células cada 1-2 días desde el día tres en adelante.

Ejemplo 1

Estrategia de aislamiento de células que contiene poca fucosa

- 15 La estrategia empleada para el aislamiento de las células que expresan poca fucosa se basó en la creación de mutaciones al azar y selección de las células con el fenotipo de poca fucosa requerido.

El proceso comprendía varias etapas (como se muestra en las Figuras 4 y 5) y se inició por incubación de células de CHO-S con el agente mutagénico MTX para generar mutaciones. Luego se eliminó el MTX y las células se aislaron según una de las siguientes etapas:

- 20 1. Dos rondas de etiquetado de células con lectina específica de fucosa biotinilada (AAL o AOL biotiniladas) y el aislamiento de las células que no se unen a microesferas magnéticas revestidas con estreptavidina. Esta etapa se siguió por etiquetado de células con lectina específica de fucosa de biotinilada (AAL o AOL biotiniladas) y estreptavidina fluorescente y un solo tipo de las células de baja fluorescencia mediante FACS (Figura 4).
- 25 2. Cuatro rondas de etiquetado de células con lectina biotinilada específica de fucosa (AAL biotinilada) y estreptavidina fluorescente y clasificación de las células de baja fluorescencia mediante FACS (Figura 5).

Incubación de Células de CHO-S en MTX: Células de CHO-S en C6614 se sembraron a $0,2 \times 10^6$ células/ml en MTX 100 nM y se reprodujeron durante 10 días hasta que la viabilidad superó el 90 %. A continuación, las células se transfirieron a la misma concentración inicial para C6614 con MTX 200 nM hasta que la viabilidad superó el 90 %. Las células se congelaron y sirvieron para el aislamiento de las células que contienen poca fucosa.

Ejemplo 2

Selección de las células de poca fucosa mediante dos rondas de aislamiento con microesferas magnéticas con estreptavidina y un ciclo de clasificación mediante FACS (células ITL-LF1)

- 35 Cincuenta millones de células de CHO-S incubadas en MTX 200 nM, CHO-S de tipo salvaje y células de CHO DUKX se separaron una vez en microesferas magnéticas sembradas en placas de 96 pocillos reproducidas y transferidas en frascos T80. El número y la viabilidad de las células no unidas independientes era mayor en el caso de las células de CHO-S tratadas con MTX y mucho menor en células no tratadas con MTX. Por otra parte, las células de CHO-S incubadas en MTX alcanzaron frascos T80 en 14 días, mientras que CHO-S y CHO-DUKX alcanzaron frascos T80 solamente después de 22 días. El aislamiento posterior de células de poca fucosa se realizó sólo con células de CHO-S tratadas con MTX. El segundo aislamiento de microesferas magnéticas revestidas de estreptavidina se inició con células de 5×10^7 y las células no enlazantes seleccionadas se sembraron en placas de 96 pocillos. La clasificación mediante FACS del 1,5 % de la población de más baja fucosa se realizó con 4×10^7 células después de la recuperación y la reproducción de las células.

- 45 *Análisis del nivel de fucosa en la membrana de las células:* El análisis del nivel de fucosa en la superficie de las células mostró que después del etiquetado de las células con AAL biotinilada y SA-PE, sólo las células de CHO-S clasificadas con MTX mostraron una subpoblación con bajos niveles de fucosa en la membrana de las células. Las células independientes CHO-S (Figura 6) y CHO DUKX (datos no mostrados) presentaron nivel de fucosa normal en la membrana de las células. Un análisis adicional de células de CHO-S tratadas con MTX después de dos rondas de selección de microesferas magnéticas recubiertas de estreptavidina y una sola selección de clasificación FACS se representa en la Figura 7A y muestra el perfil de poca fucosa de las células clasificadas. El perfil de poca fucosa se encontró que era similar en ambos medios ProCHO5 y C6614 (Figura 8A).

Un enfoque similar se realizó con AOL biotinilada. El análisis de células de CHO-S tratadas con MTX etiquetadas con AOL biotinilada después de dos rondas de selección de microesferas magnéticas recubiertas de estreptavidina y una única selección de clasificación FACS se representa en la Figura 8B y muestra el perfil de poca fucosa de las

células clasificadas.

Uso de lectina Aspergillus oryzae (AOL) específica de L-fucosa para seleccionar células de poca fucosa: Células de CHO-S incubadas con MTX se etiquetaron con AOL biotinilada y se mezclaron con microesferas magnéticas recubiertas de estreptavidina. Las células se separaron sobre un imán y las células, que no se unían al imán, se reproducían posteriormente. Esta etapa se repitió dos veces. Después, las células se etiquetaron con AOL biotinilada y estreptavidina fluorescente y las células de baja fluorescencia se clasificaron mediante FACS y se reproducían posteriormente. El análisis mediante FACS se llevó a cabo por etiquetado de las células con AOL biotinilada y estreptavidina fluorescente. Los resultados mostrados en la Figura 7B muestran que AOL puede usarse también para seleccionar células que expresan baja fucosa.

Análisis del nivel de ácido siálico en la membrana de las células: El análisis del nivel de ácido siálico puede indicar no sólo la existencia de ácido siálico de los oligosacáridos, sino también asegura que, durante la selección de células de poca fucosa, no todo el oligosacárido se ha perdido. El análisis del nivel de ácido siálico en la membrana celular se realizó por incubación de las células con lectina (MAA) específica de ácido siálico conjugada con FITC seguido de análisis mediante FACS. El análisis mostró que después del etiquetado de las células con AAL biotinilada y SA-PE, tanto las células de CHO-S como de ITL-LF1 presentan niveles similares de ácido siálico en la membrana de las células en los medios ProCHO5 y C6614 (Figura 9).

Estabilidad del fenotipo de poca fucosa: El análisis del nivel de fucosa en la superficie de las células se determinó en diferentes puntos temporales después de la selección de las células de ITL-LF1 para 358 duplicaciones de la población (PDL) y demostró que después del etiquetado de las células con AAL biotinilada y SA-PE, el fenotipo de poca fucosa seguía siendo bajo y estable (Figura 10).

Tasa de crecimiento: La tasa de crecimiento de las células de ITL-LF1 se determinó durante el ensayo de estabilidad de la fucosa y se encontró que daba como resultado un PDT de 15-20 horas (Figura 11) similar a CHO-S.

Ejemplo 3

Selección de células de fucosa cero por clasificación con FACS (células de ITL-LF2)

Las células de CHO-S incubadas en MTX 200 nM se clasificaron mediante FACS para seleccionar una población de poca fucosa. El número inicial de células extraídas, la fracción de células de entrada de poca fucosa, así como el número de células clasificadas en cada ciclo de clasificación se indica en la siguiente Tabla 4 en el presente documento.

Tabla 4

Ciclo de clasificación FACS	Número inicial de células	% de células entradas	Número de células clasificadas
1	$6,5 \times 10^7$	0,2	$1,2 \times 10^{4*}$
2	$6,5 \times 10^7$	0,07	$5,8 \times 10^{3*}$
3	8×10^7	1,0	$8 \times 10^5 \#$
4	6×10^7	2,0	$1 \times 10^6 \#$

* Células contadas por Cellavista después de clasificar

Número estimado de células según la entrada en FACS.

Análisis del nivel de fucosa en la membrana de las células: El análisis del nivel de fucosa en la superficie de las células mostraron que después del etiquetado de las células con AAL biotinilada y SA-PE, la fracción de CHO-S MTX clasificada de cero fucosa aumentó con el número de clasificaciones realizadas. Tres rondas de clasificaciones dieron como resultado una población homogénea con niveles de baja fucosilación. Una cuarta clasificación se aplicó con el fin de corroborar aún más la selección de población homogénea con bajos niveles de fucosa (Figura 12). Otro análisis mostró que los niveles de fucosilación de las células ITL-LF2 eran cero en ambos medios ProCHO5 y C6614 (Figura 13).

Análisis del nivel de ácido siálico en la membrana de las células: El análisis del nivel de ácido siálico puede indicar no sólo la existencia de ácido siálico de los oligosacáridos, sino que también asegura que a lo largo de la selección de poca fucosa no se ha perdido todo el oligosacárido. El análisis mostró que después del etiquetado de células con lectina MAA específica de ácido siálico conjugada con FITC, tanto las células de CHO-S como de ITL-LF2 presentan niveles similares de ácido siálico en la membrana de las células (Figura 14).

Estabilidad del fenotipo de poca fucosa: El análisis del nivel de fucosa en la superficie de las células se determinó en

diferentes puntos temporales después de la selección de las células de poca fucosa ITL-LF2 para 370 PDL y mostró que después del etiquetado de las células con AAL biotinilada y SA-PE, el fenotipo de poca fucosa permaneció bajo y estable (Figura 15).

5 *Tasa de crecimiento:* La tasa de crecimiento de las células de ITL-LF2 se determinó durante el ensayo de estabilidad de la fucosa y se encontró que daba como resultado un PDT de 15-20 horas (Figura 16) similar a CHO-S.

10 *Concentración máxima de células:* Para determinar la concentración máxima de células en condiciones de cultivo por lotes puro (sin alimentaciones), las células ITL-LF2 se sembraron a una concentración de $0,2 \times 10^6$ células/ml en un tubo de 50 ml y se cultivaron durante siete días. La concentración máxima viable alcanzada fue de $8,4 \times 10^6$ células/ml, que es ligeramente superior que las CHO-S parental que alcanzaron un máximo de $7,5 \times 10^6$ células viables/ml (Figura 17).

Efecto de fucosa exógena en el nivel de fucosilación de células ITL-LF2: Las células de ITL-LF2 se sembraron en medio ProCHO5 en presencia de concentraciones crecientes de L-fucosa en el medio de cultivo. Los resultados de los análisis mediante FACS muestran correlación entre la concentración de fucosa añadida de forma exógena y el nivel de fucosilación en la membrana de las células (Figura 18).

15 *Crecimiento de células de ITL-LF2 en un proceso por lotes:* Para evaluar los rendimientos de las células de ITL-LF2 y compararlos con las células de CHO-S en un proceso por lotes, las células se sembraron en ProCHO5 + CHO CD EfficientFeed® y se reprodujeron durante el tiempo en el que la viabilidad permanecía superior al 60 %. Se tomaron muestras del cultivo para medir la concentración de las células, la viabilidad de las células, la concentración de los metabolitos y los títulos del producto. Los resultados muestran que las ITL-LF2 crecen durante mayor tiempo con mayor viabilidad (Figura 19B y 19C) y ~20 % mayor concentración integral de células viables (IVCC) (Figura 19) en comparación con las células de CHO-S. Las células ITL-LF2 muestran también una concentración considerablemente menor de lactato a lo largo del proceso (Figura 19), que indica que las células utilizan lactato como fuente de carbono más eficientemente que las células de CHO-S parentales.

25 *Clonación mediante la ACDU de la FACS:* La clonación de células ITL-LF2 se hizo mediante el dispositivo Unidad de Deposición Automática de Células (ACDU) del clasificador de células FACSaria. Los clones 103 y 124 surgieron de 192 pocillos sembrados con 80 % de C6366 + 20 % de ProCHO5 en dos experimentos (que refleja una recuperación de 54 y 65 %) ocho días después de la clonación. Un similar intervalo de recuperación se obtiene generalmente después de la clonación de células de CHO-S (datos no mostrados). Varios clones se reprodujeron en medio ProCHO5 y sirvieron para la caracterización del ARNm.

30 *Análisis genético de las células ITL-LF2:* La vía de fucosilación se compone de dos rutas que empiezan independientemente y convergen. Las dos rutas están compuestas de la vía *de novo* de la D-glucosa y la vía de rescate de la L-fucosa. Para investigar la causa del fenotipo de poca fucosa en células ITL-LF2, se llevó a cabo un análisis sobre la expresión de genes que están involucrados en la vía. Esto es para ver si alguno de estos genes puede interrumpirse en la secuencia o en los niveles de expresión. Los genes que fueron analizados para modelos de expresión (mediante RT-PCR y secuenciación) y nivel de expresión (mediante Q-PCR) están resaltados en la
35 Figura 20.

La secuencia de los cebadores se detalla en la siguiente Tabla 5 en el presente documento.

Tabla 5

Gen	Cebador 5' n.º	Secuencia	Cebador 3' n.º	Secuencia
Alfa-1,6-fucosiltransferasa (Fut8)	580-23	ATAATGCGGG CATGGACTGGTTC SEQ ID NO: 33	581-26	ATACTATTTT TCAGCTTCAGGATATG SEQ ID NO: 34
GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-epimerasa-reductasa (Fx)	582-23	ATAATGGGT GAGCCCCAGGGATC SEQ ID NO: 35	583-23	ATATCTAGACAA GGGACAGCAGG SEQ ID NO: 36
GDP-manosa-4,6-deshidratasa (GMD)- cebadores de exones 5-6	586-26	ATAATGGCTC ACGCTCCCGCTAGCTG SEQ ID NO: 37	587-22	ATATCAGGCGTT GGGGTTGGTT SEQ ID NO: 38

<i>Gen</i>	<i>Cebador 5' n.º</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Cebador 3' n.º</i>	<i>Secuencia</i>
GDP-beta-L-fucosa-pirofosforilasa (GFPP)	584-23	ATAATGGCGTC TCTGCGCGAAGC SEQ ID NO: 39	585-23	ATATTAAGATT TCTCCGAATCAG SEQ ID NO: 40

Para analizar los genes de la vía de fucosilación expresados en ITL-LF2 en comparación con las células parentales de CHO-S, el ARN total se extrajo de ambas líneas de células y se sometió a transcripción inversa (RT) después de PCR con cebadores específicos del gen que capturan toda la región codificante. Los ADNc resultantes se pasaron entonces sobre geles de agarosa para analizar si había diferencias en los tamaños obtenidos a partir de las células parentales de CHO-S y de ITL-LF2. Las bandas que se obtuvieron se analizaron además por secuenciación. La Figura 21 muestra los resultados obtenidos después de RT-PCR para los cuatro genes ensayados.

ADNc de tamaños similares se obtuvieron para los genes GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-epimerasa-reductasa (Fx) y alfa-1,6-fucosiltransferasa (Fut8). El análisis de secuenciación confirmó que los ADNc de ambos genes son idénticos en las dos líneas de células. El GDP-beta-L-fucosa-pirofosforilasa (PPFV) era indetectable en las células de CHO-S (comprobado en varios análisis de RT-PCR) pero podía detectarse una banda muy tenue en el tamaño esperado en las células de ITL-LF2 (flecha en la Figura 21). La secuenciación no se llevó a cabo en este caso.

Para el gen GMD, una banda del tamaño previsto se detectó en células de CHO-S, y la secuenciación reveló que se esperaba ARNm GMD de longitud completa. Sin embargo, en las células ITL-LF2 se detectaron dos bandas (estas dos bandas se ven a veces como una banda "gruesa" en un gel, lo cual indica un doblete), ambas más pequeñas que la ORF de longitud completa. La secuenciación reveló la presencia de dos variantes de empalme: una (indicada variante de empalme 1-SV1) que contienen una eliminación de los exones 8 y 9 (Figura 22A) y la segunda (variante de empalme 2-SV2) con una eliminación de los exones 3 y 4 (Figura 22B). Las secuencias de proteínas de la GMD de longitud completa y ambas variantes de empalme se muestran en las SEQ ID N°: 23-25. Secuencias de ADN de la GMD de longitud completa y ambas variantes de empalme están descritas en las SEQ ID N°: 26-28. Además una pequeña banda de ~250 pb se encontró tanto en las células de CHO-S como en las de ITL-LF2. Debido al hecho de que esta pequeña banda se detectó en ambos tipos de células, esta banda no parece ser la razón de las diferencias observadas en la glicosilación en ambos tipos de estas células. Por lo tanto, esta banda se conoce como "pequeña" banda pero no se analizó más.

El análisis de la secuencia de variantes de empalme (SV) de GMD reveló la presencia de un único sitio de enzima de restricción para cada variante de empalme (BglII en el exón 4 y XmnI en el exón 8 (véase la Figura 23A). Para una verificación posterior del modelo de ARNm en células de CHO-S y ITL-LF2, se llevó a cabo una RT-PCR adicional de cada tipo de célula. El ADNc fue entonces dividido en tres partes iguales, una sin tratamiento, otra digerida con BglII y la tercera digerida con XmnI. Todas las reacciones se ejecutan después en un gel de agarosa y las bandas se detectaron y compararon con un marcador de tamaño de ADN (Figura 23B). Lo lógico tras este experimento era que si las células ITL-LF2 contienen una mezcla de las dos SV, la digestión con una de las enzimas de restricción dejará una mayor banda de la SV que no contiene el sitio de restricción específico y aparecerán nuevas bandas adicionales en los tamaños esperados para la otra SV que contiene el sitio de restricción específico. Los tamaños esperados de las bandas se obtuvieron en todas las digestiones, indicando que en efecto en ITL-LF2 las dos variantes de empalme existen como una mezcla. Además, la banda más grande (mayor) después de la restricción (el SV que no fue digerido) se retiró del gel y se secuenció. Los resultados mostraron la presencia de la SV esperada en cada caso: SV2 permaneció como una banda mayor en la fracción de BglII digerido y SV1 permaneció en el fragmento de XmnI digerido (para la explicación de los tamaños de fragmento obtenidos, véase la siguiente Tabla 6 en el presente documento).

Tabla 6

Calle n.º	Tipo de célula	Sin corte	Resultados de lo digerido con BglII*	Resultados de lo digerido con XmnI
1	CHO-S	1,1 (longitud completa) 0,25 (banda "pequeña")		
2	ITL-LF2	0,9-0,92 (SV1 y SV2) 0,25 (banda "pequeña")		

Calle n.º	Tipo de célula	Sin corte	Resultados de lo digerido con BgIII*	Resultados de lo digerido con XmnI
3	CHO-S		1,1 (fragmento de longitud completa no digerido) 0,8 (fragmento digerido) 0,3 (fragmento digerido) 0,25 (banda "pequeña")	
4	ITL-LF2		0,92 (SV2 no digerido) 0,59 (fragmento digerido) 0,31 (fragmento digerido) 0,25 (banda "pequeña")	
5	CHO-S			0,86 (fragmento digerido) 0,26 (fragmento digerido + banda "pequeña")
6	ITL-LF2			0,91 (SV1 no digerido) 0,67 (fragmento digerido) 0,26 (fragmento digerido + banda "pequeña")

*La digestión de BgIII de ADNc a partir de células de CHO-S es incompleta

Niveles de expresión de genes implicados en síntesis de fucosa: El nivel de expresión de genes implicados en la vía de fucosilación se determinó por Q-PCR con cebadores y sondas específicos del gen. No se detectó ningún cambio significativo en los niveles de expresión de ninguno de los genes ensayados (Figura 24). Los resultados indican que los cambios en los niveles de fucosilación de las células de ITL-LF2 no eran debidos al nivel de expresión de los ARNm de GMD.

Preparación de un Pre-MCB (preparaciones, descongelación, esterilidad y ensayo de micoplasma): Las células ITL-LF2 generadas tras cuatro ciclos de selección de poca fucosa mediante FACS se reprodujeron y congelaron. Estas células se descongelaron para propagarlas y preparar una PreMCB. Se prepararon bancos de células pre-Master (pre-MCB) que contenían 60 ampollas con 10×10^6 células por vial.

Viabilidad, esterilidad y Ensayos de micoplasma de los bancos de células pre-master: Una ampolla de las células pre-MCB de ITL-LF2 se descongeló 11 días después de la congelación. La viabilidad medida inmediatamente después de descongelar era de 98,3 %. Las células se reprodujeron durante tres ciclos de crecimiento y se encontró que eran 99,0 % viables, respectivamente.

Los Pre-MCB se ensayaron en cuanto a esterilidad y contaminación por micoplasma. Se encontró que el banco era estéril y exento de micoplasma.

Ejemplo 4

Las células ITL-LF2 recuperan la fucosilación después de la transfección con gen GMD de wt

En las células ITL-LF2 se encontró que el gen GMD (que participa en la vía de síntesis *de novo* de fucosa) mostró dos variantes de empalme y nada de ARNm de longitud completa, que difiere del modelo observado en las células de CHO-S de tipo salvaje. Para evaluar si la falta de proteína GMD de longitud completa es la causa del fenotipo de poca fucosa observado en células ITL-LF2, las células fueron transfectadas con ADNc GMD de longitud completa después de análisis mediante FACS de los niveles de fucosilación.

Construcción de plásmido MB-129 (PCMV-P-GMD): El ADNc GMD de longitud completa fue creado por RT-PCR en ARN total extraído de las células de CHO-S de wt utilizando los cebadores 586-26 y 587-22 representados en la Tabla 5, anteriormente en el presente documento. Para clonar este gen en el vector requerido, se llevó a cabo una etapa adicional de la PCR con cebadores 700-45 y 701-30 (para más detalles véase la siguiente Tabla 7 en el

presente documento) que permitió la adición de sitios de enzima de restricción (RE) (5' SwaI y 3' XhoI) requeridos para la etapa de la clonación.

Tabla 7

Construcción de vector	Molde utilizado	Fragmento obtenido	Cebador 5'		Cebador 3'	
			N.º	Secuencia*	N.º	Secuencia*
MB-127 (pTT5-APERA-HC)	Tándem PGL3 APERA EMCV- PAC1-DHFR-872	HindIII-APERAHC- NotI	690-36	GCTTGAAT TCAAGCTT GTAGCGAT CGCCGCCA CCAT SEQ ID NO: 41	691-38	GGATCCGC GGCCGCTA CGCCGCCA TCAGATCT TTATCA SEQ ID NO: 42
MB-128 (pTT5-APERA-LC)	Tándem PGL3 APERA EMCV- PAC1-DHFR-872	HindIII-APERALC- NotI	692-36	GCTTGAAT TCAAGCTT CTAGTACG CGTGTTTA AACC SEQ ID NO: 43	693-32	GCGGCCGC TGTCCGCG CCTTACTA ACACTCTC SEQ ID NO: 44
MB-129 (pCMV-P-GMD)	ADNc de GMD a partir de células de CHO wt	SwaI-GMD-XhoI	700-45	GTCCGATA TCATTTAA ATCGCCAC CATGGCTC ACGCTCCC GCTAG SEQ ID NO: 45	701-30	ATCCCTCG AGTTATCA GGCGTTGG GGTTGGTTC SEQ ID NO: 46

- 5 El fragmento PCR fue digerido con SwaI y XhoI y se ligó a vector pCMV-P que fue digerido con las mismas enzimas de restricción.

El vector resultante (MB-129) contiene el gen GMD en el promotor hCMV con el gen de resistencia a la puomicina como un marcador de selección en una casete independiente como se ilustra en la Figura 25.

