

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 695 999**

51 Int. Cl.:

C12N 15/69 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2008 E 12191535 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 2592148**

54 Título: **Expresión de proteínas a partir de múltiples ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

12.10.2007 EP 07019999

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

11.01.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GOEPFERT, ULRICH;
KNOETGEN, HENDRIK;
KOPETZKI, ERHARD y
STERN, ANNE**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 695 999 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

Expresión de proteínas a partir de múltiples ácidos nucleicos

5 La presente invención se encuentra en el campo de la producción de polipéptidos. Más precisamente, se informa de la producción de una inmunoglobulina en una célula de mamífero, de manera que la célula de mamífero se transfecta con diferentes vectores, cada uno de los cuales comprende un casete de expresión para la inmunoglobulina de interés.

10 **Antecedentes de la invención**

Los sistemas de expresión para la producción de polipéptidos recombinantes son bien conocidos en el estado de la técnica y los describen, por ejemplo, Marino, MH, Biopharm. 2 (1989) 18-33; Goeddel, D.V., et al., Methods Enzymol. 185 (1990) 3-7; Wurm, F., y Bernard, A., Curr. Opin. Biotechnol. 10 (1999) 156-159. Los polipéptidos para uso en aplicaciones farmacéuticas se producen preferentemente en células de mamífero tales como células CHO, células NS0, células SP2/0, células COS, células HEK, células BHK, células PER.C6@ o similares. Los elementos esenciales de un plásmido de expresión son una unidad de propagación de plásmidos procariontes, por ejemplo, para *E. coli*, que comprende un origen de replicación procariótico, y un marcador de selección, un marcador de selección eucariótico y uno o más casetes de expresión para la expresión del gen o genes estructurales de interés, comprendiendo cada uno un promotor, un gen estructural y un terminador de la transcripción que incluye una señal de poliadenilación. Para la expresión transitoria en células de mamífero se puede incluir un origen de replicación de mamífero, tal como el SV40 Ori u OriP. Como promotor, se puede seleccionar un promotor constitutivo o inducible. Para la transcripción optimizada, se puede incluir una secuencia de Kozak en la región no traducida 5'. Para el procesamiento de ARNm, en particular el corte y empalme de ARNm y la terminación de la transcripción, pueden incluirse señales de corte y empalme de ARNm, dependiendo de la organización del gen estructural (organización de exones e intrones), así como una señal de poliadenilación.

La expresión de un gen se realiza como expresión transitoria o como permanente. El polipéptido o polipéptidos de interés son en general polipéptidos secretados y, por lo tanto, contienen una extensión N-terminal (también conocida como secuencia señal) que es necesaria para el transporte/secreción del polipéptido a través de la célula hacia el medio extracelular. En general, la secuencia señal puede derivarse de cualquier gen que codifique un polipéptido secretado. Si se usa una secuencia señal heteróloga, preferentemente es una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para la secreción en levadura, por ejemplo, la secuencia señal nativa de un gen heterólogo que debe expresarse puede sustituirse por una secuencia señal de levadura homóloga derivada de un gen secretado, como la secuencia señal de invertasa de levadura, líder del factor alfa (incluyendo los líderes del factor α de *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* y *Hansenula*, el segundo descrito en el documento US 5.010.182), la secuencia señal de fosfatasa ácida o la secuencia señal de glucoamilasa de *C. albicans* (documento EP 0 362 179). En la expresión de células de mamíferos, la secuencia señal nativa de la proteína de interés es satisfactoria, aunque otras secuencias señal de mamíferos pueden ser adecuadas, tales como las secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o especies relacionadas, por ejemplo, para inmunoglobulinas de origen humano o murino, así como secuencias señal secretoras víricas, por ejemplo, la secuencia señal de la glucoproteína D del herpes simple. El fragmento de ADN que codifica un presegmento de este tipo está ligado en marco al fragmento de ADN que codifica un polipéptido de interés.

En la actualidad, las células CHO se utilizan ampliamente para la expresión de polipéptidos farmacéuticos, ya sea a pequeña escala en el laboratorio o a gran escala en los procesos de producción. Debido a su amplia distribución y uso, las propiedades características y el acervo genético de las células CHO son bien conocidos. Por lo tanto, las células CHO están aprobadas por las autoridades reguladoras para la producción de proteínas terapéuticas para la aplicación en seres humanos.

En el documento EP 0 569 678 se describen dobles transfectantes de genes MHC como vacunas celulares para la inmunoprevención de la metástasis tumoral. El documento WO 97/08342 informa de un procedimiento mejorado para medir la actividad de una secuencia promotora en una célula de mamífero utilizando un gen indicador. En el documento WO 2005/113770 se informa del uso de los ARNip anti-RhoA y anti-RhoC para inhibir específicamente la síntesis de RhoA o RhoC. En el documento US 7.202.072 se informa de un procedimiento para la producción o expresión recombinante de mutante de fosfatasa alcalina eucariótica en células de levadura. El documento WO 2001/038557 informa de un procedimiento de cribado de células transformadas de manera múltiple utilizando la expresión bicistrónica de proteínas fluorescentes. En el documento WO 1999/47647 se informa de un procedimiento para producir líneas celulares eucarióticas recombinantes que expresan múltiples proteínas o ARN de interés. En el documento WO 2003/076588 se informa de sistemas, incluidos procedimientos, composiciones y kits, para la transfección de células con materiales de transfección utilizando vehículos codificados. En el documento US 5.089.397 se informa de un sistema de expresión para la producción recombinante de una proteína deseada que comprende células CHO transformadas con una secuencia de ADN que tiene la secuencia codificante de la proteína deseada bajo el control del promotor de la metalotioneína II

humana. En el documento US 2003/0040047 se informa de un procedimiento para producir proteínas recombinantes. Lamango et al. (Lamango, NS, et al., Arch. Biochem. Biophys. 330 (1996) 238-250) informan de la dependencia de la producción de prohormona convertasa 2 de la presencia del polipéptido neuroendocrino 7B2. En Waldenstroem, M., et al., Gene 120 (1992) 175-181 se informa de la transfección de un vector de expresión basado en BPV-1 en células que albergan genomas de BPV-1 replicantes no integrados. El documento US 4.912.038 informa de procedimientos y vectores para obtener proteína tensioactiva alveolar 32K humana y canina. En el documento WO 89/10959 se informa de técnicas de ADN recombinante y la expresión de polipéptidos de mamíferos en células eucarióticas modificadas genéticamente. En el documento DD 287531 se informa de una cotransferencia repetida de un vector de expresión para la hormona de crecimiento humana y un vector de expresión para un gen marcador de selección.

El documento WO 93/01296 informó de la producción de anticuerpos en células infectadas por el virus de la vaccinia. En el documento WO 95/17513 se informa de la retransformación de hongos filamentosos. El documento US 2003/096341 informó de la expresión de fosfatasa alcalina en levaduras. En el documento WO 2007/113172 se informa de los anticuerpos contra el péptido amiloide beta.

Moretto, N., et al. informaron de anticuerpos sensibles a la conformación contra el amiloide beta de la enfermedad de Alzheimer por vacunación con un péptido epitópico de linfocitos B restringido a tiorredoxina (J. Biol. Chem. 282 (2007) 11436-11445).

El documento US-A-5 852 175 informó de anticuerpos bloqueantes del ligando de glucoproteína P-selectina. En el documento WO 94/25067 se informa de los anticuerpos contra la P-selectina y sus usos.

Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones.

Un primer aspecto de la presente invención es un procedimiento para la producción recombinante de una inmunoglobulina heteróloga que se secreta al medio de cultivo en una célula CHO que comprende:

- a) proporcionar una célula CHO, que está
 - adaptada al crecimiento en cultivo en suspensión.
 - adaptada al crecimiento en medio sin suero,
 - sin micoplasmas, y
 - opcionalmente sin virus,
- b) proporcionar un ácido nucleico que comprende
 - un origen de replicación procariótico,
 - una primera secuencia de ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección procariótico,
 - una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de dicha inmunoglobulina heteróloga, y/o una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicha inmunoglobulina heteróloga,

de manera que se proporciona un primer vector de transfección que comprende dicho ácido nucleico proporcionado, que comprende dicho primer así como dicho segundo y/o tercer ácido nucleico, y una secuencia adicional de un cuarto ácido nucleico que confiere resistencia a un primer agente de selección eucariótico, y

de manera que se proporciona un segundo vector de transfección que comprende dicho ácido nucleico proporcionado, que comprende el primer así como el segundo y/o tercer ácido nucleico idéntico al del/al de los contenido(s) en dicho ácido nucleico proporcionado contenido en el primer vector de transfección, y una secuencia adicional de un cuarto ácido nucleico que confiere resistencia a un segundo agente de selección eucariótico, que es diferente del cuarto ácido nucleico en dicho primer vector de transfección, de manera que dicho segundo agente de selección eucariótico es diferente de dicho primer agente de selección eucariótico,

- b1) proporcionar un ácido nucleico que comprende

- un origen de replicación procariótico,

5 - una primera secuencia de ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección procariótico,

10 - una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de dicha inmunoglobulina heteróloga, y/o una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicha inmunoglobulina heteróloga,

15 de manera que se proporciona un tercer vector de transfección que comprende dicho ácido nucleico proporcionado y una secuencia adicional de un cuarto ácido nucleico que confiere resistencia a un tercer agente de selección eucariótico, de manera que dicho tercer agente de selección eucariótico es diferente de dicho primer agente de selección eucariótico y también es diferente de dicho segundo agente de selección eucariótico,

20 c) transfectar dicha célula CHO proporcionada y seleccionar dicha célula CHO transfectada con dichos vectores de transfección de la etapa b), en la que dicha transfección y selección comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

(i) transfectar dicha célula CHO con dicho primer vector de transfección,

25 (ii) seleccionar una célula CHO transfectada en (i) mediante crecimiento seleccionado en un medio de cultivo que contiene dicho primer agente de selección eucariótico al que el primer vector de transfección confiere resistencia,

(iii) transfectar dicha célula CHO seleccionada en (ii) con dicho segundo vector de transfección,

30 (iv) seleccionar una célula CHO transfectada en (iii) mediante crecimiento seleccionado en un medio de cultivo que contiene dicho primer agente de selección eucariótico, al que dicho primer vector de transfección confiere resistencia, y que contiene dicho segundo agente de selección eucariótico, al que dicho segundo vector de transfección confiere resistencia,

35 (v) transfectar dicha célula CHO seleccionada en (iv) con dicho tercer vector de transfección,

40 (vi) seleccionar una célula CHO transfectada en (v) mediante crecimiento seleccionado en un medio de cultivo que contiene dicho primer agente de selección eucariótico al que el primer vector de transfección confiere resistencia y dicho segundo agente de selección eucariótico al que el segundo vector de transfección confiere resistencia y dicho tercer agente de selección eucariótico al que el tercer vector de transfección confiere resistencia,

45 d) cultivar dicha célula CHO transfectada y seleccionada de la etapa c) en un medio que contiene dicho primer y segundo y dicho tercer agente de selección eucariótico en condiciones adecuadas para la expresión de dicho segundo y/o tercer ácido nucleico,

e) recuperar dicha inmunoglobulina heteróloga secretada del medio de cultivo y producir así una inmunoglobulina heteróloga en una célula CHO, secretándose dicha inmunoglobulina al medio de cultivo.

50 En un modo de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, dicha célula CHO es una célula CHO K1, o una célula CHO DG44, o una célula CHO XL99, o una célula CHO DXB11, o una célula CHO DP12. En otro modo de realización, el promotor empleado para la transcripción de dichos segundo y tercer ácidos nucleicos es diferente del promotor empleado para la transcripción de dicho cuarto ácido nucleico. Otro modo de realización es que el promotor empleado para la transcripción de dichos segundo y tercer ácidos nucleicos es el mismo. En un modo de realización, dicho promotor empleado para la transcripción de dicho segundo y tercer ácido nucleico es el promotor de CMV. En otro modo de realización, dicho promotor empleado para la transcripción de dicho cuarto ácido nucleico es el promotor de SV40. En un modo de realización, dicha inmunoglobulina heteróloga es un anticuerpo anti-A β . En el documento WO 2003/070760, por ejemplo, se informa de anticuerpos anti-A β ejemplares.

60 En un modo de realización, dicha selección de una célula CHO transfectada en la etapa c) (ii) y/o (iv) es mediante el crecimiento en un medio de cultivo sin un agente de selección durante 10 a 72 horas, seguido de crecimiento seleccionado en un medio de cultivo que contiene dicho primer agente de selección eucariótico en el caso de (ii) o dicho primer y segundo agente de selección eucariótico en el caso de (iv).

5 En otro modo de realización más, el uso de codones de dicho segundo y tercer ácido nucleico se optimiza para la traducción en células CHO. También es un modo de realización que dicho segundo y/o tercer ácido nucleico contiene una secuencia de ácido nucleico intrónica. Otro modo de realización comprende que dicho primer vector de transfección y dicho segundo vector de transfección difieren solamente en el ácido nucleico que confiere resistencia a dicho agente de selección eucariótico, es decir, en dicho cuarto ácido nucleico, y, por lo demás, son al menos un 95 % idénticos según la secuencia de ácido nucleico. En otro modo de realización, dichos vectores de transfección difieren cada uno solo en el ácido nucleico que confiere resistencia a dicho primer, segundo y tercer agente de selección eucariótico.

10 En un modo de realización, dicha selección de una célula CHO transfectada en la etapa c) (vi) es mediante crecimiento en un medio de cultivo sin un agente de selección durante 10 a 72 horas, seguido de crecimiento seleccionado en un medio de cultivo que contiene dicho primer y segundo y tercer agentes de selección eucarióticos.

15 En otro modo de realización, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende una etapa adicional.

f) purificar dicha inmunoglobulina heteróloga producida y recuperada por recombinación de la etapa e) con una o más etapas cromatográficas.

20 Un modo de realización es que dicha etapa c) y dicha etapa d) se realizan en el mismo medio. Otro modo de realización es que dicho medio es un medio sin suero, o un medio sin suero suplementado con componentes definidos de origen animal, o un medio sin componentes de origen animal, o un medio sin proteínas, o un medio definido químicamente, o un medio definido sin proteínas. En otro modo de realización en dicha etapa d), dicho cultivo se realiza en presencia de dichos agentes de selección eucarióticos en un volumen de menos de 500 litros y dicho cultivo se realiza en ausencia de dichos agentes de selección eucarióticos en un volumen de 500 litros o más, de manera que dicha recuperación de dicha inmunoglobulina heteróloga secretada procede del medio de cultivo sin dichos agentes de selección eucarióticos. En otro modo de realización, dicho cultivo en dicha etapa d) comprende cultivos secuenciales, cada uno con un volumen de cultivo creciente hasta un volumen de cultivo final preestablecido, de modo que los cultivos se realizan en presencia de dichos agentes de selección eucarióticos hasta un volumen de cultivo de un 1 % (v/v) del volumen de cultivo del cultivo final y en ausencia de dichos agentes de selección eucarióticos en un volumen de cultivo de más de un 1 % (v/v) del volumen de cultivo del cultivo final.

35 La productividad de dichas células CHO es, en un modo de realización, durante 40 generaciones, no menos de un 70 % y no más de un 130 % de la productividad después de 10 generaciones de cultivo como cultivo discontinuo. En otro modo de realización, la productividad de dichas células CHO durante 60 generaciones es de no menos de un 50 % y no más de un 150 % de la productividad después de 10 generaciones de cultivo como cultivo discontinuo. En otro modo de realización más, la productividad de dicha célula CHO es de al menos 1,5 g/l de dicha inmunoglobulina heteróloga en un plazo de 21 días como cultivo en régimen discontinuo alimentado.

Un segundo aspecto de la presente invención es una célula CHO obtenible con el siguiente procedimiento:

45 a) proporcionar una célula CHO, que está

- adaptada al crecimiento en cultivo en suspensión.
- adaptada al crecimiento en medio sin suero,
- 50 - sin micoplasmas, y
- opcionalmente sin virus,

55 b) proporcionar un ácido nucleico que comprende

- un origen de replicación procariótico,
- una primera secuencia de ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección procariótico,
- 60 - una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de una inmunoglobulina heteróloga, y/o una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de una inmunoglobulina heteróloga,

de manera que se proporciona un primer vector de transfección que comprende dicho ácido nucleico proporcionado, que comprende dicho primer así como segundo y/o tercer ácido nucleico, y una secuencia adicional de un cuarto ácido nucleico que confiere resistencia a un primer agente de selección eucariótico, y

5 de manera que se proporciona un segundo vector de transfección que comprende dicho ácido nucleico proporcionado, que comprende el primer así como el segundo y/o tercer ácido nucleico idéntico al del/al de los contenido(s) en dicho ácido nucleico proporcionado contenido en el primer vector de transfección, y una secuencia adicional de un cuarto ácido nucleico que confiere resistencia a un segundo agente de selección eucariótico, que es diferente del cuarto ácido nucleico en dicho primer vector de transfección, de manera
10 que dicho segundo agente de selección eucariótico es diferente de dicho primer agente de selección eucariótico,

b1) proporcionar un ácido nucleico que comprende

15 - un origen de replicación procariótico,
- una primera secuencia de ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección procariótico,

20 - una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de dicha inmunoglobulina heteróloga, y/o una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicha inmunoglobulina heteróloga,

25 de manera que se proporciona un tercer vector de transfección que comprende dicho ácido nucleico proporcionado y una secuencia adicional de un cuarto ácido nucleico que confiere resistencia a un tercer agente de selección eucariótico, de manera que dicho tercer agente de selección eucariótico es diferente de dicho primer agente de selección eucariótico y también es diferente de dicho segundo agente de selección eucariótico,

30 c) transfectar dicha célula CHO, en la que dicha transfección comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

(i) transfectar dicha célula CHO con dicho primer vector de transfección,
35 (ii) seleccionar una célula CHO transfectada en (i) mediante crecimiento seleccionado en un medio de cultivo que contiene un primer agente de selección eucariótico al que el primer vector de transfección confiere resistencia,

40 (iii) transfectar dicha célula CHO seleccionada en (ii) con dicho segundo vector de transfección,

(iv) seleccionar una célula CHO transfectada en (iii) mediante crecimiento seleccionado en medio de cultivo que contiene dicho primer agente de selección eucariótico al que el primer vector de transfección confiere resistencia y dicho segundo agente de selección eucariótico al que el segundo vector de transfección confiere resistencia,

45 (v) transfectar dicha célula CHO seleccionada en (iv) con dicho tercer vector de transfección,

50 (vi) seleccionar una célula CHO transfectada en (v) mediante crecimiento seleccionado en un medio de cultivo que contiene dicho primer agente de selección eucariótico al que el primer vector de transfección confiere resistencia y dicho segundo agente de selección eucariótico al que el segundo vector de transfección confiere resistencia y dicho tercer agente de selección eucariótico al que el tercer vector de transfección confiere resistencia.

Descripción detallada de la invención

55 Procedimientos y técnicas conocidos por un experto en la técnica, que son útiles para llevar a cabo la presente invención, se describen, por ejemplo, en Ausubel, F.M., ed., Current Protocols in Molecular Biology, volúmenes I a III (1997), Wiley and Sons; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

60 Los procedimientos cromatográficos generales y su uso son conocidos por un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Chromatography, 5.^a edición, Part A: Fundamentals and Techniques, Heftmann, E. (ed), Elsevier Science Publishing Company, New York, (1992); Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences, Deyl, Z. (ed.), Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, (1998); Chromatography Today, Poole, C. F., and Poole, S. K., Elsevier Science Publishing Company, New York, (1991); Scopes, Protein
65

Purification: Principles and Practice (1982); Sambrook, J., et al. (ed), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; o Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M., et al. (eds), John Wiley & Sons, Inc., New York.

5 Para la purificación de inmunoglobulinas heterólogas producidas de forma recombinante se emplea a menudo una combinación de diferentes etapas de cromatografía en columna. En general, una cromatografía de afinidad con proteína A va seguida por una o dos etapas de separación adicionales. La etapa de purificación final es la llamada "etapa de pulido" para la retirada de contaminantes e impurezas traza, como inmunoglobulinas agregadas, HCP (proteína de la célula huésped) residual, ADN (ácido nucleico de la célula huésped), virus o endotoxinas. Para esta etapa de pulido se usa a menudo un material de intercambio aniónico en modo de fracción no adsorbida.

