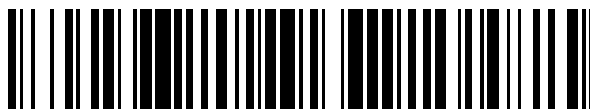


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 718**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2010** **PCT/EP2010/063583**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2011** **WO11033005**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2010** **E 10771684 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018** **EP 2478107**

54 Título: **Células para expresión transitoria y usos de las mismas**

30 Prioridad:

15.09.2009 US 242478 P

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

12.02.2019

73 Titular/es:

MEDLMMUNE LIMITED (100.0%)
Milstein Building Granta Park
Cambridge, Cambridgeshire CB21 6GH, GB

72 Inventor/es:

DARAMOLA, OLALEKAN;
DEAN, GREGORY;
HATTON, DIANE y
STEVENSON, JESSICA

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 699 718 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

Células para expresión transitoria y usos de las mismas

La presente invención se refiere a una línea celular de expresión mejorada, un método para obtener dicha línea celular, un método para producir polipéptidos exógenos a partir de dicha línea celular y un kit relacionado con la misma. Tales líneas celulares son particularmente adecuadas para la expresión transitoria de polipéptidos exógenos.

Los sistemas de expresión de proteínas que comprenden la introducción de ADN foráneo en células huésped eucariotas son el pilar de la biotecnología que proporciona cantidades de polipéptidos heterólogos para muchos propósitos, tales como proteínas para investigación y proteínas para uso terapéutico. Los protocolos de transfección se pueden categorizar como diseñados para producir una expresión "transitoria" o "estable" del gen foráneo. La línea de demarcación entre estos dos tipos de resultados es la integración del ADN introducido en el genoma del huésped, y las células en las que se ha integrado el ADN foráneo generalmente se denominan "transformadas de forma estable". En contraste con la transformación estable, la expresión transitoria del ADN transfectado no depende de la integración del ADN foráneo en los cromosomas de la célula huésped. La expresión transitoria es el método de elección cuando se analiza un gran número de muestras en un corto período de tiempo; típicamente, las células pueden recogerse tan pronto como 1 a 4 días después de la transfección y los sobrenadantes o lisados resultantes se analizan para determinar la expresión del gen objetivo. Dado que la transfección transitoria es una técnica clave para la experimentación biotecnológica, existe la necesidad continua de mejorar la tecnología de transfección transitoria para proporcionar mayores rendimientos de polipéptidos heterólogos.

El virus de Epstein Barr (EBV) es un miembro de la familia del herpesvirus. En células transformadas de linfocitos B de primate, el genoma del EBV de aproximadamente 170 pares de kilobases se mantiene de manera extracromosómica. El mantenimiento del genoma extracromosómico (episomal) está mediado por la interacción entre la proteína del antígeno nuclear del EBV-1 (EBNA-1) y el origen de replicación del EBV (*oriP*) [1, 2]. *OriP* consiste de dos elementos que se requieren para la replicación del plásmido episomal, una familia de repeticiones y un elemento de simetría por parejas de 65 pb [3]. Cada uno de estos elementos contiene varios sitios de unión para la proteína EBNA-1 [4]. En 1984, Yates et al. identificaron una región en el genoma viral del EBV que permite que los plásmidos recombinantes que la transportan se mantengan episomalmente en células infectadas de manera latente con el EBV; designaron esta región, *oriP* para el origen de replicación del plásmido [1]. Dado que *oriP* solo mejora la estabilidad de los plásmidos en células que expresan el genoma del EBV, sugirieron que debe haber un segundo elemento que actúa en forma trans dentro del genoma del EBV que interactúa con el *oriP*. En 1985, el mismo grupo identificó la región que actúa en forma trans, y la mapeó hasta la parte del genoma que codifica EBNA-1 [2]. Los plásmidos que contienen tanto *oriP* como el gen de EBNA-1 se replicarán de forma autónoma en una variedad de células cultivadas, que originalmente se pensaba que incluían líneas celulares de primate, pero no líneas celulares de roedor [2].

Además de permitir la replicación episomal, Saekiet et al. (1998) mostraron que los plásmidos que contenían la EBNA-1, las secuencias de *oriP* y un gen de interés tenían un tiempo de retención más largo en el núcleo de células de roedor en comparación con los plásmidos sin las secuencias del EBV. Además, la actividad transgénica de los plásmidos derivados del EBV fue mayor que la de los plásmidos sin las secuencias del EBV, lo que sugiere que las secuencias del EBV también pueden tener una función mejoradora de la expresión transgénica. Los plásmidos del EBV mostraron una mayor retención nuclear y actividad transgénica en células de roedores, pero no mostraron replicación episomal. Por el contrario, la replicación, así como la mejora del transgén, se observaron en células 293 (HEK293) de riñón embrionario humano [5].

Cachianes et al., 1993 [6], demostraron que tanto el EBNA-1 como los elementos de *oriP* deben estar presentes para un aumento en la actividad transgénica, lo que fue confirmado en 1998 por Längle-Rouault et al. [7]. En ambos casos, los grupos utilizaron células huésped humanas que expresan de manera estable EBNA-1. La expresión transgénica después de la transfección transitoria aumentó cuando el plásmido de expresión contenía *oriP*. En contraste, las líneas celulares negativas para EBNA-1 mostraron una actividad de expresión transgénica similar en presencia y ausencia de *oriP*, lo que demuestra que ambos componentes del sistema deben estar presentes para que ocurra el mejoramiento de la expresión. Además, encontraron que el *oriP* necesita ser transportado en el mismo vector que el gen de interés para un aumento de la actividad transgénica [6, 7].

Además, Cachianes et al. [6] mostraron que los plásmidos que contienen *oriP* y un marcador seleccionable pueden mantenerse episomalmente durante largos períodos (hasta 6 meses) cuando se transfectaron en una célula huésped que expresaba constitutivamente EBNA-1 y se mantuvo bajo selección. Los transgenes codificados en los vectores que contienen el *oriP* se produjeron de forma continua, siempre que el episoma permaneciera en la célula huésped bajo selección; esto se postuló como una alternativa a los vectores integrados de forma estable para la producción de proteínas a largo plazo [6, 7].

Tomiyasu et al. [8] investigaron la interacción entre EBNA-1 y *oriP* en un panel de células de roedor. Como se observó en las células humanas utilizadas por Cachianes et al. [6] y Längle-Rouault et al. [7], encontraron que las células de roedor transfectadas con el *oriP* y EBNA-1 mostraron niveles más altos de expresión transgénica que las

transfectadas sin los componentes derivados del EBV. La expresión transgénica disminuyó más rápidamente en células de roedor que en células de primate, lo que sugiere que los plásmidos derivados del EBV no se replicaban en las células de roedor. Se sugirió que el aumento en la expresión se debía a la localización nuclear y retención del plásmido, y a la sobreexpresión transcripcional, mediada por la interacción EBNA-1/*oriP*.

5 Aunque el trabajo inicial de Yates et al. [1, 2] mostró que las células de roedor no eran permisivas para la replicación autosómica de plásmidos derivados del EBV, en 1993 se mostró que los vectores derivados del EBV se replicarían en algunas células de roedor si se añadían grandes fragmentos (> 10 kpb) de ADN de mamífero a los vectores [9]. Sin embargo, en 2000, Mizuguchi et al. [10] utilizó estudios de transfección y análisis de transferencia Southern para
10 mostrar que en algunas células de roedores no era necesaria la adición de grandes fragmentos de ADN de mamífero para la replicación de plásmidos derivados del EBV. Las células CHO estaban entre las analizadas; sin embargo, se encontró que en las células CHO la coexpresión de EBNA-1 y *oriP* no dio como resultado la replicación episomal, aunque hubo un aumento de la actividad transgénica.

El uso de células HEK293 transfectadas de manera estable con el gen de EBNA-1 (células HEK293-EBNA), en combinación con vectores que contienen *oriP*, para la expresión génica transitoria se informa ampliamente [11, 12, 13, 14, 15] y en años recientes, se ha informado más ampliamente el uso de células de ovario de hámster chino (CHO) para la expresión génica transitoria.
15

Sin embargo, la expresión transitoria de las células CHO ha sido generalmente menos productiva que la observada en las células HEK293-EBNA [13]. Los primeros trabajos informaron de una productividad de 8 mg/L a 22 mg/L de IgG [16, 17] utilizando un método de transfección PEI en células CHO DG44 con vectores que contienen tanto los genes de EBNA-1 como de *oriP* [17].
20

Recientemente, Liu et al. encontraron que el uso de reactivos de transfección patentados puede proporcionar rendimientos equivalentes altos (50-80 mg/L) tanto en células HEK 293 como en células CHO [18].