- 10 *Expresión de fucosa de células transfectadas:* Las células de ITL-LF2 y CHO-S fueron transfectadas con el plásmido lineal que contiene la secuencia codificante GMD (pCMV-P-GMD) por triplicado utilizando reactivo lipofectamina. Las células ITL-LF2 fueron recuperadas durante tres días en 50 % de C6614 (Sigma) y 50 % de C6366 (Sigma) complementado con 13,6 mg/l de hipoxantina/3,9 mg/l de timidina (HT) y 10 µg/ml de fucosa. Luego, las células transfectadas se seleccionaron en 50 % de C6614 (Sigma) y 50 % de C6366 (Sigma) complementado con 10 µg/ml de fucosa y 10 µg/ml de puomicina. Después de la recuperación completa, las agrupaciones ITL-LF2 transfectadas fueron transferidas al medio de ProCHO5 que contiene 10 µg/ml de puomicina sin fucosa.

- 15 El nivel de fucosilación se analizó mediante FACS en células ITL-LF2 GMD transfectadas y se compararon con los niveles de fucosilación de CHO-S (control positivo) y las células de ITL-LF2 (control negativo) (Figura 26). Los resultados demuestran que aproximadamente el 45 % de la población expresan proteínas con niveles de fucosilación similares a los de las células de CHO-S. El resto de la población (~55 %) muestra niveles más bajos de fucosilación. Sin embargo, la población con el bajo nivel de fucosilación tenía niveles más altos de fucosilación que las células ITL-LF2 no transfectadas. Los resultados anteriores indican que fucosilación era reconstituida en las células ITL-LF2 después de la transfección con GMD que contienen el plásmido y confirma que el defecto en el ARNm de la GMD era la razón del bajo nivel de fucosilación en las células de ITL-LF2. La razón de la existencia de dos subpoblaciones de células ITL-LF2 GMD transfectadas que tienen diferente nivel de fucosilación puede derivar de la rigurosidad de la selección de puomicina. Se supone que ambas subpoblaciones poco y muy fucosiladas expresan puomicina N-acetil-transferasa (PAC) en una cantidad suficiente para sobrevivir a la selección de puomicina, pero no podría haber ninguna correlación directa entre el PAC y la expresión de GMD. Por lo tanto, las dos subpoblaciones expresan diferentes niveles de proteína GMD que da como resultado diferentes niveles de fucosilación.

- 30 Ejemplo 5

Análisis de las células ITL-LF2 después de transfecciones estables y transitorias

Transfecciones estables de células ITL-LF y CHO-S: Las células de ITL-LF2 y de CHO-S fueron transfectadas con el plásmido lineal que contiene la secuencia codificante mAb anti-EGFR (tándem PGL3 anti-EGFR mAb EMCV-PAC1-

DHFR) por triplicado (Figura 27) usando reactivo lipofectamina.

5 Las células ITL-LF2 fueron recuperadas durante tres días en 50 % de C6614 (Sigma) y 50 % de C6366 (Sigma) complementadas con 13,6 mg/l de hipoxantina/3,9 mg/l de timidina (HT) y 10 µg/ml de fucosa. Luego, las células transfectadas se seleccionaron en 50 % de C6614 (Sigma) y 50 % de C6366 (Sigma) complementadas con 10 µg/ml de fucosa y 5-10 µg/ml de puromicina. Después de ocho días las células se transfirieron a medio C6614 con 10 µg/ml de fucosa y 25 µg/ml de puromicina. Después de la recuperación completa, las agrupaciones de ITL-LF2 transfectadas se combinaron para crear una agrupación combinada de células transfectadas de poca fucosa. La fucosa fue retirada del medio y más tarde las células se transfirieron a medio de ProCHO5 que contenía 10 µg/ml de puromicina.

10 Las células de CHO-S fueron recuperadas durante tres días en medio ProCHO5 (Sigma) complementado con 27,2 mg/l de hipoxantina/7,8 mg/l de timidina (HT) y 10 µg/ml de fucosa. Después, las células transfectadas fueron seleccionadas en medio ProCHO5 complementado con 10 µg/ml de fucosa y 25 µg/ml de puromicina. Después de 12 días las células de CHO-S se recuperaron completamente.

15 La expresión de anticuerpos recombinantes se analizó por ELISA, se encontró que era sólo ligeramente inferior en células ITL-LF2 en comparación con células de CHO-S transfectadas (Figura 28).

Análisis mediante FACS del nivel de fucosa en la membrana de células transfectadas con mAb anti-EGFR: El análisis de los niveles de fucosa en la membrana de las células de células transfectadas con mAb anti-EGFR reproducidas en medio C6614 antes y después de la retirada de fucosa muestra que tras la retirada de fucosa la fucosilación cae hasta el nivel bajo inicial obtenido en ausencia de fucosa (Figura 29).

20 *Análisis mediante FACS del nivel de ácido siálico en la membrana de las células transfectadas con mAb anti-EGFR:* El análisis mostró que después de la transfección y después del etiquetado de células con una lectina específica de ácido siálico: MAA conjugada con FITC, ambas células de CHO-S y de ITL-LF2 transfectadas con anti-EGFR presentan niveles similares de ácido siálico en la membrana de sus células. Estos niveles son también similares a los niveles de células CHO-S y ITL-LF2 no transfectadas (Figura 30).

25 *Construcción de vectores mAb pTT5-anti-EGFR para transfecciones transitorias:* Para las transfecciones transitorias de mAb anti-EGFR en células ITL-LF2, dos vectores fueron construidos en el esqueleto del vector pTT5. Un vector contenía la cadena ligera (LC) y el otro la cadena pesada (HC) del anticuerpo mAb EFGR.

30 Para crear el vector MB-127, un fragmento PCR de 1.476 pb que contienen la HC de mAb EFGR fue creado utilizando cebadores 690-36 y 691-38 sobre el vector tándem PGL3 anti-EGFR mAb EMCV-PAC1-DHFR-872. El fragmento fue digerido con HindIII y NotI y ligado en el vector pTT5 que fue digerido con la misma RE. El vector resultante puede verse en la Figura 31A.

35 Para crear vector MB-128, un fragmento de 762 pb que contiene la LC mAb EFGR se creó utilizando cebadores 692-36 y 693-32 sobre vector tándem PGL3 anti-EGFR mAb EMCV-PAC1-DHFR-872. El fragmento fue digerido con HindIII y NotI y ligado en el vector pTT5 que fue digerido con la misma RE. El vector resultante puede verse en la Figura 31B.

Transfecciones transitorias de células ITL-LF y CHO-S: Las células de ITL-LF2 y de CHO-S se transfectaron con mAb anti-EGFR que contiene vector PTT5 (Figura 30B) utilizando reactivo de PEI por triplicado. Luego se realizaron dos protocolos de transfección:

40 *Transfección en ProCHO5:* Las células de CHO-S y de ITL-LF2 fueron transfectadas en medio que contiene ProCHO5 a 37 °C y 24 horas después de la transfección de células de CHO-S se complementaron con ácido valproico y se incubaron a 31 °C. La concentración de proteína en las células de ITL-LF2 y de CHO-S bajo las condiciones establecidas anteriores era de 12,5 µg/ml y 25 µg/ml, respectivamente (Figura 32).

Ejemplo 6

Análisis de anticuerpos recombinantes

45 *Análisis de los niveles de fucosa y ácido siálico en material en crudo o en anticuerpos purificados mediante FACS:* Los anticuerpos que contienen material en crudo o purificado se unieron a las microesferas magnéticas con proteína G seguido por tinción con una lectina específica etiquetada de forma fluorescente (como se ilustra en la Figura 33). Las muestras de anticuerpos se analizaron mediante FACS para detectar los niveles de residuos de azúcar.

50 *Análisis mediante FACS del nivel de fucosa en material de cosecha en crudo a partir de células transfectadas de forma transitoria:* Las muestras de cosecha en crudo de la transfección transitoria se concentraron por filtro de centrifugado (Amicon ultra cat. n.º UFC801024) para alcanzar una concentración superior a 25 µg/ml. Los análisis se hicieron como se indica en la sección Procedimientos a concentración de producto de proteína de 32-37 µg/ml. Los resultados muestran claramente que las células ITL-LF2 transfectadas expresan la proteína mAb anti-EGFR con bajos niveles de fucosa (Figura 33) similares a los del material de las células transfectadas de forma estable (Figura

37) y en correlación con los niveles detectados en la membrana de las células (Figura 29).

Análisis mediante FACS del nivel de fucosa en la cosecha en crudo de las agrupaciones estables: Se recogieron muestras de la cosecha en crudo preparadas a partir del lote de cultivo celular. Los análisis se hicieron mediante FACS como se describe en la sección Procedimientos a una concentración de proteína de 25 µg/ml. Los resultados muestran claramente que las células ITL-LF2 transfectadas expresan la proteína mAb anti-EGFR con bajos niveles de fucosa (Figura 35) similares a los del material de las células transfectadas de forma transitoria (Figura 34) y en correlación con los niveles detectados en las membranas de las células (Figura 29).

Análisis mediante FACS del nivel de ácido siálico en la cosecha en crudo de las agrupaciones estables: Se recogieron muestras de cosecha en crudo preparadas a partir de lotes de cultivo celular. Los análisis se realizaron mediante FACS como se describe en la sección Procedimientos a una concentración de proteína de 25 µg/ml. Los resultados muestran claramente que las células de CHO-S y de ITL-LF2 transfectadas expresan la proteína mAb anti-EGFR con niveles similares de ácido siálico (Figura 36) en correlación con los niveles detectados en la membrana de las células (Figura 30).

Análisis mediante FACS del nivel de fucosa en el producto purificado: El análisis mediante FACS del producto purificado mAb anti-EGFR a partir de células de ITL-LF2 transfectadas de forma estable mostraron niveles bajos de fucosa mientras que el producto purificado a partir de las células de CHO-S parentales contenían niveles normales de fucosa (Figura 37). Los niveles de fucosa están en correlación con los niveles detectados en la membrana de las células (Figura 29) y en material en crudo (Figura 34).

Análisis mediante FACS del nivel de ácido siálico en el material purificado: El análisis mediante FACS del material mAb anti-EGFR purificado de las células transfectadas de forma estable mostraron niveles similares de ácido siálico en el material de las células de ITL-LF2 y CHO-S (Figura 38). Los niveles de ácido siálico están en correlación con los niveles detectados en la membrana de las células (Figura 30) y en material en crudo (Figura 36).

Determinación de los niveles de fucosa en mAb anti-EGFR intacto por Octet: La fracción purificada de mAb anti-EGFR intacto eluida de la columna de Proteína A se dializó frente al tampón de la formulación y se concentró. El nivel de fucosa en el mAb anti-EGFR purificado intacto producido por células de CHO-S de tipo salvaje o ITL-LF2 se determinó mediante la unión de mAb anti-EGFR a lectina Aleuria aurantia (AAL) biotinilada. El ensayo se realizó en el sistema de Octet QK utilizando el módulo de análisis cinético. En primer lugar, la AAL biotinilada se unió a un biosensor de estreptavidina recubierto, y luego la fucosa en el anticuerpo anti-EGFR se unió a lectina AAL. El análisis del mAb anti-EGFR intacto permite la detección del residuo de fucosilación Fab solamente, puesto que el sitio de fucosilación (ASN 297) situado en la región de la Fc no es accesible para la AAL (datos no mostrados). Para detectar el sitio de fucosilación en la región de la Fc de un monómero de la Fc debería estar preparado.

Los resultados muestran bajos niveles de fucosa en mAb anti-EGFR intacto producido por las células ITL-LF2, en relación con el producto producido por las células CHO-S transfectadas (Figura 39).

Determinación de los niveles de ácido siálico en mAb anti-EGFR intacto por Octet: El mAb anti-EGFR producido por células de CHO-S de tipo salvaje (WT) o células de ITL-LF2 se evaluaron asimismo niveles de sialilación. La fracción purificada mAb anti-EGFR intacta eluida de la columna de Proteína A se dializó frente al tampón de formulación y se concentró. Los niveles de ácido siálico en el mAb anti-EGFR purificado intacto se determinaron uniendo el producto a lectina Maackia amurensis (MAA) biotinilada. El ensayo se realizó en el sistema de Octet QK utilizando el módulo de análisis cinético. En primer lugar, la MAA biotinilada se unió a un biosensor recubierto de estreptavidina, y después el ácido siálico en el mAb anti-EGFR se unió a la lectina MAA. Los resultados (Figura 40) muestran que los niveles de ácido siálico son similares en ambos productos producidos por las células de ITL-LF2 y de CHO-S. Los resultados implican que la única diferencia en el producto producido por las células de ITL-LF2 y de CHO-S es el nivel de fucosa, considerando que, probablemente, el perfil total de N-glicosilación no ha cambiado.

Determinación de los niveles de fucosa en el monómero de la Fc anti-EGFR por Octet: Las fracciones Fc de anti-EGFR se prepararon por escisión de Papaína del anticuerpo intacto, después la reducción y la alquilación se siguieron por etapas de diálisis y concentración. Las fracciones de monómero Fc se prepararon a partir del producto producido por células de CHO-S de tipo salvaje y células de ITL-LF2. Los niveles de fucosa en el monómero Fc se determinaron uniendo las fracciones a AAL biotinilada que se unió previamente a biosensores revestidos de estreptavidina del Octet QK. Los resultados muestran el bajo nivel de fucosa en monómero Fc anti-EGFR de células ITL-LF2, en relación con el producto producido por las células de CHO-S (Figura 41).

Determinación de los niveles de ácido siálico en monómero Fc anti-EGFR por Octet: Las fracciones de la Fc de mAb anti-EGFR se prepararon por escisión de Papaína de anticuerpo intacto, después reducción y alquilación se siguieron por diálisis y concentración. Las fracciones de monómeros dializados y concentrados Fc se prepararon a partir del producto producido por CHO-S de tipo salvaje e ITL-LF2. El nivel de fucosa en el monómero Fc se determinó uniendo las fracciones a una MAA biotinilada que se unió previamente a biosensores recubiertos de estreptavidina del sistema Octet QK. Los resultados muestran niveles similares de sialilación en la fracción Fc purificada de ambas células de CHO-S y de ITL-LF2 (Figura 42).

Isoelectroenfoque capilar del producto purificado de agrupaciones anti-EGFR: El producto mAb anti-EGFR producido

por células de CHO-S de tipo salvaje o ITL-LF2 se purificó en una columna de Proteína A, se dializó frente a tampón de formulación y se concentró. El perfil de carga de los productos intactos se analizó por electroforesis capilar en iCE 280. La Figura 43 muestra la comparación entre los valores de pI de los productos purificados a partir de células de CHO-S y células ITL-LF2. Los resultados muestran que el perfil de carga de producto producido por las células de CHO-S e ITL-LF2 son similares, mientras la muestra de referencia parece ser un poco más básica en comparación con ellos, probablemente debido a la diferencia en las líneas de células y condiciones de cultivo.

Análisis por espectrometría de masas de Fracciones Fc anti-EGFR: El mAb intacto anti-EGFR purificado, se escindió mediante Papaína en fracciones Fab y Fc producidas, después la fracción Fc se purificó seguido por diálisis y concentración. Las muestras Fc anti-EGFR a partir de células de CHO-S de tipo salvaje e ITL-LF2 se analizaron en el EMD Serono Research Center (BillERICA, EE.UU.) por espectrometría de masas para la evaluación del nivel de fucosilación en el sitio de glicosilación de la región Fc conservada. Las estructuras de glicano observadas fueron principalmente biantenarias con 0, 1 y 2 galactosas G0-F, G1-F y G2-F, respectivamente, como se describe en la Figura 44. El nivel de galactosa es mayor en el material derivado de CHO-S como se indica por la fracción superior con uno y principalmente dos residuos de galactosa. Los resultados muestran que la región Fc de IgG de producto producida por las células de CHO-S de tipo salvaje estaba totalmente fucosilada mientras que la región Fc del producto producido por las células de ITL-LF2 era afucosilada.

Ejemplo 7

Efecto de la adición de fucosa exógena sobre el nivel de fucosilación de las células ITL-LF2 transfectadas con mAb anti-EGFR

Las células ITL-LF2 transfectadas con mAb anti-EGFR se sembraron en medio ProCHO5 en presencia de concentraciones crecientes de L-fucosa en el medio de cultivo. Las células así como el material en crudo se analizaron 4 días después de la siembra de la célula. Los resultados del análisis mediante FACS muestran la correlación entre la concentración de fucosa añadida de forma exógena y el nivel de fucosilación en la membrana de las células (Figura 45), así como en el mAb anti-EGFR recombinante (Figura 46). La fucosilación máxima se obtuvo a 10 µg/ml de fucosa tanto en las células como en el mAb anti-EGFR recombinante. Los niveles más bajos de la fucosilación fueron detectados en las células de 1 µg/ml de fucosa externa, mientras que en el mAb anti-EGFR recombinante el nivel más bajo de fucosilación se detectó a una concentración mayor de fucosa externa de 2,5 µg/ml.

Basado en los resultados anteriores, se creó una curva de calibración donde la fluorescencia máxima fue interpretada como 100 % fucosilación, y la muestra obtenida sin fucosa se determinó como 0 % fucosilación. El nivel de fluorescencia a 0 % de fucosa externa se sustrajo del nivel de fluorescencia obtenido a cada concentración de fucosa externa y luego el porcentaje de fucosilación se calculó como el nivel de fluorescencia a cada concentración de fucosa dividido entre el nivel de fluorescencia a 100 % de fucosilación (saturación de fucosa). De estas cifras se extrajo una curva (Figura 47).

Curva de calibración de monómero de Fc mAb anti-EGFR fucosilado y afucosilado basado en los resultados por Octet QK: Las fracciones Fc de anti-EGFR se prepararon por escisión de Papaína del anticuerpo intacto, seguido por reducción, diálisis por alquilación y concentración. Las fracciones de monómero Fc se prepararon del producto producido por las células CHO-S de tipo salvaje y las células ITL-LF2. Muestras para la curva de calibración se prepararon mezclando diferentes proporciones de producto de las células de CHO-S (agrupación de fucosa 100 %) y el producto de las células ITL-LF2 (0 % de fucosa). Los niveles de fucosa en cada muestra se determinaron uniendo la muestra mixta con a AAL biotinilada que se unió previamente a biosensores recubiertos de estreptavidina del sistema Octet QK. La etapa de asociación del análisis cinético se realizó mediante el sistema Octet QK. Cada curva se corresponde con un % específico de fucosa en la muestra (Figura 48A). La correlación lineal entre el nivel de enlace y el % de material fucosilado en la curva de calibración (Figura 48B) puede servir para el cálculo del nivel fucosilado de muestras requeridas. Los resultados muestran que el ensayo es sensible y se puede distinguir con resultados altos entre niveles cercanos de fucosa. La correlación lineal entre el nivel de enlace y el % de material fucosilado implica que un porcentaje requerido de fucosilación puede obtenerse por adición de una cierta concentración de fucosa exógena.

Análisis de fracciones de monómero Fc anti-EGFR parcialmente fucosiladas por Octet: Según los resultados de los análisis mediante FACS que muestran la correlación entre la concentración de fucosa añadida de forma exógena y el nivel de fucosilación en la membrana de las células, los niveles de fucosa en el mAb anti-EGFR purificado se determinaron por Octet. Las células ITL-LF2 que expresan mAb anti-EGFR se cultivaron en 5 lotes en paralelo durante 4 días en presencia de 3,5 µg/ml de fucosa y el medio se cosechó. El mAb anti-EGFR se purificó y se escindió mediante Papaína seguida por reducción y alquilación para el aislamiento de la fracción de monómero Fc. El nivel de fucosa se analizó como se describió anteriormente. Los resultados muestran que la adición de 3,5 µg/ml de fucosa al medio genera ~15 % de nivel de fucosilación con una variabilidad de +/-0,5 % en proteína purificada a partir de cinco lotes diferentes (Figura 49). Esto indica que el nivel deseado de fucosa es reproducible.

Análisis de Fracciones de monómero Fc anti-EGFR parcialmente fucosiladas por espectrometría de masas: El nivel de fucosilación de fracciones de monómero de mAb anti-EGFR se analizaron por espectrometría de masas. Las

células ITL-LF2 con mAb anti-EGFR se cultivaron en 5 lotes en paralelo durante 4 días en presencia de 3,5 µg/ml fucosa y el medio se cosechó. El mAb anti-EGFR fue purificado y escindido mediante papaína seguida de reducción y alquilación para el aislamiento de la fracción de monómero Fc como se describió anteriormente.

5 Las estructuras de glicano observadas fueron principalmente biantenarias con residuos de galactosa 0, 1 y 2 G0-F, G0-1 y G0-2, respectivamente, como se describe en la siguiente Tabla 8, en el presente documento. El nivel de galactosa es mayor en el material derivado de CHO-S como lo indica la mayor fracción de uno y principalmente dos residuos de galactosa. Los resultados demuestran que la adición de 3,5 µg/ml de fucosa al medio induce 15,6 % de nivel de fucosilación con variabilidad de +/-1,7 % en proteína de cinco lotes diferentes. Estos resultados están en correlación con los resultados obtenidos mediante Octet (Figura 49). Los resultados muestran que la región Fc de IgG de producto producido por las células de CHO-S de tipo salvaje estaba totalmente fucosilada mientras que la región Fc del producto producido por las células de ITL-LF2 estaba afucosilada. Se encontró muy buena correlación entre el Octet y los resultados de la espectrometría de masas en términos de los niveles de fucosilación.

Tabla 8

Possible masa de Glicano	1298	1444	1460	1606	1623	1769	1509	
Estructura sugerida							Desconocida	Nivel de fucosilación
ID de la muestra	G0	G0f	G1	G1f	G2	G2f		
CHO-S (WT)		30,10 %		60,70 %		9,20 %		100 %
ITL-LF2	49,80 %		40,80 %		5,10 %		4,30 %	0 %
ITL-LF2 (3,5F/1)	41,70 %	6,50 %	37,60 %	7,70 %	6,40 %			14,20 %
ITL-LF2 (3,5F/2)	37,50 %	7,10 %	38,80 %	9,60 %	7,00 %			16,70 %
ITL-LF2 (3,5F/3)	37,20 %	7,10 %	38,70 %	10,70 %	6,30 %			17,80 %
ITL-LF2 (3,5F/4)	36,70 %	5,50 %	37,90 %	8,10 %	6,20 %		5,50 %	13,60 %
ITL-LF2 (3,5F/5)	38,20 %	6,50 %	39,70 %	9,00 %	6,50 %			15,50 %

GluNac-■; Manosa-⊖; Fucosa-▲; Galactosa-○

15

Conclusiones y discusión

Recientemente se desarrollaron varios enfoques para reducir los niveles de fucosilación de anticuerpos recombinantes para la obtención de una ADCC mejorada. Desarrollo de la línea celular de ITL-LF2 a partir de células de CHO-S se realizó satisfactoriamente en este trabajo por incubación de células en presencia de metotrexato seguida por una eficiente selección de células con los niveles más bajos de fucosa, es decir, cero fucosa en la membrana de las células. Las mutaciones y la amplificación del gen creado por incubación de las células en presencia de metotrexato (MTX) estaba descrito previamente en la documentación (Schimke 1988; Coquelle, Pipiras y col., 1997; Singer, Mesner y col., 2000).