15 Diferentes procedimientos están bien establecidos y se usan ampliamente para la recuperación y purificación de proteínas, tales como cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo, cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, intercambio catiónico (resinas de carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de aminoetilo) e intercambio mixto), adsorción tiofílica (por ejemplo, con beta-mercaptoetanol y otros ligandos SH), cromatografía de interacción hidrófoba o adsorción aromática (por ejemplo, con fenil-sefariosa, resinas aza-arenofílicas o ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad por quelatos metálicos (por ejemplo, con material de afinidad por Ni(II) y Cu(II)), cromatografía de exclusión por tamaño y procedimientos electroforéticos (tales como electroforesis en gel, electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M. A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102).

25 El término "aminoácido" como se usa en la presente solicitud, denota un grupo de carboxi α -aminoácidos, que directamente o en forma de un precursor pueden ser codificados por un ácido nucleico. Los aminoácidos individuales se codifican por ácidos nucleicos que consisten en tres nucleótidos, denominados codones o tripletes de bases. Cada aminoácido se codifica por al menos un codón. La codificación del mismo aminoácido por diferentes codones se conoce como "degeneración del código genético". El término "aminoácido" como se usa en esta solicitud denota los carboxi α -aminoácidos naturales y comprenden alanina (código de tres letras: ala, código de una letra: A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gln, Q), ácido glutámico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina (ile, I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, M), fenilalanina (phe, F), prolina (pro, P), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (tyr, Y) y valina (val, V).

35 Un "ácido nucleico" o una "secuencia de ácido nucleico", que son términos que se usan indistintamente en esta solicitud, se refiere a una molécula polimérica que consiste en los nucleótidos individuales (también denominados bases) a, c, g y t (o u en el ARN), por ejemplo, para ADN, ARN o modificaciones de los mismos. Esta molécula de polinucleótido puede ser una molécula de polinucleótido de origen natural o una molécula de polinucleótido sintético o una combinación de una o más moléculas de polinucleótido de origen natural con una o más moléculas de polinucleótido sintético. También se engloban en esta definición las moléculas de polinucleótido de origen natural en las que se cambian (por ejemplo, mediante mutagénesis), eliminan o añaden uno o más nucleótidos. Un ácido nucleico se puede aislar o integrar en otro ácido nucleico, por ejemplo, en un casete de expresión, un plásmido o el cromosoma de una célula hospedadora. Un ácido nucleico se caracteriza asimismo por su secuencia de ácido nucleico que consiste en nucleótidos individuales.

45 Un experto en la técnica conoce bien los procedimientos y técnicas para convertir una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, de un polipéptido, en una secuencia de ácido nucleico correspondiente que codifica esta secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, un ácido nucleico se caracteriza por su secuencia de ácido nucleico que consiste en nucleótidos individuales y asimismo por la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por el mismo.

50 Un "polipéptido" es un polímero que consiste en aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, ya sean producidos natural o sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 20 residuos de aminoácidos se pueden denominar "péptidos", mientras que las moléculas que consisten en dos o más polipéptidos o que comprenden un polipéptido de más de 100 residuos de aminoácidos se pueden denominar "proteínas". Un polipéptido también puede comprender componentes no aminoácidos, tales como grupos carbohidrato, iones metálicos o ésteres de ácido carboxílico. Los componentes no aminoácidos pueden ser añadidos por la célula en la que se expresa el polipéptido, y pueden variar con el tipo de célula. Los polipéptidos se definen en el presente documento en términos de la estructura de su esqueleto de aminoácidos o del ácido nucleico que codifica los mismos. Las adiciones tales como grupos carbohidrato, en general, no se especifican, pero, no obstante, pueden estar presentes.

65 El término "inmunoglobulina" engloba las diversas formas de estructuras de inmunoglobulina, incluidas las inmunoglobulinas completas y los conjugados de inmunoglobulina. La inmunoglobulina empleada en la presente invención es preferentemente un anticuerpo humano, o un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo quimérico, o un anticuerpo con reducción de antígenos de linfocitos T (véanse, por ejemplo, los documentos WO 98/33523, WO 98/52976 y WO 00/34317). La ingeniería genética de anticuerpos se describe, por ejemplo, en Morrison,

S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; los documentos US 5.202.238 y US 5.204.244; Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270; Lonberg, N., Nat. Biotechnol. 23 (2005) 1117-1125. Las inmunoglobulinas pueden existir en una variedad de formatos, incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y F(ab)₂, así como cadenas sencillas (scFv) o diacuerpos (por ejemplo, Huston, J.S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 5879-5883; Bird, R.E., et al., Science 242 (1988) 423-426; en general, Hood et al., Immunology, Benjamin N.Y., 2.^a edición (1984); y Hunkapiller, T. y Hood, L., Nature 323 (1986) 15-16).

El término "inmunoglobulina completa" denota una inmunoglobulina que comprende dos de las llamadas cadenas ligeras y dos de las llamadas cadenas pesadas. Cada una de las cadenas pesadas y ligeras de una inmunoglobulina completa contiene un dominio variable (región variable) (en general, la porción aminoterminal de la cadena polipeptídica) que comprende regiones de unión que son capaces de interaccionar con un antígeno. Cada una de las cadenas pesadas y ligeras de una inmunoglobulina completa comprende una región constante (en general, la porción carboxiterminal). La región constante de la cadena pesada media en la unión del anticuerpo i) con las células que tienen un receptor Fc gamma (FcγR), tales como las células fagocíticas, o ii) con las células que tienen el receptor Fc neonatal (FcRn), también conocido como receptor Brambell. También media en la unión con algunos factores, incluyendo los factores del sistema del complemento clásico, tales como el componente (C1q). El dominio variable de la cadena ligera o pesada de una inmunoglobulina comprende, a su vez, segmentos diferentes, es decir, cuatro regiones estructurales (FR) y tres regiones hipervariables (CDR).

El término "conjugado de inmunoglobulina" denota un polipéptido que comprende al menos un dominio de una cadena pesada o ligera de una inmunoglobulina conjugada a través de un enlace peptídico con otro polipéptido. El otro polipéptido es un péptido no inmunoglobulínico, tal como una hormona o un receptor de crecimiento o un péptido antifusogénico o un factor del complemento o similar. En el documento WO 2007/045463 se informa de conjugados de inmunoglobulina ejemplares.

El término "inmunoglobulina heteróloga" denota una inmunoglobulina que no es producida naturalmente por una célula de mamífero o la célula huésped. La inmunoglobulina producida de acuerdo con el procedimiento de la invención se produce por medios recombinantes. Dichos procedimientos son ampliamente conocidos en el estado de la técnica y comprenden la expresión de proteínas en células procarióticas con la subsiguiente recuperación y aislamiento de la inmunoglobulina heteróloga, y habitualmente, la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la producción, es decir, la expresión, de una inmunoglobulina, se insertan un ácido nucleico que codifica la cadena ligera y un ácido nucleico que codifica la cadena pesada en un casete de expresión mediante procedimientos estándar. Los ácidos nucleicos que codifican cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina se aíslan y secuencian fácilmente usando procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como fuente de dichos ácidos nucleicos. Los casetes de expresión se pueden insertar en uno o más plásmidos de expresión, que luego se transfectan en células huésped, que de lo contrario no producen inmunoglobulinas. La expresión se realiza en células huésped procarióticas o eucarióticas apropiadas y la inmunoglobulina se recupera de las células después de la lisis o del sobrenadante del cultivo.

Un "polipéptido aislado" es un polipéptido que está esencialmente libre de componentes celulares contaminantes, tales como carbohidratos, lípidos u otras impurezas proteínicas asociadas con el polipéptido en la naturaleza. Típicamente, una preparación de polipéptido aislado contiene el polipéptido en una forma altamente purificada, es decir, al menos aproximadamente un 80 % de pureza, al menos aproximadamente un 90 % de pureza, al menos aproximadamente un 95 % de pureza, mayor que un 95 % de pureza o mayor que un 99 % de pureza. Una forma de demostrar que una preparación de proteína particular contiene un polipéptido aislado es mediante la aparición de una única banda después de la electroforesis en gel con dodecilsulfato sódico (SDS)-poliacrilamida de la preparación de proteína y la tinción con azul de Coomassie del gel. Sin embargo, el término "aislado" no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas físicas alternativas, tales como dímeros o, de forma alternativa, en formas glucosiladas o derivadas.

"ADN heterólogo" o "polipéptido heterólogo" se refiere a una molécula de ADN o a un polipéptido, o a una población de moléculas de ADN o a una población de polipéptidos, que no existen de manera natural dentro de una célula huésped dada. Las moléculas de ADN heterólogas con respecto a una célula huésped particular pueden contener ADN derivado de la especie de la célula huésped (es decir, ADN endógeno) siempre que el ADN huésped se combine con ADN no huésped (es decir, ADN exógeno). Por ejemplo, se considera que una molécula de ADN que contiene un segmento de ADN no huésped que codifica un polipéptido unido funcionalmente a un segmento de ADN huésped que comprende un promotor es una molécula de ADN heteróloga. Por otro lado, una molécula de ADN heteróloga puede comprender un gen estructural endógeno unido funcionalmente a un promotor exógeno.

Un péptido o polipéptido codificado por una molécula de ADN no huésped es un péptido o polipéptido "heterólogo".

El término "célula" o "célula huésped" se refiere a una célula en la que se puede transfectar o se transfecta un ácido nucleico, por ejemplo, que codifica un polipéptido heterólogo. El término "célula" incluye tanto las células

procarióticas, que se usan para la propagación de plásmidos, como las células eucarióticas, que se usan para la expresión de un ácido nucleico y la producción del polipéptido codificado. En un modo de realización, las células eucarióticas son células de mamífero. En otro modo de realización, la célula de mamífero es una célula CHO, preferentemente una célula CHO K1 (ATCC CCL-61 o DSM ACC 110), o una célula CHO DG44 (también conocida como CHO-DHFR[-], DSM ACC 126), o una célula CHO XL99, una célula CHO-T (véase, por ejemplo, Morgan, D., et al., *Biochemistry* 26 (1987) 2959-2963), o una célula CHO-S o una célula Super-CHO (Pak, S.C.O., et al. *Cytotechnology*. 22 (1996) 139-146). Si estas células no están adaptadas al crecimiento en un medio sin suero o en suspensión, se debe realizar una adaptación antes del uso en el procedimiento actual. Como se usa en el presente documento, la expresión "célula" incluye la célula del sujeto y su descendencia. Por tanto, las palabras "transformante" y "célula transformada" incluyen la célula del sujeto primario y cultivos derivados de la misma sin tener en cuenta el número de transferencias o subcultivos. También se entiende que toda la descendencia puede no ser exactamente idéntica en cuanto al contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o accidentales. Se incluye la descendencia variante que tiene la misma función o actividad biológica para la que se ha realizado el cribado en la célula transformada originalmente.

El término "expresión" como se usa en el presente documento se refiere a procesos de transcripción y/o traducción que se producen dentro de una célula. El nivel de transcripción de una secuencia de ácido nucleico de interés en una célula se puede determinar tomando como base la cantidad de ARNm correspondiente que está presente en la célula. Por ejemplo, el ARNm transcrito de una secuencia de interés se puede cuantificar mediante RT-PCR o mediante hibridación Northern (véase Sambrook et al., 1989, *supra*). Los polipéptidos codificados por un ácido nucleico de interés se pueden cuantificar mediante diversos procedimientos, por ejemplo, mediante ELISA, analizando la actividad biológica del polipéptido o empleando ensayos que son independientes de dicha actividad, tales como la inmunoelectrotransferencia o el radioinmunoanálisis, usando inmunoglobulinas que reconocen y se unen al polipéptido (véase Sambrook et al., 1989, *supra*).

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

Un "vector de transfección" es un ácido nucleico (también denominado molécula de ácido nucleico) que proporciona todos los elementos requeridos para la expresión del vector de transfección que comprende ácidos nucleicos/gen o genes estructurales codificantes en una célula huésped. Un vector de transfección comprende una unidad de propagación de plásmido procariótico, por ejemplo, para *E. coli*, que, a su vez, comprende un origen de replicación procariótico, y un ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección procariótico; el vector de transfección comprende además uno o más ácidos nucleicos que confieren resistencia a un agente de selección eucariótico, y uno o más ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de interés. Preferentemente, los ácidos nucleicos que confieren resistencia a un agente de selección y el ácido o ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de interés se colocan cada uno dentro de un casete de expresión, de manera que cada casete de expresión comprende un promotor, un ácido nucleico codificante y un terminador de la transcripción que incluye una señal de poliadenilación. La expresión génica se coloca habitualmente bajo el control de un promotor, y se dice que dicho gen estructural está "unido funcionalmente al" promotor. De forma similar, un elemento regulador y un promotor mínimo están unidos funcionalmente si el elemento regulador modula la actividad del promotor mínimo.

Un "promotor" se refiere a una secuencia polinucleotídica que controla la transcripción de un gen/gen estructural o secuencia de ácido nucleico a la que está unida funcionalmente. Un promotor incluye señales para la unión de la ARN polimerasa y la iniciación de la transcripción. El promotor o los promotores usados serán funcionales en el tipo celular de la célula huésped en la que se contempla la expresión de la secuencia seleccionada. En la técnica se conocen bien un gran número de promotores, incluyendo promotores constitutivos, inducibles y reprimibles de una variedad de fuentes diferentes (y están identificados en bases de datos tales como GenBank) y están disponibles como o dentro de polinucleótidos clonados (a partir de, por ejemplo, depósitos tales como ATCC, así como otras fuentes comerciales o individuales). Un "promotor" comprende una secuencia nucleotídica que dirige la transcripción de un gen estructural unido funcionalmente. Típicamente, un promotor se localiza en la región no codificante o no traducida 5' de un gen, proximal al lugar de inicio de la transcripción de un gen estructural. Los elementos de secuencia dentro de los promotores que actúan en la iniciación de la transcripción a menudo se caracterizan por secuencias nucleotídicas consenso. Estos elementos promotores incluyen sitios de unión a la ARN polimerasa, secuencias TATA, secuencias CAAT, elementos específicos de diferenciación (DSE; McGehee, R.E., et al., *Mol. Endocrinol.* 7 (1993) 551-560), elementos de respuesta al AMP cíclico (CRE), elementos de respuesta al suero (SRE; Treisman, R., *Seminars in Cancer Biol.* 1 (1990) 47-58), elementos de respuesta a los glucocorticoides (GRE) y sitios de unión para otros factores de transcripción, como CRE/ATF (O'Reilly, M.A., et al., *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 19938-19943), AP2 (Ye, J., et al., *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 25728-25734), SP1, proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB; Loeken, M.R., *Gene Expr.* 3 (1993) 253-264) y factores de transcripción de octámeros (véase, en general, Watson et al., eds., *Molecular Biology of the Gene*, 4.^a ed. (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1987), y Lemaigre, F.P. y Rousseau, G.G., *Biochem. J.* 303 (1994) 1-14). Entre los promotores eucarióticos que se han identificado como promotores potentes para expresión de alto nivel están el promotor temprano de SV40, el promotor tardío

principal de adenovirus, el promotor de metalotioneína I murina, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, el factor 1 alfa de elongación de hámster chino (CHEF-1, véase, por ejemplo, el documento US 5.888.809), el EF-1 alfa humano, la ubicuitina y el promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV IE).

El "promotor" puede ser constitutivo o inducible. Un potenciador (es decir, un elemento de ADN que actúa en posición relativa cis que actúa sobre un promotor para aumentar la transcripción) puede ser necesario para actuar en conjunto con el promotor para aumentar el nivel de expresión obtenido con un promotor solo, y se puede incluir como elemento regulador de la transcripción. A menudo, el segmento de polinucleótidos que contiene el promotor incluirá también secuencias potenciadoras (por ejemplo, de CMV o SV40).

Un "potenciador", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia polinucleotídica que potencia la transcripción de un gen o secuencia codificante a la que está unida funcionalmente. A diferencia de los promotores, los potenciadores son relativamente independientes de la orientación y la posición y se han encontrado en la posición 5' o 3' (Lusky, M., et al., Mol. Cell Bio., 3 (1983) 1108-1122) con respecto a la unidad de transcripción, dentro de un intrón (Banerji, J., et al., Cell, 33 (1983) 729-740), así como dentro de la propia secuencia codificante (Osborne, T.F., et al., Mol. Cell Bio., 4 (1984) 1293-1305). Por lo tanto, los potenciadores se pueden colocar en dirección 5' o 3' respecto al lugar de iniciación de la transcripción o a distancias considerables del promotor, aunque en la práctica los potenciadores se pueden superponer física y funcionalmente con los promotores. En la técnica se conocen bien un gran número de potenciadores, de una variedad de fuentes diferentes (y están identificados en bases de datos tales como GenBank) y están disponibles como o dentro de secuencias polinucleotídicas clonadas (a partir de, por ejemplo, depósitos tales como ATCC, así como otras fuentes comerciales o individuales). Diversos polinucleótidos que comprenden secuencias promotoras (tales como el promotor de CMV comúnmente usado) también comprenden secuencias potenciadoras. Por ejemplo, todos los promotores potentes enumerados anteriormente también pueden contener potenciadores potentes (véase, por ejemplo, Bendig, M., M., Genetic Engineering 7 (Academic Press, 1988) 91-127).

Un "ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección" es un ácido nucleico que permite la selección específica a favor o en contra de las células que lo portan, en presencia de un agente de selección. Dicho ácido nucleico también se designa como marcador de selección. Típicamente, un marcador de selección conferirá resistencia a un agente de selección (fármaco) o compensará un defecto metabólico o catabólico en la célula huésped. Un marcador de selección puede ser positivo, negativo o bifuncional. Un marcador de selección positivo útil es un gen de resistencia a antibióticos. Este marcador de selección permite que la célula huésped transformada con el mismo se seleccione positivamente en presencia del agente de selección correspondiente, es decir, con crecimiento seleccionado en presencia, por ejemplo, del antibiótico correspondiente. Una célula no transformada no es capaz de crecer ni sobrevivir en las condiciones de crecimiento selectivo, es decir, en presencia del agente de selección, en el cultivo. Los marcadores de selección positivos permiten la selección de las células que portan el marcador, mientras que los marcadores de selección negativos permiten que las células que portan el marcador se eliminen selectivamente. Los marcadores de selección eucarióticos incluyen, por ejemplo, los genes de la aminoglucósido fosfotransferasa (APH) (que confieren resistencia a los agentes de selección tales como, por ejemplo, higromicina (hyg), neomicina (neomicina fosfotransferasa II, neo) y G418), dihidrofolato reductasa (DHFR) (que confiere resistencia al agente de selección metotrexato), timidina cinasa (tk), glutamina sintetasa (GS), asparagina sintetasa, triptófano sintetasa (que confiere resistencia al agente de selección indol), histidinol deshidrogenasa (que confiere resistencia al agente de selección histidinol D), citidina desaminasa, adenosina desaminasa y ácidos nucleicos que confieren resistencia a puromicina, bleomicina, fleomicina, cloranfenicol, zeocina y ácido micofenólico. Por ejemplo, en los documentos WO 92/08796 y WO 94/28143 se informa de otros ácidos nucleicos marcadores de selección. Los marcadores de selección procarióticos incluyen, por ejemplo, el gen de la betalactamasa (que confiere resistencia al agente de selección ampicilina).

La expresión de un gen se realiza como expresión transitoria o como permanente. El polipéptido o polipéptidos de interés son en general polipéptidos secretados y, por lo tanto, contienen una extensión N-terminal (también conocida como secuencia señal) que es necesaria para el transporte/secreción del polipéptido a través de la pared celular hacia el medio extracelular. En general, la secuencia señal puede derivarse de cualquier gen que codifique un polipéptido secretado. Si se usa una secuencia señal heteróloga, preferentemente es una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para la secreción en levadura, por ejemplo, la secuencia señal nativa de un gen heterólogo que debe expresarse puede sustituirse por una secuencia señal de levadura homóloga derivada de un gen secretado, como la secuencia señal de invertasa de levadura, líder del factor alfa (incluyendo los líderes del factor α de *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* y *Hansenula*, el segundo descrito en el documento US 5.010.182), la secuencia señal de fosfatasa ácida o la secuencia señal de glucoamilasa de *C. albicans* (documento EP 0 362 179). En la expresión de células de mamíferos, la secuencia señal nativa de la proteína de interés es satisfactoria, aunque otras secuencias señal de mamíferos pueden ser adecuadas, tales como las secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o especies relacionadas, por ejemplo, para inmunoglobulinas de origen humano o murino, así como secuencias señal secretoras víricas, por ejemplo, la secuencia señal de la glucoproteína D del herpes simple. El

fragmento de ADN que codifica un presegmento de este tipo está ligado en marco, es decir, está unido funcionalmente, al fragmento de ADN que codifica un polipéptido de interés.