En 2005, Kunaparaju et al. describieron el desarrollo de un sistema de expresión transitoria optimizado para células CHO que se basaba en la replicación episomal y la retención de ADN plasmídico transfectado [19]. El llamado sistema *Epi-CHO* consiste en células CHO-T, que expresan de forma constitutiva el antígeno T grande (LT) del poliomavirus (Py), y un vector de expresión que contiene *oriP* y EBNA-1, así como el origen de replicación de Py. Los elementos PyOri y PyLT estaban presentes para impulsar la replicación autónoma del plásmido, mientras que los elementos del EBV estaban presentes por su retención nuclear y efectos mejoradores transcripcionales.
25

El documento WO 2002/027005 (Bayer) informó un sistema de transfección mejorado que comprende un sistema de mantenimiento episomal, un promotor/mejorador fuerte, un sistema de transactivación de proteínas y un ADN que codifica una proteína heteróloga. Las líneas celulares preferidas no eran de roedores porque no se cree que el plásmido que contiene un *oriP* se replique de manera eficiente y las células CHO carecen de factores celulares para el sistema de transactivación.
30

El documento WO2006/060769 (Xoma Technologies) presenta vectores de expresión recombinantes que comprenden un 3'UTR de una cadena ligera de inmunoglobulina y un origen de replicación del EBV. Otros ejemplos son los métodos para producir una proteína recombinante que involucra el uso de dos vectores, donde cada vector codifica un gen de polipéptido diferente y donde el segundo vector debe estar presente en una cantidad de 1,5 a 2,5 veces más que el primer vector, para maximizar el rendimiento del producto.
35

El documento WO 2007/048601 (Roche) describió un método para usar una célula de roedor transformada de manera estable para expresar la proteína EBNA-1, luego dicha célula se transfectó con un episoma que comprende un promotor, *oriP*, una 5'UTR, la secuencia de codificación para un gen de interés, una 3'UTR y una secuencia de poliadenilación y un marcador seleccionable.
40

La glutamina sintetasa (GS; EC 6.3.1.2, también conocida como γ -glutamyl:amoniaco ligasa) desempeña un papel esencial en el metabolismo del nitrógeno al catalizar la condensación dependiente de ATP de glutamato y amoníaco para formar glutamina. Algunas líneas celulares (como NS0) no producen GS y, por lo tanto, tienen una necesidad absoluta de glutamina y no crecen en un medio libre de glutamina. Para estas células, el gen de GS se puede utilizar como un marcador seleccionable. Para líneas celulares tales como CHO que producen GS endógena, la glutamina sintetasa aún puede usarse como un marcador seleccionable, pero es necesario usar un inhibidor específico de GS (por ejemplo, metionina sulfoximina (MSX)) para inhibir la enzima endógena. En 1992, Birch et al. describió el uso del gen de GS en células auxotróficas de glutamina para el desarrollo de líneas celulares estables de alta productividad [20].
45
50

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un sistema mejorado de expresión transitoria.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) de expresión mejorada derivada de una línea celular parental, la línea celular de expresión mejorada que comprende ácido nucleico que codifica el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr o un derivado, análogo o variante funcional del mismo; y que además comprende:
55

(a) un ácido nucleico que codifica una glutamina sintetasa exógena;

(b) un ácido nucleico que codifica una glutamina sintetasa endógena, en el que la glutamina sintetasa endógena se dispone para tener una actividad enzimática mejorada y/o una expresión mejorada en relación con la línea celular parental en condiciones comparables; o

5 (c) tanto (a) como (b)

en donde el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1) y la glutamina sintetasa (GS) exógena se transfectan establemente en la línea celular.

10 Sorprendentemente, los inventores han encontrado que una línea celular que expresa EBNA-1 junto con glutamina sintetasa, en lo sucesivo denominada línea celular o células "de expresión mejorada", es capaz de una expresión génica más alta en un sistema de expresión transitoria que una línea celular que tiene EBNA-1 o glutamina sintetasa sola. Estas células de expresión mejorada son capaces de proporcionar un sistema de expresión transitoria que es robusto y escalable, produciendo regularmente más de 100 mg/L de polipéptido heterólogo en todas las escalas, desde matraces de agitación de 30 mL a biorreactores de un solo uso de 250 L.

15 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una línea celular CHO de expresión mejorada transfectada de manera estable con el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1) y que comprende una glutamina sintetasa sobrerregulada (GS).

La línea celular puede comprender un ácido nucleico que codifica tanto una glutamina sintetasa endógena como una glutamina sintetasa exógena.

20 El ácido nucleico que codifica la glutamina sintetasa está unido operativamente a un promotor y, opcionalmente, a un mejorador. El promotor puede ser un promotor de SV40. En una realización, la línea celular de expresión mejorada es capaz de expresar la glutamina sintetasa en una cantidad suficiente para permitir el crecimiento de la célula en un medio libre de glutamina, y opcionalmente suplementado adicionalmente con MSX a una concentración de al menos 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 2 µM, 3 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM, 200 µM, 1 mM o 3 mM.

25 En una realización, la línea celular CHO de expresión mejorada no tiene actividad enzimática de glutamina sintetasa endógena, o no tiene actividad enzimática de glutamina sintetasa endógena detectable. En una realización alternativa, la línea celular de expresión mejorada tiene una actividad enzimática detectable de glutamina sintetasa endógena detectable.

30 El ácido nucleico que codifica la glutamina sintetasa puede ser cromosómico. En una realización alternativa, el ácido nucleico que codifica la glutamina sintetasa es episomal. El ácido nucleico que codifica EBNA-1 puede ser cromosómico. El ácido nucleico que codifica EBNA-1 puede ser episomal.

La provisión de glutamina sintetasa codificada cromosómicamente y/o EBNA-1 proporciona ventajosamente una línea celular que tiene ácido nucleico integrado de forma estable que codifica glutamina sintetasa y/o EBNA-1. Esto puede ayudar a superar las dificultades asociadas con el mantenimiento del ácido nucleico episomal en líneas celulares.

35 En una realización, el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1) y la glutamina sintetasa (GS) se transfectan de manera estable en la línea celular de expresión mejorada. El antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1) y/o la glutamina sintetasa (GS) pueden expresarse de forma constitutiva en la línea celular de expresión mejorada.

40 En otra realización, la línea celular de expresión mejorada tiene glutamina sintetasa endógena (GS) mejorada y se transfecta de manera estable con el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1).

La línea celular de expresión mejorada puede comprender además un ácido nucleico que codifica un polipéptido exógeno (también conocido como un polipéptido heterólogo). El ácido nucleico que codifica el polipéptido exógeno puede ser localizado en relación con el ácido nucleico que codifica EBNA-1 y/o el ácido nucleico que codifica GS.

45 El ácido nucleico que codifica el polipéptido exógeno puede codificar adicionalmente una secuencia de unión a EBNA-1. En una realización, la secuencia de unión de EBNA-1 es un origen de replicación del EBV (*oriP*), o variante funcional de la misma. Una variante funcional de *oriP* puede comprender una secuencia de *oriP* que tiene más o menos secuencias normales de 20 repeticiones en la familia de repeticiones (FR). Una variante funcional de *oriP* puede comprender una secuencia de *oriP* que tiene una familia dividida de repeticiones (FR). Por ejemplo, las secuencias repetidas de la familia de repeticiones se pueden espaciar en varios grupos distintos en la secuencia de ácido nucleico. Dichas variantes de *oriP* se identifican en Aiyar et al. (2009) [28].

50 El polipéptido exógeno puede comprender una cadena pesada de anticuerpo y/o una cadena ligera de anticuerpo, un dominio V_H o V_L, o un fragmento del mismo. El polipéptido exógeno puede ser un profármaco, enzima, fragmento enzimático, inhibidor enzimático, activador enzimático, polipéptido biológicamente activo, proteína de erizo, proteína morfogenética ósea, factor de crecimiento, eritropoyetina, trombopoyetina, G-CSF, interleuquina, interferón,

inmunoglobulina, tal como Fab , Fv, scFv, fragmento de inmunoglobulina DAb, o combinaciones de los mismos. En una realización, el polipéptido exógeno es una inmunoglobulina o un fragmento de inmunoglobulina.

5 El ácido nucleico que codifica el polipéptido exógeno puede ser episomal. El ácido nucleico que codifica el polipéptido exógeno puede ser un plásmido o ácido nucleico viral. Se pueden proporcionar uno o más marcadores de selección en el ácido nucleico que codifica el polipéptido exógeno. En una realización, el marcador de selección para el ácido nucleico que codifica el polipéptido exógeno no es un ácido nucleico que codifica una glutamina sintetasa.

10 El ácido nucleico que codifica el polipéptido exógeno puede comprender una región no traducida (UTR) 3' que comprende una señal de poliadenilación. El ácido nucleico que codifica el polipéptido exógeno puede comprender una región 5' que comprende un promotor.

En el presente documento se describe una línea celular CHO de expresión mejorada que expresa EBNA-1 y que tiene una GS sobreexpresada, caracterizada porque dicha línea celular contiene un episoma, en el que dicho episoma comprende:

(a) un marcador de selección;

15 (b) un origen de replicación del virus de Epstein-Barr (EBV) (oriP); y

(c) un casete de expresión adecuado para la expresión de un polipéptido exógeno en dicha célula, en el que dicho casete de expresión comprende una secuencia promotora, una región no traducida 5', una secuencia de ácido nucleico que codifica dicho polipéptido exógeno y una región no traducida 3' que comprende una señal de poliadenilación.

20 La invención también proporciona un método para obtener una línea celular CHO de expresión mejorada a partir de una línea celular parental, que comprende:

(a) proporcionar una línea celular parental; y

(b) transfectar de manera estable la línea celular parental con ácido nucleico que codifica el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr, o un derivado, análogo o variante del mismo; y

25 (c) Transfectar de manera estable la línea celular parental con ácido nucleico exógeno que codifica una glutamina sintetasa; y

(d) adaptar opcionalmente la línea celular para mejorar la expresión y/o actividad enzimática de una glutamina sintetasa endógena.