Después del tratamiento con MTX, el reactivo mutagénico se retiró para las siguientes etapas de la selección. La selección se realizó por aislamiento en microesferas magnéticas (Figura 7) y/o por clasificación mediante FACS

25

(Figura 12) utilizando la lectina específica de fucosa, la lectina Aleuria aurantia (AAL), que tiene una alta afinidad por el residuo aFuc1-6GlcNA presente en el sitio de glicosilación de la Fc. Aunque la selección de las células que expresan cero fucosa se hizo según los niveles de fucosa en la membrana de las células, se encontraron niveles cero de fucosa en el anticuerpo recombinante (mAb anti-EGFR) expresado en estas células, por diversos procedimientos de análisis (Figuras 34-43). El mAb anti-EGFR que sirvió como un anticuerpo modelo presenta dos sitios de N-glicosilación, uno en el fragmento Fab y el otro que es importante para la actividad ADCC en el CH2 de Fc. Los análisis por Octet y por MS se realizaron no solo en el mAb intacto sino también en el monómero de Fc con el residuo de fucosa relevante de la ADCC. Los resultados muestran niveles cero de fucosa en el residuo de fucosa relevante de la ADCC de material producido por las células ITL-LF2. El fenotipo de fucosa cero de las células ITL-LF2 se encontró que era estable para 370 PDL ensayadas (Figura 15). El desarrollo de las células que expresan proteínas recombinantes y la producción en biorreactores se completa habitualmente dentro de ~200 PDL de las células. La duración del experimento de estabilidad de fucosa cero (370 PDL) es mayor que eso, de manera que se espera que la ITL-LF2 permanecerá estable durante todo el proceso de desarrollo y producción del clon. Se encontró que la mayoría de las características de la línea celular ITL-LF2 eran similares a CHO-S como se deduce de la siguiente Tabla 9 en el presente documento. La tasa de crecimiento, la concentración celular máxima, el nivel de ácido siálico de las proteínas de las células y del anticuerpo recombinante expresado en estas células y el nivel de expresión de mAb anti-EGFR eran muy similares. Además, las células de ITL-LF2 eran superiores a las células de CHO-S en viabilidad y como resultado en la concentración integral de células viables (IVCC) determinadas en un proceso por lotes. Este fenómeno podría ser un resultado del riguroso proceso de selección que las células pasaron a lo largo de los ciclos de clasificación para conocer el bajo contenido de fucosa en la membrana de las células.

La transfección estable se realizó con alta eficiencia para células ITL-LF2 en presencia de fucosa exógena. Por otra parte, la recuperación de las células ITL-LF2 de la transfección era más rápida que la de las células de CHO-S, aunque en ausencia de fucosa exógena las células transfectadas apenas podían recuperarse (datos no mostrados). Este hallazgo implica que la fucosa desempeña una función importante en la recuperación de las etapas de la transfección y de la selección. La transfección transitoria con mAb anti-EGFR era también satisfactoria con aproximadamente 65-75 % de la productividad obtenida en CHO-S.

La siguiente Tabla 9 en el presente documento proporciona un resumen de características de las ITL-LF2.

Tabla 9

<i>Característica</i>	<i>Resultado</i>
Nivel de fucosa en ausencia de fucosa	Cero
Nivel de fucosa en presencia de fucosa	Variable
Transfectabilidad	Similar a CHO-S
Estabilidad del fenotipo de cero fucosa	Durante al menos 370 PDL
Tasa de crecimiento (PDT)	15-20 horas, similar a CHO-S
Concentración celular máxima	$8,4 \times 10^6$, similar a CHO-S
Nivel de sialilación	Similar a CHO-S
Expresión transitoria	~50 % de la expresión en CHO-S
Modificación genética	Modificación del perfil de ARNm de GMD
Expresión estable	Similar a CHO-S
Viabilidad en un procedimiento por lotes	Alta viabilidad durante un mayor tiempo que CHO-S
IVCC en un procedimiento por lotes	IVCC mayor que las células de CHO-S en la fase de agrupación

Aparte del hecho de que el nivel de fucosa en células ITL-LF2 se encontró que era cero y estable, el nivel de fucosilación en células (Figura 18 y Figura 45) y en proteína recombinante (Figura 46-47 y 49) se encontró que dependía de la adición de fucosa exógena de una manera dependiente de la dosis. Por otra parte, tras la adición

exógena de una cierta concentración de fucosa, el nivel de fucosilación derivado de un anticuerpo recombinante en diferentes muestras era reproducible (Figura 49 y Tabla 8). La vía de fucosilación (Figura 20) muestra que tanto las ramificaciones de la vía *de novo* como la de rescate podrían conducir a la generación de GDP-fucosa. Dado que las ITL-LF2 fueron seleccionadas según el fenotipo de fucosa cero fue interesante descubrir la fuente genética de esa característica. La adición de fucosa exógena dio como resultado la recuperación del nivel de fucosilación de proteínas en la membrana de la célula (Figura 18). Este hallazgo implicó que la vía de rescate está activa (Figura 20). La RT-PCR y el análisis de secuenciación de varias enzimas claves para las vías *de novo* y de rescate demostraron que el ARNm de fucosiltransferasa 8 (Fut8) en células de ITL-LF2 y CHO-S eran idéntico tanto en tamaño (Figura 21) como en secuencia (datos no mostrados). Este hallazgo discrimina las células ITL-LF2 de Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd, que interrumpió ambos alelos FUT8 en una línea de células DG44 CHO de ovario de hámster chino por recombinación homóloga secuencial (Yamane-Ohnuke, Kinoshita y col., 2004; Kanda, Satoh y col., 2005).

De manera similar a Fut8, el tamaño de ARNm y la secuencia de GDP-ceto-6-desoximanosa-3,5-epimerasa, 4-reductasa (FX) (Figura 21) involucrados en la vía *de novo* no cambió en las células ITL-LF2. Por otro lado, el tamaño del ARNm de la GDP-manosa-4,6-deshidratasa (GMD) en células ITL-LF2 era más corto que en CHO-S (Figura 20) y la secuencia reveló dos variantes de empalme. Las moléculas de ARNm extraídas de las células carecían de los exones tercero y cuarto u octavo y noveno (Figuras 21A-B y Figuras 22A-B). La diferenciación entre las eliminaciones no puede ser detectada a partir del gel, porque los tamaños de las eliminaciones son similares (Figura 21 y Figura 23B). Sin embargo, sólo las versiones cortas de GMD (y no la longitud completa) podían ser detectadas en el gel (Figura 21). El mecanismo por el cual una subpoblación que se incubó con un mutágeno expresa diferentes variaciones de empalme y no el ARNm de longitud completa no está claro pero es probable que las alteraciones no existan en la población de CHO-S original ya que no se seleccionaron células de poca fucosa sin MTX. Estos resultados son muy interesantes teniendo en cuenta que la selección se hizo fenotípicamente.

El análisis mediante QPCR mostró que todos los genes se ensayaron, que están involucrados en la vía de fucosilación, y que expresan similares niveles de ARNm (Figura 24). Los resultados sugieren que los niveles de fucosa cero obtenidos en las células ITL-LF2 se derivan de cualquier inactividad de la proteína GMD expresada a partir de las diferentes variantes de empalme, o a partir de bajos niveles o ausencia completa de la proteína GMD.

Un diferente enfoque de selección fenotípica se utilizó por otro grupo de investigación para la generación de mutantes resistentes a lectinas en células de CHO (Lec 13) (Ripka y Stanley, 1986). En este enfoque, las células se incubaron con lectina tóxica específica de fucosa de guisante y se encontró que las células de resistencia expresan IgG1 humana que eran deficientes en fucosa unida al carbohidrato enlazado a la Asn(297) (Shields, Lai y col., 2002). El trabajo de investigación adicional reveló que los niveles de fucosa en estas células aumentaba después de un tiempo relativamente corto, lo que indica que el fenotipo de poca fucosa no era estable y alguna proteína GDP-fucosa activa se sintetizaba en la vía *de novo* (Kanda, Yamane-Ohnuke y col., 2006). En otro reciente documento, Kanda y colaboradores (Kanda, Imai-Nishiya y col., 2007) mostraban por análisis de la RT-PCR que Lec13 expresa el ARNm en el mismo tamaño que el ARNm expresado en DG44 CHO. Las células de ITL-LF2, como se indicó antes, presentan un fenotipo de fucosa cero estable probablemente debido a una deficiencia completa de la forma GMD activa (Figura 21). El análisis genotípico de CHO-SM (Kanda, Imai-Nishiya y col., 2007) que es otra línea celular resistente a lectinas (Lens culinaris agglutinin-LCA), mediante secuenciación por RT PCR e hibridación Southern reveló que esta línea celular expresa ARNm de GMD mutada que carece de los exones 5, 6 y 7 que codifica dominios de actividad crítica (Somoza, Menon y col., 2000; Webb, Mulichak y col., 2004). Los exones 3 y 4, así como los exones 8 y 9 son también críticos para la actividad GMD como se demostró en células ITL-LF2. Por lo tanto, se concluye que el perfil GMD de células ITL-LF2 es diferente tanto de Lec13 como de SM CHO.

Las células ITL-LF2 se generaron después de cuatro ciclos sucesivos de clasificación mediante FACS seleccionando en cada clasificación la fracción de células (Tabla 4) que contiene la fucosa más baja (o la ausencia de fucosa). La primera clasificación apenas dio lugar a células con fenotipo de poca fucosa. Sin embargo, después de la segunda clasificación la mayoría de las células expresaron niveles de poca fucosa en la membrana celular. La clasificación (tercera) adicional terminó con la población homogénea que presentan sólo niveles de fucosa cero. La cuarta clasificación se hizo para asegurarse de que sólo estaban presentes las células que expresan cero fucosa (Figura 12).

La línea de células ITL-LF2 ha sido depositada en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes en el Instituto Pasteur de Paris como depósito CNCM I-4449 el 28 de febrero de 2011.

Referencias

ANOLIK, J. H., D. CAMPBELL, Y COL. (2003). "THE RELATIONSHIP OF FCGA MMARIIIA GENOTYPE TO DEGREE OF B CELL DEPLETION BY RITUXIMAB IN THE TREATMENT OF SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS." ARTHRITIS RHEUM 48(2): 455-9.

CARTER, P. J. (2006). "POTENT ANTIBODY THERAPEUTICS BY DESIGN." NAT REV IMMUNOL 6(5): 343-57.

CARTRON, G., L. DACHEUX, Y COL. (2002). "THERAPEUTIC ACTIVITY OF HUMANIZED ANTI-CD20 MONOCLONAL ANTIBODY AND POLYMORPHISM IN IGG FC RECEPTOR FCGA MMARIIIA GENE." BLOOD

99(3): 754-8.

CLARK, M. R. (1997). "IGG EFFECTOR MECHANISMS." CHEM IMMUNOL 65: 88-110.

5 COQUELLE, A., E. PIPIRAS, Y COL. (1997). "EXPRESSION OF FRAGILE SITES TRIGGERS INTRACHROMOSOMAL MAMMALIAN GENE AMPLIFICATION AND SETS BOUNDARIES TO EARLY AMPLICONS." CELL 89(2): 215-25.

COX, K. M., J. D. STERLING, Y COL. (2006). "GLYCAN OPTIMIZATION OF A HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY IN THE AQUATIC PLANT LEMNA MINOR." NAT BIOTECHNOL 24(12): 1591-7.

10 CROWE, J. S., V. S. HALL, Y COL. (1992). "HUMANIZED MONOCLONAL ANTIBODY CAMPATH-1H: MYELOMA CELL EXPRESSION OF GENOMIC CONSTRUCTS, NUCLEOTIDE SEQUENCE OF CADN CONSTRUCTS AND COMPARISON OF EFFECTOR MECHANISMS OF MYELOMA AND CHINESE HAMSTER OVARY CELL-DERIVED MATERIAL." CLIN EXP IMMUNOL 87(1): 105-10.

DALL'OZZO, S., S. TARTAS, Y COL. (2004). "RITUXIMAB-DEPENDENT CYTOTOXICITY BY NATURAL KILLER CELLS: INFLUENCE OF FCGR3A POLYMORPHISM ON THE CONCENTRATION-EFFECT RELATIONSHIP." CANCER RES 64(13): 4664-9.

15 GENNARI, R., S. MENARD, Y COL. (2004). "PILOT STUDY OF THE MECHANISM OF ACTION OF PREOPERATIVE TRASTUZUMAB IN PATIENTS WITH PRIMARY OPERABLE BREAST TUMORS OVEREXPRESSING HER2." CLIN CANCER RES 10(17): 5650-5.

HAMILTON, S. R., R. C. DAVIDSON, Y COL. (2006). "HUMANIZATION OF YEAST TO PRODUCE COMPLEX TERMINALLY SIALYLATED GLYCOPROTEINS." SCIENCE 313(5792): 1441-3.

20 IDUSOGIE, E. E., L. G. PRESTA, Y COL. (2000). "MAPPING OF THE C1Q BINDING SITE ON RITUXAN, A CHIMERIC ANTIBODY WITH A HUMAN IGG1 FC." J IMMUNOL 164(8): 4178-84.

IDUSOGIE, E. E., P. Y. WONG, Y COL. (2001). "ENGINEERED ANTIBODIES WITH INCREASED ACTIVITY TO RECRUIT COMPLEMENT." J IMMUNOL 166(4): 2571-5.

25 IIDA, S., R. KUNI-KAMOCHI, Y COL. (2009). "TWO MECHANISMS OF THE ENHANCED ANTIBODY-DEPENDENT CELLULAR CYTOTOXICITY (ADCC) EFFICACY OF NON-FUCOSILATED THERAPEUTIC ANTIBODIES IN HUMAN BLOOD." BMC CANCER 9: 58.

30 IMAI-NISHIYA, H., K. MORI, Y COL. (2007). "DOUBLE KNOCKDOWN OF ALPHA 1,6-FUCOSYLTRANSFERASE (FUT8) AND GDP-MANOSA 4,6-DESHIDRATASA (GMD) IN ANTIBODY-PRODUCING CELLS: A NEW STRATEGY FOR GENERATING FULLY NON-FUCOSILATED THERAPEUTIC ANTIBODIES WITH ENHANCED ADCC." BMC BIOTECHNOL 7: 84.

JEFFERIS, R. (2005). "GLYCOSYLATION OF RECOMBINANT ANTIBODY THERAPEUTICS." BIOTECHNOL PROG 21(1): 11-6.

JEFFERIS, R. (2007). "ANTIBODY THERAPEUTICS: ISOTYPE AND GLYCOFORM SELECTION." EXPERT OPIN BIOL THER 7(9): 1401-13.

35 JEFFERIS, R. (2009). "RECOMBINANT ANTIBODY THERAPEUTICS: THE IMPACT OF GLYCOSYLATION ON MECHANISMS OF ACTION." TRENDS PHARMACOL SCI 30(7): 356-62.

KANDA, Y., H. IMAI-NISHIYA, Y COL. (2007). "ESTABLISHMENT OF A GDP-MANOSA 4,6-DESHIDRATASA (GMD) KNOCKOUT HOST CELL LINE: A NEW STRATEGY FOR GENERATING COMPLETELY NON-FUCOSILATED RECOMBINANT THERAPEUTICS." J BIOTECHNOL 130(3): 300-10.

40 KANDA, Y., M. SATOH, Y COL. (2005). CELLS PRODUCING ANTIBODY COMPOSITIONS WITH INCREASED ANTIBODY DEPENDENT CELLULAR CYTOTOXIC ACTIVITY. TOKYO, KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. KANDA, Y., N. YAMANE-OHNUKI, Y COL. (2006). "COMPARISON OF CELL LINES FOR STABLE PRODUCTION OF FUCOSA-NEGATIVE ANTIBODIES WITH ENHANCED ADCC." BIOTECHNOL BIOENG 94(4): 680-8.

45 LAZAR, G. A., W. DANG, Y COL. (2006). "ENGINEERED ANTIBODY FC VARIANTS WITH ENHANCED EFFECTOR FUNCTION." PROC NATL ACAD SCI U S A 103(11): 4005-10.

LOUIS, E., Z. EL GHOUL, Y COL. (2004). "ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISM IN IGG FC RECEPTOR IIIA CODING GENE AND BIOLOGICAL RESPONSE TO INFlixIMAB IN CROHN'S DISEASE." ALIMENT PHARMACOL THER 19(5): 511-9.

50 MIESCHER, S., M. O. SPYCHER, Y COL. (2004). "A SINGLE RECOMBINANT ANTI-RHD IGG PREVENTS RHD IMMUNIZATION: ASSOCIATION OF RHD-POSITIVE RED BLOOD CELL CLEARANCE RATE WITH

- POLYMORPHISMS IN THE FCGA MMARIA AND FCGA MMAIII GENES." BLOOD 103(11): 4028-35.
- MORGAN, A., N. D. JONES, Y COL. (1995). "THE N-TERMINAL END OF THE CH2 DOMAIN OF CHIMERIC HUMAN IGG1 ANTI-HLA-DR IS NECESSARY FOR C1Q, FC GA MMA RI AND FC GA MMA RIII BINDING." I MMUNOLOGY 86(2): 319-24.
- 5 MOUTEL, S. AND F. PEREZ (2008). ""ANTIBODIES--EUROPE. ENGINEERING THE NEXT GENERATION OF ANTIBODIES"." BIOTECHNOL J 3(3): 298-300.
- NECHANSKY, A., M. SCHUSTER, Y COL. (2007). "COMPENSATION OF ENDOGENOUS IGG MEDIATED INHIBITION OF ANTIBODY-DEPENDENT CELLULAR CYTOTOXICITY BY GLYCO-ENGINEERING OF THERAPEUTIC ANTIBODIES." MOL I MMUNOL 44(7): 1815-7.
- 10 NEZLIN, R. AND V. GHETIE (2004). "INTERACTIONS OF I MMUNOGLOBULINS OUTSIDE THE ANTIGEN-COMBINING SITE." ADV I MMUNOL 82: 155-215.
- OGANESYAN, V., M. M. DAMSCHRODER, Y COL. (2008). "STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF A MUTATED, ADCC-ENHANCED HUMAN FC FRAGMENT." MOL I MMUNOL 45(7): 1872-82.
- 15 OHYAMA, C., P. L. SMITH, Y COL. (1998). "MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF GDP-D-MANOSA-4,6-DESHIDRATASA, A KEY ENZYME FOR FUCOSA METABOLISM DEFECTIVE IN LEC13 CELLS." J BIOL CHEM 273(23): 14582-7.
- PRESTA, L. G. (2008). "MOLECULAR ENGINEERING AND DESIGN OF THERAPEUTIC ANTIBODIES." CURR OPIN I MMUNOL 20(4): 460-70.
- 20 RAJU, T. S. (2008). "TERMINAL SUGARS OF FC GLYCANS INFLUENCE ANTIBODY EFFECTOR FUNCTIONS OF IGGs." CURR OPIN I MMUNOL 20(4): 471-8.
- REICHERT, J. M. AND V. E. VALGE-ARCHER (2007). "DEVELOPMENT TRENDS FOR MONOCLONAL ANTIBODY CANCER THERAPEUTICS." NAT REV DRUG DISCOV 6(5): 349-56.
- RIPKA, J. AND P. STANLEY (1986). "LECTIN-RESISTANT CHO CELLS: SELECTION OF FOUR NEW PEA LECTIN-RESISTANT PHENOTYPES." SOMAT CELL MOL GENET 12(1): 51-62.
- 25 ROOPENIAN, D. C. AND S. AKILESH (2007). "FCRN: THE NEONATAL FC RECEPTOR COMES OF AGE." NAT REV I MMUNOL 7(9): 715-25.
- SALFELD, J. G. (2007). "ISOTYPE SELECTION IN ANTIBODY ENGINEERING." NAT BIOTECHNOL 25(12): 1369-72.
- SCHIMKE, R. T. (1988). "GENE AMPLIFICATION IN CULTURED CELLS." J BIOL CHEM 263(13): 5989-92.
- 30 SHIELDS, R. L., J. LAI, Y COL. (2002). "LACK OF FUCOSA ON HUMAN IGG1 N-LINKED OLIGOSACCHARIDE IMPROVES BINDING TO HUMAN FCGA MMA RIII AND ANTIBODY-DEPENDENT CELLULAR TOXICITY." J BIOL CHEM 277(30): 26733-40.
- 35 SHINKAWA, T., K. NAKAMURA, Y COL. (2003). "THE ABSENCE OF FUCOSA BUT NOT THE PRESENCE OF GALACTOSE OR BISECTING N-ACETYLGLUCOSAMINE OF HUMAN IGG1 COMPLEX-TYPE OLIGOSACCHARIDES SHOWS THE CRITICAL ROLE OF ENHANCING ANTIBODY-DEPENDENT CELLULAR CYTOTOXICITY." J BIOL CHEM 278(5): 3466-73.
- SINGER, M. J., L. D. MESNER, Y COL. (2000). "AMPLIFICATION OF THE HUMAN DIHYDROFOLATE REDUCTASE GENE VIA DOUBLE MINUTES IS INITIATED BY CHROMOSOME BREAKS." PROC NATL ACAD SCI U S A 97(14): 7921-6.
- 40 SOMOZA, J. R., S. MENON, Y COL. (2000). "STRUCTURAL AND KINETIC ANALYSIS OF ESCHERICHIA COLI GDP-MANOSA 4,6 DESHIDRATASA PROVIDES INSIGHTS INTO THE ENZYME'S CATALYTIC MECHANISM AND REGULATION BY GDP-FUCOSA." STRUCTURE 8(2): 123-35.
- STROHL, W. R. (2009). "OPTIMIZATION OF FC-MEDIATED EFFECTOR FUNCTIONS OF MONOCLONAL ANTIBODIES." CURR OPIN BIOTECHNOL 20(6): 685-91.
- 45 STROHL, W. R. (2009). THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES-PAST, PRESENT AND FUTURE. THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES: FROM BENCH TO CLINIC. A. Z. N. Y. J. W. SONS: 4-50.
- SULLIVAN, F. X., R. KUMAR, Y COL. (1998). "MOLECULAR CLONING OF HUMAN GDP-MANOSA 4,6-DESHIDRATASA AND RECONSTITUTION OF GDP-FUCOSA BIOSYNTHESIS IN VITRO." J BIOL CHEM 273(14): 8193-202.

TREON, S. P., M. HANSEN, Y COL. (2005). "POLYMORPHISMS IN FCGA MMARIIIA (CD16) RECEPTOR EXPRESSION ARE ASSOCIATED WITH CLINICAL RESPONSE TO RITUXIMAB IN WALDENSTROM'S MACROGLOBULINEMIA." J CLIN ONCOL 23(3): 474-81.