5 En el presente documento se divulga un procedimiento para la producción recombinante de una inmunoglobulina heteróloga secretada en una célula CHO que comprende:

a) proporcionar una célula CHO, que está adaptada para el crecimiento en cultivo en suspensión, adaptada para el crecimiento en medio sin suero, y sin micoplasmas;

10 b) proporcionar un vector de transfección, que comprende los siguientes elementos:

- un origen de replicación procariótico,

15 - una primera secuencia de ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección procariótico,

- una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de dicha inmunoglobulina heteróloga, y una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicha inmunoglobulina heteróloga,

20 - una cuarta secuencia de ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección eucariótico,

de manera que cada una de dichas primera a cuarta secuencias de ácido nucleico está contenida en un casete de expresión,

25 c) transfectar y seleccionar dicha célula CHO, en la que dicha transfección y selección comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

30 (i) transfectar dicha célula CHO con un vector de transfección que comprende dicho primer a tercer ácido nucleico y una cuarta secuencia de ácido nucleico que confiere resistencia a un primer agente de selección eucariótico,

35 (ii) seleccionar una célula CHO transfectada en (i) mediante crecimiento seleccionado en medio de cultivo que contiene dicho primer agente de selección eucariótico,

(iii) transfectar dicha célula CHO seleccionada en (ii) con un vector de transfección que comprende dicho primer a tercer ácido nucleico y una cuarta secuencia de ácido nucleico diferente de la del vector de transfección usada en (i) que confiere resistencia a un segundo agente de selección eucariótico diferente de dicho primer agente de selección eucariótico,

40 (iv) seleccionar una célula CHO transfectada en (iii) mediante crecimiento seleccionado en medio de cultivo que contiene dicho primer y dicho segundo agente de selección eucariótico,

45 d) cultivar dicha célula CHO transfectada y seleccionada de la etapa c) en un medio de cultivo que contiene dicho primer y segundo agente de selección eucariótico, en condiciones adecuadas para la expresión de dicho segundo y tercer ácido nucleico,

50 e) recuperar dicha inmunoglobulina heteróloga secretada del medio de cultivo y producir de este modo por recombinación una inmunoglobulina heteróloga.

El procedimiento de acuerdo con la invención es adecuado para la producción de una inmunoglobulina heteróloga secretada a gran escala, es decir, industrialmente. El cultivo de una célula para la producción de un polipéptido deseado a gran escala consiste, en general, en una secuencia de cultivos individuales, en los que todos los cultivos excepto el cultivo final, es decir, a gran escala, es decir, el último en la secuencia, se realizan hasta que se alcanza cierta densidad celular en el recipiente de cultivo. Si se alcanza la densidad celular predeterminada, se utiliza todo el cultivo o una fracción del mismo para inocular el siguiente recipiente de cultivo, que tiene un volumen mayor, hasta 1000 veces el volumen del cultivo precedente. Todos los cultivos que sirven como base para al menos otro cultivo en un volumen mayor se designan como fermentaciones de la serie de siembra. Solo en el cultivo a gran escala, es decir, en el cultivo que no está destinado a servir como base para otro cultivo en un volumen mayor, que también se designa como fermentación principal, el punto final del cultivo se determina dependiendo de la concentración de la inmunoglobulina heteróloga secretada producida en el medio de cultivo. El término "gran escala" como se usa en la presente solicitud denota el cultivo final de un proceso de producción industrial. Preferentemente, un cultivo a gran escala se realiza a un volumen de al menos 100 l, más preferentemente de al menos 500 l, lo más preferentemente de al menos 1000 l hasta un volumen de

20 000 l. En un modo de realización, el medio de cultivo final, es decir, a gran escala, no contiene un agente de selección eucariótico.

5 En un modo de realización, el cultivo de dicha célula CHO transfectada se realiza en presencia de dicho agente de selección eucariótico en un volumen de menos de 500 litros y el cultivo de dicha célula CHO transfectada se realiza en ausencia de dichos agentes de selección eucarióticos en un volumen de 500 litros o más y dicha recuperación de dicha inmunoglobulina heteróloga secretada procede del medio de cultivo sin dichos agentes de selección eucarióticos. En otro modo de realización, el cultivo comprende cultivos secuenciales con un volumen de cultivo creciente hasta un volumen de cultivo final, de manera que los cultivos se realizan en presencia de
10 dichos agentes de selección eucarióticos hasta un volumen de cultivo del 1 % (v/v) del volumen de cultivo del cultivo final o principal y en ausencia de todos los dichos agentes de selección eucarióticos en un volumen de cultivo de más de un 1 % (v/v) del volumen de cultivo del cultivo final. En otro modo de realización, dicho cultivo comprende cultivos secuenciales de la serie de siembra con un volumen de cultivo creciente, de manera que cada uno de los cultivos de la serie de siembra se realiza en presencia de dichos agentes de selección eucarióticos y la fermentación principal se realiza en ausencia de todos los dichos agentes de selección eucarióticos. En un modo de realización, el cultivo de dicha célula CHO transfectada se realiza en presencia de dicho agente de selección eucariótico en las fermentaciones de la serie de siembra y el cultivo de dicha célula CHO transfectada se realiza en ausencia de dichos agentes de selección eucarióticos en la fermentación principal y dicha recuperación de dicha inmunoglobulina heteróloga secretada procede del medio de cultivo principal que no contiene dichos agentes de selección eucarióticos. En estos modos de realización, los agentes de selección eucarióticos se añaden durante la fase de crecimiento y se omiten durante la fase de producción de dicha célula CHO. El término "fase de producción" denota el cultivo de una célula CHO en un gran volumen, es decir, la fermentación principal, después de lo cual se recupera la inmunoglobulina heteróloga producida.

25 En otro modo de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, la productividad de dicha célula CHO es durante 40 generaciones de no menos de un 70 % y no más de un 130 % de la productividad después de 10 generaciones de cultivo como cultivo discontinuo. En un modo de realización, la productividad de dichas células CHO es durante 60 generaciones de no menos de un 50 % y no más de un 150 % de la productividad después de 10 generaciones de cultivo como cultivo discontinuo. La productividad de dicha célula CHO es de al menos
30 1,5 g/l de dicha inmunoglobulina heteróloga en un plazo de 21 días como cultivo en régimen discontinuo alimentado en otro modo de realización. En un modo de realización, la productividad específica de la célula CHO obtenida con el procedimiento de acuerdo con la invención es más de $1 \mu\text{g}/10^6$ células/d, más de $5 \mu\text{g}/10^6$ células/d o más de $10 \mu\text{g}/10^6$ células/d. En un modo de realización, la inmunoglobulina heteróloga secretada es una inmunoglobulina heteróloga secretada completamente procesada. El término "inmunoglobulina heteróloga secretada completamente procesada" denota una inmunoglobulina i) que se secreta al medio de cultivo y cuyas secuencias señal se han escindido, ii) que comprende una región de unión a antígeno, iii) que tiene modificaciones secundarias, tales como sacáridos o polisacáridos unidos, y/o enlaces disulfuro formados correctamente.

40 En un modo de realización de la invención, la inmunoglobulina heteróloga es un anticuerpo anti-A β . En otro modo de realización, el dominio variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo anti-A β comprende una CDR3 con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 1, 2 o 3. En otro modo de realización, el dominio variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo anti-A β comprende una CDR3 con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 4, 5 o 6. En otro modo de realización, dicho anticuerpo anti-A β
45 comprende un dominio variable de la cadena pesada con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 7, 8 o 9. En otro modo de realización más, dicho anticuerpo anti-A β comprende un dominio variable de la cadena ligera con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 10, 11 o 12.

50 En un modo de realización de la invención, la inmunoglobulina heteróloga es un anticuerpo anti-P-selectina. En otro modo de realización, dicho anticuerpo anti-P-selectina comprende un dominio variable de la cadena pesada con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 13, 14 o 15. En otro modo de realización más, dicho anticuerpo anti-P-selectina comprende un dominio variable de la cadena ligera con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 16, 17 o 18.

55 En un modo de realización de la invención, la inmunoglobulina heteróloga es un anticuerpo anti-IL-13R α . En otro modo de realización, dicho anticuerpo anti-IL-13R α comprende un dominio variable de la cadena pesada con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22 o 23. En otro modo de realización más, dicho anticuerpo anti-IL-13R α comprende un dominio variable de la cadena ligera con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27 o 28.

60 En un modo de realización de la invención, la inmunoglobulina heteróloga es un anticuerpo conjugado anti-CD4. En otro modo de realización, el dominio variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo anti-CD4 en dicho conjugado comprende una CDR3 con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 29, 30 o 31. En otro modo de realización, el dominio variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo anti-CD4 en dicho conjugado comprende una CDR3 con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 32, 33 o
65 34. En otro modo de realización, dicho anticuerpo anti-CD4 en dicho conjugado comprende un dominio variable

de la cadena pesada con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 35, 36 o 37. En otro modo de realización más, dicho anticuerpo anti-CD4 en dicho conjugado comprende un dominio variable de la cadena ligera con una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 38, 39 o 40.

5 Una célula de mamífero utilizable para la producción a gran escala de productos terapéuticos, es decir, polipéptidos destinados al uso en seres humanos, tiene que cumplir distintos criterios. Entre otros, están los de poder cultivarse en medio sin suero, preferentemente en medio sin componentes derivados de mamífero no definidos, o en un medio sin suero suplementado con componentes derivados de mamífero definidos. El suero es una mezcla de multitud de compuestos. Normalmente se ha utilizado suero bovino para el cultivo de células de mamífero. Con el problema emergente de las enfermedades transmisibles de una especie a otra, debe evitarse el uso de suero y otros compuestos derivados de mamífero no definidos. El término "compuesto derivado de mamífero no definido" como se usa en la presente solicitud denota compuestos que se derivan de un mamífero, especialmente preferente de una vaca, un cerdo, una oveja o un cordero, y cuya composición se puede especificar en menos de un 80 %, preferentemente en menos de un 90 % (p/p). Un "compuesto derivado de mamífero definido" es un compuesto que se obtiene de un mamífero, especialmente preferente de una vaca, un cerdo, una oveja o un cordero, y cuya composición se puede especificar en más de un 95 % (p/p), preferentemente en más de un 98 % (p/p), lo más preferentemente en más de un 99 % (p/p). Un ejemplo de un compuesto derivado de mamífero definido es el colesterol derivado de lana ovina, y la galactosa derivada de la leche bovina. En un modo de realización, el medio puede suplementarse con compuestos no derivados de mamífero definidos o no definidos. Un ejemplo de dicho compuesto no derivado de mamífero es el aceite de hígado de bacalao.

Por lo tanto, en un modo de realización de la presente invención, el medio utilizado en el cultivo es un medio sin suero, o un medio sin suero suplementado con componentes derivados de mamífero definidos, o un medio sin componentes derivados de mamífero, o un medio sin proteínas, un medio sin proteínas complementado con componentes derivados de mamífero definidos, o un medio definido químicamente, o un medio sin componentes derivados de mamífero, o un medio sin proteínas definidas. Ejemplos de un medio sin componentes derivados de mamífero son el medio CD CHO disponible de Invitrogen Corp., o el ProCHO4 disponible de Gibco. Un ejemplo de un medio sin proteínas es HyQ SFM4CHO disponible de Hyclone.

En otro modo de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, el procedimiento que comienza con la primera transfección y termina con la recuperación de la inmunoglobulina heteróloga secretada se realizada en el mismo medio. El término "en el mismo medio" denota en la presente solicitud que, comenzando con la primera transfección y terminando con la recuperación de la inmunoglobulina heteróloga secretada del medio de cultivo, se usa el mismo medio. Esto no denota que haya que añadir los mismos aditivos al medio en todas las etapas, es decir, el medio se puede suplementar con diferentes aditivos en las diferentes etapas del procedimiento. Los aditivos son compuestos que se añaden a un medio en total en menos de un 20 % (p/p), en un modo de realización en menos de un 15 % (p/p), en otro modo de realización en menos de un 10 % (p/p). En un modo de realización, el medio utilizado en el procedimiento de acuerdo con la invención es el mismo medio en todas las etapas y es un medio adecuado para la producción a gran escala de la inmunoglobulina heteróloga secretada.

Se ha encontrado sorprendentemente que con el procedimiento de acuerdo con la invención se puede obtener una célula CHO transfectada múltiples veces que tiene características de crecimiento similares y una productividad mejorada en comparación con una célula CHO transfectada una sola vez. El término "características de crecimiento similares" denota que la célula CHO transfectada múltiples veces crece hasta al menos un 50 % de la densidad celular en el mismo periodo de tiempo que la célula CHO transfectada de una sola vez. En otro modo de realización, dicha célula CHO transfectada múltiples veces crece hasta al menos un 90 % de la densidad celular que la célula transfectada una sola vez. En otro modo de realización más, el tiempo de duplicación de la célula transfectada múltiples veces es como máximo un 150 % del de la célula transfectada una sola vez. En un modo de realización, dicha célula CHO transfectada múltiples veces es una célula CHO transfectada dos o tres veces. En otro modo de realización, la célula transfectada múltiples veces tiene un rendimiento volumétrico mejorado en un medio de cultivo. La productividad general de un proceso de fermentación a gran escala se determina mejor por el rendimiento volumétrico, es decir, la cantidad de polipéptido por unidad de volumen del cultivo. Este rendimiento volumétrico es el producto de la densidad celular, la productividad específica de cada célula y el tiempo de cultivo. Por tanto, un cultivo con baja densidad celular pero alta productividad específica tendrá el mismo rendimiento volumétrico en el mismo periodo de tiempo que un cultivo con alta densidad celular pero baja productividad específica en el mismo tiempo de cultivo. Por tanto, con la célula CHO transfectada múltiples veces y el procedimiento de acuerdo con la invención, es obtenible una célula CHO con características de crecimiento similares pero un rendimiento volumétrico/productividad mejorados en comparación con las células CHO transfectadas una sola vez.

La inmunoglobulina heteróloga secretada se puede recuperar del medio de cultivo con procedimientos cromatográficos conocidos por los expertos en la técnica. Por lo tanto, en un modo de realización, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende la etapa final de purificar dicha inmunoglobulina heteróloga con una o más etapas cromatográficas.

Un vector adecuado para uso en el procedimiento de acuerdo con la invención comprende un origen de replicación procariótico, y un primer ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección procariótico, y/o un segundo ácido nucleico que codifica la cadena pesada de dicha inmunoglobulina heteróloga, y/o un tercer ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicha inmunoglobulina heteróloga, y un cuarto ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección eucariótico.

El primer ácido nucleico comprendido confiere resistencia a la adición de un agente de selección procariótico al medio de cultivo. Agentes de selección procarióticos ejemplares son, por ejemplo, ampicilina, kanamicina, cloranfenicol, tetraciclina o eritromicina. El término "un ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección" y los equivalentes gramaticales del mismo denota en la presente solicitud que el polipéptido codificado por dicho ácido nucleico puede neutralizar dicho agente de selección por modificación o degradación o puede contrarrestar el efecto de dicho agente de selección. Por tanto, una célula que comprende un ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección tiene la capacidad de sobrevivir y proliferar con el agente de selección presente en el medio de cultivo. Agentes de selección eucarióticos ejemplares son, por ejemplo, neomicina, higromicina, puromicina, metotrexato, Geneticin® (G418) o ácido micofenólico. El agente de selección se elige con la condición de que el agente de selección procariótico y el eucariótico no sea un metal.

La transfección de la célula CHO proporcionada de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con la invención se realiza como etapas secuenciales de transfección y selección. Las células CHO adecuadas en el procedimiento de acuerdo con la invención son, por ejemplo, una célula CHO K1, o una célula CHO DG44, o una célula CHO XL99, o una célula CHO DXB11, o una célula CHO DP12 o una célula super-CHO. Dentro del alcance de la presente invención, las células transfectadas se pueden obtener con sustancialmente cualquier tipo de procedimiento de transfección conocido en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede introducir en las células mediante electroporación o microinyección. De forma alternativa, se pueden usar reactivos de lipofección tales como FuGENE 6 (Roche Diagnostics GmbH, Alemania), X-tremeGENE (Roche Diagnostics GmbH, Alemania), LipofectAmine (Invitrogen Corp., EE. UU.) y nucleotransfección (AMAX Corp.). De forma alternativa adicional, el ácido nucleico se puede introducir en la célula mediante sistemas de vectores víricos apropiados basados en retrovirus, lentivirus, adenovirus o virus adenoasociados (Singer, O., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (2004) 5313-5314).

Después de la transfección, las células con transfección positiva se seleccionan en presencia de agentes de selección, es decir, por crecimiento seleccionado. Se ha encontrado sorprendentemente que más de un agente de selección eucariótico puede estar presente en el medio de cultivo sin interferir con el crecimiento y la expresión de polipéptidos heterólogos si la célula CHO cultivada se ha transfectado con todos los ácidos nucleicos correspondientes requeridos que confieren resistencia a estos agentes de selección eucarióticos de acuerdo con la presente invención. También se ha encontrado que las células CHO se pueden cultivar en la presencia concomitante de tres agentes de selección eucarióticos sin una reducción del tiempo de duplicación en más de un 150 % del tiempo de duplicación de la célula CHO no transfectada o transfectada una sola vez. Por lo tanto, la célula CHO transfectada múltiples veces comprende ácidos nucleicos, que se encuentran en cada etapa de transfección del procedimiento de acuerdo con la invención que comprende un ácido nucleico diferente, no transfectado previamente, como cuarto ácido nucleico que confiere una nueva resistencia que no estaba ya presente en dicha célula CHO a un agente de selección eucariótico diferente. Por lo tanto, después de la segunda etapa de transfección, una célula transfectada con éxito se selecciona por cultivo en la presencia concomitante de dos agentes de selección eucarióticos diferentes. Después de la tercera transfección, la célula transfectada se puede cultivar para su selección en la presencia concomitante de tres agentes de selección eucarióticos diferentes.

Por tanto, el vector empleado en las diferentes etapas de transfección de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con la invención es al menos un 95 % idéntico a nivel de ácido nucleico, excepto por el ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección eucariótico, es decir, el cuarto ácido nucleico.

Para la expresión de una inmunoglobulina heteróloga secretada, el vector con el que se transfecta la célula CHO y que comprende un ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección eucariótico también comprende un ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicha inmunoglobulina heteróloga y/o un ácido nucleico que codifica la cadena pesada de dicha inmunoglobulina heteróloga. Si el vector comprende solo un ácido nucleico que codifica bien la cadena ligera de dicha inmunoglobulina o la cadena pesada de dicha inmunoglobulina, dicha célula CHO también se transfecta en cada etapa mediante otro vector que comprende un ácido nucleico que codifica la otra cadena correspondiente de dicha inmunoglobulina.