30 En el presente documento también se describe un método para obtener una línea celular CHO de la invención de expresión mejorada que comprende:

(a) proporcionar una línea celular parental; y

(b) transfectar dicha línea celular con el gen de EBNA-1 y el gen de GS,

para producir una célula que expresa EBNA-1 y GS; y opcionalmente transfectar dicha línea celular que expresa EBNA-1 y GS con un gen que codifica un polipéptido exógeno.

35 En el presente documento también se describe un método para obtener una línea celular de expresión mejorada de la invención que comprende:

(a) proporcionar una línea celular parental;

(b) transfectar dicha línea celular parental con el gen de EBNA-1, y

40 (c) tratar la línea celular transfectada con el gen de EBNA-1 obtenido en (b) para aumentar la expresión y/o la actividad enzimática de GS;

para producir una línea celular transfectada con EBNA-1 y que comprende una GS sobreexpresada.

Para evitar dudas, estaría claro para el experto que los genes de EBNA-1 y GS podrían transfectarse en la célula en reacciones de transfección secuenciales en cualquier orden o en la misma reacción de transfección.

45 El ácido nucleico que codifica el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr y el ácido nucleico que codifica una glutamina sintetasa pueden transfectarse en una célula en el mismo ácido nucleico. El ácido nucleico que codifica el antígeno nuclear 1 del Virus de Epstein-Barr y el ácido nucleico que codifica una glutamina sintetasa pueden transfectarse en ácidos nucleicos separados.

En el presente documento también se describe un método para obtener una línea celular de expresión mejorada de la invención que comprende:

- (a) proporcionar una línea celular parental;
- (b) transfectar dicha línea celular parental con ácido nucleico que comprende un gen de EBNA-1, y

5 (c) tratar la línea celular para aumentar la expresión y/o la actividad enzimática de GS;

para producir una línea celular transfectada con EBNA-1 y que comprende una GS sobreexpresada; y opcionalmente transfectar dichas células que expresan EBNA-1 y GS con un ácido nucleico que comprende un gen que codifica un polipéptido exógeno.

10 El experto en la materia estaría familiarizado con los métodos para aumentar/mejorar la expresión y/o la actividad enzimática de la glutamina sintetasa endógena, por ejemplo, la expresión de GS puede aumentarse/mejorarse mediante un método seleccionado del cultivo de las células en ausencia de glutamina o en un nivel bajo de glutamina, y opcionalmente seleccionar células cultivables en presencia de concentraciones crecientes de MSX; mutar el promotor de GS; añadir un promotor más fuerte en relación con un promotor de GS endógena; mutar el mejorador de GS endógeno; añadir un mejorador; añadir un mejorador más fuerte en relación con un mejorador de GS endógena; y proporcionar copias adicionales de la GS endógena; o por una combinación de tales métodos.

En el presente documento también se describe un método para obtener una línea celular de expresión mejorada de la invención que comprende:

- (a) proporcionar una célula parental;
- (b) proporcionar un primer plásmido que comprende:

20 i. origen procariota de la replicación;

ii. un marcador de selección; y

iii. un casete de expresión funcional para EBNA-1, por lo que dicho casete de expresión comprende una secuencia promotora, una región no traducida 5', un ácido nucleico que codifica EBNA-1 y una secuencia no traducida 3' que comprende una señal de poliadenilación;

25 (c) proporcionar un segundo plásmido que comprende:

- i. un origen procariota de replicación;
- ii. un marcador de selección; y
- iii. un casete de expresión funcional para GS, por lo que dicho casete de expresión comprende una secuencia promotora, una región no traducida 5' , un ácido nucleico que codifica GS y una secuencia no traducida 3' que comprende una señal de poliadenilación;

30 (d) introducir dichos primer y segundo plásmidos en dicha célula y seleccionar una célula transfectada con EBNA-1 y GS.

y opcionalmente

(e) proporcionar un tercer plásmido que comprende

35 i. un origen procariota de replicación;

ii. un marcador de selección; y

iii. un casete de expresión funcional para un polipéptido exógeno, mediante el cual dicho casete de expresión comprende una secuencia promotora, una región no traducida 5' , un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido exógeno y una secuencia no traducida 3' que comprende una señal de poliadenilación; y

40 (f) introducir dicho tercer plásmido en dicha célula transfectada con EBNA-1 y GS y seleccionar una célula transformada que exprese dicho polipéptido exógeno.

En el presente documento también se describe un método para obtener una línea celular de expresión mejorada de la invención que comprende:

(a) proporcionar una célula parental;

45 (b) proporcionar un primer plásmido que comprende:

i. un origen procariota de replicación;

ii. un marcador de selección; y

iii. un casete de expresión funcional para EBNA-1, por lo que dicho casete de expresión comprende una secuencia promotora, una región no traducida 5', un ácido nucleico que codifica EBNA-1 y una secuencia no traducida 3' que comprende una señal de poliadenilación; y

iv. un casete de expresión funcional para GS, por lo que dicho casete de expresión comprende una secuencia promotora, una región no traducida 5', un ácido nucleico que codifica GS y una secuencia no traducida 3' que comprende una señal de poliadenilación; y

(c) introducir dicho primer plásmido en dicha célula y seleccionar una célula transfectada con EBNA-1 y GS;

y opcionalmente

(d) proporcionar un segundo plásmido que comprende

i. un origen procariota de replicación;

ii. un marcador de selección; y

iii. un casete de expresión funcional para un polipéptido exógeno, en el que dicho casete de expresión comprende una secuencia promotora, una región no traducida 5', un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido exógeno y una secuencia no traducida 3' que comprende una señal de poliadenilación; y

(e) introducir dicho segundo plásmido en las células transfectadas con EBNA-1 y GS obtenidas en (c) y seleccionar una célula transfectada que exprese dicho polipéptido exógeno.

El experto en la técnica estaría familiarizado con varias técnicas para transfectar de forma estable o transitoria una línea celular parental con el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1) y la glutamina sintetasa (GS). En una realización, una línea celular parental se cotransfecta con un vector de expresión que codifica el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1) y un vector de expresión que codifica la glutamina sintetasa (GS). En otra realización, una línea celular parental se transfecta secuencialmente, en cualquier orden, con un vector de expresión que comprende el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1) y un vector de expresión que codifica la glutamina sintetasa (GS). En una realización, el vector de expresión que codifica la glutamina sintetasa no comprende ácido nucleico que codifica un polipéptido destinado a la expresión y purificación. En otra realización, se transfecta una línea celular parental con un vector de expresión que comprende tanto el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1) como la glutamina sintetasa (GS), en donde el vector de expresión no comprende el ácido nucleico que codifica un polipéptido exógeno destinado a la expresión y purificación. El polipéptido exógeno destinado a la expresión y purificación puede seleccionarse de una cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina, un dominio V_H o V_L o un fragmento de los mismos, profármacos, inhibidores de enzimas, activadores de enzimas, proteínas de erizo, proteínas morfogenéticas óseas, factores de crecimiento, eritropoyetina, trombopoyetina, G-CSF, interleuquinas, interferones, inmunoglobulina y fragmentos de inmunoglobulina, tales como Fab, Fv, scFv y DAb, o combinaciones de los mismos. En otra realización, el polipéptido exógeno destinado a la expresión y purificación comprende una enzima o fragmento de la misma, en la que la enzima no es glutamina sintetasa.

Pueden elegirse o construirse vectores de expresión adecuados, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, que incluyen secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias mejoradoras, genes marcadores y otras secuencias. Los vectores pueden ser plásmidos, por ejemplo, fagémidos o virales, por ejemplo, fago, según corresponda [21]. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica y análisis de proteínas, se describen en detalle en Ausubel et al. [22].

Hay una serie de vectores de expresión disponibles para el experto, tales como vectores episomales, vectores no episomales, vectores con casetes de expresión inducibles o constitutivos, vectores monocistrónicos o multicistrónicos.

El método puede comprender introducir ácido nucleico, tal como un vector, en una línea celular. La introducción del ácido nucleico puede emplear cualquier técnica adecuada. Para las células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir la transfección con fosfato de calcio, DEAE-Dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas, polímeros catiónicos (por ejemplo, polilisina y polietilenimina) y la transducción utilizando retrovirus u otro virus, por ejemplo, vacuna o, para células de insectos, baculovirus. La introducción de ácido nucleico en la célula huésped, en particular una célula eucariota puede usar un sistema viral o basado en plásmidos. La introducción puede ser seguida causando o permitiendo la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, cultivando células huésped

en condiciones para la expresión del gen. La purificación del producto expresado se puede lograr mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Hay una serie de trabajos de referencia a los que el experto puede referirse para técnicas de transfección. Éstos incluyen:

- 5 . (i) J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press;
- (ii) Ausubel, F.M., ed., Current Protocols in Molecular Biology, Volúmenes I a III (1997);
- (iii) Glover, N.D. y Hames, B.D., ed., DNA Cloning: A Practical Approach, Volúmenes I y II (1995), Oxford University Press;
- 10 (iv) Freshney, R.I. (ed.), Animal Cell Culture - a practical approach, IRL Press (1986);
- (v) Watson, J.D., et al., Recombinant DNA, Segunda edición, CHSL Press (1992);
- (vi) Winnacker, E.L., From Genes to Clones; N.Y., VCH Publishers (1987);
- (vii) Celis, J., ed., Cell Biology, segunda edición, Academic Press (1998);
- 15 (viii) Freshney, R.I., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques, Segunda edición, Alan R. Liss, Inc., N.Y. (1987);
- (ix) B. Roe, J. Crabtree y A. Kahn, 1996, DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques, John Wiley & Sons;
- (x) J. M. Polak y James O'D. McGee, 1990, In Situ Hybridization: Principles and Practice; Oxford University Press;
- (xi) M. J. Gait (Editor), 1984, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, Irl Press.