5 UMANA, P., J. JEAN-MAIRET, Y COL. (1999). "ENGINEERED GLYCOFORMS OF AN ANTINEUROBLASTOMA IGG1 WITH OPTIMIZED ANTIBODY-DEPENDENT CELLULAR CYTOTOXIC ACTIVITY." NAT BIOTECHNOL 17(2): 176-80.

VON HORSTEN, H. H., C. OGOREK, Y COL., "PRODUCTION OF NON-FUCOSILADAS ANTIBODIES BY CO-EXPRESSION OF HETEROLOGOUS GDP-6-DESOXI-D-LYXO-4-HEXULOSE REDUCTASE." GLYCOBIOLOGY 20(12): 1607-18.

10 WEBB, N. A., A. M. MULICHAK, Y COL. (2004). "CRYSTAL STRUCTURE OF A TETRAMERIC GDP-D-MANOSA 4,6-DESHIDRATASA FROM A BACTERIAL GDP-D-RHAMNOSE BIOSYNTHETIC PATHWAY." PROTEIN SCI 13(2): 529-39.

15 WENG, W. K. AND R. LEVY (2003). "TWO I MMUNOGLOBULIN G FRAGMENT C RECEPTOR POLYMORPHISMS INDEPENDENTLY PREDICT RESPONSE TO RITUXIMAB IN PATIENTS WITH FOLLICULAR LYMPHOMA." J CLIN ONCOL 21(21): 3940-7.

YAMANE-OHNUKI, N., S. KINOSHITA, Y COL. (2004). "ESTABLISHMENT OF FUT8 KNOCKOUT CHINESE HAMSTER OVARY CELLS: AN IDEAL HOST CELL LINE FOR PRODUCING COMPLETELY DEFUCOSILADAS ANTIBODIES WITH ENHANCED ANTIBODY-DEPENDENT CELLULAR CYTOTOXICITY." BIOTECHNOL BIOENG 87(5): 614-22.

20 **Lista de secuencias**

<110> MERCK SERONO S.A.
HELMAN, DANIEL
BAR-SHIMON, MEIRAV
TOISTER-ACHITUV, MIRA

25 <120> LÍNEAS DE CÉLULAS CON POCO CONTENIDO EN FUCOSA Y USOS DE LAS MISMAS

<130> P 11/028PCT

<150> 211583
<151> 2011-03-06

30 <150> 217216
<151> 2011-12-27

<160> 46

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 36
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

40 <400> 1
gtctgaattc aagctttag cgatcgccgc caccat
36

<210> 2
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 2
ggatccggg ccgctacgcc gccctcagat ctttatca
38

<210> 3
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 3
 gcttgaattc aagcttctag tacgcgtggt taaacc
 36

10 <210> 4
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

15 <400> 4
 gcgggccgctg tccgcgcctt actaacactc tc
 32

<210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<220>
 <221> características_diversas
 25 <223> oligonucleótido conjugado con 5' FAM

<220>
 <221> características_diversas
 <223> Oligonucleótido conjugado en 3' BQ

<400> 5
 atggctgagt ctctccga
 30 18

<210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 6
 ctggagcgct taaaacaaca aa
 22

40 <210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

45 <400> 7
 ctgatcaata ggccttctg gta
 23

<210> 8
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<220>
 <221> características_diversas
 <223> oligonucleótido conjugado con 5' FAM

10 <220>
 <221> características_diversas
 <223> Oligonucleótido conjugado en 3' BQ

<400> 8
 caaagatgca gatctgac
 18

15 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 9
 gcttaccggg agaggaatgg
 20

25 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 10
 gaacagggct tgggtttgtg
 20

30 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<220>
 <221> características_diversas
 <223> oligonucleótido conjugado con 5' FAM

40 <220>
 <221> características_diversas
 <223> Oligonucleótido conjugado en 3' BQ

<400> 11
 ctttgactta gcagagtaca
 20

45 <210> 12
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

 <400> 12
 gccctatgga gcagccaaa
 19
 5 <210> 13
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 10 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

 <400> 13
 aatgccgttc accgcaaa
 18

 <210> 14
 <211> 19
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

 <220>
 20 <221> características_diversas
 <223> oligonucleótido conjugado con 5' FAM

 <220>
 <221> características_diversas
 <223> Oligonucleótido conjugado en 3' BQ
 25 <400> 14
 cctgaatggt gttgtcctt
 19

 <210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

 <400> 15
 tccacctcct caaggaaca c
 21
 35 <210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

 <400> 16
 ctccctccgtt gttccaatgt g
 21

 <210> 17
 <211> 18
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>

- <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 <220>
 <221> características_diversas
 <223> oligonucleótido conjugado con 5' FAM
- 5 <220>
 <221> características_diversas
 <223> Oligonucleótido conjugado en 3' BQ
 <400> 17
 ttctatgccc tgctcaca
 18
- 10 <210> 18
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 <400> 18
 ctgctgctca aacagaccac tt
 22
- 20 <210> 19
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 <400> 19
 gtgcctcag ctccctctt
 19
- 25 <210> 20
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 <220>
 <221> características_diversas
 <223> oligonucleótido conjugado con 5' FAM
- 35 <220>
 <221> características_diversas
 <223> Oligonucleótido conjugado en 3' BQ
 <400> 20
 ttgggacgct tcactgc
 17
- 40 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 <400> 21

ctgctccctg gcaactccta
20

<210> 22

<211> 23

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 22

aagtgggaag caaatgagc aaa

23

10 <210> 23

<211> 300

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<220>

15 <221> características_diversas

<223> GDP-manosa 4,6-deshidratasa (GMD)-Empalme variante 1

<400> 23

ES 2 687 771 T3

Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp
 1 5 10 15

Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr
 20 25 30

Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr
 35 40 45

Glu Val His Gly Ile Val Arg Arg Ser Ser Ser Phe Asn Thr Gly Arg
 50 55 60

Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met
 65 70 75 80

Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile
 85 90 95

Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser
 100 105 110

His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp
 115 120 125

Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu
 130 135 140

Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly
 145 150 155 160

Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg
 165 170 175

Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn
 180 185 190

ES 2 687 771 T3

Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn
 195 200 205

His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser
 210 215 220

Arg Ser Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu
 225 230 235 240

Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val
 245 250 255

Glu Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn
 260 265 270

Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln
 275 280 285

Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr Asn Pro Asn Ala
 290 295 300

<210> 24

<211> 306

<212> PRT

5 <213> Cricetulus griseus

<220>

<221> características_diversas

<223> GDP-manosa 4,6-deshidratasa (GMD)-Empalme variante 2

<400> 24

Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp
 1 5 10 15

Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr
 20 25 30

Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr
 35 40 45

Glu Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp Gly Val
 50 55 60

Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu Ile Asn
 65 70 75 80

10

ES 2 687 771 T3

Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly Lys Val
85 90 95

Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg Ser Pro
100 105 110

Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn Phe Arg
115 120 125

Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn His Glu
130 135 140

Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser Arg Ser
145 150 155 160

Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu Gly Asn
165 170 175

Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val Glu Ala
180 185 190

Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val Ile Ala
195 200 205

Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser Phe Met
210 215 220

His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn Glu Val
225 230 235 240

Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys Ile His Val Thr Val Asp Leu Lys
245 250 255

Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys Ser Lys
260 265 270

Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp Glu Leu
275 280 285

Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr Asn Pro
290 295 300

Asn Ala
305

<210> 25

<211> 372

<212> PRT

5 <213> *Cricetulus griseus*

<220>

<221> características diversas

<223> GDP-manosa 4,6-deshidratasa (GMD Longitud completa)

<400> 25

ES 2 687 771 T3

Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp
 1 5 10 15

Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr
 20 25 30

Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr
 35 40 45

Glu Val His Gly Ile Val Arg Arg Ser Ser Ser Phe Asn Thr Gly Arg
 50 55 60

Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met
 65 70 75 80

Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile
 85 90 95

Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser
 100 105 110

His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp
 115 120 125

Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu
 130 135 140

Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly
 145 150 155 160

Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg
 165 170 175

Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn
 180 185 190

ES 2 687 771 T3

Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn
 195 200 205

His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser
 210 215 220

Arg Ser Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu
 225 230 235 240

Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val
 245 250 255

Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val
 260 265 270

Ile Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser
 275 280 285

Phe Met His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn
 290 295 300

Glu Val Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys Ile His Val Thr Val Asp
 305 310 315 320

Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys
 325 330 335

Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp
 340 345 350

Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr
 355 360 365

Asn Pro Asn Ala
 370

<210> 26

<211> 903

<212> ADN

5 <213> Cricetulus griseus

<220>

<221> características_diversas

<223> GDP-manosa 4,6-deshidratasa (GMD)-Empalme variante 1

<400> 26

ES 2 687 771 T3

atggctcacg ctcccgctag ctgcccgagc tccaggaact ctggggacgg cgataagggc
60

aagcccagga aggtggcget catcacgggc atcaccggcc aggatggctc atacttggca
120

gaattcctgc tggagaaagg atacgaggtt catggaattg tacggcgatc cagttcattt
180

aatacaggtc gaattgaaca tttatataag aatccacagg ctcatattga aggaaacatg
240

aagttgcact atggtgacct caccgacagc acctgcctag taaaaatcat caatgaagtc
300

aaacctacag agatctacaa tcttgggtgcc cagagccatg tcaagatttc ctttgactta
360

gcagagtaca ctgcagatgt tgatggagtt ggcaccttgc ggcttctgga tgcaattaag
420

acttgtggcc ttataaattc tgtgaagtcc taccaggcct caactagtga actgtatgga
480

aaagtgcaag aaatacccca gaaagagacc acccctttct atccaaggtc gccctatgga
540

gcagccaaac tttatgccta ttggattgta gtgaactttc gagaggctta taatctcttt
600

gcggtgaacg gcattctctt caatcatgag agtcctagaa gaggagctaa ttttgttact
660

cgaaaaatta gccggtcagt agctaagatt taccttggac aactggaatg tttcagtttg
720

ggaaatctgg acgccaaacg agactggggc catgccaaagg actatgtcga ggacttcctg
780

cagggagact gctccaaggc gcagcagaaa ctgaactgga agccccgctg tgcctttgac
840

gagctggtga gggagatggt gcaagccgat gtggagctca tgagaaccaa ccccaacgcc
900

tga
903

<210> 27

<211> 921

<212> ADN

5 <213> Cricetulus griseus

<220>

<221> características_diversas

<223> GDP-manosa 4,6-deshidratasa (GMD)-Empalme variante 2

<400> 27

ES 2 687 771 T3

atggctcacg ctcccgctag ctgcccgagc tccaggaact ctggggacgg cgataagggc
60

aagcccagga aggtggcgct catcacgggc atcaaccggc aggatggctc atacttggca
120

gaattcctgc tggagaaagg atacgagatt tcctttgact tagcagagta cactgcagat
180

gttgatggag ttggcacctt gcggcttctg gatgcaatta agacttgtgg ccttataaat
240

tctgtgaagt tctaccaggc ctcaactagt gaactgtatg gaaaagtgca agaaatacc
300

cagaaagaga ccacccttt ctatccaagg tcgccctatg gagcagccaa actttatgcc
360

tattggattg tagtgaactt tcgagaggct tataatctct ttgcggtgaa cggcattctc
420

ttcaatcatg agagtcttag aagaggagct aattttgta ctcgaaaaat tagccgggtca
480

gtagctaaga tttaccttgg acaactggaa tgtttcagtt tgggaaatct ggacgccaaa
540

cgagactggg gccatgccaa ggactatgtc gaggctatgt ggctgatggt acaaaatgat
600

gaaccagagg actttgtcat agctactggg gaagttcata gtgtccgtga atttgttgag
660

aatcattca tgcacattgg aaagaccatt gtgtgggaag gaaagaatga aatgaagtg
720

ggcagatgta aagagaccgg caaaattcat gtgactgtgg atctgaaata ctaccgacca
780

actgaagtgg acttcctgca gggagactgc tccaaggcgc agcagaaact gaactggaag
840

ccccgcgttg cctttgacga gctggtgagg gagatggtgc aagccgatgt ggagctcatg
900

agaaccaacc ccaacgcctg a
921

<210> 28

<211> 1120

<212> ADN

5 <213> *Cricetulus griseus*

<220>

<221> características_diversas

<223> GDP-manosa 4,6-deshidratasa (GMD Longitud completa)

<400> 28

ES 2 687 771 T3

atggctcag ctcccgctag ctgcccgagc tccaggaact ctggggacgg cgataagggc
60

aagcccagga aggtggcgct catcacgggc atcaccggcc aggatggctc atacttgga
120

gaattcctgc tggagaaagg atacgaggtt catggaattg tacggcgatc cagttcattt
180

aatacaggtc gaattgaaca tttatataag aatccacagg ctcatattga aggaaacatg
240

aagttgcact atggtgacct caccgacagc acctgcctag taaaaatcat caatgaagtc
300

aaacctacag agatctacaa tcttgggtgcc cagagccatg tcaagatttc ctttgactta
360

gcagagtaca ctgcagatgt tgatggagtt ggcaccttgc ggcttctgga tgcaattaag
420

acttggtggc ttataaattc tgtgaagttc taccaggcct caactagtga actgtatgga
480

aaagtgcaag aaatacccca gaaagagacc accccttct atccaaggtc gccctatgga
540

gcagccaaac tttatgccta ttggattgta gtgaactttc gagaggctta taatctcttt
600

gcggtgaacg gcattctctt caatcatgag agtcctagaa gaggagctaa ttttgttact
660

cgaaaaatta gccggtcagt agctaagatt taccttggac aactggaatg tttcagtttg
720

ggaaatctgg acgccaaac agactggggc catgccaaag actatgtcga ggctatgtgg
780

ctgatgttac aaaatgatga accagaggac tttgtcatag ctactgggga agttcatagt
840

gtccgtgaat ttgttgagaa atcattcatg cacattggaa agaccattgt gtgggaagga
900

aagaatgaaa atgaagtggg cagatgtaaa gagaccggca aaattcatgt gactgtggat
960

ctgaaatact accgaccaac tgaagtggac ttctgcagg gagactgctc caaggcgcag
1020

cagaaactga actggaagcc ccgcttggc tttgacgagc tggtgaggga gatggtgcaa
1080

gccgatgtgg agctcatgag aaccaacccc aacgcctgag
1120

<210> 29

<211> 575

<212> PRT

5 <213> *Cricetulus griseus*

<400> 29

ES 2 687 771 T3

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe
 1 5 10 15

Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp
 20 25 30

Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala
 35 40 45

Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala
 50 55 60

Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr
 65 70 75 80

Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln
 85 90 95

Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Asp Leu Gly Lys Asp His
 100 105 110

Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe
 115 120 125

Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Lys Leu Glu Gly Asn Glu
 130 135 140

Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu
 145 150 155 160

Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala
 165 170 175

Gly Glu Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln
 180 185 190

Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg
 195 200 205

Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu
 210 215 220

ES 2 687 771 T3

His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr
 225 230 235 240
 Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu
 245 250 255
 Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu
 260 265 270
 Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Lys Asp Lys Asn Val Gln Val
 275 280 285
 Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu
 290 295 300
 Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His
 305 310 315 320
 Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile
 325 330 335
 Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Arg Glu Ile Glu Glu Thr Thr Lys Lys
 340 345 350
 Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp
 355 360 365
 Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val
 370 375 380
 His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Glu Arg Arg Met Lys Val Asp
 385 390 395 400
 Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ser Leu Leu Lys Glu
 405 410 415
 Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
 420 425 430
 Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
 435 440 445
 Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
 450 455 460

ES 2 687 771 T3

Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
465 470 475 480

Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
485 490 495

Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro
500 505 510

His Gln Pro Arg Thr Lys Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
515 520 525

Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asn Gly Tyr Ser Lys Gly Val Asn
530 535 540

Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
545 550 555 560

Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys
565 570 575

<210> 30

<211> 321

<212> PRT

5 <213> *Cricetulus griseus*

<400> 30

Met Gly Glu Pro Gln Gly Ser Arg Arg Ile Leu Val Thr Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Leu Val Gly Arg Ala Ile Gln Lys Val Val Ala Asp Gly Ala Gly
20 25 30

Leu Pro Gly Glu Glu Trp Val Phe Val Ser Ser Lys Asp Ala Asp Leu
35 40 45

Thr Asp Ala Ala Gln Thr Gln Ala Leu Phe Gln Lys Val Gln Pro Thr
50 55 60

His Val Ile His Leu Ala Ala Met Val Gly Gly Leu Phe Arg Asn Ile
65 70 75 80

Lys Tyr Asn Leu Asp Phe Trp Arg Lys Asn Val His Ile Asn Asp Asn
85 90 95

ES 2 687 771 T3

Val Leu His Ser Ala Phe Glu Val Gly Thr Arg Lys Val Val Ser Cys
 100 105 110

Leu Ser Thr Cys Ile Phe Pro Asp Lys Thr Thr Tyr Pro Ile Asp Glu
 115 120 125

Thr Met Ile His Asn Gly Pro Pro His Ser Ser Asn Phe Gly Tyr Ser
 130 135 140

Tyr Ala Lys Arg Met Ile Asp Val Gln Asn Arg Ala Tyr Phe Gln Gln
 145 150 155 160

His Gly Cys Thr Phe Thr Ala Val Ile Pro Thr Asn Val Phe Gly Pro
 165 170 175

His Asp Asn Phe Asn Ile Glu Asp Gly His Val Leu Pro Gly Leu Ile
 180 185 190

His Lys Val His Leu Ala Lys Ser Asn Gly Ser Ala Leu Thr Val Trp
 195 200 205

Gly Thr Gly Lys Pro Arg Arg Gln Phe Ile Tyr Ser Leu Asp Leu Ala
 210 215 220

Arg Leu Phe Ile Trp Val Leu Arg Glu Tyr Asn Glu Val Glu Pro Ile
 225 230 235 240

Ile Leu Ser Val Gly Glu Glu Asp Glu Val Ser Ile Lys Glu Ala Ala
 245 250 255

Glu Ala Val Val Glu Ala Met Asp Phe Cys Gly Glu Val Thr Phe Asp
 260 265 270

Ser Thr Lys Ser Asp Gly Gln Tyr Lys Lys Thr Ala Ser Asn Gly Lys
 275 280 285

Leu Arg Ala Tyr Leu Pro Asp Phe Arg Phe Thr Pro Phe Lys Gln Ala
 290 295 300

Val Lys Glu Thr Cys Ala Trp Phe Thr Asp Asn Tyr Glu Gln Ala Arg
 305 310 315 320

Lys

<210> 31
 <211> 1728
 <212> ADN

5 <213> Cricetulus griseus

<400> 31

ES 2 687 771 T3

atgcgggcat ggactggttc ctggcgttgg attatgctca ttctttttgc ctgggggacc
60

ttattgtttt atataggtgg tcatttggtt cgagataatg accaccctga ccattctagc
120

agagaactct ccaagattct tgcaaagctg gagcgcttaa aacaacaaaa tgaagacttg
180

aggagaatgg ctgagtctct ccgaatacca gaaggccta ttgatcaggg gacagctaca
240

ggaagagtcc gtgttttaga agaacagctt gttaaggcca aagaacagat tgaaaattac
300

aagaaacaag ctaggaatga tctgggaaag gatcatgaaa tcttaaggag gaggattgaa
360

aatggagcta aagagctctg gttttttcta caaagtgaat tgaagaaatt aaagaaatta
420

gaaggaaacg aactccaaag acatgcagat gaaattcttt tggatttagg acatcatgaa
480

aggtctatca tgacagatct atactacctc agtcaaacag atggagcagg tgagtggcgg
540

gaaaaagaag ccaaagatct gacagagctg gtccagcggg gaataacata tctgcagaat
600

cccaaggact gcagcaaagc cagaaagctg gtatgtaata tcaacaaagg ctgtggctat
660

ggatgtcaac tccatcatgt ggtttactgc ttcattgattg cttatggcac ccagcgaaca
720

ctcatcttgg aatctcagaa ttggcgctat gctactggag gatgggagac tgtgtttaga
780

cctgtaagtg agacatgcac agacaggtct ggccctctcca ctggacactg gtcaggtgaa
840

gtgaaggaca aaaatgttca agtggctcag cccccattg tagacagcct ccacccctgt
900

cctccttact tacccttggc tgtaccagaa gaccttcag atcgactcct gagagtccat
960

ggtgatcctg cagtgtggtg ggtatcccag tttgtcaaat acttgatcog tccacaacct
1020

tggctggaaa gggaaataga agaaaccacc aagaagcttg gcttcaaaca tccagttatt
1080

ES 2 687 771 T3

ggagtccatg tcagacgcac tgacaaagtg ggaacagaag cagccttcca tcccattgag
1140

gaatacatgg tacacgttga agaacatttt cagcttctcg aacgcagaat gaaagtggat
1200

aaaaaaagag tgtatctggc cactgatgac ccttctttgt taaaggaggc aaagacaaag
1260

tactccaatt atgaatttat tagtgataac tctatttctt ggtcagctgg actacacaac
1320

cgatacacag aaaattcact tcggggcgtg atcctggata tacactttct ctcccaggct
1380

gacttccttg tgtgtacttt ttcattcccag gtctgtaggg ttgcttatga aatcatgcaa
1440

acactgcatc ctgatgcctc tgcaaaacttc cattctttag atgacatcta ctattttgga
1500

ggccaaaatg cccacaacca gattgcagtt taccctcacc aacctogaac taaagaggaa
1560

atccccatgg aacctggaga tatcattggt gtggctggaa accattggaa tggttactct
1620

aaaggtgtca acagaaaact aggaaaaaca ggctgtacc cttcctacaa agtccgagag
1680

aagatagaaa cagtcaaata ccctacatat cctgaagctg aaaaatag
1728

<210> 32

<211> 966

<212> ADN

5 <213> *Cricetulus griseus*

<400> 32

atgggtgagc cccagggatc caggaggatc ctagtgcag ggggctctgg actggtgggc
60

agagctatcc agaaggtggt cgcagatggc gctggcttac cgggagagga atgggtgttt
120

gtctcctcca aagatgcaga tctgcaggat gcagcacaaa cccaagccct gttccagaag
180

gtacagccca cccatgtcat ccattcttgc gcaatggtag gaggcctttt ccggaatata
240

aaatacaact tggatttctg gaggaagaat gtgcacatca atgacaacgt cctgcaactca
300

gctttcgagg tgggcaactc caaggtggc tctgcctgt ccacctgtat cttcctgac
360

aagaccacct atcctattga tgaacaatg atccacaatg gtccacccca cagcagcaat
420

ES 2 687 771 T3

tttgggtact cgtatgcaa gaggatgatt gacgtgcaga acagggccta cttccagcag
480

catggctgca ccttcaactgc tgtcatccct accaatgtct ttggacctca tgacaacttc
540

aacattgaag atggccatgt gctgcctggc ctcatccata aggtgcatct ggccaagagt
600

aatggttcag ccttgactgt ttgggttaca gggaaaccac ggaggcagtt catctactca
660

ctggacctag cccggctctt catctgggtc ctgctgggagt acaatgaagt tgagcccatc
720

atctctcag tgggcgagga agatgaagtc tccattaagg aggcagctga ggctgtagtg
780

gaggccatgg acttctgtgg ggaagtcact tttgattcaa caaagtcaga tgggcagtat
840

aagaagacag ccagcaatgg caagcttcgg gctacttgc ctgatttcg tttcacacce
900

ttcaagcagg ctgtgaagga gacctgtgcc tggttcaccg acaactatga gcaggcccgg
960

aagtga
966

<210> 33

<211> 23

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 33

ataatgcggg catggactgg ttc
23

10 <210> 34

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 34

atactatddd teagcttcag gatatg
26

<210> 35

<211> 23

20 <212>ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 35

ataatgggtg agccccaggg atc
23

25

<210> 36

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 <400> 36
 atatctagac aagggacagc agg
 5 23
 <210> 37
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 <400> 37
 ataatggctc acgctcccgc tagctg
 26
 <210> 38
 15 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 20 <400> 38
 atatcaggcg ttggggttgg tt
 22
 <210> 39
 <211> 23
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 <400> 39
 ataatggcgt ctctgcgcga agc
 23
 30 <210> 40
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 <400> 40
 atattaagat ttctccgaat cag
 23
 <210> 41
 <211> 36
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 <400> 41
 gtctgaattc aagctttag cgatcgccgc caccat
 45 36