En un modo de realización, de la primera a la cuarta secuencia de ácido nucleico comprendidas en los vectores de transfección de acuerdo con la invención (es decir, el primer, segundo y tercer vector de transfección) están contenidas en un casete de expresión. Un "casete de expresión" se refiere a una construcción que contiene los elementos reguladores necesarios, tales como promotor y sitio de poliadenilación, para la expresión de al menos el ácido nucleico contenido en una célula, por ejemplo, un promotor, un ácido nucleico que va a expresarse y un terminador de la transcripción que incluye una señal de poliadenilación. El promotor contenido en el casete de expresión determina la cantidad de transcripción del ácido nucleico unido funcionalmente y con ello determina la

cantidad de la traducción de dicho ácido nucleico. Un primer promotor que induce una mayor cantidad de traducción de un ácido nucleico en comparación con un segundo promotor se denomina un “promotor más potente” con respecto a dicho segundo promotor. Está destinado a producir la inmunoglobulina heteróloga secretada y no el polipéptido que confiere resistencia a un agente de selección. Por tanto, la capacidad del mecanismo de transcripción y traducción de las células huésped tiene que dividirse proporcionalmente. Por lo tanto, en un modo de realización, el promotor empleado para la transcripción de dichos segundo y tercer ácidos nucleicos es diferente del promotor empleado para la transcripción de dicho cuarto ácido nucleico. En otro modo de realización, la cantidad de transcrito de dicho segundo y tercer ácido nucleico que codifica las cadenas de dicha inmunoglobulina heteróloga es mayor que la cantidad de transcrito de dicho cuarto ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección. Por tanto, el promotor empleado para la expresión de dicho segundo y tercer ácido nucleico es más potente que el promotor empleado para la expresión de dicho cuarto ácido nucleico. En otro modo de realización, el promotor empleado para la transcripción de dichos segundo y tercer ácidos nucleicos es el mismo pero diferente del promotor de dicho cuarto ácido nucleico. En un modo de realización, el promotor para la expresión de dicho segundo y tercer ácido nucleico es el promotor de CMV o una variante del mismo y el promotor para la expresión de dicho cuarto ácido nucleico es el promotor de SV40 o una variante del mismo.

En otro modo de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, el uso de codones de dicho segundo y tercer ácido nucleico se optimiza para la expresión en células CHO. Esto permite un uso más eficiente de los ARN de transferencia presentes en la célula CHO recombinante. En otro modo de realización, dicho segundo y/o tercer ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico intrónica; en otro modo de realización, el ácido nucleico intrónico es un intrón híbrido ratón/humano. En el genoma de las células eucarióticas, las secuencias de ADN genómico contienen secuencias de ácido nucleico codificantes (exónicas) y no codificantes (intrónicas). Después de la transcripción del ADN al pre-ARNm, el pre-ARNm también contiene estas secuencias de ácido nucleico intrónicas y exónicas. Antes de la traducción, las secuencias de ácido nucleico intrónicas no codificantes se eliminan durante el procesamiento del ARNm mediante corte y empalme de las mismas del transcrito de ARNm primario para generar el ARNm maduro. El corte y empalme del ARNm primario se controla mediante un sitio donador de corte y empalme en combinación con un sitio aceptor de corte y empalme espaciado adecuadamente. El sitio donador de corte y empalme se localiza en el extremo 5' y el sitio aceptor de corte y empalme se localiza en el extremo 3' de una secuencia intrónica y ambos se eliminan solo parcialmente durante el corte y empalme del pre-ARNm.

Para producir un polipéptido secretado, el ácido nucleico o los ácidos nucleicos de interés que codifican las cadenas de la inmunoglobulina heteróloga incluyen un segmento de ADN que codifica una secuencia señal/péptido líder. La secuencia señal dirige el polipéptido recién sintetizado hacia y a través de la membrana del retículo endoplasmático (ER) donde el polipéptido se puede enviar para la secreción. La secuencia señal se escinde mediante una peptidasa señal al cruzar la membrana del ER. En cuanto a la función de la secuencia señal, es esencial el reconocimiento por parte del mecanismo de secreción de la célula huésped. Por lo tanto, la secuencia señal usada tiene que ser reconocida por las proteínas y enzimas de la célula huésped del mecanismo de secreción.

El procedimiento de acuerdo con la invención comprende una tercera etapa de transfección en la etapa c):

(v) transfectar dicha célula CHO seleccionada en (iv) con dicho vector que comprende una cuarta secuencia de ácido nucleico diferente de la del vector de transfección usado en (i) y (iii) que confiere resistencia a un tercer agente de selección eucariótico, que es diferente de dicho primero y dicho segundo agente de selección eucariótico,

(vi) seleccionar una célula CHO transfectada en (v) mediante crecimiento seleccionado en un medio de cultivo que contiene dicho primer y dicho segundo y dicho tercer agente de selección eucariótico.

El medio de cultivo empleado para el cultivo de dicha célula CHO transfectada en la etapa d) comprende además un tercer agente de selección eucariótico.

Un segundo aspecto de la presente invención es una célula CHO que expresa una inmunoglobulina heteróloga secretada obtenible con el siguiente procedimiento:

a) proporcionar una célula CHO, que está

- adaptada al crecimiento en cultivo en suspensión.
- adaptada al crecimiento en medio sin suero,
- sin micoplasmas,

b) proporcionar un ácido nucleico que comprende

- un origen de replicación procariótico,

5 - una primera secuencia de ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección procariótico,

10 - una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de dicha inmunoglobulina heteróloga, y una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicha inmunoglobulina heteróloga,

15 de manera que se proporciona un primer vector de transfección que comprende dicho ácido nucleico proporcionado y una cuarta secuencia de ácido nucleico adicional que confiere resistencia a un primer agente de selección eucariótico,

20 de manera que se proporciona un segundo vector de transfección que comprende dicho ácido nucleico proporcionado y una cuarta secuencia de ácido nucleico adicional diferente del cuarto ácido nucleico en dicho primer vector de transfección que confiere resistencia a un segundo agente de selección eucariótico, de manera que dicho segundo agente de selección eucariótico sea diferente de dicho primer agente de selección eucariótico,

b1) proporcionar un ácido nucleico que comprende

25 - un origen de replicación procariótico,

- una primera secuencia de ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección procariótico,

30 - una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de dicha inmunoglobulina heteróloga, y/o una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicha inmunoglobulina heteróloga,

35 de manera que se proporciona un tercer vector de transfección que comprende dicho ácido nucleico proporcionado y una secuencia adicional de un cuarto ácido nucleico que confiere resistencia a un tercer agente de selección eucariótico, de manera que dicho tercer agente de selección eucariótico es diferente de dicho primer agente de selección eucariótico y también es diferente de dicho segundo agente de selección eucariótico,

40 c) transfectar y seleccionar dicha célula CHO, en la que dicha transfección y selección comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

(i) transfectar dicha célula CHO con dicho primer vector de transfección,

45 (ii) seleccionar una célula CHO transfectada en (i) mediante crecimiento seleccionado en un medio de cultivo que contiene un primer agente de selección eucariótico al que el primer vector de transfección confiere resistencia,

(iii) transfectar dicha célula CHO seleccionada en (ii) con dicho segundo vector de transfección,

50 (iv) seleccionar una célula CHO transfectada en (iii) mediante crecimiento seleccionado en un medio de cultivo que contiene dicho primer agente de selección eucariótico, al que el primer vector de transfección confiere resistencia, y dicho segundo agente de selección eucariótico, al que el segundo vector de transfección confiere resistencia,

55 (v) transfectar dicha célula CHO seleccionada en (iv) con dicho tercer vector de transfección,

60 (vi) seleccionar una célula CHO transfectada en (v) mediante crecimiento seleccionado en un medio de cultivo que contiene dicho primer agente de selección eucariótico al que el primer vector de transfección confiere resistencia y dicho segundo agente de selección eucariótico al que el segundo vector de transfección confiere resistencia y dicho tercer agente de selección eucariótico al que el tercer vector de transfección confiere resistencia.

65 El término "sin virus" que se usa en la presente solicitud denota que la célula CHO no contiene ningún ácido nucleico vírico que resultaría si se expresara durante el cultivo en operaciones de procesamiento posteriores, en productos nocivos no separables para humanos.

Se proporcionan los siguientes ejemplos y figuras para ayudar al entendimiento de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

5 **Descripción de las figuras**

Figura 1 Mapa plasmídico con anotaciones del plásmido p5128.

Figura 2 Mapa plasmídico con anotaciones del plásmido p5137.

10 **Figura 3** Mapa plasmídico con anotaciones del plásmido p5151.

Figura 4 Mapa plasmídico con anotaciones del plásmido p5057.

15 **Figura 5** Mapa plasmídico con anotaciones del plásmido p5069.

Figura 6 (A) Títulos de anticuerpos de clones obtenidos después de la subclonación con dilución limitada y de clones obtenidos con el procedimiento de acuerdo con la invención; eje de abscisas: (1) G24, (2) dilución limitada, (3) procedimiento de acuerdo con la invención; eje de ordenadas: concentración de inmunoglobulina [$\mu\text{g/ml}$].

20 (B) Tasas de producción específicas de clones obtenidos después de la subclonación con dilución limitada y de clones obtenidos con el procedimiento de acuerdo con la invención; eje de abscisas: (1) G24, (2) dilución limitada, (3) procedimiento de acuerdo con la invención; eje de ordenadas: tasa de producción específica [$\text{pg/d}^*\text{célula}$].

25 **Figura 7** SDS-Page después de la purificación por HPLC con proteína A del anticuerpo. Para las cuatro muestras 35-45, 37-65, 39-4 y 43-16 son visibles dos bandas, siendo la superior la cadena pesada y siendo la inferior la cadena ligera. La muestra 25g7 es un anticuerpo de control con productos secundarios relacionados con el anticuerpo (por encima de la cadena pesada y entre la cadena pesada y ligera). Muestras: (1) Marcador de peso molecular, (2) 35-45, (3) 37-65, (4) 39-4, (5) 43-16, (6) 25g7, (7) Anticuerpo de referencia, (8) Medio 25x.

30 **Figura 8** Mapa plasmídico con anotaciones del plásmido p6311.

35 **Figura 9** Mapa plasmídico con anotaciones del plásmido p5321.

Ejemplos

40 **Materiales y procedimientos**

La información general sobre las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas humanas se da en: Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Los aminoácidos de las cadenas de anticuerpos se numeran de acuerdo con la numeración EU (Edelman, G.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991))

50 **Técnicas de ADN recombinante:**

Se usaron procedimientos habituales para manipular el ADN como se describe en Sambrook et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Los reactivos biológicos moleculares se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

55 **Síntesis de genes:**

Los segmentos génicos deseados se prepararon a partir de oligonucleótidos preparados por síntesis química. Los segmentos génicos de 100 a 600 pb, que están flanqueados por sitios singulares de escisión de endonucleasas de restricción, se ensamblaron por hibridación y ligado de oligonucleótidos, incluida la amplificación por PCR, y posteriormente se clonaron en el vector de clonación pCR2.1-TOPO-TA (Invitrogen Corp., EE. UU.) mediante nucleótidos protuberantes A o el vector de clonación pPCR-Script Amp SK(+) (Stratagene Corp., EE. UU.). La secuencia de ADN de los fragmentos de genes subclonados se confirmó por secuenciación de ADN.

65

Determinación de proteínas:

La concentración de proteína se determinó determinando la densidad óptica (DO) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado tomando como base la secuencia de aminoácidos.

Determinación del título de anticuerpos:

Los títulos de anticuerpos se determinaron mediante ELISA con anticuerpo anti-Fc humano o mediante cromatografía con proteína A utilizando el anticuerpo autólogo purificado como referencia.

SDS-PAGE

Tampón de muestra de LDS, concentrado cuatro veces (4x): 4 g de glicerol, 0,682 g de TRIS-Base, 0,666 g de TRIS-clorhidrato, 0,8 g de LDS (dodecilsulfato de litio), 0,006 g de EDTA (ácido etilendiaminotetracético), 0,75 ml de una solución al 1 % en peso (p/p) de Serva Blue G250 en agua, 0,75 ml de una solución al 1 % en peso (p/p) de rojo de fenol, añadir agua para obtener un volumen total de 10 ml.

El caldo de cultivo que contenía el anticuerpo secretado se centrifugó para extraer células y residuos celulares. Se mezcló una alícuota del sobrenadante clarificado con 1/4 de volumen (v/v) de tampón de muestra 4 x LDS y 1/10 de volumen (v/v) de 1,4-ditiotreitol (DTT) 0,5 M. Luego se incubaron las muestras durante 10 min. a 70 °C y se separó la proteína por SDS-PAGE. El sistema de gel NuPAGE[®] Pre-Cast (Invitrogen Corp.) se utilizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En particular, se utilizaron geles NuPAGE[®] Novex[®] Bis-TRIS Pre-Cast (pH 6,4) al 10 % y un tampón de desarrollo NuPAGE[®] MOPS.

Inmunoelectrotransferencia

Tampón de transferencia: Glicina 39 mM, clorhidrato de TRIS 48 mM, SDS al 0,04 % en peso (p/p) y metanol (v/v) al 20 % en volumen

Después de SDS-PAGE, las cadenas de anticuerpos separadas se transfirieron electroforéticamente a una membrana de filtro de nitrocelulosa (tamaño de poro: 0,45 µm) de acuerdo con el "procedimiento de transferencia semiseca" de Burnette (Burnette, W.N., Anal. Biochem. 112 (1981) 195-203).

Ejemplo 1**Vector de expresión para expresar un anticuerpo anti-Aβ**

Un ejemplo de anticuerpo (preferentemente monoclonal) para el cual se puede obtener una línea celular para la expresión de acuerdo con la presente invención es un anticuerpo contra el péptido amiloide β-A4 (anticuerpo anti-Aβ). En los documentos WO 2003/070760 o US 2005/0169925, o en la SEQ ID NO: 1 a 12, por ejemplo, se informa de un anticuerpo de este tipo y las correspondientes secuencias de ácido nucleico.

El anticuerpo anti-Aβ que expresa la línea celular del ovario de hámster chino (CHO) se generó mediante tres transfecciones y campañas de selección completas sucesivas.

Se añadió un segmento génico de región constante de la cadena ligera κ humana genómica (C_L-kappa, C_L) a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-Aβ, mientras que se añadió un segmento génico de región constante de la cadena pesada γ1 humana (C_{H1}-Bisagra-C_{H2}-C_{H3}) a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-Aβ. Los genes completos de la cadena pesada γ1 y ligera κ del anticuerpo se unieron luego con un promotor de citomegalovirus humano (HCMV) en el extremo 5' y una secuencia señal de poliadenilación de inmunoglobulina humana en el extremo 3'.

a) Casete de expresión de cadena pesada

La unidad de transcripción de la cadena pesada del anticuerpo anti-Aβ se compone de los siguientes elementos:

- el potenciador y promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano,
- una región no traducida en dirección 5' derivada de un gen de la línea germinal de anticuerpo humano,
- el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-Aβ que incluye una secuencia señal derivada de un gen de la línea germinal de anticuerpo humano,
- un intrón 2 híbrido de la cadena pesada humano/ratón que incluye el elemento potenciador de la cadena pesada de Ig de ratón (véase, por ejemplo, (Neuberger, M.S., EMBO J. 2 (1983) 1373-1378),

- la región constante del gen genómico de la cadena pesada $\gamma 1$ humana,
- la secuencia señal de poliadenilación ("poliA") de la cadena pesada $\gamma 1$ de inmunoglobulina humana,
- los sitios de restricción únicos *Ascl* y *SgrAI* en los extremos 5' y 3', respectivamente.

b) Casete de expresión de cadena ligera

La unidad de transcripción de la cadena ligera del anticuerpo anti-A β se compone de los siguientes elementos:

- el potenciador y promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (HCMV),
- una región no traducida en dirección 5' derivada de un gen de la línea germinal de anticuerpo humano,
- la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-A β que incluye una secuencia señal derivada de un gen de la línea germinal de anticuerpo humano,
- un intrón 2 híbrido del gen de la cadena ligera κ humano/ratón que incluye el elemento potenciador de la cadena ligera χ de Ig de ratón (Picard y Schaffner, A lymphocyte-specific enhancer in the mouse immunoglobulin kappa gene. Nature 307(1984) 80-82),
- la región constante del gen de la cadena ligera κ humana (C-kappa),
- la secuencia señal de poliadenilación ("poliA") de κ de inmunoglobulina humana,
- los sitios de restricción únicos *Sse8387* y *Fsel* en los extremos 5' y 3', respectivamente.

c) Plásmidos de expresión 5128, 5137 y 5151

Para la expresión y producción del anticuerpo anti-A β , los casetes de expresión de cadena ligera y pesada se colocaron en un solo vector de expresión (cadena pesada en dirección 5' de la cadena ligera en orientación horaria). Se generaron tres vectores de expresión idénticos que diferían solo en el gen marcador seleccionable incluido, en particular, en el gen que confiere resistencia al agente de selección neomicina, higromicina o puromicina. Los vectores también incluyen un gen de DHFR de ratón que no se usó para selección ni amplificación.

Los vectores de expresión contienen, junto al casete de expresión de cadena ligera y pesada, los siguientes elementos:

- un marcador seleccionable (un gen de resistencia ya sea a neomicina, higromicina o puromicina),
- un origen de replicación que permite la replicación del plásmido en *E. coli*,
- un gen de betalactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*,
- un gen de DHFR derivado de ratón.

El mapa plasmídico del vector de expresión 5128 que contiene un gen marcador seleccionable de resistencia a higromicina se muestra en la figura 1. El mapa plasmídico del vector de expresión 5137 que contiene un gen marcador seleccionable de resistencia a neomicina se muestra en la figura 2. El mapa plasmídico del vector de expresión 5151 que contiene un gen marcador seleccionable de resistencia a puromicina se muestra en la figura 3.

Ejemplo 2

Transfección y selección de una célula CHO que expresa un anticuerpo anti-A β

Se usaron células CHO-K1 progenitoras, previamente adaptadas para el crecimiento en cultivo en suspensión sin suero en medio ProCHO4 sintético sin componentes animales (Cambrex Corp.) que contenía glutamina 8 mM y suplemento HT 1x (Gibco/Invitrogen) como línea de célula huésped. Este medio ProCHO4 suplementado se designa en adelante medio ProCHO4 completo. La línea celular parental CHO-K1 de cultivo adherente se recibió de ATCC como ATCC CCL-61.

Las células huésped parentales adaptadas previamente se propagaron en suspensión en medio ProCHO4 completo sintético, sin componentes animales, en condiciones de humidificación estándar (95 %, 37 °C y 5 % de CO₂). A intervalos regulares, dependiendo de la densidad celular, las células se dividieron en medio fresco. Las células se recogieron por centrifugación en la fase de crecimiento exponencial, se lavaron una vez en solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril y se resuspendieron en PBS estéril.

Antes de la transfección, los plásmidos que expresaban el anticuerpo anti-A β se linealizaron dentro del gen de betalactamasa (gen marcador de resistencia a la ampicilina en *E. coli*) usando la enzima endonucleasa de restricción PvuI o AvII. El ADN escindido se precipitó con etanol, se secó al vacío y se disolvió en PBS estéril.

En general, para la transfección, las células CHO (progenitoras o ya transfectadas) se sometieron a electroporación con 20-50 μ g de ADN plasmídico linealizado por aproximadamente 10⁷ células en PBS a temperatura ambiente. Las electroporaciones se realizaron con un dispositivo de electroporación Gene Pulser XCell (Bio-Rad Laboratories) en una cubeta con ranura de 2 mm, utilizando un protocolo de onda cuadrada con un solo pulso de 180 V. Después de la transfección, las células se colocaron en placas en medio ProCHO4 completo en placas de cultivo de 96 pocillos. Después de 24 h de crecimiento, se añadió una solución que contenía uno o más agentes de selección (medio ProCHO4 de selección completo; G418: 400 μ g/ml; higromicina: 600 μ g/ml; puromicina 8 μ g/ml). Una vez a la semana se reemplazó el medio ProCHO4 de selección completo. La concentración de anticuerpos del anticuerpo anti-A β se analizó con un ensayo ELISA específico para IgG1 humana en los sobrenadantes de cultivo.

Para la selección de líneas celulares de producción de anticuerpos anti-A β de alto rendimiento, la productividad se sometió a prueba en medio ProCHO4 de selección completo después de la propagación en placas de cultivo de 6 pocillos, matraces T y/o matraces Erlenmeyer con un ELISA con anticuerpo anti-IgG1 humana y/o HPLC analítica con proteína A.

Se obtuvieron subclones por dos procedimientos, dilución limitante (LD) y separación celular activada por fluorescencia (FACS).

Dilución limitante:

Para la dilución limitante, las células se colocaron en placas en un medio ProCHO4 acondicionado (que consistía en un 50 % (v/v) de un medio ProCHO4 de selección completo fresco y un 50 % (v/v) de un medio ProCHO4 de selección acondicionado completo derivado de las células que se iban a propagar) a una densidad celular de 0,5-2 células por 0,1 ml de medio por pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos. Una vez a la semana, el medio era reemplazado por medio ProCHO4 de selección completo. La concentración de anticuerpos del anticuerpo anti-A β se analizó mediante un ensayo ELISA específico para IgG1 humana en los sobrenadantes de cultivo.