20 La presente invención proporciona además un sistema de expresión de polipéptidos para la producción de polipéptidos exógenos usando las líneas celulares mejoradas de la expresión de la invención. El sistema de expresión es adecuado para la producción, por ejemplo, de profármacos, enzimas, fragmentos enzimáticos, inhibidores enzimáticos, activadores enzimáticos, polipéptidos biológicamente activos, proteínas de erizo, proteínas morfogénicas óseas, factores de crecimiento, eritropoyetina, trombopoyetina, G-CSF, interleuquinas, interferones, inmunoglobulinas, cadenas pesadas y/o ligeras de inmunoglobulina, dominio V_H y/o V_L , o fragmentos de los mismos, o fragmentos de inmunoglobulina como Fab, Fv, scFv y DAb. En una realización, dicho polipéptido exógeno es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

En el presente documento también se describe un polipéptido exógeno producido usando un sistema de expresión de la invención. En una realización, el polipéptido exógeno se formula con un excipiente farmacéuticamente aceptable como una composición farmacéutica.

30 En el presente documento también se describe un sistema de expresión de proteínas que comprende una línea celular de expresión mejorada transfectada de manera estable con y que expresa constitutivamente EBNA-1 y GS, transfectada con un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido exógeno. En otra realización de la invención, se proporciona una línea celular CHO de expresión mejorada transfectada de manera estable y que expresa de forma constitutiva EBNA-1 y GS con un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido exógeno. El polipéptido exógeno se selecciona entre una inmunoglobulina, una cadena pesada de anticuerpo y/o una cadena ligera de anticuerpo, un dominio V_H y/o un dominio V_L , o un fragmento de los mismos. En otras realizaciones de la invención, se proporcionan líneas celulares de expresión mejorada establemente transfectadas con y que expresan constitutivamente EBNA-1 y GS transfectados con un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada de anticuerpo y/o una cadena ligera de anticuerpo, un dominio V_H y/o un dominio V_L , o un fragmento del mismo. La cadena pesada de anticuerpo y las cadenas ligeras de anticuerpo pueden estar presentes en un vector o la cadena pesada de anticuerpo en un vector de expresión y la cadena ligera de anticuerpo en un vector de expresión diferente. El dominio V_H puede estar presente en un vector de expresión y el dominio V_L en otro vector de expresión.

45 También se describe en el presente documento que se proporciona un sistema de expresión de polipéptidos que comprende:

- a) una línea celular de expresión mejorada que expresa constitutivamente EBNA-1 y GS; y
- b) un vector de expresión que comprende un origen de replicación EBV (*oriP*) y un gen que codifica un polipéptido exógeno.

En el presente documento también se describe un método para expresar un polipéptido exógeno a partir de una línea celular, en el que el método comprende:

- a) proporcionar una línea celular de expresión mejorada de la invención;
- b) transfectar la línea celular con un vector de expresión que comprende un origen de replicación de EBV (*oriP*) y un gen que codifica el polipéptido exógeno para formar una célula huésped transfectada transitoriamente; y
- c) cultivar la célula transfectada transitoriamente en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido exógeno, por lo que se expresa el polipéptido.

En el presente documento también se describe un método para producir un polipéptido exógeno a partir de una línea celular de expresión mejorada de acuerdo con la invención, que comprende:

- a) proporcionar una línea celular de expresión mejorada de acuerdo con la invención;
- b) transfectar la línea celular con un vector de expresión que codifica un origen de replicación de EBV (*oriP*) y el polipéptido exógeno para formar una célula huésped transfectada transitoriamente;
- c) cultivar la célula huésped transfectada transitoriamente para formar un polipéptido exógeno expresado; y
- d) aislar el polipéptido exógeno expresado de otro material celular.

Preferiblemente, en realizaciones descritas en el presente documento, el cultivo de la célula huésped transfectada transitoriamente se realiza en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido exógeno.

También se describe en la presente memoria un método para fabricar polipéptidos exógenos que comprende un método como se describe en la presente memoria.

El método descrito en el presente documento es adecuado para la producción de un polipéptido exógeno, que puede ser un polipéptido exógeno secretado, en todas las escalas de producción desde matraces de cultivo celular hasta biorreactores y biorreactores desechables escalables. El método es adecuado para la producción a gran escala, es decir, industrialmente. El cultivo de una célula para la producción de un polipéptido deseado en gran escala generalmente consiste en una secuencia de cultivos individuales, en donde todos los cultivos excepto el cultivo final, es decir, el cultivo a gran escala, es decir, el último en la secuencia, se realizan hasta que se alcanza una cierta densidad celular en el recipiente de cultivo. Si se alcanza la densidad celular predeterminada, se utiliza todo el cultivo o una fracción de la misma para inocular el siguiente recipiente de cultivo, que tiene un volumen mayor, hasta 100 veces el volumen del cultivo anterior. Todos los cultivos, que sirven como base para al menos un cultivo adicional en un volumen mayor, se denominan "fermentación de trenes de siembra". Solo en el cultivo a gran escala, es decir, en el cultivo que no pretende servir de base para un cultivo adicional en un volumen mayor, que también se denota como "fermentación principal", el punto final del cultivo se determina según la concentración de la inmunoglobulina exógena secretada producida en el medio de cultivo o el tiempo de cultivo. El término "gran escala" tal como se utiliza en esta solicitud denota el cultivo final de un proceso de producción industrial. En una realización, un cultivo a gran escala se realiza en un volumen de al menos 50 litros, en otra realización de al menos 500 litros, en una realización adicional de al menos 1.000 litros hasta un volumen de 2.000 o 12.500 litros. En una realización, el medio de cultivo final, es decir, a gran escala, no contiene un agente de selección eucariota.

En una realización, el cultivo de dicha línea celular transfectada, tal como una línea celular CHO, se realiza en presencia de un agente o agentes de selección eucariotas en un volumen de menos de 500 litros y el cultivo de dicha línea celular transfectada se realiza en ausencia de un agente o agentes de selección eucariota en un volumen de 500 litros o más y la recuperación del polipéptido exógeno es del medio de cultivo sin dichos agentes de selección eucariotas. En una realización adicional, el cultivo comprende cultivos secuenciales con un volumen de cultivo creciente hasta un volumen de cultivo final, por lo que los cultivos se realizan en presencia de un agente o agentes de selección eucariotas hasta un volumen de cultivo del 1% (v/v) del volumen de cultivo del cultivo final o principal, y en ausencia de todos los agentes de selección eucariotas en un volumen de cultivo de más del 1% (v/v) del volumen de cultivo del cultivo final. En una realización adicional, dicho cultivo comprende cultivos secuenciales de trenes de semillas con un volumen de cultivo creciente, por lo que cada uno de los cultivos del tren de siembra se realiza en presencia de un agente o agentes de selección eucariotas y la fermentación principal se realiza en ausencia de todos los agentes de selección eucariotas. En una realización, el cultivo de dicha línea celular transfectada se realiza en presencia de un agente o agentes de selección eucariotas en las fermentaciones del tren de siembra y el cultivo de dicha línea celular transfectada se realiza en ausencia de agentes de selección eucariotas en la fermentación principal y la recuperación del polipéptido exógeno proviene del medio de cultivo principal que no contiene agente o agentes de selección eucariota. En estas realizaciones, el agente o agentes de selección eucariota se agregan durante los cultivos del tren de siembra y se omite durante la fase de producción (cultivo de fermentación principal) de dicha línea celular. El término "fase de producción" denota el cultivo de una línea celular, tal como una línea celular CHO, en un gran volumen, es decir, la fermentación principal, después de lo cual se recupera el polipéptido exógeno producido.