- <210> 42
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 5 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
- <400> 42
 ggatccgagg ccgctacgcc gccctcagat ctttatca
 38
- 10 <210> 43
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
- 15 <400> 43
 gcttgaattc aagcttctag tacgcgtggt taaacc
 36
- <210> 44
 <211> 32
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
- <400> 44
 gcggccgctg tccgcgcctt actaacactc tc
 32
- 25 <210> 45
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
- <400> 45
 gtccgatatc atttaaactg ccaccatggc tcacgctccc gctag
 45
- <210> 46
 <211> 33
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
- <400> 46
 40 atccctcgag ttatcaggcg ttggggttg ttc

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de selección de células de ovario de hámster chino (CHO) que tienen un nivel de cero fucosa útil como células anfitrionas para expresar proteínas recombinantes, preferentemente un anticuerpo o una proteína de Fc, comprendiendo el procedimiento:
 - 5 (a) introducir mutaciones genéticas en una población de células de CHO poniendo en contacto las células con metotrexato (MTX), en donde las células de CHO se seleccionan de CHO-KI, CHO-S, DUXB11, CHO-1E5, CH03F, CHO/DG44 y CHO-2.6;
 - (b) poner en contacto la población de células de CHO que comprende células mutadas con un agente de unión a fucosa no tóxico durante un período de tiempo no mayor de 60 minutos, que permite la unión del agente de unión a fucosa con un resto de fucosa en una membrana de la célula de la población de células, en donde el período de tiempo no permite destruir las células; y
 - 10 (c) eliminar de la población de células que comprende células mutadas, una subpoblación de células que se unen al agente de unión a fucosa, seleccionando de ese modo células útiles como células anfitrionas para expresar proteínas recombinantes, teniendo las células seleccionadas un contenido cero de fucosa.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde dicho agente de unión a fucosa no es tóxico para dicha población de células que comprende células mutadas en donde dicho agente de unión a fucosa se une a un resto detectable o un resto de afinidad.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en donde dicho resto de afinidad comprende biotina.
4. El procedimiento de las reivindicaciones 2 o 3, en donde cuando dicho agente de unión a fucosa se une a un resto de afinidad, el procedimiento comprende además poner en contacto dicha población mutada de las células con un agente adicional, comprendiendo dicho agente adicional un resto de unión a cognado para dicho resto de afinidad en donde dicho resto de unión a cognado se une a un resto detectable, y en donde dicho resto detectable comprende un resto fluorescente o un resto magnético.
- 20 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde dicha eliminación se efectúa mediante clasificación mediante FACS o por separación magnética, y en donde dicha eliminación se efectúa mediante al menos tres rondas de eliminación secuencial.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde dicho agente de unión a fucosa es lectina Aleuria aurantia (AAL) o lectina Aspergillus oryzae (AOL) específicas de 1-fucosa.
7. Una célula de CHO aislada generada según el procedimiento de reivindicación 1, que expresa una GDP-manosa-4,6-deshidratasa (GMD) mutada, en donde dicha GMD mutada tiene una secuencia de aminoácidos como se establece en las SEQ ID NO: 23 o 24.
- 30 8. Una célula de CHO aislada que es modificada genéticamente de manera que una cantidad de fucosilación de una proteína expresada en ella es linealmente dependiente de una concentración de fucosa externa en donde cuando dicha concentración de fucosa externa es cero, dicha cantidad de fucosilación de dicha proteína es cero, y en donde dicha célula de CHO es modificada genéticamente para expresar una GDP-manosa-4,6-deshidratasa (GMD) mutada, correspondiendo la mutación a eliminaciones de los exones 3 y 4, u 8 y 9 del gen GMD.
- 35 9. La célula de CHO aislada de las reivindicaciones 7 u 8, en donde al menos uno de cada alelo de dicha GMD acarrea al menos una pérdida de mutación de la función.
10. La célula de CHO aislada de las reivindicaciones 7 o 9, que tiene una concentración integral de células viables (IVCC) un 20% mayor que las células de CHO no mutadas.
- 40 11. La célula de CHO aislada de la reivindicación 8, que expresa una fucosiltransferasa-8 (Fut8) de tipo salvaje.
12. La célula de CHO aislada de la reivindicación 8, que expresa una GDP-ceto-6-desoximanosa-3,5-epimerasa, 4-reductasa (FX) de tipo salvaje.
13. La célula de CHO aislada de la reivindicación 8, caracterizada por una o más de las siguientes características:
 - 45 (a) que tiene un tiempo de duplicación de la población similar a las células de CHO parentales de las que se deriva,
 - (b) que tiene un fenotipo de fucosa estable durante al menos 370 duplicaciones de la población,
 - (c) que expresa un anticuerpo recombinante o proteína de fusión Fc de interés.
14. Una línea de células de CHO que comprende la célula aislada de la reivindicación 8.

15. La línea de células de CHO de la reivindicación 13, en donde la línea de células es la línea de células depositada bajo el Número 1-4449 de Acceso al CNCM.
- 5 16. Un cultivo de células que comprende la célula de CHO aislada de las reivindicaciones 8 o 13 y un medio de cultivo de células que está desprovisto de xenocontaminantes, en donde dicho medio de cultivo celular comprende fucosa o está desprovisto de fucosa.
- 10 17. Un procedimiento para la producción de una proteína recombinante que comprende transfectar la célula de CHO aislada de la reivindicación 8 con un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína recombinante, cultivar la célula CHO transfectada en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína recombinante, y aislar la proteína, en donde la proteína recombinante es un anticuerpo o una proteína de fusión Fc, y en donde dicha transfección se efectúa, preferentemente, en presencia de fucosa exógena.
18. El procedimiento de la reivindicación 17, que comprende además cultivar la célula CHO aislada de la reivindicación 11 en un medio de cultivo que comprende fucosa después de dicha transfección.
19. El procedimiento de las reivindicaciones 17 o 18, en donde la concentración de fucosa es 1-5 µg/ml, preferentemente 2,5-5 µg/ml, lo más preferentemente 3,5 µg/ml.
- 15 20. Un anticuerpo que tiene una ADCC mejorada producida según el procedimiento de la reivindicación 19.