Depósito de células individuales mediante citometría de flujo, incluyendo identificación y aislamiento de clones:

La identificación y aislamiento de clones transfectados de manera estable se realizó con la ayuda de una técnica de marcado de la superficie celular utilizando una proteína A marcada con fluorescencia que se une a anticuerpos secretados pero aún unidos a la membrana. La intensidad de la fluorescencia de las células teñidas se usó como criterio para la selección de células.

En el caso de la separación celular activada por fluorescencia, la población de células electroporadas se sembró directamente en matraces T en medio ProCHO4 completo. El agente o agentes de selección apropiados (G418, higromicina y/o puromicina) se añadió/añadieron al cultivo un día después de la transfección y se propagó el grupo de células transfectadas.

Las células del grupo transfectado se trataron primero con Accumax (PAA Laboratories) durante 15 minutos a 37 °C y luego se pasaron a través de una malla de nailon de 40 μ M para extraer los agregados celulares grandes restantes. Las células se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en PBS que contenía FCS al 5 % (Gibco/Invitrogen) a una densidad celular de 10⁶ a 10⁷ células/ml y se incubaron durante 20 minutos en hielo. A continuación, las células se tiñeron con 10 ng/ml de proteína A Alexa Fluor 488 (Molecular Probes Inc.) en un volumen de 8 ml de FCS-PBS durante 30 minutos en hielo en la oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron una vez con FCS-PBS al 5 % y una vez con medio ProCHO4 que contenía Ultra Glutamine 8 mM (Cambrex Corp.), suplemento de HT 1x y FCS al 5 %. Finalmente, las células se resuspendieron en el medio ProCHO suplementado utilizado para el lavado a una densidad celular de 10⁶ a 10⁷ células/ml y se transfirieron a un separador celular BD FACSAria (BD Biosciences).

Las células individuales se separaron por citometría de flujo y se depositaron en pocillos de placas de cultivo de 96 pocillos que contenían medio ProCHO4 acondicionado. Las células seleccionadas y depositadas englobaban células con un máximo de un 10 %, 7 % o 4 % de intensidad de fluorescencia superior de las células vivas seleccionadas. Después de 48 horas, se añadió a cada pocillo medio ProCHO4 de selección completo que

contenía el agente de selección apropiado en una concentración dos veces mayor. Una vez a la semana, el medio era reemplazado por medio ProCHO4 de selección completo. La concentración de anticuerpos del anticuerpo anti-A β se analizó con un ensayo ELISA específico para IgG1 humana en los sobrenadantes de cultivo.

5

Etapas de transfección y selección:

Para la primera etapa de transfección y selección, se ha utilizado el plásmido 5137. El plásmido 5137 se ha transfectado con electroporación en la línea de células progenitoras adaptada para el crecimiento en medio ProCHO4 completo. Las células transfectadas se cultivaron en medio ProCHO4 completo suplementado con hasta 700 μ g/ml de G418 en placas de 96 pocillos. La concentración de anticuerpos en los sobrenadantes del cultivo se evaluó mediante un ELISA con anticuerpo anti-IgG1 humana. Se han sometido a prueba aproximadamente 1000 clones y los seleccionados se cultivaron además en placas de 24 pocillos, placas de 6 pocillos y posteriormente en matraces Erlenmeyer. El crecimiento y productividad de aproximadamente 20 clones se evaluó en cultivos estáticos y en suspensión mediante ELISA con anticuerpo anti-IgG1 humana y/o HPLC analítica con proteína A. El mejor clon (el mejor clon no denota el clon más productivo; denota el clon con las mejores propiedades para las otras etapas) se subclonó por dilución limitada en medio ProCHO4 acondicionado suplementado con 700 μ g/ml de G418. El clon seleccionado recibió el nombre de 8C8.

10

15

Para la segunda etapa de transfección y selección, se ha utilizado el plásmido 5128. El plásmido 5128 se ha transfectado con electroporación en el clon de línea celular 8C8 cultivado en medio ProCHO4 completo suplementado con 700 μ g/ml de G418. Las células transfectadas se expandieron durante aproximadamente dos a tres semanas en medio ProCHO4 acondicionado suplementado con 200 μ g/ml de G418 y 300 μ g/ml de higromicina (medio ProCHO4 de selección doble). Se identificaron y depositaron células secretoras de anticuerpos individuales en función de su intensidad de fluorescencia después de la tinción con un conjugado de proteína A Alexa Fluor mediante análisis FACS. Las células depositadas se cultivaron en medio ProCHO4 de selección doble en placas de 96 pocillos. La concentración de anticuerpos en los sobrenadantes del cultivo se evaluó mediante un ELISA con anticuerpo anti-IgG1 humana. Se han sometido a prueba aproximadamente 500 clones y los seleccionados se cultivaron además en placas de 24 pocillos, placas de 6 pocillos y posteriormente en matraces Erlenmeyer. El crecimiento y productividad de aproximadamente 14 clones se evaluó en cultivos estáticos y en suspensión mediante ELISA con anticuerpo anti-IgG1 humana y/o HPLC analítica con proteína A. El clon seleccionado recibió el nombre de 4F5.

20

25

30

Para la tercera etapa de transfección y selección, se ha utilizado el plásmido 5151. El plásmido 5151 se ha transfectado con electroporación en el clon de línea celular 4F5 cultivado en medio ProCHO4 de selección doble. Las células transfectadas se expandieron durante aproximadamente dos a tres semanas en medio ProCHO4 de selección triple (medio ProCHO4 acondicionado suplementado con 200 μ g/ml de G418 y 300 μ g/ml de higromicina y 4 μ g/ml de puromicina). Se identificaron y depositaron células secretoras de anticuerpos individuales en función de su intensidad de fluorescencia después de la tinción con un conjugado de proteína A Alexa Fluor mediante análisis FACS. Las células depositadas se cultivaron en medio ProCHO4 de selección triple en placas de 96 pocillos. La concentración de anticuerpos en los sobrenadantes del cultivo se evaluó mediante un ELISA con anticuerpo anti-IgG1 humana. Se han sometido a prueba aproximadamente 500 clones y los seleccionados se cultivaron además en placas de 24 pocillos, placas de 6 pocillos y posteriormente en matraces Erlenmeyer. El crecimiento y productividad de aproximadamente 10 clones se evaluó en cultivos estáticos y en suspensión mediante ELISA con anticuerpo anti-IgG1 humana y/o HPLC analítica con proteína A. El clon seleccionado recibió el nombre de 20F2.

35

40

45

El clon 20F2 se ha seleccionado en función de sus características de crecimiento, productividad y calidad del producto después del crecimiento en cultivo en suspensión en régimen discontinuo alimentado en medio ProCHO4 de selección triple, es decir, en presencia concomitante de los tres agentes de selección G418, higromicina y puromicina.

50

Características de los clones:

Como puede verse en la siguiente tabla, el tiempo de duplicación y la densidad celular después de tres días de cultivo eran similares cuando se comparan la línea celular básica CHO-K1 (de tipo natural) y los clones seleccionados.

55

Tabla 1: Características de crecimiento

60

Clon	Tiempo de duplicación [h]	Densidad celular inicial [10 ⁶ células/ml]	Densidad celular el día 3 [10 ⁶ células/ml]	Viabilidad el día 3 [%]
CHO-K1 (de tipo natural)	22-23	3	18-20	97-98

8C8	26-28	3	12-15	96-98
4F5	22-24	3	24-27	96-97
20F2	24-26	2	23-26	97-98

Ejemplo 3

Estabilidad del clon 20F2 que expresa un anticuerpo anti-A β

La estabilidad del crecimiento y la formación del producto se evaluó en un subcultivo celular secuencial durante un período de tiempo de 60 días (aproximadamente 60 generaciones) en presencia y ausencia de los agentes de selección (con y sin antibióticos). El cultivo se realizó como se describe anteriormente.

Tabla 2: Características del clon 20F2.

Parámetro		Clon 20F2	
		cultivo en presencia de tres agentes de selección	cultivo en ausencia de agentes de selección
Valor medio de viabilidad	[%]	97	97
Valor medio de tiempo de duplicación	[h]	27	26
Valor medio de SPR	[pg/c/d]	11	9

Después de una prolongada tanda de pases (hasta la generación 60), no se obtuvo evidencia que indicara que el clon 20F2 que produce el anticuerpo anti-A β era inestable en lo que respecta al crecimiento celular y la formación de producto en presencia o ausencia de los tres agentes de selección, respectivamente.

Ejemplo 4

Vector de expresión para expresar un anticuerpo anti-P-selectina

Otro ejemplo de anticuerpo (preferentemente monoclonal) para el cual se puede obtener una línea celular para la expresión de acuerdo con la presente invención es un anticuerpo contra la glucoproteína P-selectina humana (anticuerpo anti-P-selectina). Un anticuerpo de este tipo y las correspondientes secuencias de ácido nucleico se describen, por ejemplo, en los documentos WO 2005/100402, o US 2005/0226876 o la SEQ ID NO: 13 a 18.

El anticuerpo anti-P-selectina que expresa la línea celular del ovario de hámster chino se generó mediante dos transfecciones y campañas de selección de clones completas sucesivas.

Se añadió un segmento génico de región constante de la cadena ligera kappa humana genómica (C-kappa) a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-P-selectina, mientras que se añadió un segmento génico de región constante de la cadena pesada gamma 4 humana (C_{H1}-Bisagra-C_{H2}-C_{CH3}) a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-P-selectina. Los genes completos del anticuerpo de cadena ligera kappa y pesada gamma 4 se unieron a continuación con un promotor y potenciador temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV IE) en el extremo 5' y la secuencia señal de poliadenilación temprana del papovavirus SV40 (poliA temprana de SV40) en el extremo 3'.

a) Casete de expresión de cadena pesada

La unidad de transcripción de la cadena pesada del anticuerpo anti-P-selectina se compone de los siguientes elementos:

- el potenciador y promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV IE),
- una región no traducida 5' (5' UTR),
- la secuencia codificante de la cadena pesada gamma 4 del anticuerpo anti-P-selectina que incluye un péptido señal en la estructura génica de intrones y exones,
- la secuencia señal de poliA temprana de SV40.

b) Casete de expresión de cadena ligera

La unidad de transcripción de la cadena ligera del anticuerpo anti-P-selectina se compone de los siguientes elementos:

- 5 - el potenciador y promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV IE),
- una región no traducida 5' (5' UTR),
- 10 - la secuencia codificante de la cadena ligera kappa del anticuerpo anti-P-selectina en una estructura génica de intrones y exones,
- la secuencia señal de poliA temprana de SV40.

c) Plásmidos de expresión 5057 y 5069.

Para la expresión y producción del anticuerpo anti-P-selectina, los casetes de expresión de las cadenas ligera y pesada se colocaron en un solo vector de expresión (cadena ligera en dirección 5' de la cadena pesada). Se generaron dos vectores de expresión idénticos que diferían solo en el gen marcador seleccionable incluido, en particular, el gen de la dihidrofolato reductasa murina (DHFR) o un gen de resistencia a la neomicina.

Los vectores de expresión contienen, junto al casete de expresión de cadena ligera y pesada, los siguientes elementos:

- 25 - un marcador seleccionable, ya sea el gen de la DHFR murina o un gen que confiere resistencia al agente de selección neomicina bajo el control del promotor temprano de SV40 y su origen,
- un origen de replicación que permite la replicación del plásmido en *E. coli* tomado de pUC19 (origen de pUC),
- 30 - un gen de betalactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*.

El mapa plasmídico del vector de expresión 5057 que contiene el gen marcador de la DHFR murina se muestra en la figura 4. El mapa plasmídico del vector de expresión 5069 que contiene un gen marcador seleccionable para neomicina se muestra en la figura 5.

Ejemplo 5**Transfección y selección de una línea celular CHO que expresa un anticuerpo anti-P-selectina**

Células CHO-K1, adaptadas previamente para crecimiento en un cultivo en suspensión sin suero en medio HyQ SFM4CHO sin proteínas (Hyclone, n.º de cat. SH30549) suplementado con componentes de origen animal definidos (colesterol derivado de lana ovina y aceite de hígado de bacalao) se utilizaron como línea de células huésped. Las células se propagaron en matraces Erlenmeyer en medio HyQ SFM4CHO sin proteínas en condiciones de humidificación estándar (95 %, 37 °C, y 5 % de CO₂) y bajo agitación constante a 150 rpm/min. Dependiendo de la densidad celular, las células se dividieron en medio fresco.

Las líneas celulares CHO-K1 adherentes se habían obtenido de la American Type Culture Collection como ATCC CCL-61.

Primera transfección y selección

Antes de la transfección, el plásmido de expresión 5057 se linealizó dentro del gen de betalactamasa usando la enzima de restricción PvuI. El ADN escindido se purificó utilizando columnas de centrifugación QiaQuick (Qiagen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

La transfección se llevó a cabo por electroporación utilizando Gene Pulser XCell (BIO-RAD) y cubetas de 0,2 cm (BIO-RAD, n.º de cat. 165-2086). Para la transfección, se recogieron 10⁶ a 10⁷ células CHO-K1 mediante centrifugación, se resuspendieron en PBS, se transfirieron a la cubeta y se mezclaron con 20-50 µg de ADN plasmídico linealizado. Las células se expusieron a un solo pulso de onda cuadrada (160 V, 15 ms) y posteriormente se diluyeron en medio HyQ SFM4CHO a una densidad de aprox. 4 × 10⁵ células/ml y se sembraron en un matraz de cultivo de células T75. Después de 48 horas de propagación sin la suplementación de un agente de selección, las células se diluyeron en medio HyQ SFM4CHO suplementado con MTX 200 nM a una densidad de 10⁴ a 10⁵ células/ml y se sembraron en placas de 96 pocillos con 3-7000 células por pocillo. Después de aprox. dos semanas, se añadió medio fresco por pocillo y, después de dos semanas adicionales, el

medio de cultivo se reemplazó completamente por medio fresco. Cuatro días después, los sobrenadantes de cultivo se sometieron a prueba para determinar la producción de anticuerpos mediante ELISA con anticuerpo anti-Fc humano. En total se cribaron aproximadamente 600 clones.

5 Se seleccionaron 45 clones con títulos de anticuerpos de más de 10 µg/ml y se transfirieron a placas de 48 pocillos. Los clones se expandieron a matraces Erlenmeyer en pases adicionales y posteriormente se transfirieron a un medio de producción sin suero para la evaluación final de la productividad. Se inoculó un
10 matraz Erlenmeyer de 125 ml con 10^5 a 10^6 células/ml en medio suplementado con MTX 200 nM. Se controlaron durante una semana la densidad celular viable y la viabilidad. Se midieron los títulos de anticuerpos mediante cromatografía con proteína A en el último día. Tomando como base estos datos, se seleccionó el clon G24 para su posterior desarrollo. G24 alcanzó una densidad celular viable máxima de $3,3 \times 10^6$ células/ml. El título de anticuerpos fue de 402 µg/ml. La tasa de producción específica (SPR) promedio fue de 28 pg/(célula*d).

Segunda transfección y selección:

15 El clon G24 se sometió a una segunda transfección. Para la segunda transfección se utilizó plásmido 5069. La linealización y purificación del plásmido así como la electroporación de G24 se realizaron como se describe para la primera transfección. Después de 48 horas de propagación sin presión de selección, las células se diluyeron en medio HyQ SFM4CHO suplementado con MTX 200 nM y 400 µg/ml de G418 a una densidad de 10^3 a
20 10^4 células/ml y se sembraron en placas de 96 pocillos con 500 células por pocillo. Después de aprox. dos semanas, se añadió medio fresco por pocillo y, después de una semana adicional, el medio de cultivo se reemplazó completamente por medio fresco. Cuatro días después, los sobrenadantes de cultivo se sometieron a prueba para determinar la producción de anticuerpos mediante ELISA con anticuerpo anti-Fc humano. En total se cribaron aproximadamente 220 clones.

25 Luego se seleccionaron 13 clones con títulos de anticuerpos de más de 150 µg/ml y se transfirieron a placas de 24 pocillos. Los clones se expandieron a matraces Erlenmeyer en pases adicionales y posteriormente se transfirieron a un medio de producción sin suero para la evaluación final de la productividad. Se inoculó un matraz Erlenmeyer con 10^5 a 10^6 células/ml en 50 ml de medio suplementado con MTX 200 nM y 400 µg/ml de
30 G418. Se controlaron durante una semana la densidad celular viable y la viabilidad. Se midieron los títulos de anticuerpos mediante cromatografía con proteína A en el último día. Tomando como base estos datos, el clon G24_x6 se consideró el mejor clon. G24_x6 alcanzó una densidad celular viable máxima de $3,0 \times 10^6$ células/ml. El título de anticuerpos fue de 685 µg/ml. La tasa de producción específica (SPR) promedio fue de 48 pg/(célula*d).

Dilución limitante:

35 Para comparar el procedimiento de acuerdo con la invención con una subclonación simple en lo que respecta a su efecto en la productividad, el clon G24 se sometió a dilución limitada o depósito de células individuales en
40 placas de 96 pocillos.

Para dilución limitante, se sembraron las células en placas de 96 pocillos en medio HyQ SFM4CHO suplementado con medio acondicionado al 50 % (v/v), FCS al 10 % y MTX 200 nM a 0,5 células/pocillo. De forma
45 alternativa, se depositó 1 célula/pocillo en placas de 96 pocillos mediante FACS. Después de 10 días, se añadió medio HyQ SFM4CHO fresco, MTX 200 nM sin FCS por pocillo y, después de una semana adicional, el medio de cultivo se reemplazó completamente por medio HyQ SFM4CHO, MTX 200 nM. Cuatro días después, los sobrenadantes de cultivo se sometieron a prueba para determinar la producción de anticuerpos mediante ELISA con anticuerpo anti-Fc humano. En total se cribaron aproximadamente 230 clones.

50 Once subclones con títulos de anticuerpos de más de 130 µg/ml se transfirieron a placas de 24 pocillos. Después de pases en placas de 6 pocillos, los clones se transfirieron a matraces Erlenmeyer y posteriormente se transfirieron a un medio de producción sin suero para la evaluación final de la productividad. Se inoculó un matraz Erlenmeyer con 10^5 a 10^6 células/ml en medio suplementado con MTX 200 nM. Se controlaron durante una semana la densidad celular viable y la viabilidad. Se midieron los títulos de anticuerpos mediante
55 cromatografía con proteína A en el último día. Tomando como base estos datos, G24_13 se consideró el mejor clon. G24_13 alcanzó una densidad celular viable máxima de $3,6 \times 10^6$ células/ml. El título de anticuerpos fue de 472 µg/ml. La tasa de producción específica (SPR) promedio fue de 31 pg/(célula*d).

60 La tabla 3 resume los datos de productividad del subclón con mejor rendimiento G24_13 y el clon con mejor rendimiento G24_x6 obtenido con el procedimiento de acuerdo con la invención en comparación con su clon parental G24. Con el procedimiento de acuerdo con la invención se puede obtener un clon con productividad volumétrica y específica aumentada en más de un 50 %, mientras que después de la subclonación solo se observó un aumento menor de ambos parámetros.

65 La figura 6 muestra una visión general de las productividades volumétricas (A) y específicas (B) de todos los subclones de G24 que se habían investigado en matraces Erlenmeyer. Como puede verse, la productividad

volumétrica y específica promedio de los clones obtenidos con el procedimiento de acuerdo con la invención fue significativamente mayor que después de la subclonación.

Tabla 3: Productividad de los mejores clones productores en comparación con el clon parental G24.

	G24	G24_13 (Subclón)	G24_x6 (procedimiento de acuerdo con la invención)
Concentración de anticuerpos en el sobrenadante [$\mu\text{g/ml}$]	402	472	685
SPR pg/(célula*d)	28	31	48
Máx. densidad celular [$10^5/\text{ml}$]	33	36	30

Características de los clones:

Como puede verse en la siguiente tabla, el tiempo de duplicación y la densidad celular después de tres días de cultivo fueron similares cuando se compararon la línea celular G24 transfectada una sola vez y los clones seleccionados.