- En una realización, el polipéptido exógeno es una inmunoglobulina exógena secretada que puede ser una inmunoglobulina exógena secretada completamente procesada. El término "inmunoglobulina exógena 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 correctamente formados.
- Una célula 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, estos son que tiene que ser cultivable en medio sin suero, preferiblemente medio sin componente animal (ACF). En una realización, el medio definido químicamente libre de polipéptido es el medio CD CHO disponible de Invitrogen Corp.
- En el presente documento también se describe un método que comienza con la primera transfección y finaliza con la recuperación del polipéptido exógeno realizado en el mismo medio. El término "en el mismo medio" significa dentro de la solicitud actual que, comenzando con la primera transfección y terminando con la recuperación del polipéptido exógeno del medio de cultivo de fermentación principal, se usa el mismo medio. Esto significa que en todos los pasos se emplea un nuevo medio de la misma composición. Esto no indica que los mismos aditivos deben agregarse al medio en todas las etapas, es decir, el medio se puede complementar con diferentes aditivos en diferentes etapas del método. En una realización, el medio utilizado en el método de acuerdo con la invención es el mismo medio en todas las etapas y es un medio adecuado para la producción a gran escala del polipéptido exógeno.
- El polipéptido exógeno se puede recuperar de los sobrenadantes o lisados usando métodos cromatográficos. En el presente documento también se describe un método que comprende como la etapa final de purificación de dicho polipéptido exógeno con una o más etapas cromatográficas.
- Los métodos cromatográficos y su uso son conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, *Chromatography*, 5 edición, Parte 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., y Poole, S. K., Elsevier Science Publishing Company, New York, (1991); *Scopes, Protein Purification: Principles and Practice* (1982).
- Por ejemplo, para la expresión de una inmunoglobulina exógena, el vector con el que se transfecta la línea celular descrita en el presente documento puede comprender un ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección eucariota, un ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicha inmunoglobulina exógena y/o un ácido nucleico que codifica la cadena pesada de dicha inmunoglobulina exógena. Si el vector comprende solo un ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicha inmunoglobulina o la cadena pesada de dicha inmunoglobulina, dicha célula CHO también se transfecta en cada etapa por otro vector que comprende un ácido nucleico que codifica la otra cadena correspondiente de dicha inmunoglobulina.
- También se describe en el presente documento una línea celular de la invención cultivada en un medio químico definido, libre de polipéptidos. También se incluye un polipéptido exógeno expresado a partir de una línea celular de este tipo. Otro aspecto de la presente invención es una composición que comprende la línea celular de la invención.
- En una realización, el ácido nucleico que codifica la glutamina sintetasa no se usa como un marcador de selección. Por ejemplo, la capacidad de la línea celular para crecer y/o sobrevivir en presencia de MSX no se puede usar como un marcador de selección para el ácido nucleico que codifica la glutamina sintetasa.
- La línea celular parental es preferiblemente de mamífero. Las líneas celulares parentales de mamíferos se pueden seleccionar de una línea celular humana y una línea celular no humana. Las líneas celulares humanas se pueden seleccionar de cualquier línea celular humana adecuada, tal como HEK (riñón embrionario humano), HeLa (Henrietta Lacks), la línea celular PER.C6® de Crucell y las células de retina embrionarias humanas. Las líneas celulares no humanas pueden seleccionarse de cualquier línea celular no humana adecuada tal como una línea celular de roedor y una línea celular de primate. Las líneas celulares de primate pueden seleccionarse de cualquier línea celular de primate adecuada, tal como COS (células de riñón de mono verde africano transformadas con SV40).
- La línea celular parental de mamífero puede ser una línea celular de roedor. La línea celular de roedor se puede seleccionar de cualquier línea celular de roedor adecuada, tal como las células CHO (ovario de hámster chino) o sus derivados, las células NS0 o sus derivados (ECACC 85110503), las células BHK (riñón de hámster bebé) o sus derivados, células de mieloma de rata YB2/0 o sus derivados y líneas celulares de fibroblastos de ratón tales como NIH3T3 o sus derivados. Las líneas celulares CHO pueden incluir cualquiera de los grupos que comprenden CHO-K1 (ATCC CCL 61) [23], CHO-DXB11, CHO-DG44, CHO-T y CHO-S.
- Las células parentales adecuadas para la invención pueden comprender además líneas celulares que producen proteínas con perfiles de glicosilación modificados o transformados por ingeniería genética, como, por ejemplo, líneas celulares que producen anticuerpos a-fucosilados para aumentar la actividad de ADCC, por ejemplo, líneas celulares inactivadas CHO FUT-8 (por ejemplo, Biowa CHO FUT-8).

La línea celular parental puede ser la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) ("CAT-S") como la depositada en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) con el número de acceso 10090201.

En el presente documento también se describe un kit para la expresión de polipéptidos exógenos que comprende:

1. a) una línea celular de expresión mejorada de acuerdo con la invención; y
- 5 2. b) un vector de expresión que comprende un origen de replicación del EBV (*oriP*) y un ácido nucleico que codifica un polipéptido exógeno en relación con la línea celular.

El kit puede comprender además instrucciones según un método de la invención.

10 Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a un anticuerpo oligoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado en CDR, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo catalítico, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo completamente humano o un anticuerpo antiidiotípico y los anticuerpos que pueden marcarse en forma soluble o unida, así como fragmentos, variantes o derivados de los mismos, incluidos los derivados marcados con histidina, ya sea solos o en combinación con otras secuencias de aminoácidos proporcionadas por técnicas conocidas. Un anticuerpo puede ser de cualquier especie. El término anticuerpo 15 también puede incluir fragmentos de unión de los anticuerpos descritos en el presente documento; los ejemplos de fragmentos incluyen Fv, Fab, Fab', Fd, anticuerpo monocatenario (svFC), región variable dimérica (Diacuerpo) y región variable estabilizada con disulfuro (dsFv). En general, para la preparación de anticuerpos monoclonales o sus fragmentos funcionales, especialmente de origen murino, es posible referirse a técnicas que se describen en particular en el manual "Antibodies" [24] o a la técnica de preparación a partir de hibridomas descrita por Köhler y Milstein [25]. Las moléculas de anticuerpos y los métodos para su construcción y uso también se describen en 20 Holliger & Hudson [26].

25 Como se usa en el presente documento, el término "cultivo celular" se refiere a células que crecen en suspensión o adherentes, en botellas de rodillos, matraces, recipientes de cultivo de vidrio o de acero inoxidable, y similares. Los enfoques a gran escala, tales como los biorreactores, también están incluidos en el término "cultivo celular". Los procedimientos de cultivo celular tanto para la producción a gran escala como a pequeña escala de polipéptidos están abarcados por la presente invención. Los procedimientos que incluyen, entre otros, un biorreactor de lecho fluidizado, un cultivo en matraz agitador, un biorreactor desechable o un sistema biorreactor de tanque agitado se pueden usar y operar alternativamente en un modo por lotes, lotes divididos, lotes alimentados o perfusión.

30 Como se usa en el presente documento, los términos "medio de cultivo celular" y "medio de cultivo", como se usan de manera intercambiable dentro de la presente invención, se refieren a una solución nutritiva usada para el crecimiento de células de mamíferos. Una solución nutritiva de este tipo generalmente incluye varios factores necesarios para el crecimiento y mantenimiento del entorno celular. Por ejemplo, una solución nutritiva típica puede incluir una formulación de medios basales, diversos suplementos según el tipo de cultivo y, en ocasiones, agentes de selección.

35 Como se usa en el presente documento, el término "medio químico definido" denota un medio que comprende solo compuestos sintéticos y que está libre de componentes derivados de animales. Además, el término "medio químico definido" puede indicar un medio que contiene en una realización menos de 0,1 mM de glutamina, en otra realización menos de 0,01 mM de glutamina y en una realización adicional menos de 0,001 mM de glutamina. En una realización, el medio químico definido está libre de glutamina. En una realización, el medio químico definido está 40 libre de componentes derivados de animales y también está libre de hidrolizados celulares de origen vegetal. Ejemplos de medios sintéticos químicamente definidos son el medio CD CHO de Invitrogen.

45 Como se usa en el presente documento, el término 'gen de EBNA-1' o 'ácido nucleico de EBNA-1' se refiere al antígeno nuclear 1 del Virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1) tal como se define por la secuencia del NCBI número de acceso YP_401677. El término 'gen de EBNA-1' también se refiere a cualquier variante del gen de EBNA-1, que facilita la expresión de un vector de expresión que comprende un elemento *oriP*. Un derivado, análogo o variante funcional de EBNA-1 puede comprender una forma truncada, pero funcional, de EBNA-1. Una forma truncada funcional de EBNA-1 se describe en el documento WO2009/137911 A1. Por ejemplo, una forma truncada de EBNA-1 puede estar sin las repeticiones habituales Gly-Ala de la proteína de longitud completa normal de 641 aminoácidos. Un derivado funcional, análogo o variante de EBNA-1 puede comprender un péptido que tenga al 50 menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad de secuencia en toda la longitud de la EBNA-1 de la SEQ ID NO: 1, o sobre la longitud de una forma truncada de EBNA-1.

55 Como se usa en el presente documento, el término "glutamina sintetasa sobrerregulada" puede incluir la transfección de uno o más genes de glutamina sintetasa en una célula, o una glutamina sintetasa endógena mejorada. La glutamina sintetasa endógena mejorada puede comprender un mayor número de copias de genes de la glutamina sintetasa endógena, de modo que la línea celular sea capaz de producir más glutamina sintetasa. Adicionalmente, o alternativamente, la actividad enzimática de la glutamina sintetasa endógena puede mejorarse. Dicha mejora de la actividad enzimática de la glutamina sintetasa puede ser relativa a la actividad enzimática natural de la glutamina sintetasa endógena en condiciones comparables *in vivo* y/o *in vitro*.

Como se usa en el presente documento, el término "glutamina sintetasa endógena mejorada" se refiere a un aumento en el nivel de proteína y/o un aumento en la actividad de la glutamina sintetasa endógena en una célula. Dicho nivel de proteína y/o actividad puede medirse en relación con el nivel de proteína y/o actividad de una célula parental antes de la mejora.