FIG.1

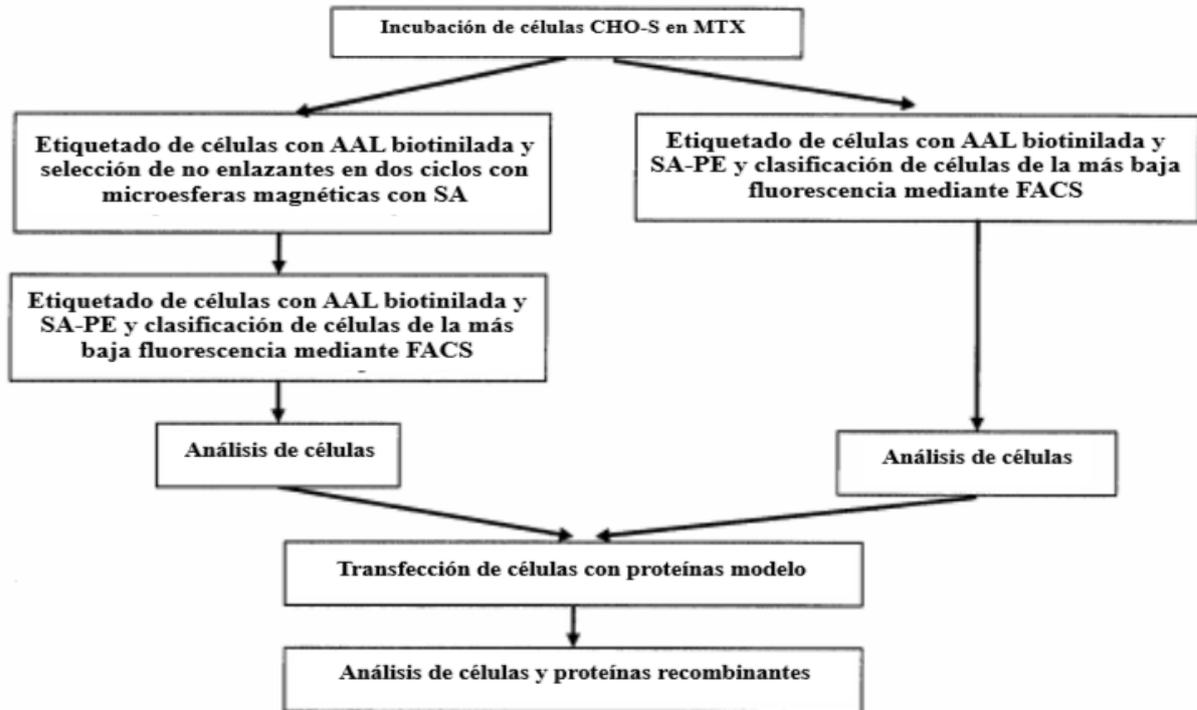


FIG.2

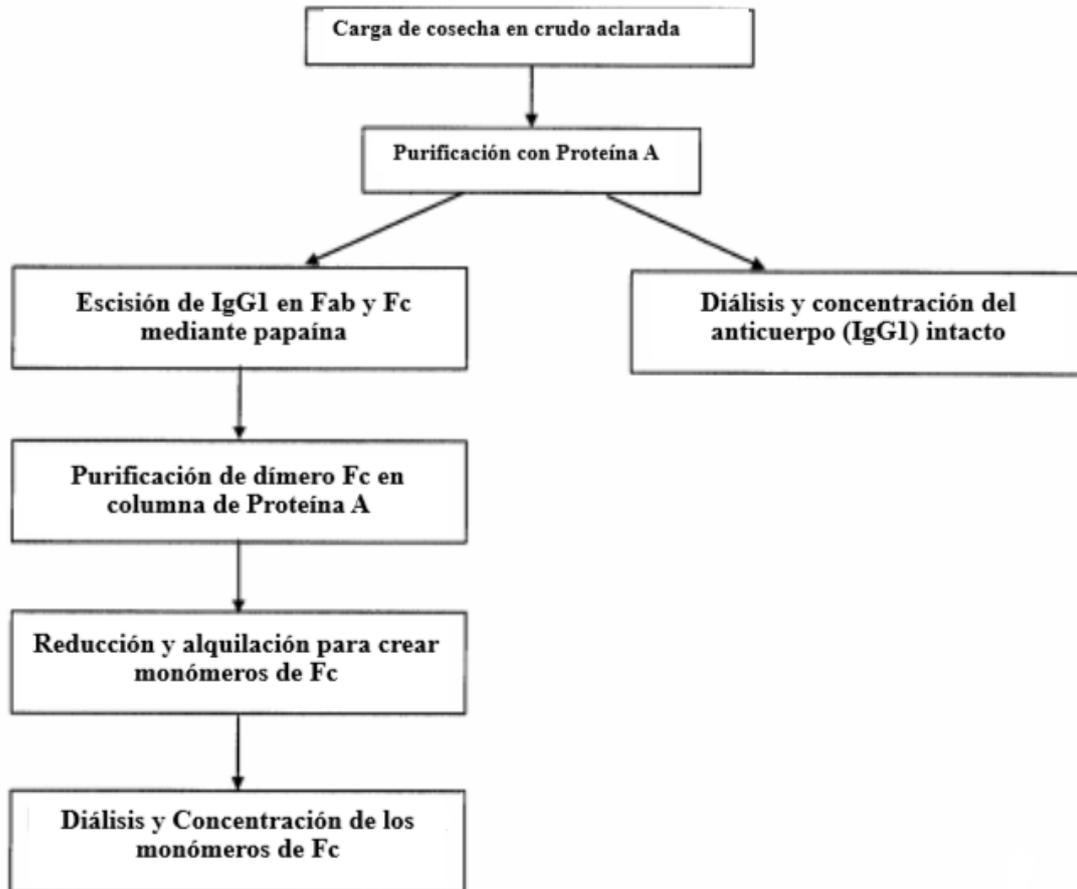


FIG. 3

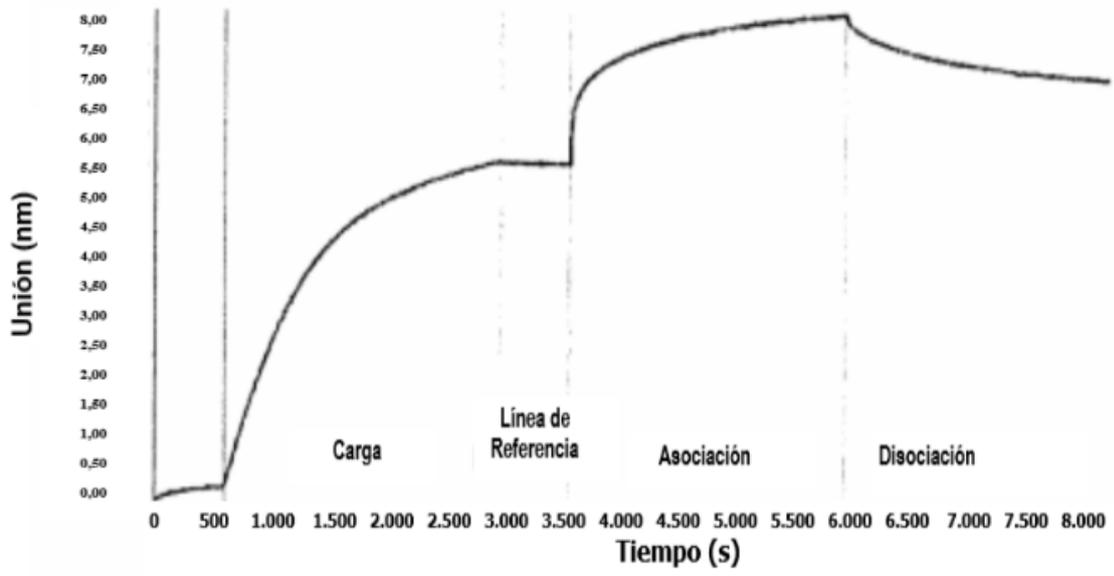


FIG.4

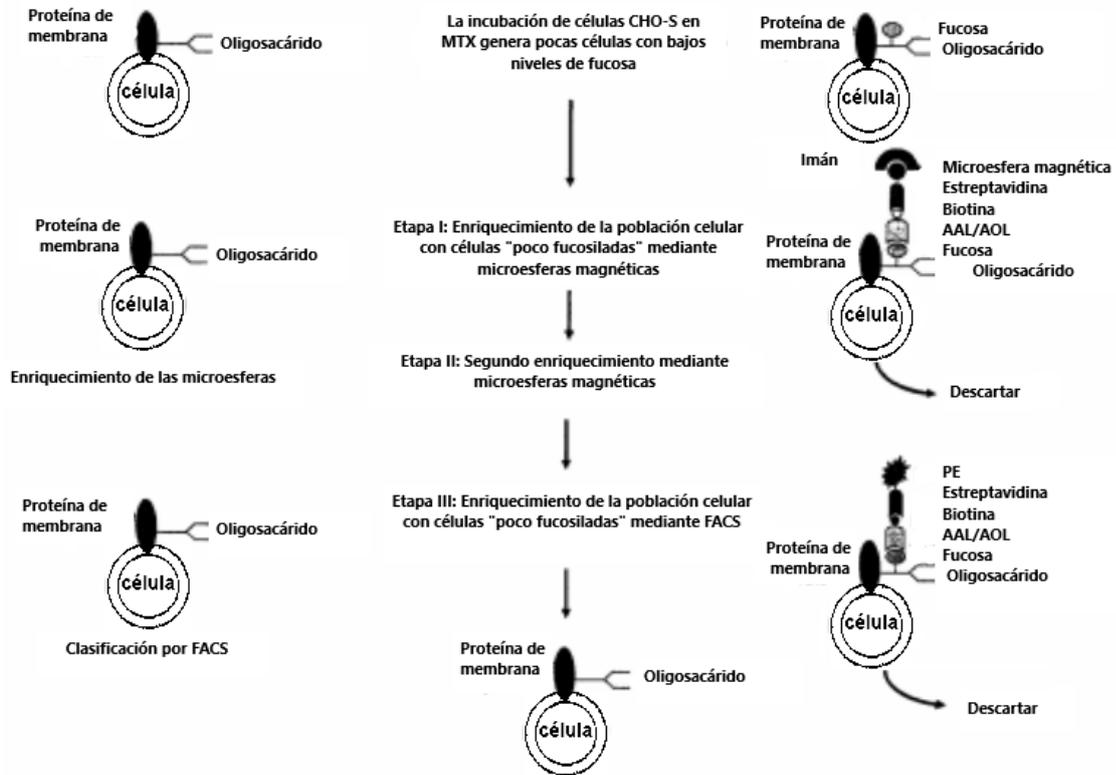


FIG. 5

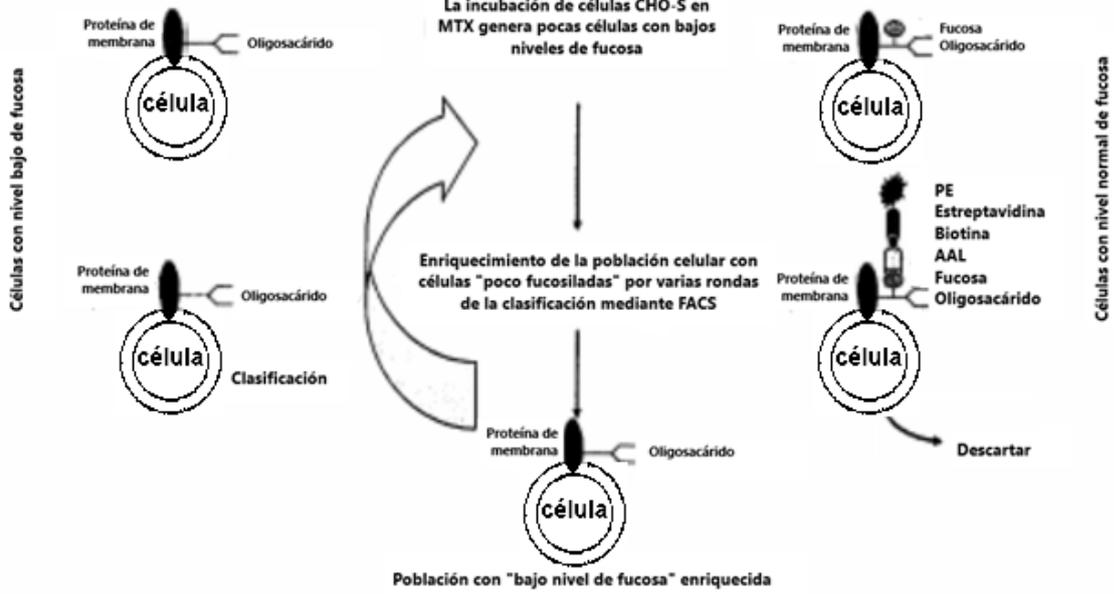


FIG. 6

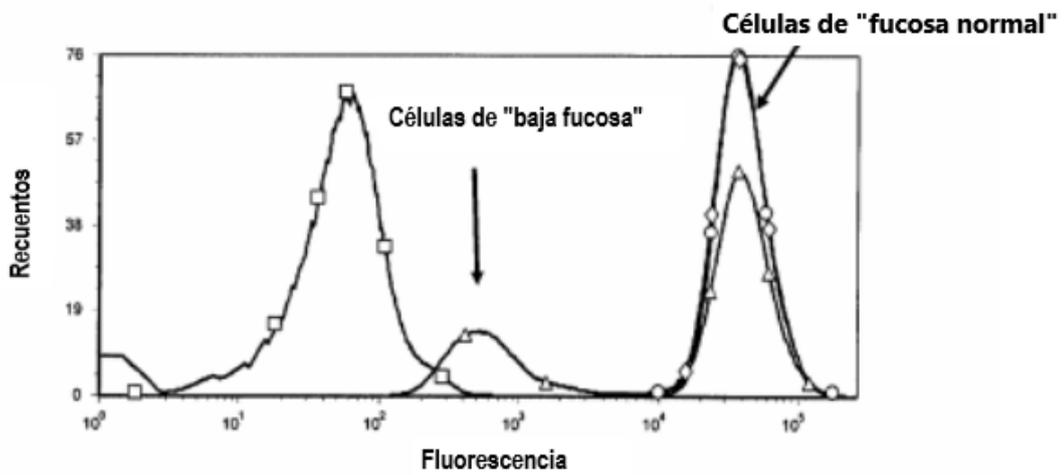


FIG. 7A

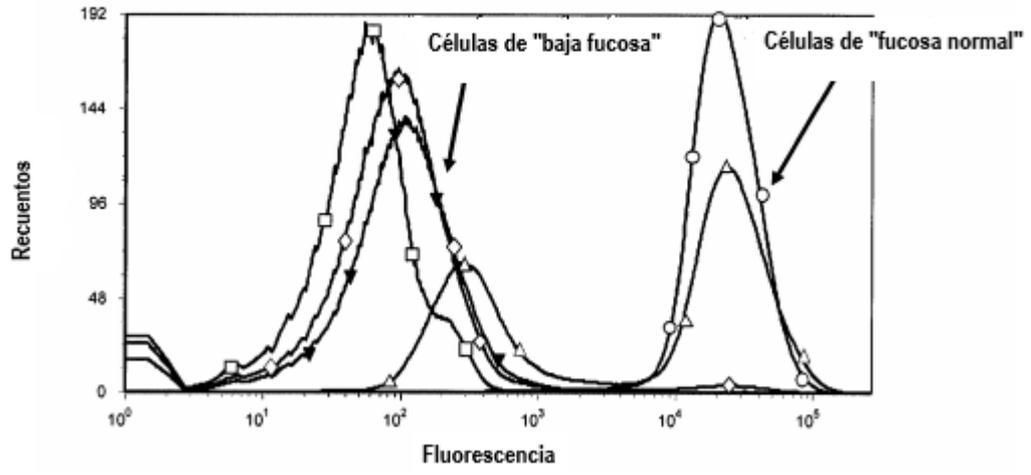


FIG. 7B

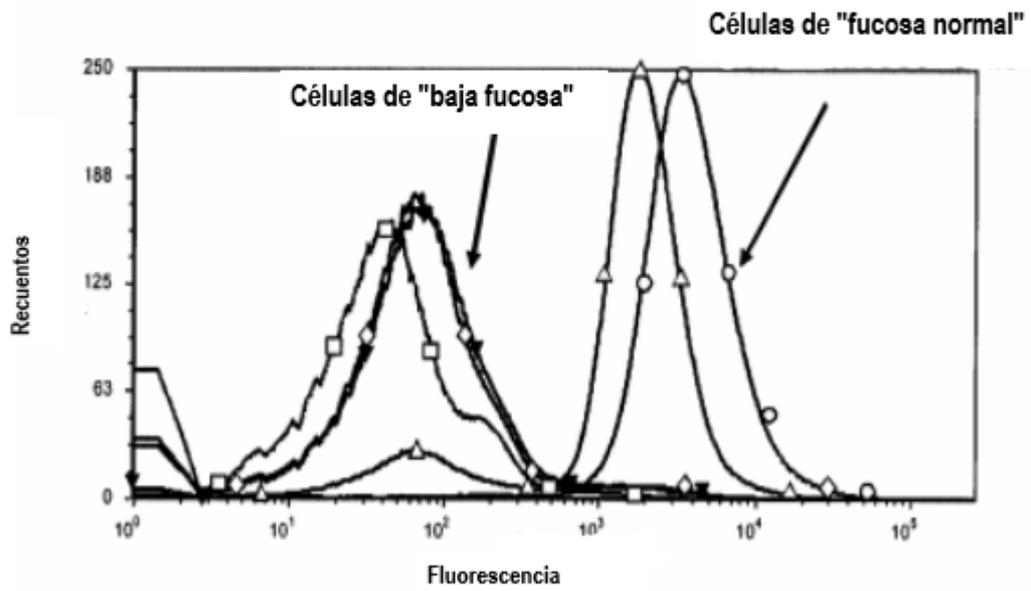


FIG.8A

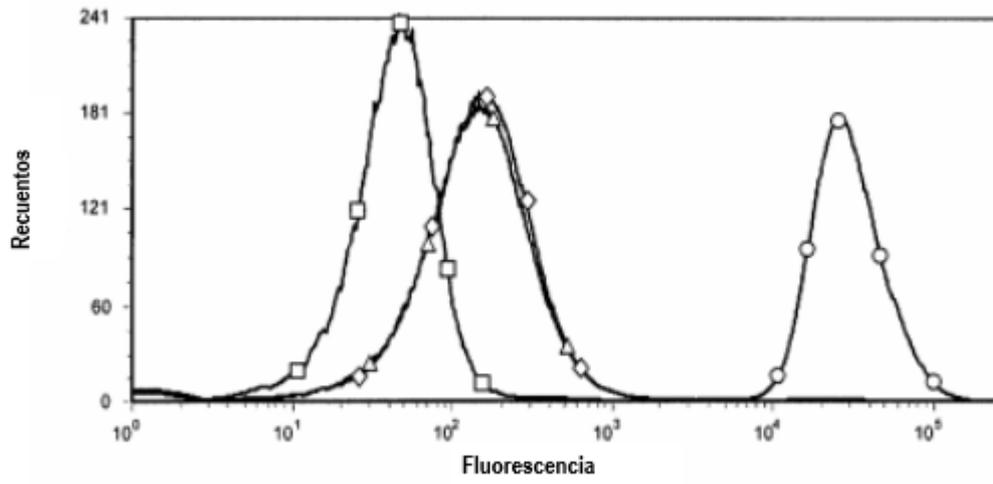


FIG.8B

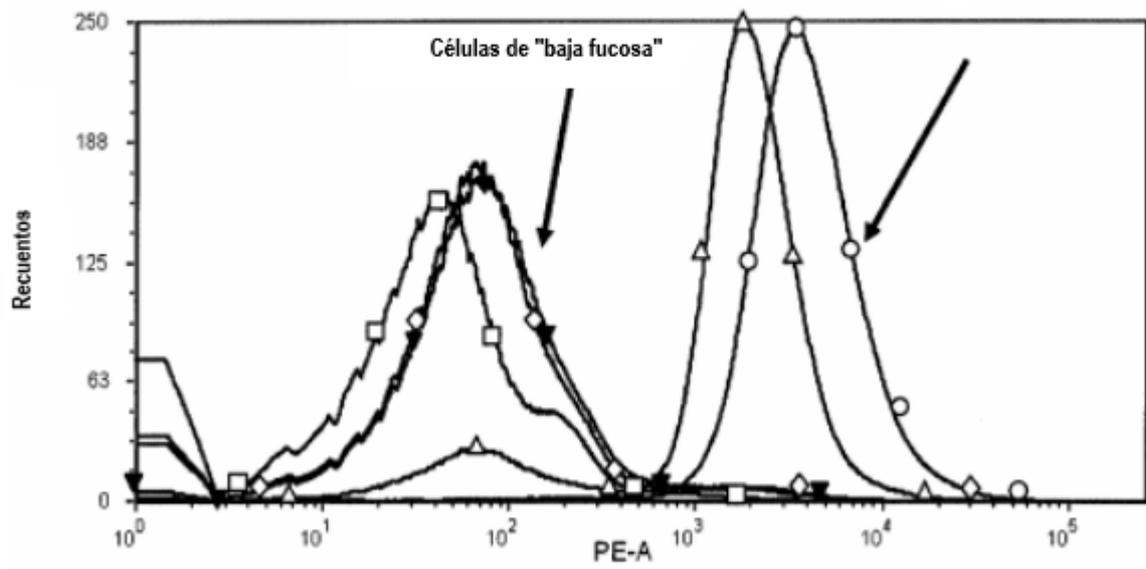


FIG. 9

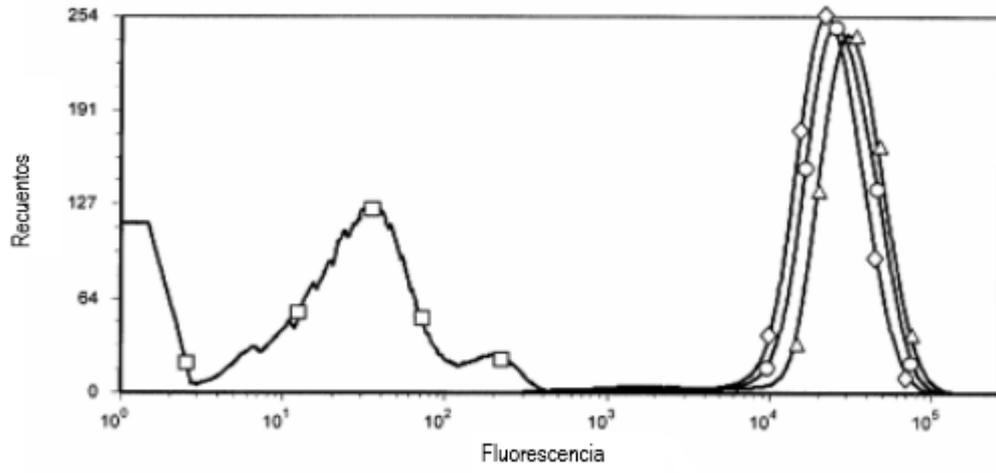


FIG. 10

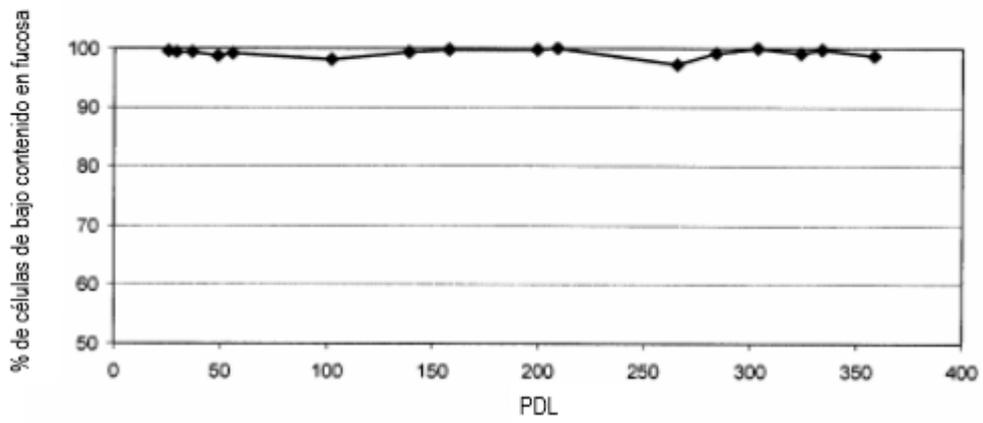


FIG. 11

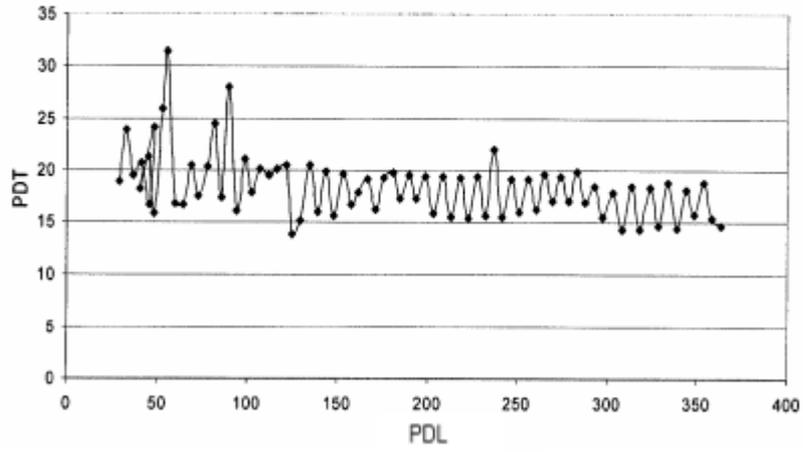


FIG.12

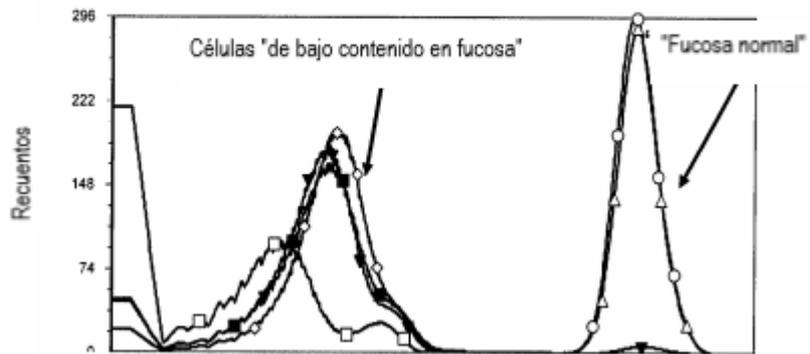


FIG. 13

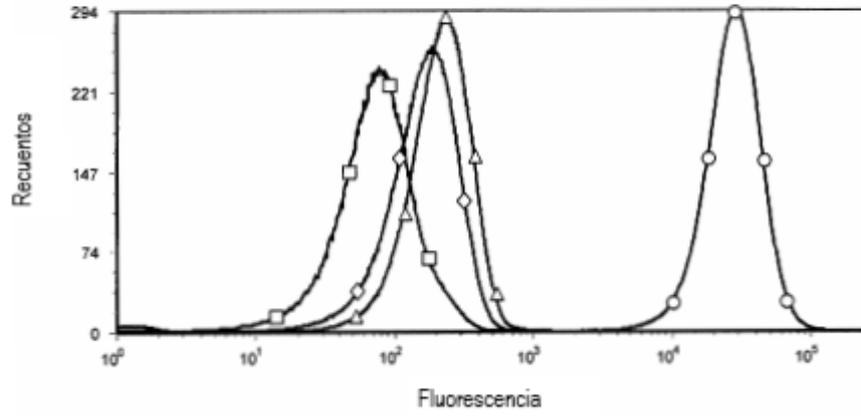


FIG. 14

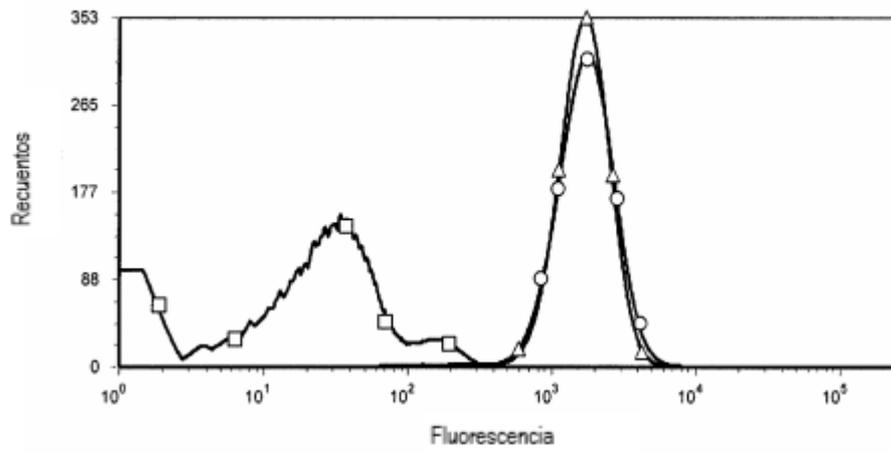


FIG.15

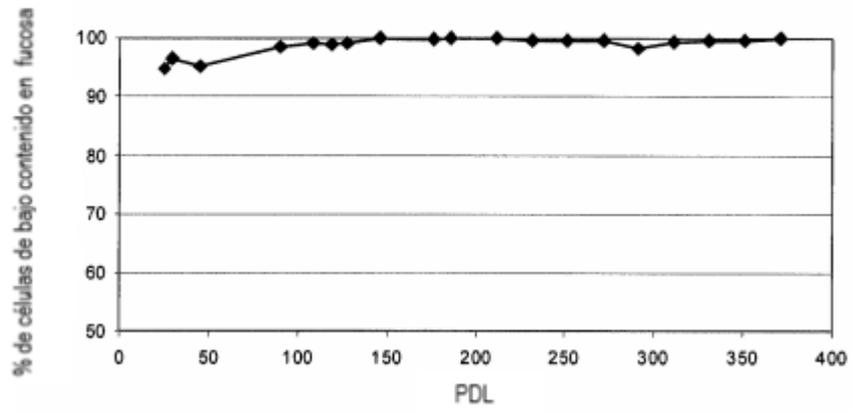


FIG. 16

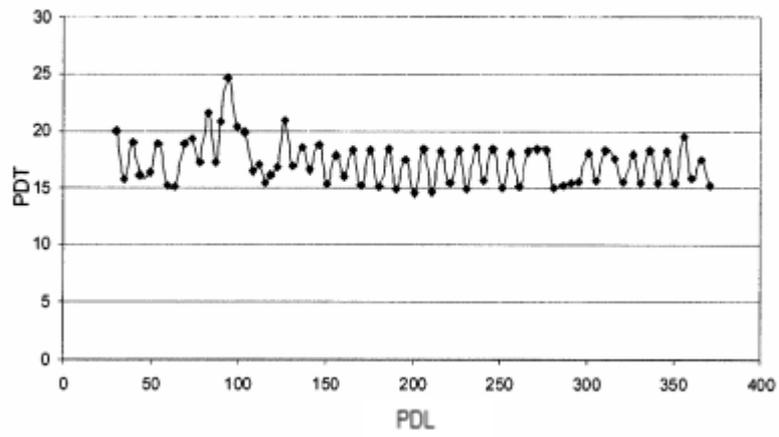


FIG. 17

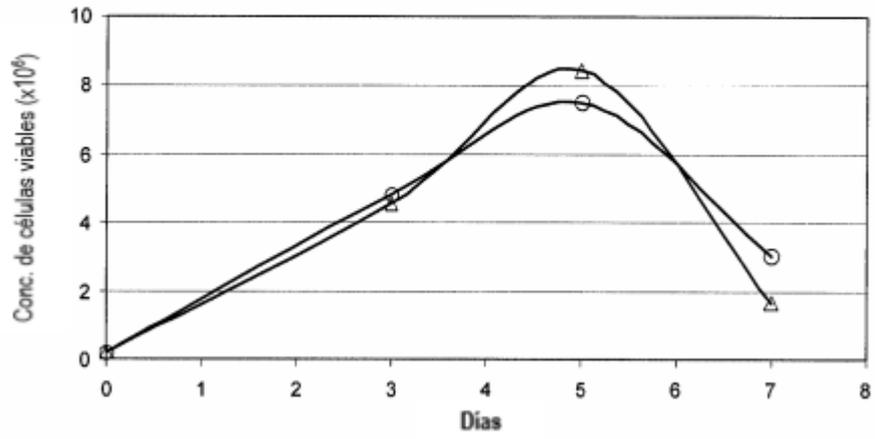


FIG 18

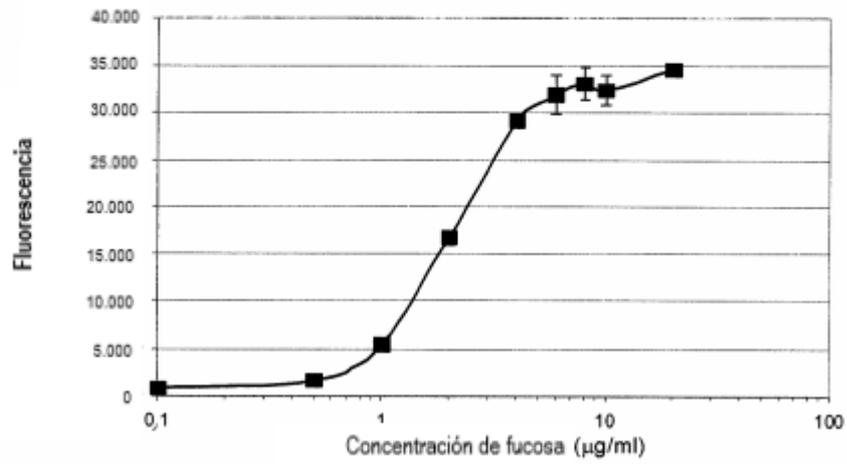


FIG. 19A

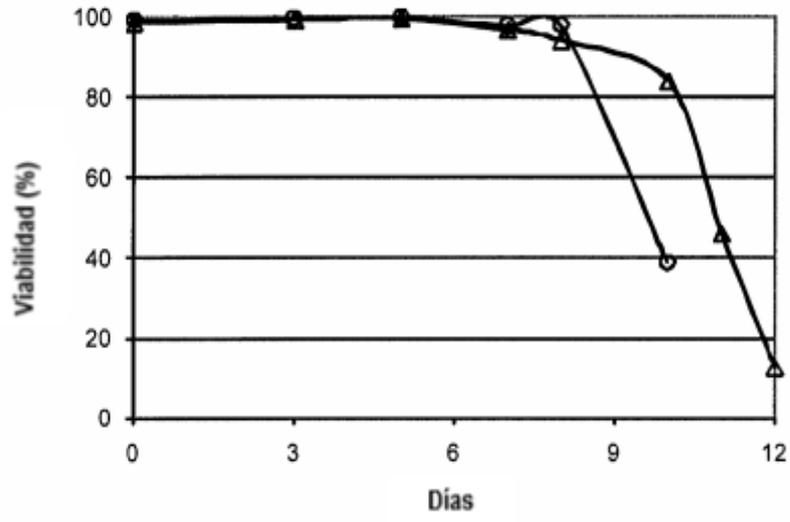


FIG 19B

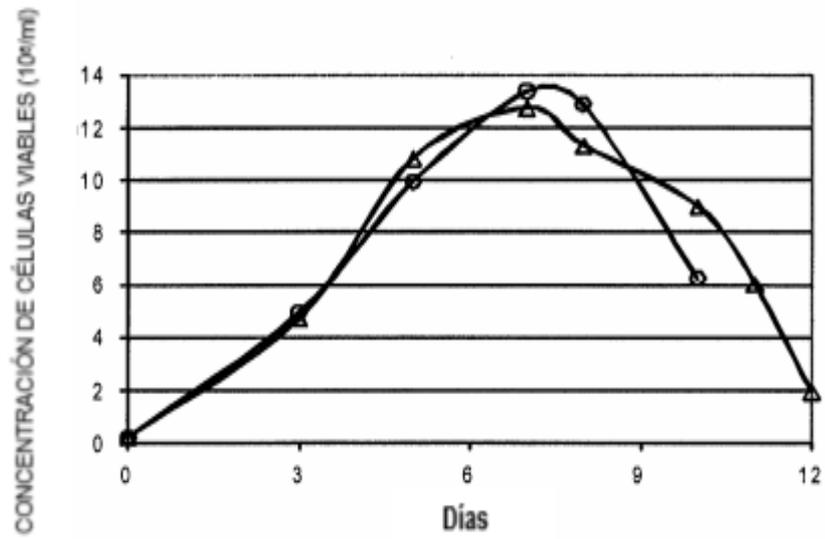


FIG. 19C

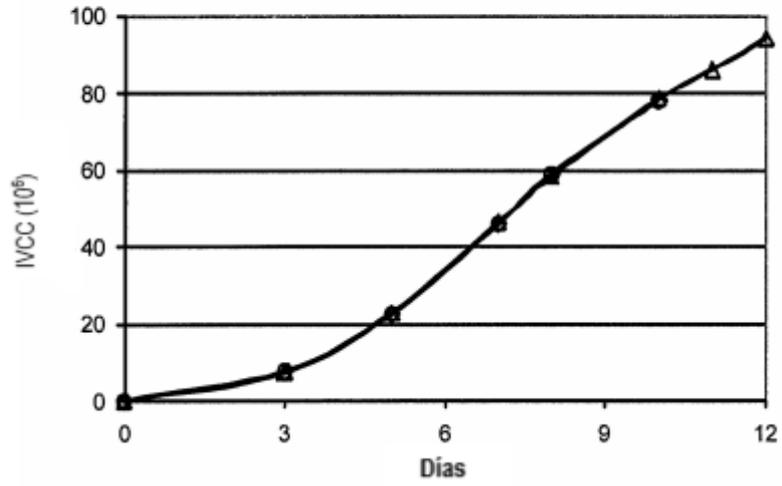


FIG.19D

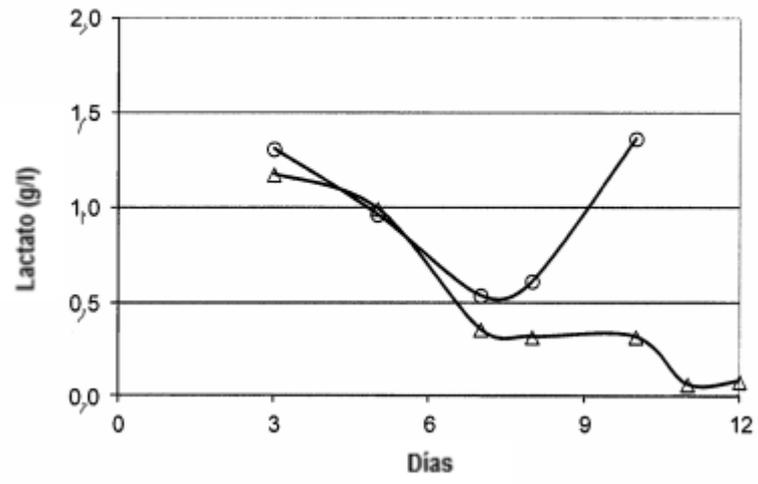


FIG. 20

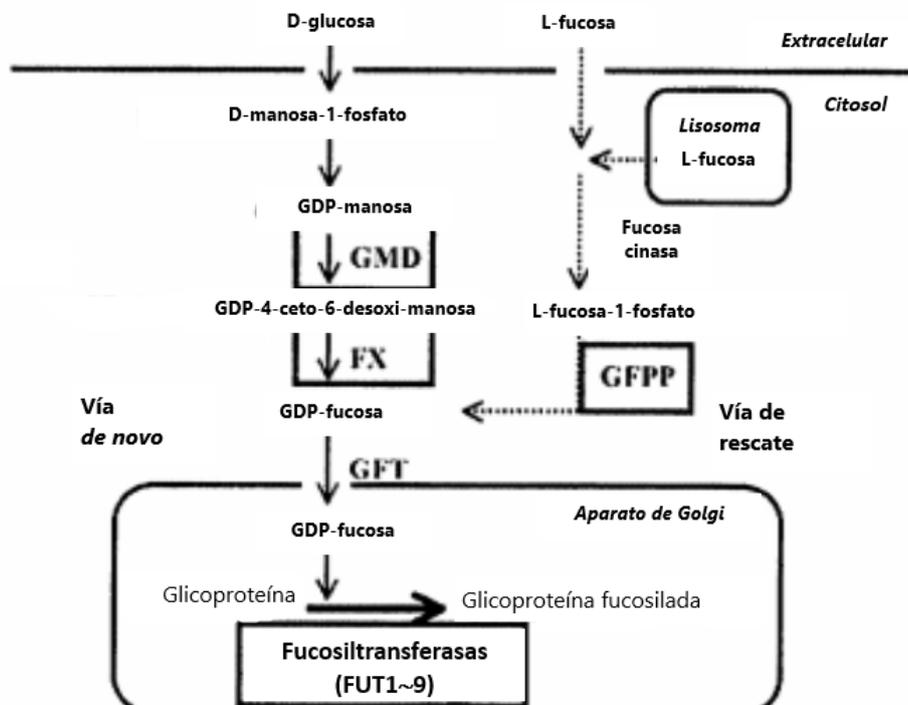


FIG. 21

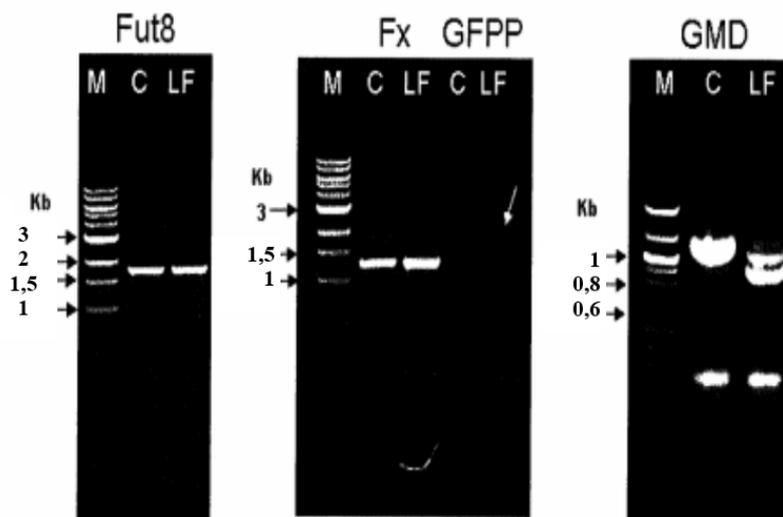


FIG. 22A-B

A

GMD (Completo)	1 nahapascpcsrnsqdgdkgkprkvalitgitqdgaylaefllekyevhgivrreefntgriehlyknpqahieggn
GMD SV1	1 nahapascpcsrnsqdgdkgkprkvalitgitqdgaylaefllekyevhgivrreefntgriehlyknpqahieggn
GMD (Completo)	81 klhygdltatclvkiinevkpteiynlgaqshvki sfdlaeytadvdgvgtlrlldaiktoglinsvkfyqaateelyg
GMD SV1	241 klhygdltatclvkiinevkpteiynlgaqshvki sfdlaeytadvdgvgtlrlldaiktoglinsvkfyqaateelyg
GMD (Completo)	161 kvqei pqkettpfyprapygaaklyaywivnfreaynlfavngilfnhesprrganfvtrkieravakiylgqlecfel