Tabla 4: Características de crecimiento

Clon	Tiempo de duplicación [h]	Densidad celular inicial [10^6 células/ml]	Densidad celular el día 3 [10^6 células/ml]	Viabilidad el día 3 [%]
G24	29	0,3	0,7	91
G24_13	27	0,3	2,0	91
G24_x6	24	0,3	2,5	93

Ejemplo 6

Transfección y selección de una línea celular CHO que expresa un anticuerpo anti-P-selectina

Células CHO-DG44 adaptadas previamente para crecimiento en un cultivo en suspensión sin suero en medio HyQ SFM4CHO sin proteínas (Hyclone, n.º de cat. SH30549) se utilizaron como línea de células huésped. La línea de células huésped se cultivó en medio comercial HyQ SFM4CHO-utility (Hyclone, n.º de cat. SH30516) durante las etapas de transfección, cribado y subclonación.

Primera transfección y selección

Antes de la transfección, el plásmido de expresión 5057 (figura 4) se linealizó dentro del gen de betalactamasa usando la enzima de restricción PvuI.

La transfección de la línea de células huésped se realizó mediante una nucleotransfección proporcionada por AMAXA (Nucleofector Kit T, n.º de cat. VCA-1002, Programa de transfección U-17). Se cultivaron células en medio suplementado con suero de ternera fetal al 10 % durante 48 h después de la transfección.

Se colocaron células transfectadas en placas de 96 pocillos con 1000 células por pocillo en medio suplementado con suero de ternera fetal al 10 % en presencia de metotrexato (MTX) 40 nM como agente de selección y se incubaron durante aprox. tres semanas.

Se determinó la concentración de anticuerpos mediante ELISA en el sobrenadante de las placas de 96 pocillos. Se cribaron cerca de 400 clones primarios. Veinticuatro clones con la máxima productividad de anticuerpos se transfirieron a placas de 24 pocillos y se cultivaron en presencia del agente de selección sin suplementación con suero de ternera fetal. Se analizó la calidad del producto mediante inmunoelectrotransferencia detectando cadenas de anticuerpo ligeras y pesadas. Nueve clones que mostraron la máxima productividad y que expresaron anticuerpos sin productos secundarios derivados de anticuerpos detectables (inmunoelectrotransferencia) se expandieron en matraces Erlenmeyer.

Se analizó la productividad en matraces Erlenmeyer con régimen discontinuo después de 7 y 10 días de incubación. Se evaluó la calidad del producto mediante SDS-PAGE después de la purificación por HPLC con proteína A (figura 7). La mejor concentración de producto se alcanzó con el clon 43-16. La mejor productividad específica por célula se logró con el clon 35-45. Ninguno de los dos clones mostró productos secundarios detectables en la SDS-PAGE. Ambos clones se seleccionaron para subclonación por dilución limitante.

Se subclonaron los clones parentales 35-45 y 43-16 mediante dilución limitante en placas de 96 pocillos en medio comercial HyQ suplementado con suero de ternera fetal al 5 % (v/v) en presencia de MTX 20 nM. Después de 20 días de incubación, la producción de anticuerpos se cribó mediante ELISA. Los mejores subclones en términos de productividad se expandieron a matraces Erlenmeyer y posteriormente se transfirieron a un medio de producción sin suero para la evaluación final de la productividad. Los dos mejores subclones, 35-45-F2 y 43-16-A10, de los clones parentales 35-45 y 43-16 se evaluaron en un ensayo en matraz Erlenmeyer con régimen discontinuo estándar. La productividad fue 270 µg/ml y 185 µg/ml después de 7 días y 337 µg/ml y 343 µg/ml después de 10 días, respectivamente.

Segunda transfección y selección:

El subclón 43-16-A10 se transfectó con el vector de expresión p5069 (figura 5) utilizando el procedimiento de nucleofección (Amaxa Nucleofector Kit T, VCA-1002, Programa de transfección U-17). La segunda transfección también se llevó a cabo en medio Hyclone: HyQ SFM4CHO-utility (n.º de cat. SH30516) suplementado con suero de ternera fetal al 10 % y MTX 20 nM. Dos días después de la segunda transfección, las células se transfirieron a placas de 96 pocillos con 1000 células por pocillo. Como segundo agente de selección, se añadieron 250 µg/ml de G418.

Después del cultivo durante dos semanas, se cribaron más de 2000 pocillos primarios mediante determinación de títulos de anticuerpos por ELISA con anticuerpo anti-Fc humano. Cincuenta clones con la máxima productividad se transfirieron a placas de 24 pocillos y se cribaron una segunda vez mediante ELISA con anticuerpo anti-Fc humano tres días después. Todos los clones se transfirieron a placas de 6 pocillos y se cribaron mediante ELISA con anticuerpo anti-Fc humano tres días después. Los seis clones con la mejor productividad se subclonaron directamente desde la etapa de placa de 6 pocillos.

Dilución limitante:

Los mejores clones parentales de la segunda ronda de transfección y selección 43-16A10_S1, 43-16A10_S13, 43-16A10_S14, 43-16A10_S19, 43-16A10_S24, 43-16A10_S43 se subclonaron por dilución limitante. La calidad del producto de los doce mejores subclones se evaluó en SDS-PAGE e inmunoelectrotransferencia desde la etapa de 24 pocillos. No se detectaron productos secundarios relacionados con anticuerpos no deseados.

Se seleccionaron tres subclones, 43-16-A10-S1-16, 43-16-A10-S24-11 y 43-16-A10-S43-14, de acuerdo con su productividad en placas de 6 pocillos para la expansión en matraces Erlenmeyer. Se transfirieron a un medio de producción sin suero para la evaluación final de la productividad. Su productividad se comparó con el subclón después de la primera transfección, el clon 43-16-A10. La productividad se multiplicó por dos para dos de los clones después de la segunda transfección y selección, 43-16-A10-S1-16 y 43-16-A10-S24-11, de 221 µg/ml después de 7 días en el matraz Erlenmeyer en régimen discontinuo a 436 µg/ml y 407 µg/ml, respectivamente. Después de 10 días de incubación en el matraz Erlenmeyer en régimen discontinuo, la productividad aumentó de 306 µg/ml a 683 µg/ml y 446 µg/ml, respectivamente.

La productividad específica por célula aumentó también de 17 pg/célula/día para el clon 43-16-A10 después de la primera transfección a 40 pg/célula/día para el primer clon transfectado 43-16-A10-S1-16 y a 33 pg/célula/día para el segundo clon transfectado 43-16-A10-S24-11. El tiempo de duplicación no se vio afectado por la segunda transfección. El tiempo de duplicación para el clon 43-16-A10 después de la primera transfección fue de 33 h y fue de 32 h para ambos clones 43-16-A10-S1-16 y 43-16-A10-S24-11.

Ejemplo 7

Vector de expresión para expresar un anticuerpo anti-IL-13R α

Otro ejemplo de anticuerpo (preferentemente monoclonal) para el cual se puede obtener una línea celular para la expresión de acuerdo con la presente invención es un anticuerpo que se une al receptor alfa 1 de IL-13 (anticuerpo anti-IL-13R α 1 anti-IL-13R α). Un anticuerpo de este tipo y las correspondientes secuencias de ácido nucleico se describen, por ejemplo, en el documento WO 2006/072564 o SEQ ID NO: 19 a 28.

Se añadió un segmento génico de región constante de la cadena ligera kappa humana genómica (C-kappa) a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-IL-13R α mientras que se añadió un segmento génico de región constante de la cadena pesada gamma 1 humana (C_{H1}-Bisagra-C_{H2}-C_{H3}) a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-IL-13R α . El plásmido de expresión 5321 comprende un casete de expresión

para la cadena pesada $\gamma 1$ del anticuerpo anti-IL-13R α , y la cadena ligera κ del anticuerpo anti-IL-13R α , y un ácido nucleico que codifica el gen de la DHFR murina. En la figura 9 se muestra un mapa plasmídico con anotaciones.

5 **a) Casete de expresión de cadena pesada**

La unidad de transcripción de la cadena pesada del anticuerpo conjugado anti-IL-13R α se compone de los siguientes elementos:

- 10
- el potenciador y promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV IE),
 - una región no traducida 5' (5' UTR),
- 15
- la secuencia codificante del conjugado con la cadena pesada gamma 1 del anticuerpo anti-IL-13R α que incluye un péptido señal en la estructura génica de intrones y exones,
 - la secuencia señal de poliadenilación de la inmunoglobulina gamma 1 humana.

20 **b) Casete de expresión de cadena ligera**

La unidad de transcripción de la cadena ligera del anticuerpo anti-IL-13R α se compone de los siguientes elementos:

- 25
- el potenciador y promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV IE),
 - una región no traducida 5' (5' UTR),
- 30
- la secuencia codificante de la cadena ligera kappa del anticuerpo anti-IL-13R α en una estructura génica de intrones y exones,
 - la secuencia señal de poliadenilación de kappa de inmunoglobulina humana.

c) Plásmidos de expresión

35 Para la expresión y producción del anticuerpo conjugado anti-IL-13R α , los casetes de expresión de las cadenas ligera y pesada se colocaron en un solo vector de expresión (cadena ligera en dirección 5' de la cadena pesada). Se generaron dos vectores de expresión idénticos que diferían solo en el gen marcador seleccionable incluido, en particular, el gen de DHFR murina y tanto el gen de DHFR murina como un gen de resistencia a la higromicina.

40 Los vectores de expresión contienen, junto al casete de expresión de cadena ligera y pesada, los siguientes elementos:

- 45
- un origen de replicación que permite la replicación del plásmido en *E. coli* (origen de pUC),
 - un gen de betalactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*.

Ejemplo 8

50 **Transfección y selección de una línea celular CHO que expresa un anticuerpo anti-IL-13R α**

Para la primera etapa de transfección y selección, se ha utilizado el plásmido 5321. El plásmido 5321 se ha transfectado con electroporación en la línea de células progenitoras adaptada para el crecimiento en medio ProCHO4 completo. Las células transfectadas se cultivaron en medio HyQSFMCHO (HyClone) suplementado con metotrexato hasta 200 nM en placas. La concentración de anticuerpos en los sobrenadantes del cultivo se evaluó mediante un ELISA con anticuerpo anti-IgG1 humana. Los clones se han sometido a prueba y los seleccionados se cultivaron además en placas de 24 pocillos, placas de 6 pocillos y posteriormente en matraces Erlenmeyer. El crecimiento y productividad se evaluó en cultivos estáticos y en suspensión mediante ELISA con anticuerpo anti-IgG1 humana y/o HPLC analítica con proteína A. Se seleccionó el mejor clon (el mejor clon no denota el clon más productivo; denota el clon con las mejores propiedades para las otras etapas). El clon seleccionado recibió el nombre de 200_019. La productividad fue 90 $\mu\text{g/ml}$ con una tasa de producción específica promedio de 7 $\text{pg/célula}\cdot\text{d}$ después de 7 días de cultivo.

55

60

Para la segunda etapa de transfección y selección se ha utilizado un plásmido con un gen de DHFR y de resistencia a la higromicina. El plásmido se ha transfectado con electroporación en la línea celular seleccionada cultivada en medio HyQSFMCHO (HyClone) suplementado con metotrexato hasta 200 nM. El medio de selección doble contenía además 300 µg/ml de higromicina B. Se identificaron y depositaron células secretoras de anticuerpos individuales en función de su intensidad de fluorescencia después de la tinción con un conjugado de proteína A Alexa Fluor mediante análisis FACS. El clon seleccionado recibió el nombre de 5_17_35. La productividad fue 150 µg/ml con una tasa de producción específica promedio de 10 pg/célula*d después de 7 días de cultivo.

Ejemplo 9

Vector de expresión para expresar un anticuerpo conjugado anti-CD4

Otro ejemplo de anticuerpo (monoclonal) para el que se puede obtener una línea celular para expresión de acuerdo con la presente invención es un anticuerpo contra el receptor de superficie CD4 humano (anticuerpo anti-CD4) que se conjuga con dos a ocho péptidos antifusogénicos. En el documento WO 2009/012944 o en la SEQ ID NO: 29 a 40, por ejemplo, se informa de un anticuerpo de este tipo y las correspondientes secuencias de ácido nucleico.

Se añadió un segmento génico de región constante de la cadena ligera kappa humana genómica (C-kappa) a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-CD4 de SEQ ID NO: 39, mientras que se añadió un segmento génico de región constante de la cadena pesada gamma 1 humana (C_{H1}-Bisagra-C_{H2}-C_{H3}) a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD4 de SEQ ID NO: 36. El plásmido de expresión 6311 comprende una cadena pesada γ1 del anticuerpo anti-CD4, que se une en el penúltimo aminoácido C-terminal, es decir, se elimina el residuo de lisina C-terminal de la cadena pesada, con un ácido nucleico que codifica un péptido antifusogénico de SEQ ID NO: 41 a través del conector glicina-serina peptídico de SEQ ID NO: 42, y una cadena ligera κ del anticuerpo anti-CD4, y un ácido nucleico que confiere resistencia al marcador seleccionable neomicina. En la figura 8 se muestra un mapa plasmídico con anotaciones.

a) Casete de expresión de cadena pesada

La unidad de transcripción de la cadena pesada del anticuerpo conjugado anti-CD4 se compone de los siguientes elementos:

- el potenciador y promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV IE),
- una región no traducida 5' (5' UTR),
- la secuencia codificante del conjugado con la cadena pesada gamma 1 del anticuerpo anti-CD4 que incluye un péptido señal en la estructura génica de intrones y exones,
- la secuencia señal de poliA temprana de SV40.

b) Casete de expresión de cadena ligera

La unidad de transcripción de la cadena ligera del anticuerpo conjugado anti-CD4 se compone de los siguientes elementos:

- el potenciador y promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV IE),
- una región no traducida 5' (5' UTR),
- la secuencia codificante de la cadena ligera kappa del anticuerpo anti-CD4 en una estructura génica de intrones y exones,
- la secuencia señal de poliA temprana de SV40.

c) Plásmidos de expresión

Para la expresión y producción del anticuerpo conjugado anti-CD4, los casetes de expresión de las cadenas ligera y pesada se colocaron en un solo vector de expresión (cadena ligera en dirección 5' de la cadena pesada). Se generaron tres vectores de expresión idénticos que diferían solo en el gen marcador seleccionable incluido, en particular, un gen de resistencia a la neomicina, un gen de resistencia a la puomicina y un gen de resistencia a la higromicina.

Los vectores de expresión contienen, junto al casete de expresión de cadena ligera y pesada, los siguientes elementos:

- 5 - un origen de replicación que permite la replicación del plásmido en *E. coli* tomado de pUC18 (origen de pUC),
- un gen de betalactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*.

Ejemplo 10

10

Transfección y selección de una línea celular CHO que expresa un anticuerpo conjugado anti-CD4

Etapas de transfección y selección:

15 Para la primera etapa de transfección y selección, se ha utilizado el plásmido 6311. El plásmido 6311 se ha transfectado con electroporación en la línea de células progenitoras adaptada para el crecimiento en medio ProCHO4 completo. Las células transfectadas se cultivaron en medio ProCHO4 completo suplementado con hasta 700 µg/ml de G418 en placas de 96 pocillos. La concentración de anticuerpos en los sobrenadantes del cultivo se evaluó mediante un ELISA con anticuerpo anti-IgG1 humana. Se han sometido a prueba

20 aproximadamente 5000 clones y los seleccionados se cultivaron además en placas de 24 pocillos, placas de 6 pocillos y posteriormente en matraces Erlenmeyer. El crecimiento y productividad de aproximadamente 15 clones se evaluó en cultivos estáticos y en suspensión mediante ELISA con anticuerpo anti-IgG1 humana y/o HPLC analítica con proteína A. El mejor clon (el mejor clon no denota el clon más productivo; denota el clon con las mejores propiedades para las otras etapas) se subclonó por dilución limitada en medio ProCHO4

25 acondicionado suplementado con 700 µg/ml de G418.

Se obtuvieron subclones por dos procedimientos, dilución limitante (LD) y separación celular activada por fluorescencia (FACS).

30 Dilución limitante:

Para dilución limitante, se colocaron células en placas en un medio ProCHO4 de selección a una densidad celular de 0,5-2 células por 0,1 ml de medio por pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos.

35 Depósito de células individuales mediante citometría de flujo, incluyendo identificación y aislamiento de clones:

En el caso de la separación celular activada por fluorescencia, la población de células electroporadas se sembró directamente en matraces T en medio ProCHO4 completo. El agente o agentes de selección apropiados (G418, higromicina y/o puromicina) se añadió/añadieron al cultivo un día después de la transfección y se propagó la mezcla transfectante. El crecimiento y productividad de aproximadamente 112 clones se evaluó en cultivos

40 estáticos y en suspensión mediante ELISA con anticuerpo anti-IgG1 humana y/o HPLC analítica con proteína A. El clon seleccionado recibió el nombre de I-17.

45 Para la segunda etapa de transfección y selección se ha utilizado un plásmido con un gen de resistencia a la higromicina. El plásmido se ha transfectado con electroporación en el clon de línea celular I-17 cultivado en medio ProCHO4 completo suplementado con 700 µg/ml de G418. Las células transfectadas se expandieron durante aproximadamente dos a tres semanas en medio ProCHO4 acondicionado suplementado con 200 µg/ml de G418 y 300 µg/ml de higromicina (medio ProCHO4 de selección doble). Se identificaron y depositaron células

50 secretoras de anticuerpos individuales en función de su intensidad de fluorescencia después de la tinción con un conjugado de proteína A Alexa Fluor mediante análisis FACS. Las células depositadas se cultivaron en medio ProCHO4 de selección doble en placas de 96 pocillos. La concentración de anticuerpos en los sobrenadantes del cultivo se evaluó mediante un ELISA con anticuerpo anti-IgG1 humana. El clon seleccionado recibió el nombre de 24_16. Para la tercera etapa de transfección y selección se ha utilizado un plásmido con un gen de resistencia

55 a la puromicina. El plásmido se ha transfectado con electroporación en el clon de línea celular 24_16 cultivado en medio ProCHO4 de selección doble. Las células transfectadas se expandieron durante aproximadamente dos a tres semanas en medio ProCHO4 de selección triple (medio ProCHO4 acondicionado suplementado con 200 µg/ml de G418 y 300 µg/ml de higromicina y 4 µg/ml de puromicina). Se identificaron y depositaron células

60 secretoras de anticuerpos individuales en función de su intensidad de fluorescencia después de la tinción con un conjugado de proteína A Alexa Fluor mediante análisis FACS. Las células depositadas se cultivaron en medio ProCHO4 de selección triple en placas de 96 pocillos. La concentración de anticuerpos en los sobrenadantes del cultivo se evaluó mediante un ELISA con anticuerpo anti-IgG1 humana. El clon seleccionado recibió el nombre de 1_24.

65

Características de los clones:

Como puede verse en la siguiente tabla, el tiempo de duplicación y la densidad celular después de tres días de cultivo eran similares cuando se comparan la línea celular básica CHO-K1 (de tipo natural) y los clones seleccionados.