5 Como se usa en el presente documento, el término "mejorador" se refiere a una secuencia de polinucleótidos que mejora la transcripción de un gen o secuencia codificante a la que está unida operativamente. A diferencia de los promotores, los mejoradores son relativamente independientes de la orientación y la posición y se han encontrado 5' o 3' (Lusky, M., et al., Mol. Cell Bio., 3 (1983) 1108-1122) para 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, TF, et al., Mol. Cell Bio., 4 (1984) 1293-1305). Por lo tanto, los mejoradores pueden colocarse en sentido secuencia arriba o
10 secuencia abajo desde el sitio de inicio de la transcripción o a una distancia considerable del promotor, aunque en la práctica los mejoradores pueden superponerse física y funcionalmente con los promotores. Un gran número de mejoradores, de una variedad de fuentes diferentes, son bien conocidos en la técnica (y se identifican en bases de datos como el GenBank) y están disponibles como o dentro de secuencias de polinucleótidos clonadas (por ejemplo, de depósitos como la ATCC, así como otras fuentes comerciales o individuales). Un número de polinucleótidos que comprenden secuencias promotoras (tales como el promotor CMV comúnmente usado) también comprenden secuencias mejoradoras. Por ejemplo, todos los promotores fuertes enumerados anteriormente también pueden contener mejoradores fuertes (véase, por ejemplo, Bendig, M., M., Genetic Engineering 7 (Academic Press, 1988) 91-127).

20 Como se usa en el presente documento, el término "expresión" se refiere a los procesos de transcripción y/o traducción que tienen lugar dentro de una célula. El nivel de transcripción de una secuencia de ácido nucleico de interés en una célula puede determinarse sobre la base de la cantidad de ARNm correspondiente que está presente en la célula. Por ejemplo, el ARNm transcrito de una secuencia de interés puede cuantificarse mediante RT-PCR o mediante hibridación Northern [21]. Los polipéptidos codificados por un ácido nucleico de interés se pueden
25 cuantificar por diversos métodos, por ejemplo, por ELISA, analizando la actividad biológica del polipéptido, o empleando ensayos que son independientes de dicha actividad, como transferencia Western o radioinmunoensayo, usando inmunoglobulinas que reconocen y se unen al polipéptido (véase Sambrook, et al., 1989, citado más arriba).

Como se usa en el presente documento, el término "casete de expresión" se refiere a un constructo que contiene los elementos reguladores necesarios, tales como el promotor y el sitio de poliadenilación, para la expresión de al menos el ácido nucleico contenido en una célula.

Como se usa en el presente documento, el término "vector de expresión" se refiere a un ácido nucleico (también denominado molécula de ácido nucleico) que proporciona todos los elementos requeridos para la expresión de un polipéptido, por ejemplo EBNA-1 y/o GS o un polipéptido heterólogo en una célula huésped. Un vector de expresión comprende una unidad de propagación de plásmidos procariotas, por ejemplo, *E. coli*, que a su vez comprende un origen procariota de replicación, y un ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección procariota, comprende además del vector de expresión uno o más ácidos nucleicos que confieren resistencia a un agente de selección eucariota, y uno o más ácidos nucleicos que codifican un polipéptido. Preferiblemente, los ácidos nucleicos que confieren resistencia a un agente de selección y el ácido o los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido se colocan cada uno dentro de un casete de expresión, por lo que cada casete de expresión comprende un promotor, un ácido nucleico codificante y un terminador de transcripción que incluye una señal de poliadenilación. La expresión génica generalmente se coloca bajo el control de un promotor, y se dice que dicho gen estructural está "unido operativamente" al promotor. De manera similar, un elemento regulador y un promotor central están vinculados operativamente si el elemento regulador modula la actividad del promotor central.

Como se usa en el presente documento, el término "glutamina sintetasa (GS)" se refiere a una enzima que cataliza la condensación dependiente de ATP de glutamato y amoníaco para formar glutamina, que se conoce en el sistema de clasificación de enzimas como EC 6.3.1.2. Por ejemplo, como se define por secuencia NCBI número de acceso X03495 y/o como se define en la SEQ ID NO: 2. La glutamina sintetasa también se conoce como γ -glutamyl:amoníaco ligasa. El término 'glutamina sintetasa' también se refiere a cualquier variante de la enzima glutamina sintetasa (GS), que facilita la biosíntesis de glutamina a partir de glutamato y amoníaco.

Como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico exógeno" se refiere a un ácido nucleico o una población de moléculas de ácido nucleico, que no existen naturalmente dentro de una célula huésped dada. El término se puede usar indistintamente con 'ácido nucleico heterólogo'. Las moléculas de ácido nucleico exógenas/heterólogas a una célula huésped particular pueden contener ácido nucleico derivado de la especie de célula huésped (es decir, ácido nucleico endógeno) siempre que el ácido nucleico huésped se combine con ácido nucleico no huésped (es decir, ácido nucleico exógeno). Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que contiene un segmento de ácido nucleico no huésped que codifica un polipéptido unido operativamente a un segmento de ácido nucleico huésped que comprende un promotor se considera una molécula de ácido nucleico heteróloga. A la inversa, una molécula de ácido nucleico heteróloga puede comprender un gen estructural endógeno unido operativamente con un promotor exógeno. Un péptido o polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico no huésped es un péptido o polipéptido "heterólogo" o "exógeno".

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido heterólogo" denota un polipéptido, que no es producido naturalmente (es decir, de manera endógena) por la célula de mamífero o la célula huésped. El término "polipéptido heterólogo" se puede usar de manera intercambiable con el término "polipéptido exógeno". El polipéptido producido como se describe en el presente documento puede producirse por medios recombinantes.

Dichos métodos son ampliamente conocidos en el estado de la técnica y comprenden la expresión de proteínas en células eucariotas con posterior recuperación y aislamiento del polipéptido heterólogo, y usualmente la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la producción, es decir, la expresión, de un polipéptido, uno o más ácidos nucleicos que codifican el polipéptido se insertan cada uno en un casete de expresión por métodos estándar. Las células de hibridoma pueden, por ejemplo, servir como una fuente de tales ácidos nucleicos que codifican cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos. Los casetes de expresión pueden insertarse en un plásmido o plásmidos de expresión, que luego se transfectan en células huésped, que de otro modo no producen el polipéptido heterólogo. La expresión se realiza en células huésped eucariotas apropiadas y el polipéptido se recupera de las células después de la lisis o del sobrenadante del cultivo.

Como se usa en el presente documento, el término "aislado" se refiere a un ácido nucleico o un polipéptido que está esencialmente libre de componentes celulares contaminantes, tales como hidratos de carbono, lípidos, otras impurezas proteínicas u otros ácidos nucleicos asociados con el ácido nucleico o polipéptido en la naturaleza. Típicamente, una preparación de polipéptido o ácido nucleico aislado contiene el polipéptido o ácido nucleico en una forma altamente purificada, es decir, al menos aproximadamente 80% pura, al menos aproximadamente 90% pura, al menos aproximadamente 95% pura, más del 95% pura o superior al 99% pura. Los polipéptidos y el ácido nucleico pueden formularse con diluyentes o adyuvantes, e incluso con fines prácticos, pueden aislarse. Los polipéptidos pueden estar glicosilados, naturalmente o por sistemas de células eucarióticas heterólogas (por ejemplo, células CHO o NS0 (ECACC 85110503)), o pueden estar (por ejemplo, si se producen por expresión en una célula procariotas) sin glicosilar.

Como se usa en el presente documento, la frase "un ácido nucleico que confiere resistencia a un agente de selección" se refiere a un ácido nucleico que permite que las células que lo portan se seleccionen específicamente a favor o en contra, en presencia de un agente de selección. Tal ácido nucleico también se denota como marcador de selección. Normalmente, un marcador de selección confiere 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 los antibióticos. Este marcador de selección permite que las células transformadas con las mismas se seleccionen positivamente en presencia del agente de selección correspondiente, es decir, bajo crecimiento seleccionado en presencia, por ejemplo, del correspondiente antibiótico. Una célula no transformada no es capaz de crecer o sobrevivir en las condiciones de crecimiento selectivo, es decir, en presencia del agente de selección, en cultivo. Los marcadores de selección positivos permiten la selección de células que portan el marcador, mientras que los marcadores de selección negativos permiten eliminar selectivamente las celdas que portan el marcador. Los marcadores de selección eucariotas incluyen, por ejemplo, los genes de la aminoglicosido fosfotransferasa (APH) (que confieren resistencia a los agentes de selección como, por ejemplo, higromicina (hyg), neomicina (neomicina fosfotransferasa II, neo) y G418), dihidrofolato reductasa (DHFR) (que confieren resistencia al agente de selección metotrexato), timidina quinasa (tk), 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 y adenosina desaminasa y ácidos nucleicos que confieren resistencia a la puomicina, bleomicina, fleomicina, cloranfenicol, Zeocina y ácido micofenólico. Se reportan ácidos nucleicos marcadores de selección adicionales, por ejemplo, en los documentos WO 92/08796 y WO 94/28143. Los marcadores de selección procariotas incluyen, por ejemplo, el gen de la beta-lactamasa (que confiere resistencia al agente de selección ampicilina).

Como se usa en el presente documento, el término "proteína de producción" se refiere a una proteína cuya secuencia de ácido nucleico se ha transfectado en una línea celular para producir cantidades de dicha proteína.