GMD SV1	481 kvqei pqkettpfyprapygaaklyaywivnfreaynlfavngilfnhesprrganfvtrkieravakiylgqlecfel
GMD (Completo)	241 gnldakrdwghakdyveawmlgndepedfviatgevhsvrefveksfnhigktivwegkneevgrcketgkihvtvd
GMD SV1	721 gnldakrdwghakdyve----- <i>Eliminación de Exón 5 y Exón 9 en SV1</i>
GMD (Completo)	321 lkyyrptevdflqgdcskaqqklnwkprvafdelvremvqadvelmrtnpna
GMD SV1	772 -----dfiqgdcskaqqklnwkprvafdelvremvqadvelmrtnpna

B

GMD (Completo)	1 nahapascpcsrnsqdgdkgkprkvalitgitqdgaylaefllekyevhgivrreefntgriehlyknpqahieggn
GMD SV2	1 nahapascpcsrnsqdgdkgkprkvalitgitqdgaylaefllekyevhgivrreefntgriehlyknpqahieggn <i>Eliminación de Exón 3 y Exón 4 en SV2</i>
GMD (Completo)	81 klhygdltatclvkiinevkpteiynlgaqshvki sfdlaeytadvdgvgtlrlldaiktoglinsvkfyqaateelyg
GMD SV2	148 -----isfdlaeytadvdgvgtlrlldaiktoglinsvkfyqaateelyg
GMD (Completo)	161 kvqei pqkettpfyprapygaaklyaywivnfreaynlfavngilfnhesprrganfvtrkieravakiylgqlecfel
GMD SV2	283 kvqei pqkettpfyprapygaaklyaywivnfreaynlfavngilfnhesprrganfvtrkieravakiylgqlecfel
GMD (Completo)	241 gnldakrdwghakdyveawmlgndepedfviatgevhsvrefveksfnhigktivwegkneevgrcketgkihvtvd
GMD SV2	523 gnldakrdwghakdyveawmlgndepedfviatgevhsvrefveksfnhigktivwegkneevgrcketgkihvtvd
GMD (Completo)	321 lkyyrptevdflqgdcskaqqklnwkprvafdelvremvqadvelmrtnpna
GMD SV2	763 lkyyrptevdflqgdcskaqqklnwkprvafdelvremvqadvelmrtnpna

FIG. 23A



FIG. 23B

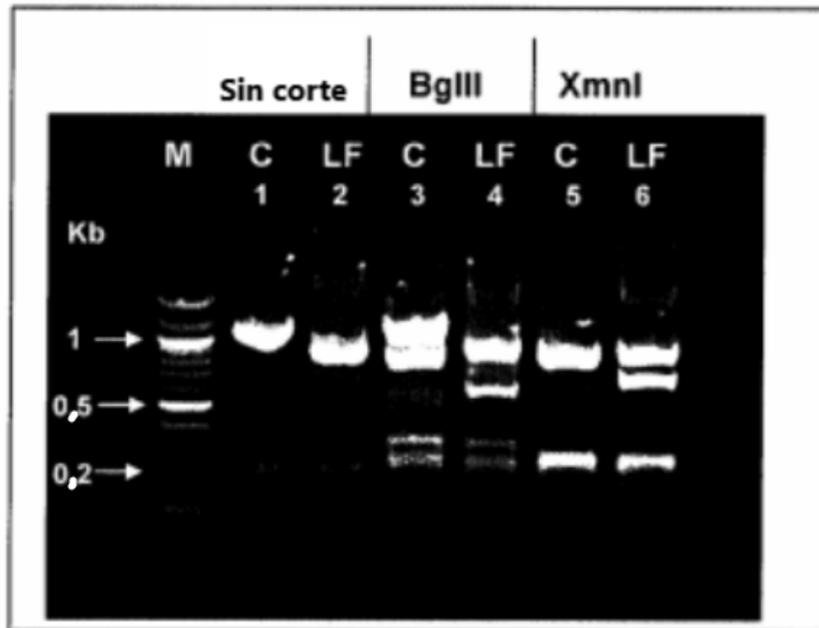


FIG. 24

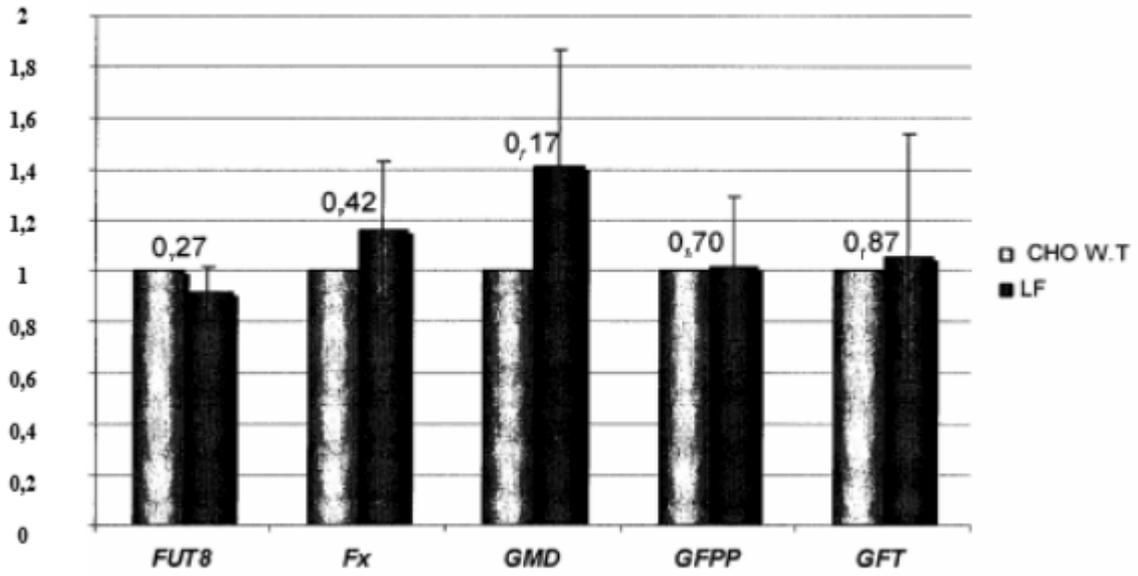


FIG. 25

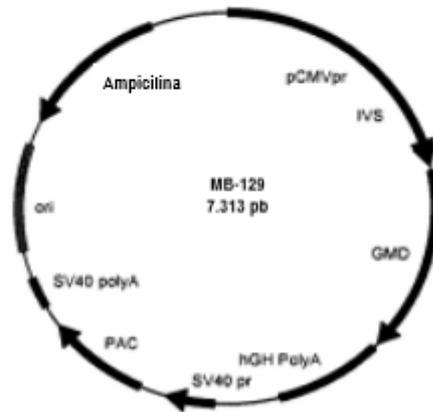


FIG.26

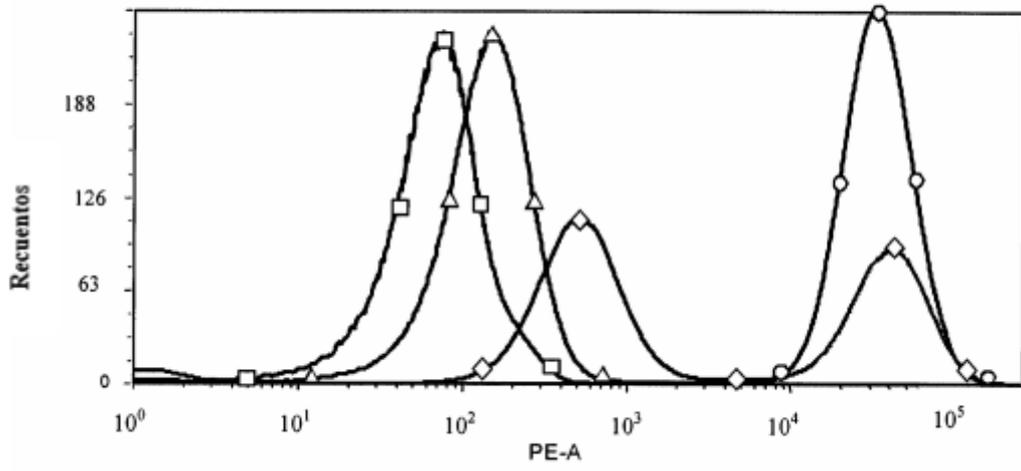


FIG.27

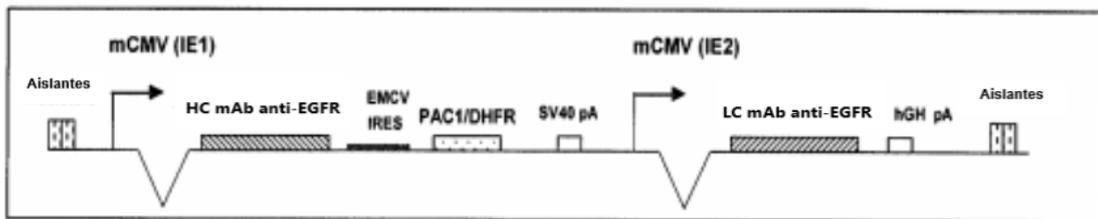


FIG.28

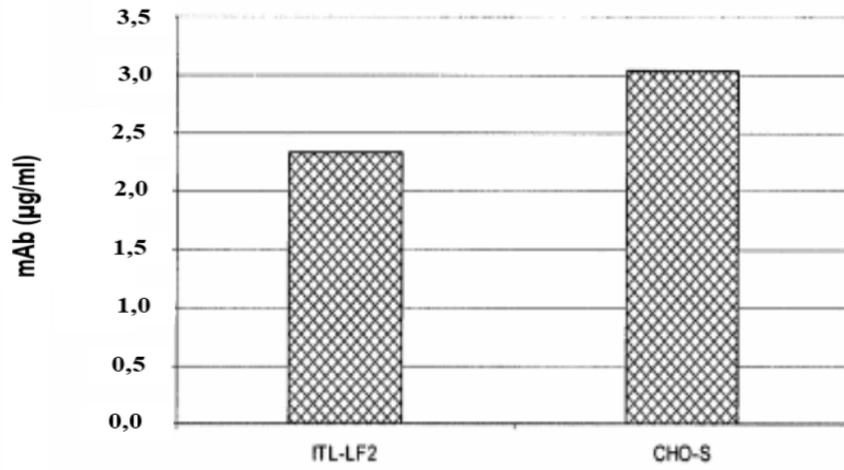


FIG. 29

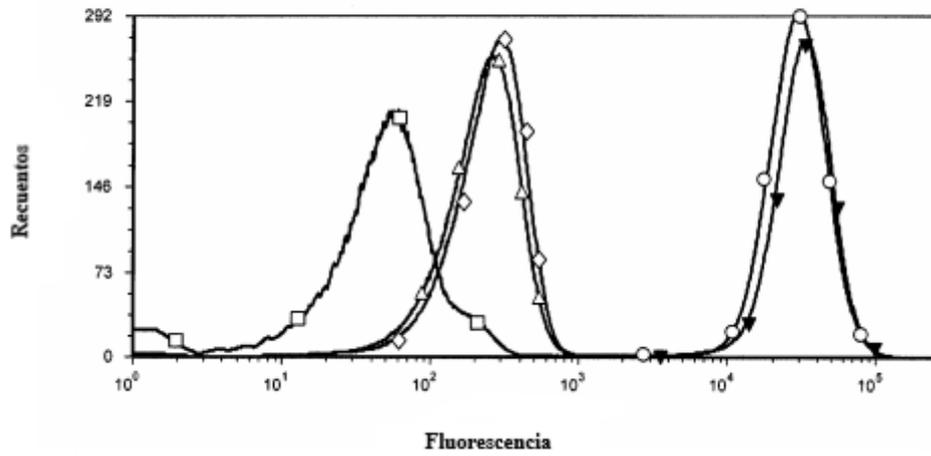
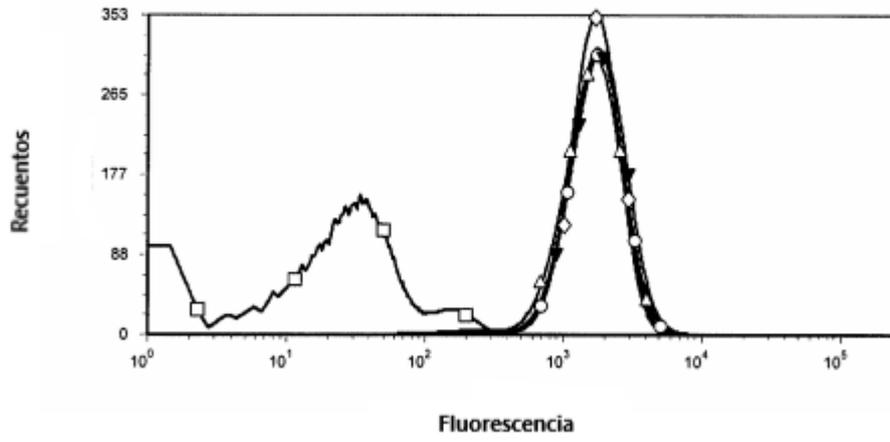