5

Tabla 5: Características de crecimiento

Clon	Tiempo de duplicación [h]	Densidad celular inicial [10⁶ células/ml]	Densidad celular el día 3 [10⁶ células/ml]	Viabilidad el día 3 [%]
CHO-K1 (adaptado previamente)	22-25	3	18-22	96-98
I-17	25-30	3	13-15	95-97
24_16	25-30	3	15-16	95-96
1_24	30-32	3	12-14	95-97

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

5 <120> Expresión de proteínas a partir de múltiples ácidos nucleicos

<130> 24518 EP3

<150> EP 07019999.7

10 <151> 12/10/2007

<160> 42

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> VH CDR3

<400> 1

25 **Leu Thr His Tyr Ala Arg Tyr Tyr Arg Tyr Phe Asp Val**

1 5 10

<210> 2

<211> 17

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> VH CDR3

35 <400> 2

Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr Phe Asp

1 5 10 15

Val

40 <210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

45 <220>

<223> VH CDR3

<400> 3

Leu Leu Ser Arg Gly Tyr Asn Gly Tyr Tyr His Lys Phe Asp Val

50 **1 5 10 15**

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

55 <213> Artificial

<220>

<223> VL-CDR3

<400> 4

Gln Gln Val Tyr Asn Pro Pro Val
1 5

5 <210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> VL-CDR3

<400> 5

Phe Gln Leu Tyr Ser Asp Pro Phe
15 1 5

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
20 <213> Artificial

<220>
<223> VL-CDR3

25 <400> 6

Gln Gln Leu Ser Ser Phe Pro Pro
1 5

30 <210> 7
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> VH

<400> 7

ES 2 695 999 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Thr His Tyr Ala Arg Tyr Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 8
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> VH

<400> 8

ES 2 695 999 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr
 100 105 110

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 9
 <211> 124
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> VH

10 <400> 9

ES 2 695 999 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Leu Ser Arg Gly Tyr Asn Gly Tyr Tyr His Lys Phe Asp
 100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 10
 <211> 110
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> VL

10 <400> 10

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Tyr Asn Pro Pro

ES 2 695 999 T3

85

90

95

Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

<210> 11
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> VL

10

<400> 11

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Leu Tyr Ser Asp Pro
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

15

<210> 12
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> VL

<400> 12

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

25

ES 2 695 999 T3

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Ser Ser Phe Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

5 <210> 13
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Thr Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Arg Ile Ser Met Asp Arg Gly Val Lys Asn Asn Trp Phe Asp
 100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15 <210> 14
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

20 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly

ES 2 695 999 T3

Gln Pro Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Asn Thr Leu Thr Glu Leu
 20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asn Gly Glu Ala Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Asp Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Thr Asp Leu Ala Gly Gly Ser Asp Phe Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp
 100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- 5 <210> 16
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*

- 10 <400> 16

ES 2 695 999 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asn Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 17
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 17

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

10 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

15 <210> 18
 <211> 107
 <212> PRT

ES 2 695 999 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 18

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

5 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 19

<211> 119

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> LC5002-002 Dominio variable de la cadena pesada/VH gamma

15 <400> 19

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ile Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

ES 2 695 999 T3

Ser Val Ile Ser Gly Arg Gly Ile Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Ser Ser Ser Trp Thr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20
<211> 119
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> LC5002-003 Dominio variable de la cadena pesada/VH gamma

<400> 20

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ile Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Ser Gly Arg Gly Ile Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Ser Ser Tyr Trp Thr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

15 <210> 21
<211> 118
<212> PRT

ES 2 695 999 T3

<213> Artificial

<220>

<223> LC5002-005 Dominio variable de la cadena pesada/VH gamma

5

<400> 21

Glu Val Gln Val Leu Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Leu Tyr
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Glu Gly Asp Trp Ile Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Ile Val Ser Ser
115

10

<210> 22
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

15

<220>
<223> LC5002-007 Dominio variable de la cadena pesada/VH gamma

<400> 22

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

20

ES 2 695 999 T3

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Glu Thr Leu Asp Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 23
<211> 119
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> LC5002-018 Dominio variable de la cadena pesada/VH gamma

<400> 23

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ile Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly Val Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Ser Ser Trp Tyr Val Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

15 <210> 24
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> LC5002-002 Dominio variable de la cadena ligera/VL kappa

ES 2 695 999 T3

<400> 24

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Trp
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

5

<210> 25
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> LC5002-003 Dominio variable de la cadena ligera/VL kappa

<400> 25

15

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp
85 90 95

ES 2 695 999 T3

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

5 <210> 26
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> LC5002-005 Dominio variable de la cadena ligera/VL kappa
<400> 26

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser His Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

15 <210> 27
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> LC5002-007 Dominio variable de la cadena ligera/VL kappa
<400> 27

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

25 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

ES 2 695 999 T3

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ile Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Gly Ser Ser Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 28
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> LC5002-018 Dominio variable de la cadena ligera/VL kappa

10

<400> 28

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

15 <210> 29
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20 <400> 29

Glu Lys Asp Asn Tyr Ala Thr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 30

ES 2 695 999 T3

<211> 13
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 5 <400> 30
 Glu Lys Asp Asn Tyr Ala Thr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10
 <210> 31
 10 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 31
 15 Ala Arg Lys Tyr Gly Gly Asp Tyr Asp Pro Phe
 1 5 10
 <210> 32
 <211> 8
 20 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 32
 Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Arg Thr
 25 1 5
 <210> 33
 <211> 8
 <212> PRT
 30 <213> *Mus musculus*
 <400> 33
 Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Arg Thr
 35 1 5
 <210> 34
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 40 <400> 34
 Tyr Asp Asn Leu Leu Phe
 1 5
 45 <210> 35
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> dominio variable de la cadena pesada mutado
 <400> 35

ES 2 695 999 T3

Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Val Ile His Trp Val Arg Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Asp Tyr Asp Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Lys Asp Asn Tyr Ala Thr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 36
 <211> 122
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> dominio variable de la cadena pesada mutado

10 <400> 36

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Val Ile His Trp Val Arg Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Asp Tyr Asp Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

ES 2 695 999 T3

Ala Arg Glu Lys Asp Asn Tyr Ala Thr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 37
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> dominio variable de la cadena pesada mutado
 <400> 37

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Ala Ala Ile Ser Asp His Ser Thr Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Lys Tyr Gly Gly Asp Tyr Asp Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15 <210> 38
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> dominio variable de la cadena ligera mutado
 <400> 38

25 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
 1 5 10 15

ES 2 695 999 T3

Glu Lys Val Thr Met Ile Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

Thr Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 39
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> dominio variable de la cadena ligera mutado

10

<400> 39

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

Thr Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

15 <210> 40
 <211> 108
 <212> PRT

ES 2 695 999 T3

<213> Artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena ligera mutado

5

<400> 40

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

Ile Ala Trp Tyr Gln His Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Cys Leu Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Leu Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
100 105

10

<210> 41
<211> 37
<212> PRT
<213> Artificial

15

<220>
<223> afp-1
<400> 41

Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Gln Tyr Thr Ser
1 5 10 15

Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn
20 25 30

20

Glu Gln Glu Leu Leu
35

25

<210> 42
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> conector

<400> 42

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

5

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción recombinante de una inmunoglobulina heteróloga en una célula CHO que se secreta al medio de cultivo que comprende:

5

a) proporcionar una célula CHO, que está

- adaptada al crecimiento en cultivo en suspensión.
- adaptada al crecimiento en medio sin suero,
- sin micoplasmas,

10

b) proporcionar un ácido nucleico que comprende

15

- un origen de replicación procariótico,
- una primera secuencia de ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección procariótico,
- una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de dicha inmunoglobulina heteróloga, y/o
- una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicha inmunoglobulina heteróloga,

20

25

de manera que se proporciona un primer vector de transfección que comprende dicho ácido nucleico proporcionado y una cuarta secuencia de ácido nucleico adicional que confiere resistencia a un primer agente de selección eucariótico,

30

de manera que se proporciona un segundo vector de transfección que comprende dicho ácido nucleico proporcionado y una cuarta secuencia de ácido nucleico adicional que confiere resistencia a un segundo agente de selección eucariótico, de manera que dicho segundo agente de selección eucariótico sea diferente de dicho primer agente de selección eucariótico,

35

b1) proporcionar un ácido nucleico que comprende

- un origen de replicación procariótico,
- una primera secuencia de ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección procariótico,
- una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de dicha inmunoglobulina heteróloga, y/o una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicha inmunoglobulina heteróloga,

40

45

de manera que se proporciona un tercer vector de transfección que comprende dicho ácido nucleico proporcionado y una secuencia adicional de un cuarto ácido nucleico que confiere resistencia a un tercer agente de selección eucariótico, de manera que dicho tercer agente de selección eucariótico es diferente de dicho primer agente de selección eucariótico y también es diferente de dicho segundo agente de selección eucariótico,

50

c) transfectar dicha célula CHO, en la que dicha transfección comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

55

- (i) transfectar dicha célula CHO con dicho primer vector de transfección,
- (ii) seleccionar una célula CHO transfectada en (i) mediante crecimiento seleccionado en un medio de cultivo que contiene un primer agente de selección eucariótico al que el primer vector de transfección confiere resistencia,

60

- (iii) transfectar dicha célula CHO seleccionada en (ii) con dicho segundo vector de transfección,

- 5
- (iv) seleccionar una célula CHO transfectada en (iii) mediante crecimiento seleccionado en medio de cultivo que contiene dicho primer agente de selección eucariótico al que el primer vector de transfección confiere resistencia y dicho segundo agente de selección eucariótico al que el segundo vector de transfección confiere resistencia,
- (v) transfectar dicha célula CHO seleccionada en (iv) con dicho tercer vector de transfección,
- 10
- (vi) seleccionar una célula CHO transfectada en (v) mediante crecimiento seleccionado en medio de cultivo que contiene dicho primer agente de selección eucariótico al que el primer vector de transfección confiere resistencia y dicho segundo agente de selección eucariótico al que el segundo vector de transfección confiere resistencia y dicho tercer agente de selección eucariótico al que el tercer vector de transfección confiere resistencia,
- 15
- d) cultivar dicha célula CHO transfectada en un medio en presencia de dicho primer y dicho segundo y dicho tercer agente de selección eucariótico, en condiciones adecuadas para la expresión de dicho primer, segundo y/o tercer ácido nucleico,
- e) recuperar dicha inmunoglobulina heteróloga secretada del medio de cultivo y producir así una inmunoglobulina heteróloga en una célula CHO que se secreta al medio de cultivo,
- 20
- en el que el primer, segundo y tercer vector de transfección difieren cada uno solo en el ácido nucleico que confiere resistencia a dicho primero, segundo y tercer agente de selección eucariótico.
- 25
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que dicha célula CHO es una célula CHO K1, o una célula CHO DG44, o una célula CHO XL99, o una célula CHO DXB11 o una célula CHO DP12.
3. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicho segundo y/o tercer ácido nucleico contiene una secuencia de ácido nucleico intrónica híbrida.
- 30
4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el promotor empleado para la transcripción de dichos segundo y tercer ácidos nucleicos es diferente del promotor empleado para la transcripción de dicho cuarto ácido nucleico.
- 35
5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el promotor empleado para la transcripción de dichos segundo y tercer ácidos nucleicos es el mismo.
- 40
6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la selección de una célula CHO transfectada en la etapa c) (i) y/o (iii) es mediante el crecimiento en medio de cultivo sin un agente de selección durante 12 a 72 horas, seguido de crecimiento seleccionado en medio de cultivo que contiene dicho primer agente de selección en el caso de (ii) o dicho primer y segundo agente de selección eucariótico en el caso de (iv).
- 45
7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el uso de codones de dicho segundo y tercer ácido nucleico está optimizado para la traducción en células CHO.
- 50
8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la etapa c) y la etapa d) se realizan en el mismo medio.
- 55
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por que dicho medio es un medio sin suero, o un medio sin suero suplementado con componentes de origen animal definidos, o un medio sin componentes de origen animal, o un medio sin proteínas, un medio sin proteínas suplementado con componentes de origen animal definidos, o un medio sin proteínas definidas, o un medio definido químicamente.
- 60
10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que en dicha etapa d) dicho cultivo es en presencia de dichos agentes de selección eucarióticos en un volumen de menos de 500 litros y por que dicho cultivo es en ausencia de dichos agentes de selección eucarióticos en un volumen de 500 litros o más y por que dicha recuperación de dicha inmunoglobulina heteróloga secretada procede del medio de cultivo sin dichos agentes de selección eucarióticos.
- 65
11. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la productividad de dichas células CHO es durante 40 generaciones de no menos de un 70 % y no más de un 130 % de la productividad después de 10 generaciones de cultivo como cultivo discontinuo.

12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la productividad de dichas células CHO durante 60 generaciones es de no menos de un 50 % y no más de un 150 % de la productividad después de 10 generaciones de cultivo como cultivo discontinuo.
- 5 13. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la productividad de dicha célula CHO es de al menos 1,5 g/l de dicha inmunoglobulina heteróloga en un plazo de 21 días como cultivo en régimen discontinuo alimentado.
- 10 14. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicho procedimiento comprende además:
f) purificar dicha inmunoglobulina heteróloga con una o más etapas cromatográficas.
- 15 15. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicha célula CHO transfectada de la etapa d) tiene
- un tiempo de duplicación de un 150 % o menos del tiempo de duplicación de la célula CHO seleccionada en la subetapa (ii),
20 - un rendimiento volumétrico de al menos un 125 % comparado con el rendimiento volumétrico de la célula CHO seleccionada en (ii).
- 25 16. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicha inmunoglobulina heteróloga es un anticuerpo anti-A β .
17. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicha inmunoglobulina heteróloga es un anticuerpo anti-P-selectina.
- 30 18. Una célula CHO obtenible con el siguiente procedimiento:
a) proporcionar una célula CHO, que está
- adaptada al crecimiento en cultivo en suspensión.
35 - adaptada al crecimiento en medio sin suero,
- sin micoplasmas,
b) proporcionar un ácido nucleico que comprende
40 - un origen de replicación procariótico,
- una primera secuencia de ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección procariótico,
45 - una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de dicha inmunoglobulina heteróloga, y/o una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicha inmunoglobulina heteróloga,
50 de manera que se proporciona un primer vector de transfección que comprende dicho ácido nucleico proporcionado y una cuarta secuencia de ácido nucleico adicional que confiere resistencia a un primer agente de selección eucariótico,
de manera que se proporciona un segundo vector de transfección que comprende dicho ácido nucleico proporcionado y una cuarta secuencia de ácido nucleico adicional que confiere resistencia a un segundo agente de selección eucariótico, de manera que dicho segundo agente de selección eucariótico sea diferente de dicho primer agente de selección eucariótico,
55 b1) proporcionar un ácido nucleico que comprende
60 - un origen de replicación procariótico,
- una primera secuencia de ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección procariótico,

- una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de dicha inmunoglobulina heteróloga, y/o una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicha inmunoglobulina heteróloga,

5

de manera que se proporciona un tercer vector de transfección que comprende dicho ácido nucleico proporcionado y una secuencia adicional de un cuarto ácido nucleico que confiere resistencia a un tercer agente de selección eucariótico, de manera que dicho tercer agente de selección eucariótico es diferente de dicho primer agente de selección eucariótico y también es diferente de dicho segundo agente de selección eucariótico,

10

c) transfectar dicha célula CHO, en la que dicha transfección comprende las siguientes etapas en el siguiente orden:

15

(i) transfectar dicha célula CHO con dicho primer vector de transfección,

(ii) seleccionar una célula CHO transfectada en (i) mediante crecimiento seleccionado en un medio de cultivo que contiene un primer agente de selección eucariótico al que el primer vector de transfección confiere resistencia,

20

(iii) transfectar dicha célula CHO seleccionada en (ii) con dicho segundo vector de transfección,

(iv) seleccionar una célula CHO transfectada en (iii) mediante crecimiento seleccionado en medio de cultivo que contiene dicho primer agente de selección eucariótico al que el primer vector de transfección confiere resistencia y dicho segundo agente de selección eucariótico al que el segundo vector de transfección confiere resistencia,

25

(v) transfectar dicha célula CHO seleccionada en (iv) con dicho tercer vector de transfección,

30

(vi) seleccionar una célula CHO transfectada en (v) mediante crecimiento seleccionado en medio de cultivo que contiene dicho primer agente de selección eucariótico al que el primer vector de transfección confiere resistencia y dicho segundo agente de selección eucariótico al que el segundo vector de transfección confiere resistencia y dicho tercer agente de selección eucariótico al que el tercer vector de transfección confiere resistencia,

35

en el que el primer, segundo y tercer vector de transfección difieren cada uno solo en el ácido nucleico que confiere resistencia a dicho primero, segundo y tercer agente de selección eucariótico.

40

19. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 o célula de acuerdo con la reivindicación 18, caracterizado por que la inmunoglobulina es un anticuerpo humano, o un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo quimérico o un anticuerpo con reducción de antígenos de linfocitos T.

45

20. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 y 19 o célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 19, caracterizado por que la célula CHO es una célula CHO K1 (ATCC CCL-61 o DSM ACC 110), o una célula CHO DG44 (también conocida como CHO-DHFR[-], DSM ACC 126), o una célula CHO XL99, una célula CHO-T (véase, por ejemplo, Morgan, D., et al., *Biochemistry* 26 (1987) 2959-2963), o una célula CHO-S o una célula Super-CHO (Pak, S.C.O., et al. *Cytotechnology*. 22 (1996) 139-146).

50

21. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicación 1 a 17 y 19 a 20 o la célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, caracterizado por que la cadena pesada y la cadena ligera contienen una extensión N-terminal, que es necesaria para el transporte/secreción del polipéptido a través de la célula al medio extracelular.

55

22. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a 17 y 19 a 21, caracterizado por que el procedimiento es adecuado para la producción de una inmunoglobulina heteróloga secretada a gran escala.

60

23. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a 17 y 19 a 22, caracterizado por que el cultivo se realiza a un volumen de al menos 100 l, más preferentemente de al menos 500 l, lo más preferentemente de al menos 1000 l.

65

24. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a 17 y 19 a 23, caracterizado por que el cultivo de dicha célula CHO transfectada se realiza en presencia de dicho agente de selección eucariótico en las fermentaciones de la serie de siembra y el cultivo de dicha célula CHO transfectada se realiza en ausencia de dichos agentes de selección eucarióticos en la fermentación principal y dicha

recuperación de dicha inmunoglobulina heteróloga secretada procede del medio de cultivo sin dichos agentes de selección eucarióticos.