Como se usa en el presente documento, el término "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 operativamente. Un promotor incluye señales para la unión de la ARN polimerasa y el inicio de la transcripción. El promotor o los promotores utilizados serán funcionales en el tipo de célula de la célula huésped en la que se contempla la expresión de la secuencia seleccionada. Un gran número de promotores, incluidos los promotores constitutivos, inducibles y reprimibles de una variedad de fuentes diferentes, son bien conocidos en la técnica (e identificados en bases de datos como el GenBank) y están disponibles como o dentro de polinucleótidos clonados (por ejemplo, de depósitos, tales como ATCC así como otras fuentes comerciales o individuales). Un "promotor" comprende una secuencia de nucleótidos que dirige la transcripción de un gen estructural unido operativamente. Típicamente, un promotor está localizado en la región 5' no codificante o no traducida de un gen, proximal al sitio de inicio de la transcripción de un gen estructural. Los elementos de secuencia dentro de los promotores que funcionan en el inicio de la transcripción a menudo se caracterizan por secuencias de nucleótidos de consenso. Estos elementos promotores incluyen sitios de unión a la ARN polimerasa, secuencias TATA, secuencias CAAT, elementos específicos de diferenciación (DSE; McGehee, RE, et al., Mol. Endocrinol. 7 (1993) 551-560), elementos de respuesta de AMP cíclicos (CRE), elementos de respuesta en suero (SRE; Treisman, R., Seminars in Cancer Biol. 1 (1990) 47-58), elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) y sitios de unión para otros factores de transcripción, como CRE/ATF (O'Reilly, MA, et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 19938-19943), AP2 (Ye, J., et al., J.

- 5 Biol. Chem. 269 (1994) 25728-25734), SP1, proteína de unión al elemento de respuesta AMPc (CREB; Loeken, MR, Gene Expr. 3 (1993) 253-264) y factores octámeros (véase, en general, Watson et al., eds., Molecular Biology of the Gene, 4ª ed. (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1987), y Lemaigre, FP y Rousseau, GG, Biochem. J. 303 (1994) 1-14). Entre los promotores eucariotas que se han identificado como promotores fuertes para la expresión de alto nivel se encuentran el promotor temprano de SV40, el promotor tardío principal de adenovirus, la metalotioneína I de ratón, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, el factor de alargamiento 1 alfa de hámster chino (CHEF-I, véase, por ejemplo, el documento US 5.888.809), el promotor temprano inmediato de la EF-I alfa humana, la ubiquitina y el citomegalovirus humano (IE de CMV). El "promotor" puede ser constitutivo o inducible. Un mejorador (es decir, un elemento de ADN que actúa en cis que actúa sobre un promotor para aumentar la transcripción) puede ser necesario para funcionar junto con el promotor para aumentar el nivel de expresión obtenido con un promotor solo, y puede incluirse como un elemento regulador de la transcripción. A menudo, el segmento de polinucleótido que contiene el promotor también incluirá secuencias mejoradoras (por ejemplo, CMV o SV40).
- 10 Como se usa en el presente documento, el término "transfección transitoria", tal como se usa en esta solicitud, se refiere a un proceso en el que no se requiere que el ácido nucleico introducido en una célula se integre en el genoma o ADN cromosómico de esa célula. De hecho, se mantiene predominantemente como un elemento extracromosómico, por ejemplo, como un episoma, en la célula. Los procesos de transcripción del ácido nucleico del episoma no se ven afectados, por ejemplo, se produce una proteína codificada por el ácido nucleico del episoma.
- 15 Como se usa en el presente documento, el término "cromosómico" o "cromosómicamente" es una indicación de la ubicación del ácido nucleico como parte del cromosoma de una célula. Esto incluye secuencias de ácido nucleico heterólogas/exógenas que no son de origen cromosómico, pero que ahora están integradas como parte del cromosoma. El término "episomal" o "episómicamente" es una indicación de la ubicación del ácido nucleico como parte del episoma de una célula. Esto incluye secuencias de ácido nucleico heterólogas/exógenas que no son de origen episomal.
- 20 Como se usa en el presente documento, el término "trans", tal como se usa en relación con la ubicación relativa del ácido nucleico, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que está en una ubicación diferente a otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico se considera "trans" si está ubicada en una molécula de ácido nucleico o vector diferente en relación con otra secuencia de ácido nucleico. Una secuencia de ácido nucleico ubicada en un vector se considera "trans" a una secuencia de molécula de ácido nucleico en el cromosoma. Por el contrario, el término "cis" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se encuentra en la misma molécula de ácido nucleico, vector o cromosoma.
- 25 Como se usa en el presente documento, el término "transformado de manera estable", "transfectado de manera estable" o "expresión estable" como se usa en esta solicitud se refiere a una integración hereditaria y estable de ácido nucleico exógeno en el genoma/cromosoma de una célula huésped.
- 30 Como se usa en el presente documento, los términos "transformado" o "transfectado" pueden abarcar el término "transducido".
- 35 Como se usa en el presente documento, el término "transformado transitoriamente", "transfectado transitoriamente" o "expresión transitoria" se refiere a la provisión de ácido nucleico exógeno en una célula que no está integrada de manera estable en el genoma/cromosoma de una célula huésped. El ácido nucleico exógeno puede ser solo temporalmente hereditario o no hereditario. Un ejemplo de transfección transitoria es un vector que se transfecta en la célula, pero no se integra cromosómicamente, y puede además requerir una presión selectiva para mantenerla en el huésped de la célula durante un período de tiempo (por ejemplo, 1-5, o 2-3 días).
- 40 La persona experta apreciará que las características de cualquier realización o aspecto de la invención se pueden aplicar, cuando sea apropiado, a otras realizaciones o aspectos de la invención.
- 45 La invención se ejemplificará ahora mediante los siguientes ejemplos no limitativos en los que se utilizan las siguientes abreviaturas:
- CMV: Citomegalovirus
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- EBNA-1: Antígeno nuclear 1 del virus de Epstein Barr
- 50 EBV: Virus de Epstein Barr
- ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
- GS: Glutamina sintetasa
- HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento

IgG: Inmunoglobulina G

M-PBST: Leche desnatada en polvo disuelta en PBST

MSX: Metionina sulfoximina

NEO: Neomicina

5 PA-HPLC: HPLC- Proteína A

PEI: polietilenimina

PBS: Solución salina regulada con fosfato

PBS-T: Solución salina regulada con fosfato más Tween

ARN: ácido ribonucleico

10 SDS-PAGE: Electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio y poliacrilamida

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina

Breve descripción de las figuras

Figura 1: vector de clonación pmCEP4

Figura 2: vector de clonación pSI-GS

15 Figura 3: vector de expresión pEU para la cadena pesada del anticuerpo.

Figura 4: vector de expresión pEU para la cadena ligera del anticuerpo.

Figura 5: Distribución de la productividad de los transfectantes CHO-EBNA-1. En el que el eje y en el título en mg/mL y el eje x muestra los diferentes transfectantes. Los transfectantes se transfectaron de forma transitoria para evaluar la productividad de IgG de los transfectantes CHO-EBNA-1. Se incluyeron células CHO de tipo silvestre (células huésped no transfectadas) como control. El transfectante de mayor producción fue C1, con un título por ELISA de 28 mg/L de MAb D. Las barras muestran el promedio de dos repeticiones, con el intervalo indicado por las barras de error.

Figura 6: Transferencia Western de líneas celulares transfectadas que muestran la expresión de EBNA-1. Los carriles 1 y 8 son estándares de la proteína Magic Mark (Invitrogen, Reino Unido). El carril 2 es el estándar de proteína EBNA (Autogen Bioclear). El carril 3 es la línea de células anfitrionas CATS. El carril 4 es G22, el carril 5 es C1, el carril 6 es GH5 y el carril 7 es C1GS. Una banda que migra al mismo nivel que una de las bandas menores en el carril estándar de EBNA se puede detectar en los carriles 4-7 pero no en el carril 3, el carril de CATS. Las líneas celulares CATS no contienen EBNA-1 transfectada, mientras que las líneas celulares G22, C1, GH5 y C1GS contienen todas las EBNA-1 transfectadas.

Figura 7: Expresión transitoria en diferentes variantes de células huésped C1 en las que el eje y muestra el título de IgG en mg/L y el grupo 1 en el eje x son los clones C1, el grupo 2 son los transfectantes C1 + GS y el grupo 3 es el progenitor C1. Distribución de los títulos de recolección de transfección transitoria para clones C1 y transfectantes C1-GS. Quince clones C1 derivados de la dilución de la clonación de los transfectantes C1 y 20 C1 + GS derivados de la transfección de C1 con el gen de GS fueron transfectados de forma transitoria con MAb A. La línea de células progenitoras C1 (población heterogénea) también se transfectó como control. La barra muestra el título medio de la población, mientras que los puntos muestran la distribución de los títulos dentro de la población. Para el C1 transfectado con GS, la media es significativamente más alta que el progenitor C1 o los clones de dilución C1 y la distribución de los transfectantes muestra un cambio en la población hacia niveles de expresión más altos. Dado que la única diferencia entre las poblaciones es que los transfectantes contienen y se seleccionan para el gen de GS, la marcada mejora en el título puede atribuirse a la coexpresión estable de GS en las líneas celulares que expresan EBNA-1.