FIG. 30



FIGs. 31A-B

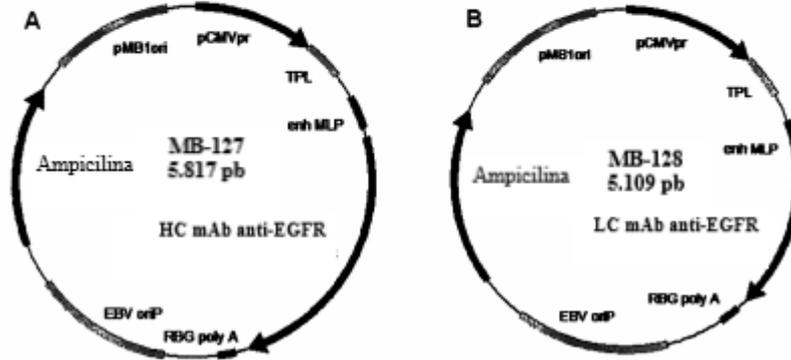


FIG. 32

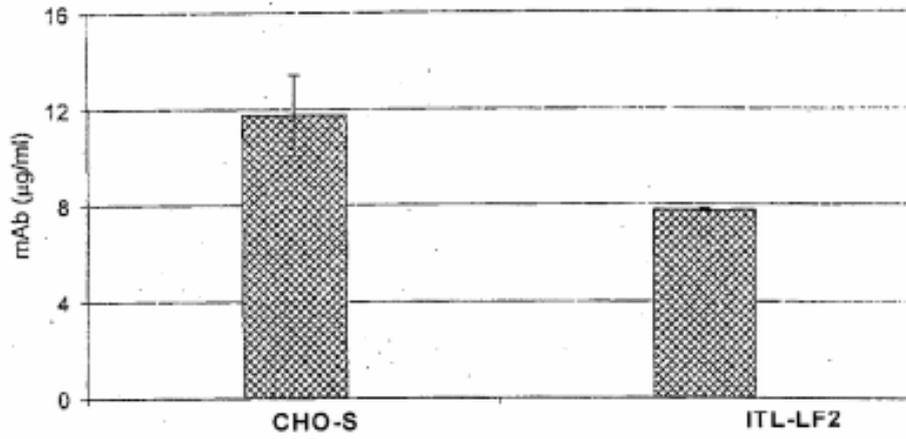


FIG. 33

Nivel bajo de fucosa

Nivel normal de fucosa

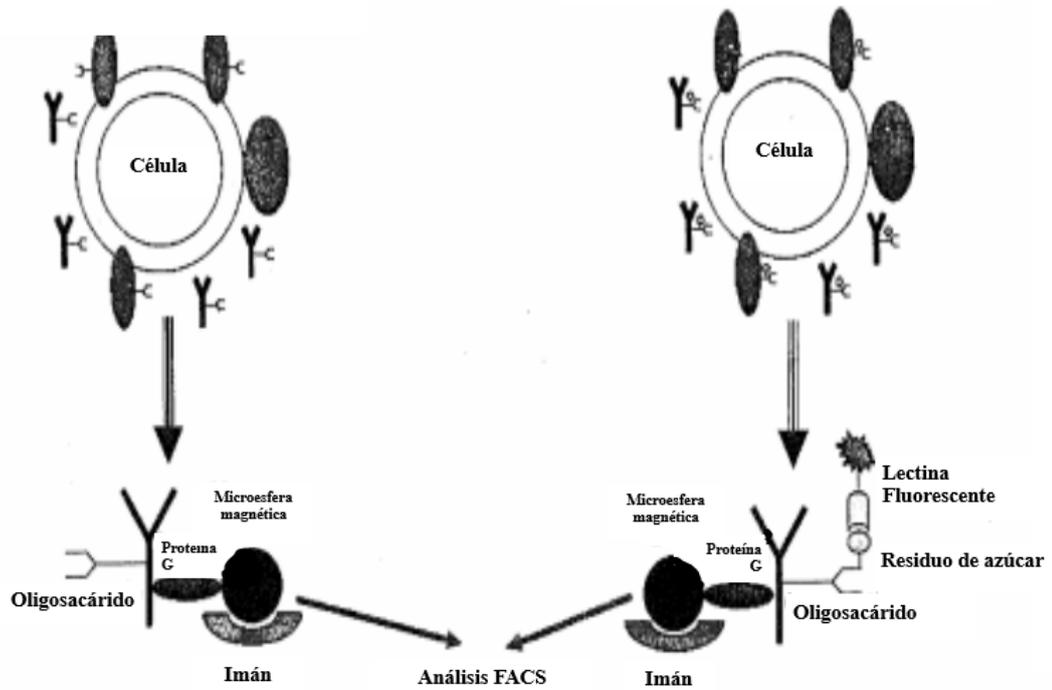


FIG. 34

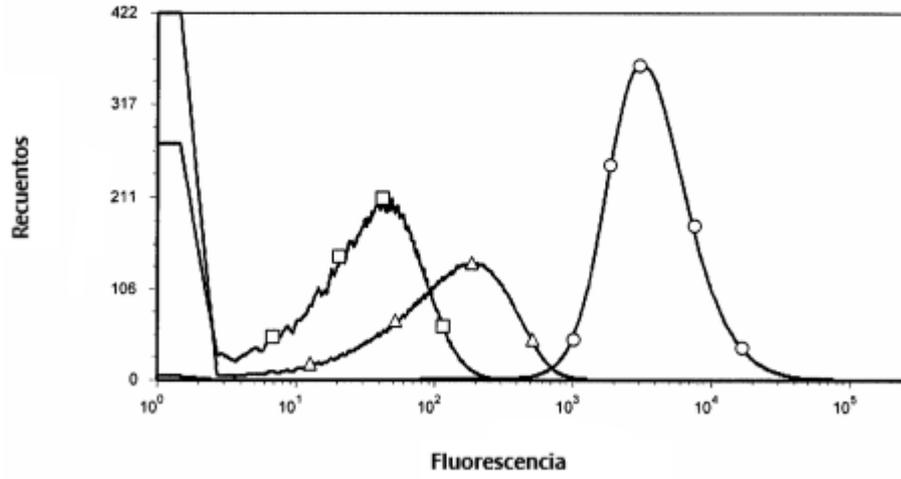


FIG. 35

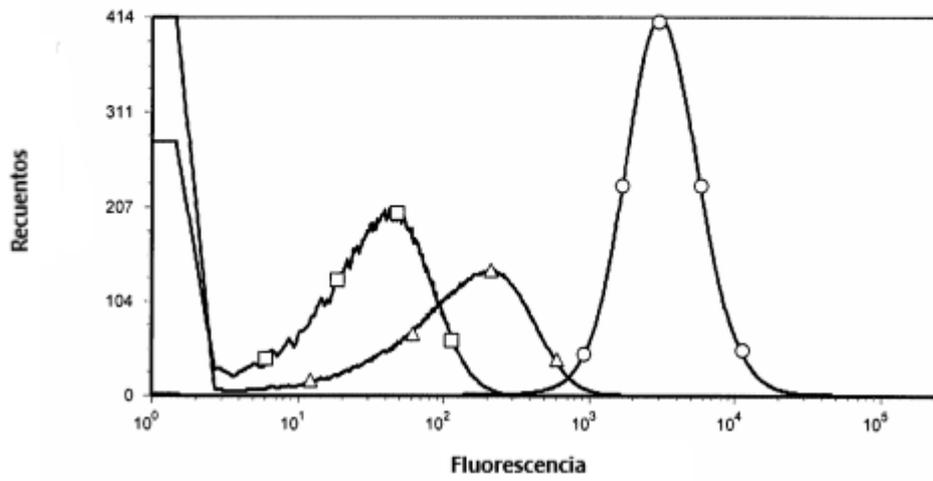


FIG. 36

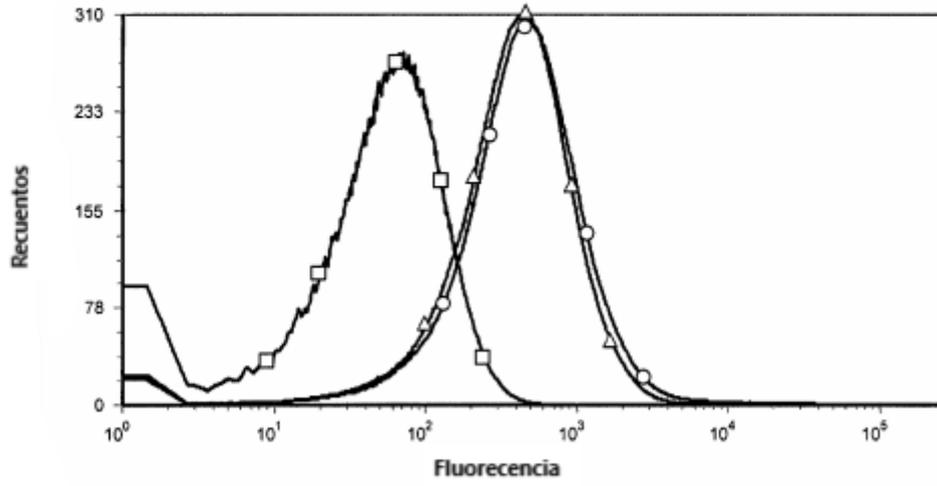


FIG. 37

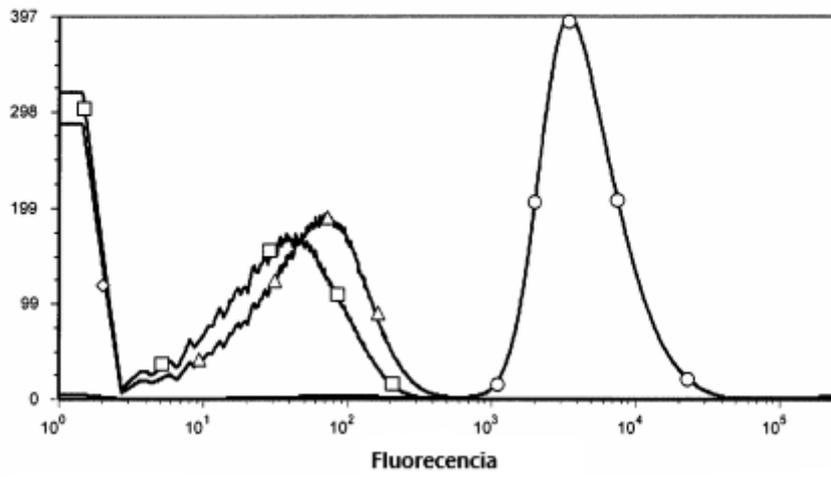


FIG. 38

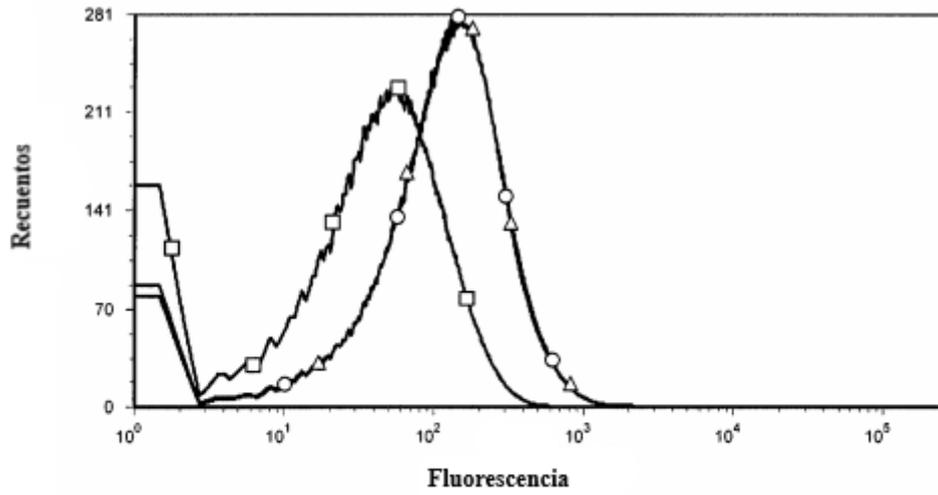


FIG. 39

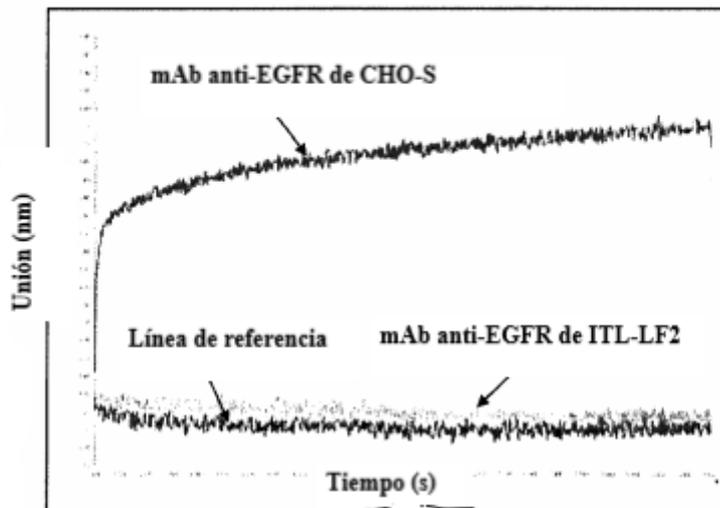


FIG. 40

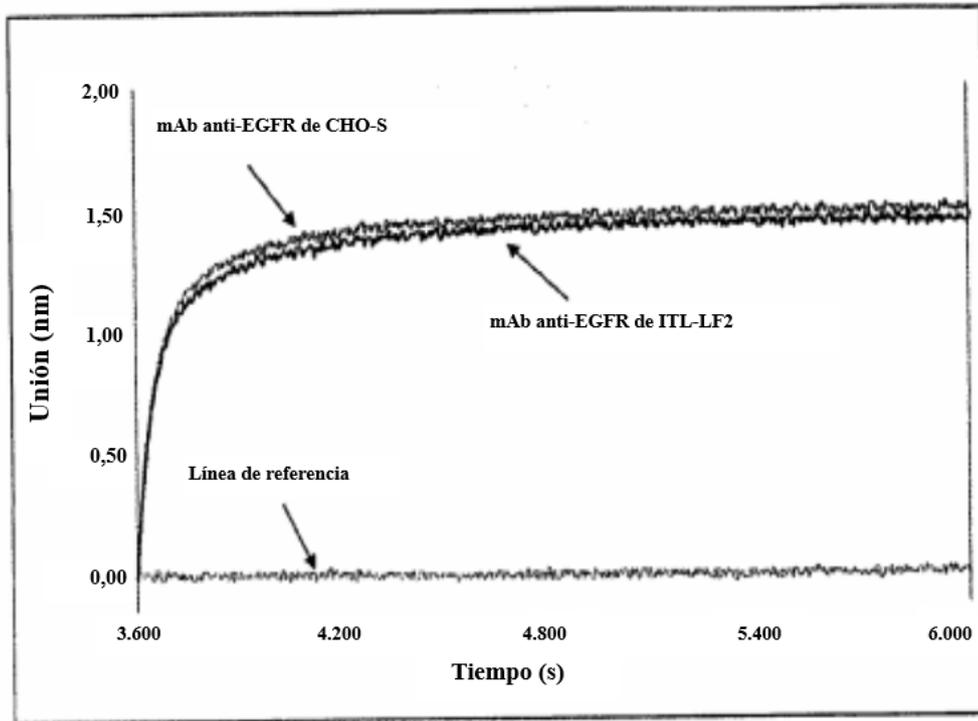


FIG. 41

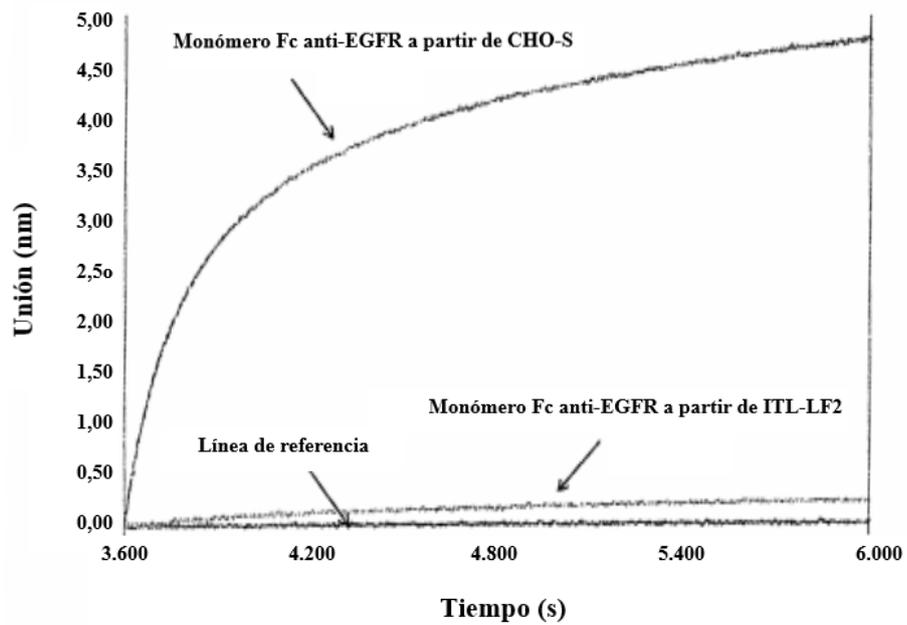


FIG. 42

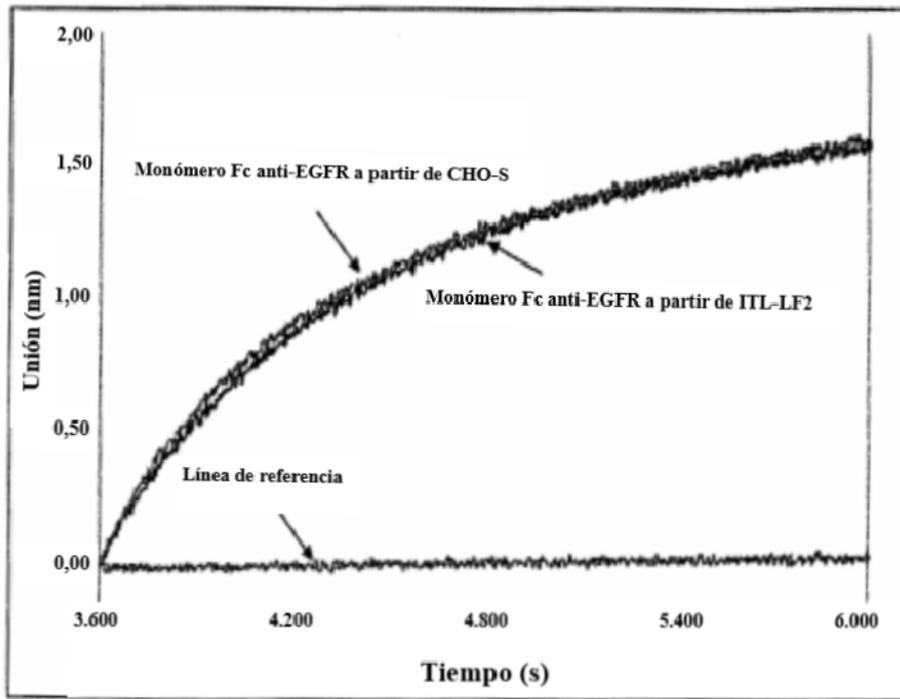


FIG. 43

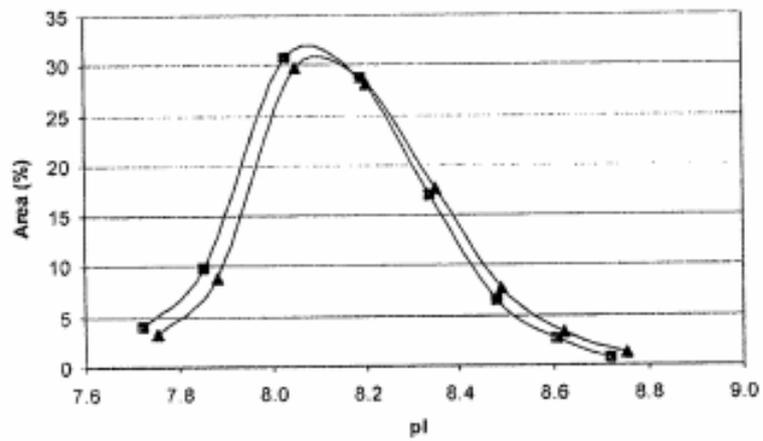


FIG. 44

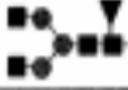
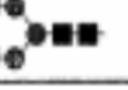
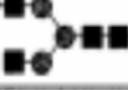
Muestra	Estructura de glicano	Abundancia relativa	Porcentaje de Fucosilación
CHO-S WT de fucosa normal	 G0-F	25,5 %	100 %
	 G1-F	56,8 %	
	 G2-F	17,8 %	
ITL-LF2 de baja fucosa	 G0-F	45,9 %	0%
	 G1-F	49,0 %	
	 G2-F	5,1 %	

FIG. 45

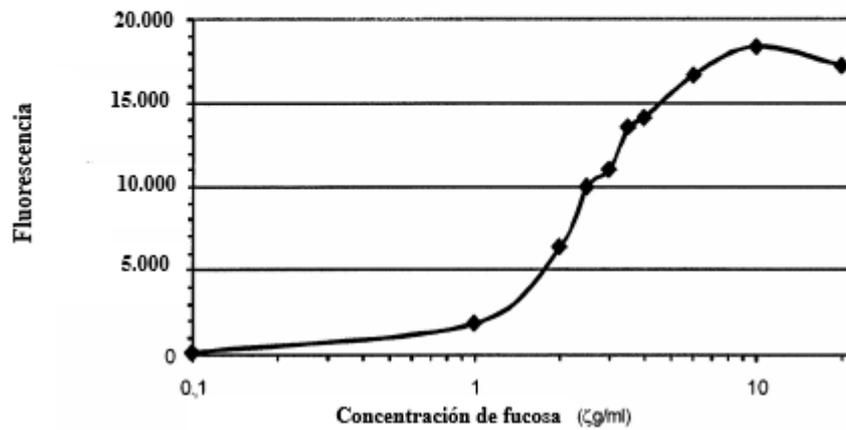


FIG. 46

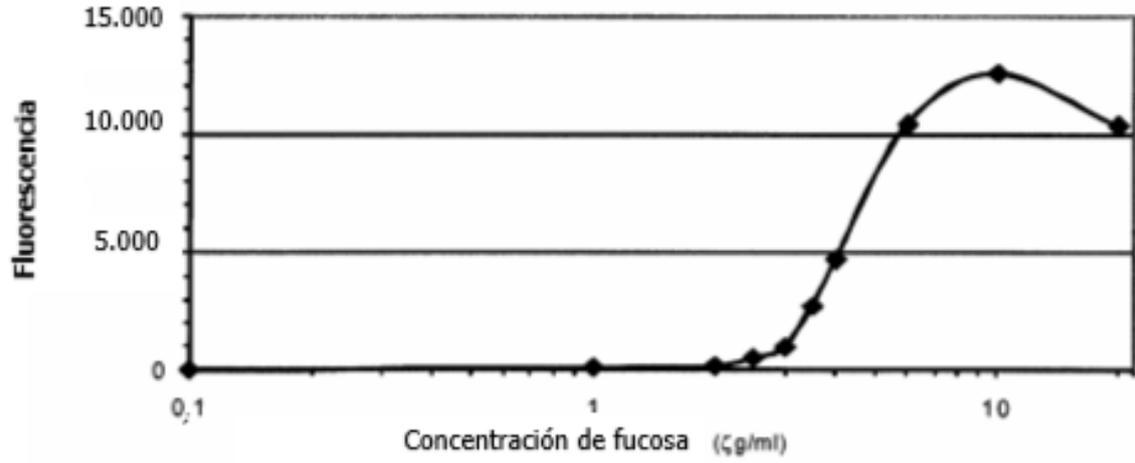


FIG. 47

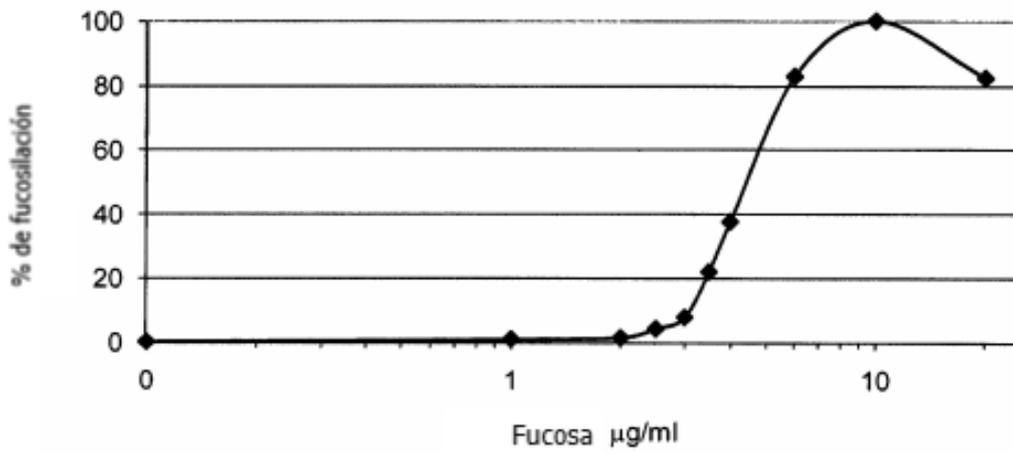


FIG. 48A

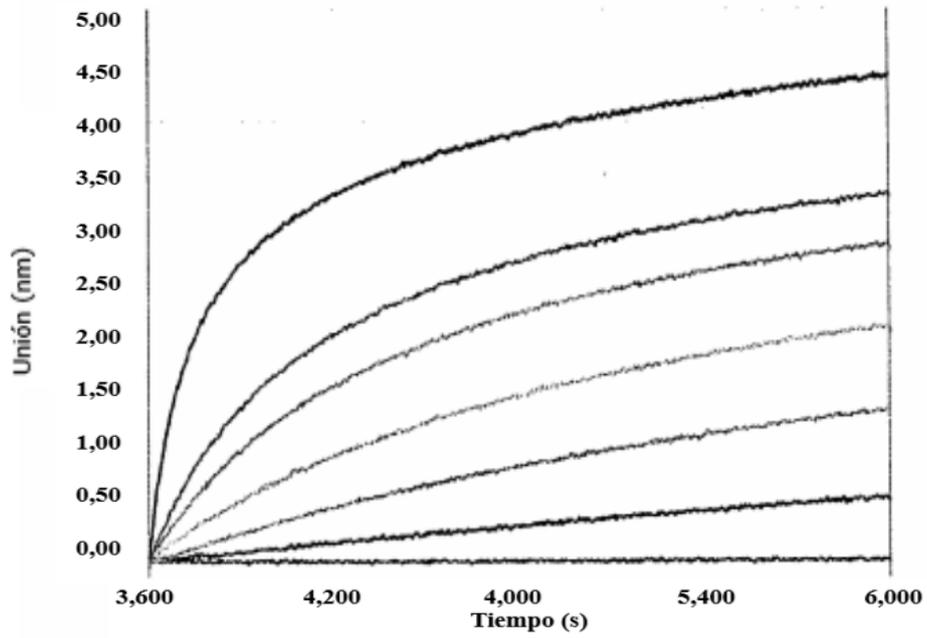


FIG. 48B



FIG.49