- 5 25. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a 17 y 19 a 24, caracterizado por que los agentes de selección eucarióticos se añaden durante la fase de crecimiento y se omiten durante la fase de producción de dicha célula CHO.
- 10 26. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a 17 y 19 a 25 o la célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, caracterizado por que la productividad específica de la célula CHO obtenida es más de $1 \mu\text{g}/10^6$ células/d, preferentemente más de $5 \mu\text{g}/10^6$ células/d, más preferentemente más de $10 \mu\text{g}/10^6$ células/d.
- 15 27. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a 17 y 19 a 26 o la célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21 y 26, caracterizado por que la inmunoglobulina heteróloga es una inmunoglobulina heteróloga secretada completamente procesada.
- 20 28. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a 17 y 19 a 27, caracterizado por que el medio utilizado en el cultivo es un medio sin suero, o un medio sin suero suplementado con componentes derivados de mamífero definidos, o medio sin componentes de origen animal, o un medio sin proteínas, un medio sin proteínas suplementado con componentes de origen animal definidos, o un medio definido químicamente, o un medio sin componentes derivados de mamíferos, o un medio sin proteínas definidas.
- 25 29. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a 17 y 19 a 28, caracterizado por que el medio es el mismo medio en todas las etapas y es un medio adecuado para la producción a gran escala de la inmunoglobulina heteróloga secretada.
- 30 30. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a 17 y 19 a 29, caracterizado por que comprende la etapa final de purificar dicha inmunoglobulina heteróloga con una o más etapas cromatográficas.
- 35 31. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 1 a 17 y 19 a 30 o la célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21 y 26 a 27 y 30, caracterizado por que el vector con el que se transfecta la célula CHO y que comprende un ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección eucariótico también comprende un ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicha inmunoglobulina heteróloga y un ácido nucleico que codifica la cadena pesada de dicha inmunoglobulina heteróloga o si el vector comprende solo un ácido nucleico que codifica bien la cadena ligera de dicha inmunoglobulina o la cadena pesada de dicha inmunoglobulina, dicha célula CHO también se transfecta por otro vector que comprende un ácido nucleico que codifica la otra cadena correspondiente de dicha inmunoglobulina.
- 40

Fig. 1

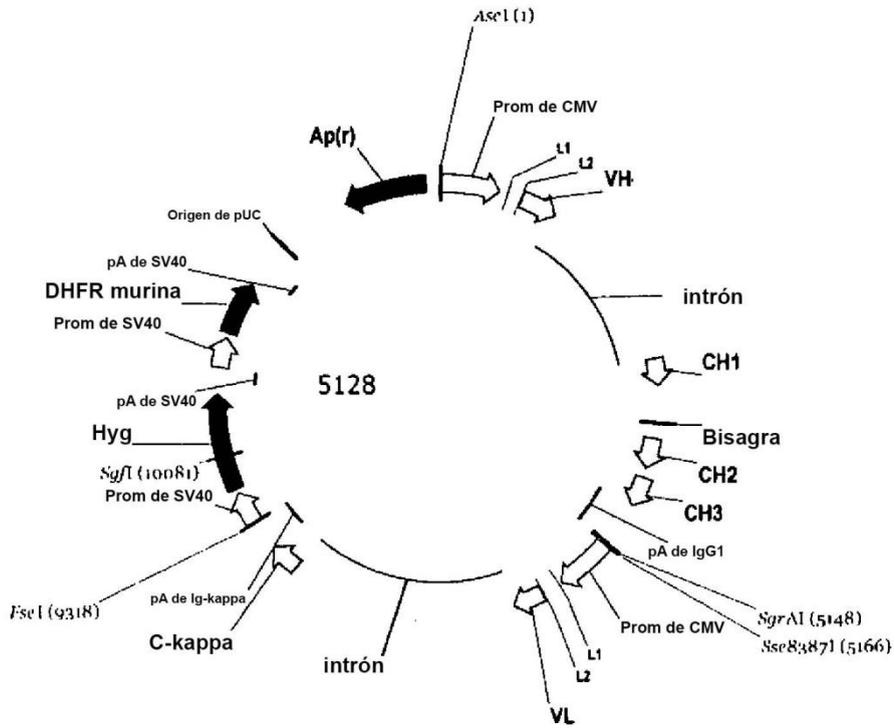


Fig. 2

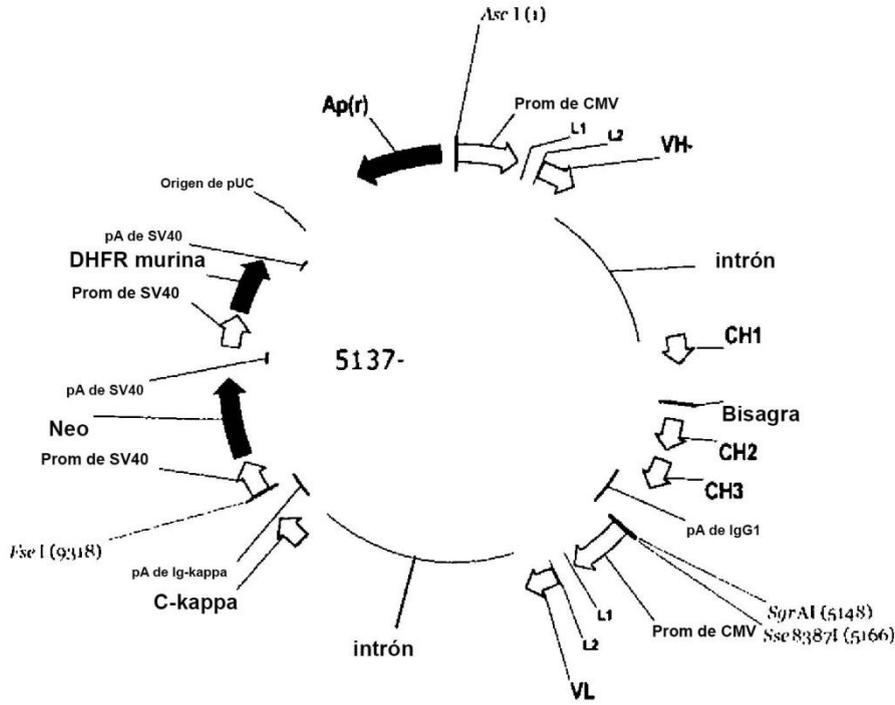


Fig. 3

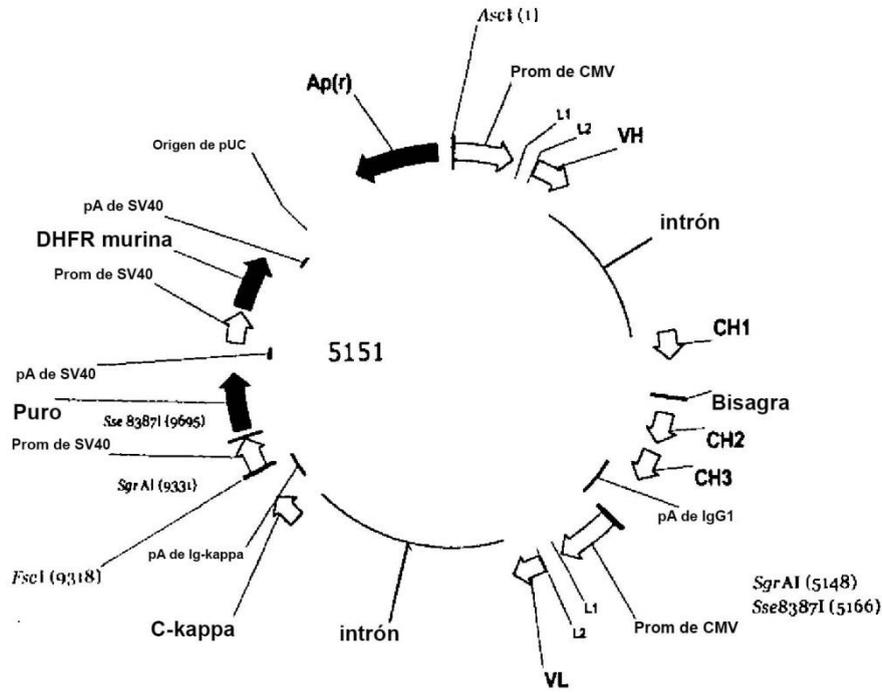


Fig. 4

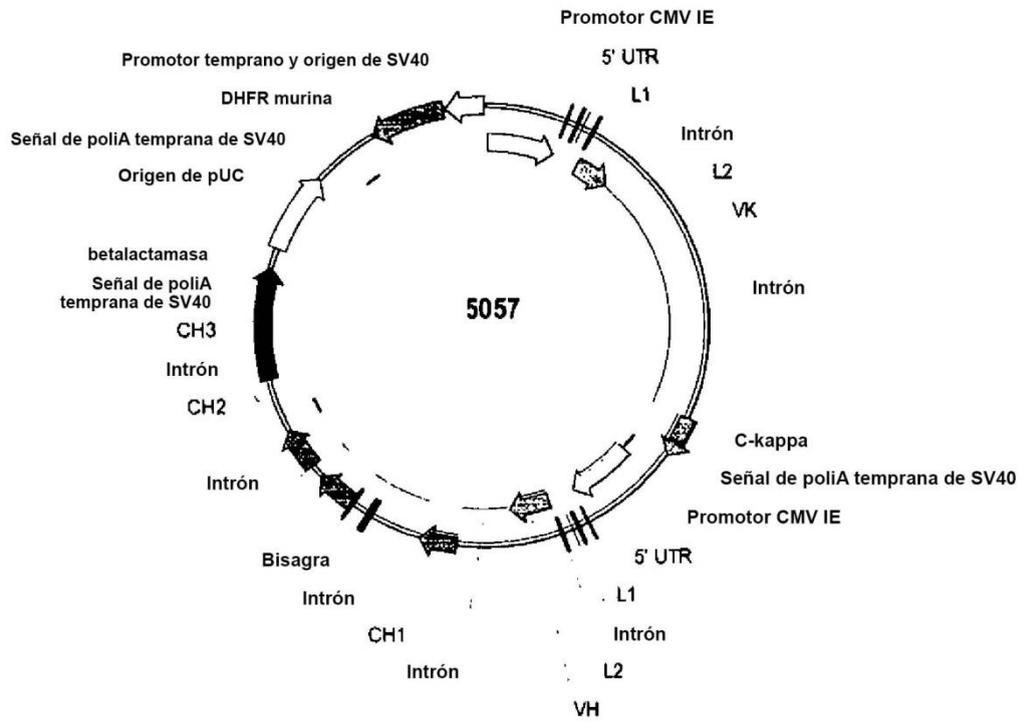


Fig. 5

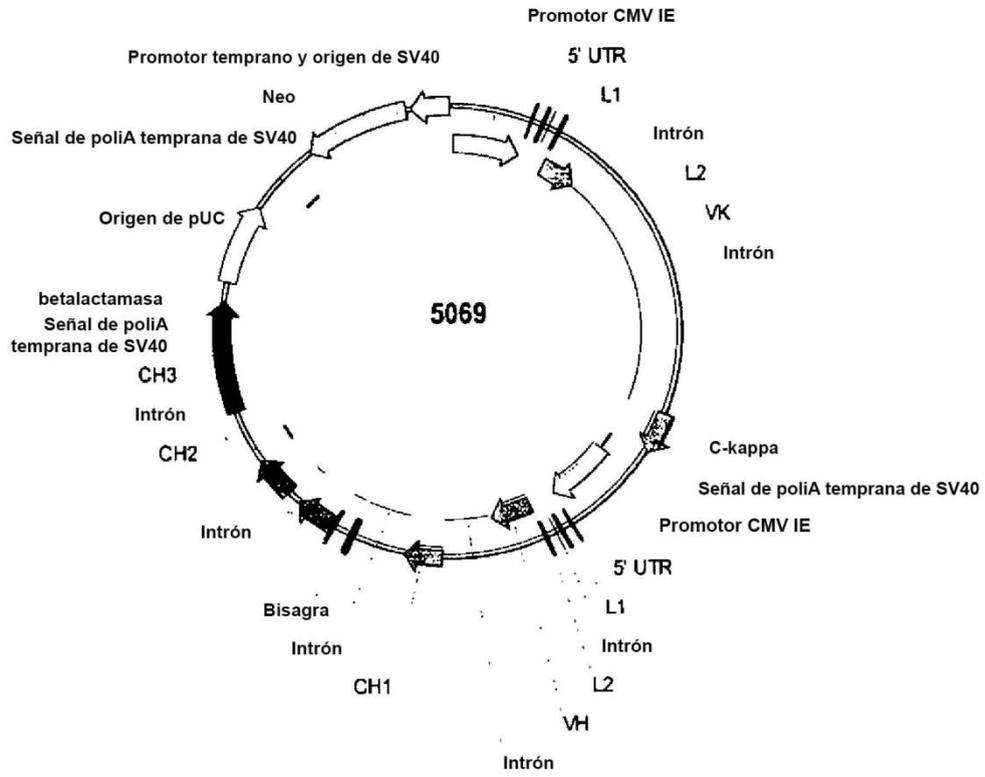
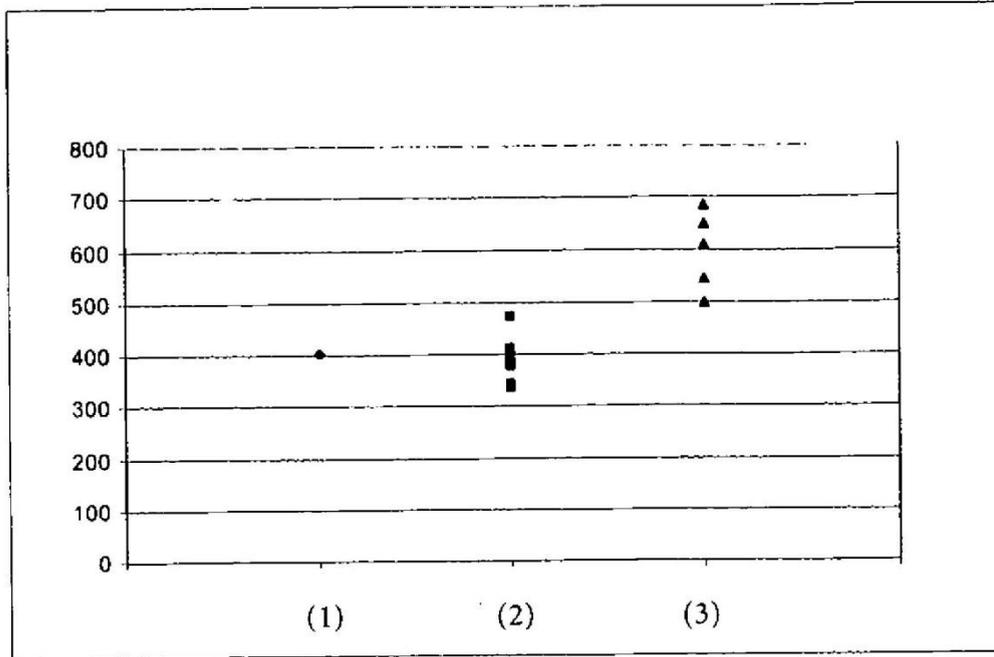


Fig. 6

(A)



(B)

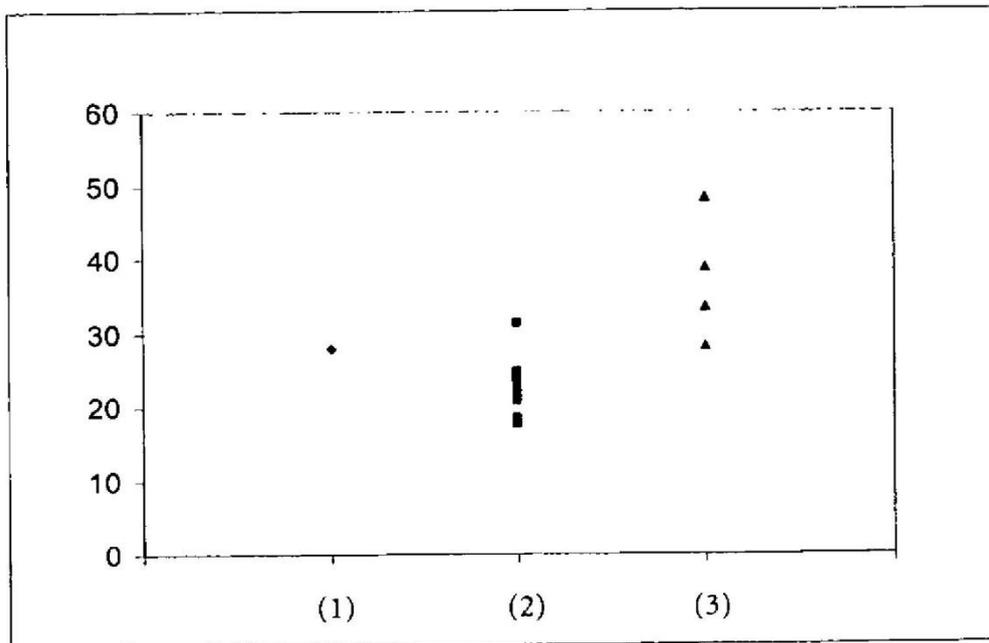


Fig. 7

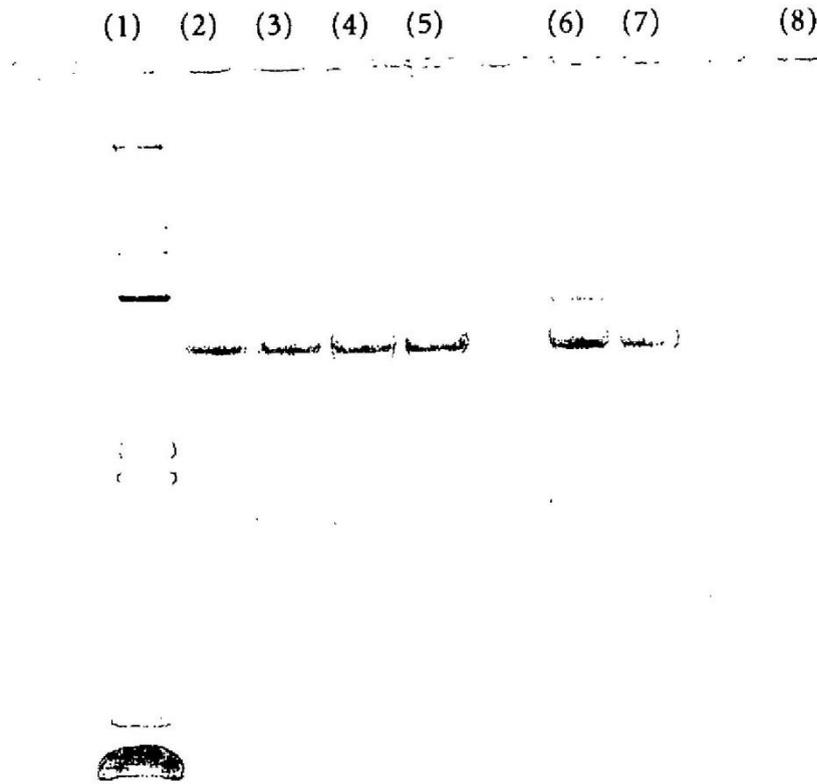


Fig. 8

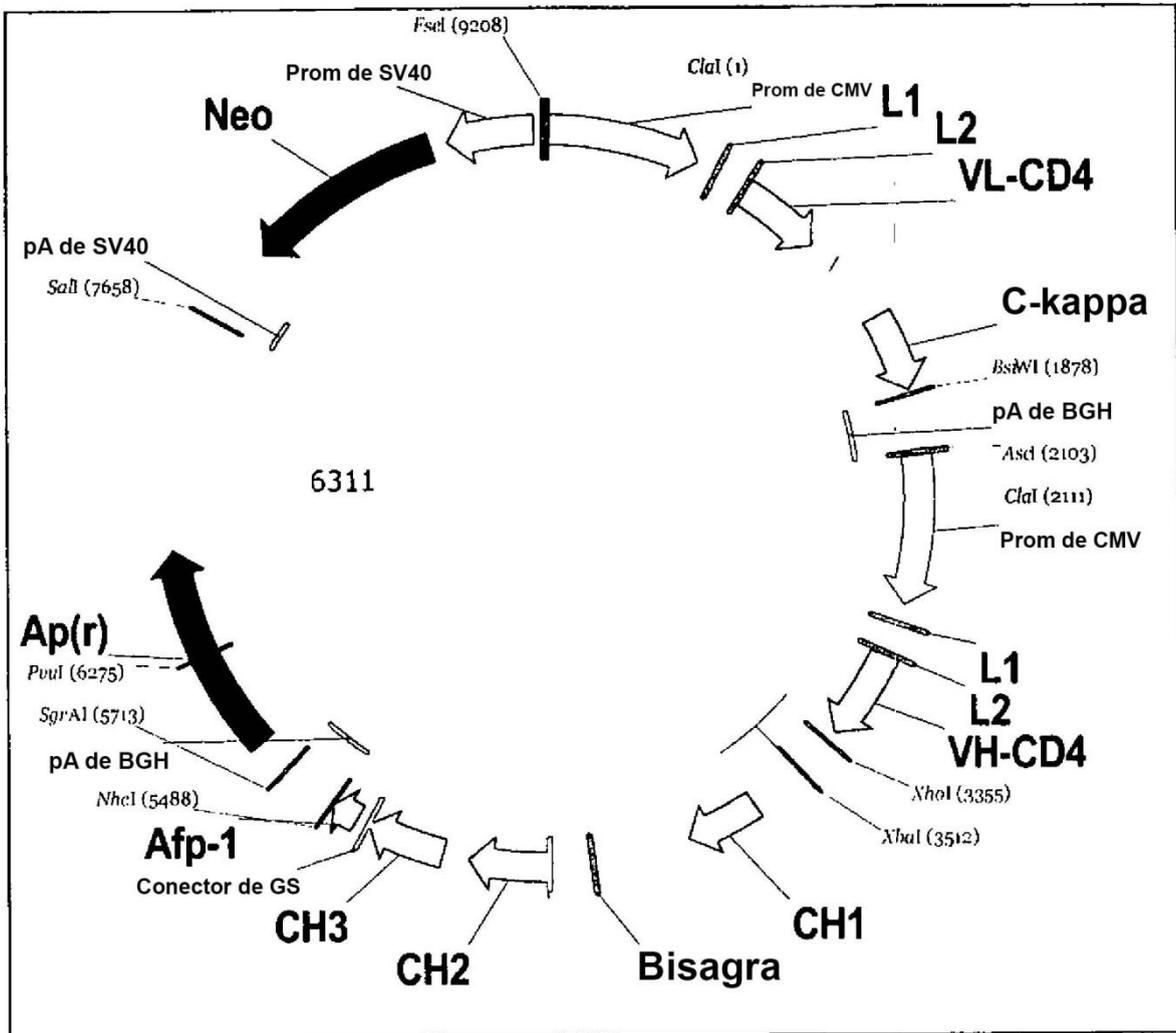


Fig. 9