Figura 8: Expresión transitoria del anticuerpo de un panel de células CHO-EBNA-1/GS. Expresión de tres anticuerpos diferentes (MAb-A, B y C) de las líneas celulares CHO-EBNA-1/GS líderes (G22, GH5 y C1-GS). Estas líneas celulares, y también incluyendo como control las células huésped CHO (CATS) y CHO-EBNA (C1), se cotransfectaron transitoriamente con constructos de expresión de cadena ligera y cadena pesada para los anticuerpos apropiados. Se permitió que los cultivos crecieran en exceso y luego se analizaron los sobrenadantes de cultivo clarificados mediante HPLC con Proteína A para determinar la concentración del anticuerpo producido. Consistentemente para los tres anticuerpos expresados, la coexpresión estable tanto de EBNA-1 como de GS conduce a una mayor expresión transitoria del anticuerpo en estas líneas celulares en relación con las células huésped que expresan de manera estable solo EBNA-1 o ni EBNA-1 o GS.

Figura 9: Distribución de la productividad de los transfectantes CHO-EBNA-1. Los transfectantes se transfectaron transitoriamente en matraces de cultivo para evaluar la productividad de IgG de los transfectantes CHO-EBNA-1-GS. El transfectante de mayor producción fue CEP27, con un título por PA-HPLC de 83 mg/L de MAb A.

5 Figura 10: Distribución de la productividad de los transfectantes CHO-EBNA-1/GS seleccionados utilizando MSX e higromicina. Los transfectantes se transfectaron de forma transitoria para evaluar la productividad de IgG de los transfectantes CHO-EBNA-1. El transfectante de mayor producción fue CO16, con un título de 113 mg/L por PA-HPLC de MAb A.

10 Figura 11: Comparación de la distribución de la productividad de los transfectantes CHO-EBNA-1 seleccionados utilizando higromicina y los transfectantes CHO-EBNA-GS seleccionados utilizando MSX e higromicina. Los transfectantes se transfectaron de forma transitoria para evaluar la productividad de IgG de los transfectantes CHO-EBNA-1. La comparación analítica de las dos poblaciones mediante una prueba t de dos colas muestra que la diferencia entre las poblaciones es altamente significativa ($P < 0,0001$). El ANOVA de dos vías muestra significancia en la diferencia entre poblaciones ($P = 0,0066$) pero no dentro de las poblaciones ($P = 0,6719$).

15 Figura 12: Comparación de la distribución de la productividad de los transfectantes CHO-EBNA-1. Los transfectantes se transfectaron transitoriamente para evaluar la productividad de IgG. Se incluyó G22 como control para permitir la comparación entre esta ronda y la ronda inicial de selección de transfectantes.

Figura 13: Comparación de la distribución de la productividad de los transfectantes CHO-EBNA-1-GS. Los transfectantes se transfectaron transitoriamente para evaluar la productividad de IgG. Se incluyó G22 como control para permitir la comparación entre esta ronda y la ronda inicial de selección de transfectantes.

20 Figura 14: Transferencia Western (Gel 1) de transfectantes CHO-EBNA-1. Carril 1 - Estándar de la proteína Magic Mark (Invitrogen), carril 2 - Estándar de EBNA-1, Carril 3 - Control negativo de CATS, Carril 4 - Control positivo de G22, Carril 5 - CEP2, Carril 6 - CEP9, Carril 7 - CEP12, Carril 8 - CEP27, Carril 9 - CEP35, Carril 10 - Estándar de proteína Magic Mark. CEP27 es el único carril (sin control) con EBNA-1 presente. Esto confirma que se requiere la presencia de EBNA-1 para la expresión alta del anticuerpo.

25 Figura 15: Transferencia Western (Gel 2) de los transfectantes CHO-EBNA-1. Carril 1 - Estándar de la proteína Magic Mark (Invitrogen), Carril 2 - Estándar de EBNA-1, Carril 3 - Control negativo de CATS, Carril 4 - CEP39, Carril 5 - CEP40, Carril 6 - CEP47, Carril 7-CEP54 Carril 8 - Estándar de proteína. CEP47 es el único carril (sin control) con EBNA-1 presente. Esto confirma que se requiere la presencia de EBNA-1 para la expresión alta del anticuerpo.

30 Figura 16: Transferencia Western (Gel 1) de los transfectantes CHO-EBNA-1-GS. Carril 1 - Estándar de la proteína Magic Mark (Invitrogen), Carril 2 - Estándar de EBNA-1, Carril 3 - Control negativo de CATS, Carril 4 - Control positivo de G22, Carril 5 - CO8, Carril 6 - CO12, Carril 7 - CO15, Carril 8 - CO16, Carril 9 - CO18, Carril 10 - Estándar de proteína Magic Mark. Cuando hay poco o ningún EBNA-1 presente (carriles 7 y 9), la productividad del anticuerpo es baja. Se observan mayores niveles de anticuerpos en los transfectantes que expresan EBNA-1.

35 Figura 17: Transferencia Western (Gel 2) de transfectantes CHO-EBNA-1. Carril 1 - Estándar de la proteína Magic Mark (Invitrogen), Carril 2 - Estándar de EBNA-1, Carril 3 - Control negativo de CATS, Carril 4 - CO23, Carril 5 - CO27, Carril 6 - CO31, Carril 7 - CO32, Carril 8 - CO34, Carril 9 - CO35, Carril 10 - Estándar de proteína Magic Mark. Cuando hay poco o ningún EBNA-1 presente (carriles 6 y 9), la productividad del anticuerpo es baja. Se observan mayores niveles de anticuerpos en los transfectantes que expresan EBNA-1.

40 Figura 18: se muestran las medias geométricas de los picos de fluorescencia del análisis citométrico de flujo de GS en los diferentes tipos de células. Las celdas secundarias solo proporcionan los niveles de señal de fondo y se utilizan para configurar el citómetro. Las células GSKO muestran la señal de una línea celular con el GS endógeno desactivado. La señal de CATS se debe solo a GS endógeno. La señal de C1 (transfectada con EBNA-1 solo en la primera ronda de selecciones) es comparable con CATS, indicando solo la expresión de GS endógena. Para G22 (incluido como control positivo) y para las cinco líneas celulares cotransfectadas de alta expresión, la señal es mucho más alta que para la GS endógena solamente. Esto muestra que se tienen la expresión de GS transfectada en estas células.

45 Figura 19: Caracterización por qRT-PCR de células CHO transfectadas con EBNA-1 y EBNA-1/GS. A: Se muestran el ARNm de EBNA-1 relativo ($\Delta\Delta Ct$) para 9* CEP (CHO EBNA-1), 12* CO (CHO EBNA-1/GS) y TS CAT-S. Todas las muestras se normalizan con GAPDH como control de carga y luego se expresan como una diferencia de pliegue con la línea celular C1 (CHO CAT-S/EBNA-1). Como se esperaba, no se observó ningún mensaje EBNA-1 en la línea celular CAT-S no transfectada de TS, y se observó un bajo nivel de variación de los niveles de ARNm con las líneas celulares CEP (CHO EBNA-1 solamente). Con las líneas celulares Co (CHO EBNA-1/GS) se observó una mayor propagación del ARNm de EBNA-1 relativo con niveles hasta 10 veces mayores de EBNA-1 que en la línea celular C1 (CHO CAT-S/EBNA-1).

55 B: Se muestran el ARNm de GS relativo ($\Delta\Delta Ct$) para 9* CEP (CHO EBNA-1), 12* CO (CHO EBNA-1/GS) y CHO CAT-S TS. Todas las muestras se normalizan con GAPDH como control de carga y luego se expresan como una diferencia del número de veces con la línea celular C1 (CAT-S/EBNA-1). Como era de esperar, se observó muy

poco ARNm de GS con la línea celular CEP (CHO EBNA-1 solamente) y CHO CAT-S TS. Sin embargo, con las líneas celulares de CO (CHO EBNA-1/GS) se observó una gran propagación de los niveles relativos de ARNm de GS, con un aumento de 6 a 100 veces mayor que la línea celular C1 (CHO CAT-S/EBNA-1).

- 5 C: Comparación de la distribución de la productividad para 9* CEP (CHO EBNA-1), 12* CO (CHO EBNA-1/GS) y CHO CAT-S TS. Las líneas celulares se transfectaron de forma transitoria para evaluar la productividad de IgG de las líneas celulares CEP (CHO-EBNA-1) o CO (CHO-EBNA/GS).

Para todos los conjuntos de datos, se muestra la media y el error estándar de la media (SEM).

Breve descripción del listado de secuencias

SEQ ID No.	Identidad	
1	EBNA-1	Proteína
2	GS	Ácido Nucleico
3	Dominio V _H del Mab A	Ácido Nucleico
4	Dominio V _L del Mab A	Ácido Nucleico
9	Dominio V _H del Mab B	Ácido Nucleico
10	Dominio V _L del Mab B	Ácido Nucleico
5	Dominio V _H del Mab C	Ácido Nucleico
6	Dominio V _L del Mab C	Ácido Nucleico
7	Dominio V _H del Mab D	Ácido Nucleico
8	Dominio V _L del Mab D	Ácido Nucleico

10

Materiales

a. Construcción de plásmidos de expresión

- 15 Los vectores de expresión utilizados para la transfección transitoria se basan en vectores conocidos como vectores pEU (Persic et al, 1997) [27]. Los vectores pEU contienen un casete de expresión para el gen de interés, el origen de replicación (*oriP*) del virus de Epstein Barr (EBV) y un marcador seleccionable para la selección de transfectantes estables. El marcador seleccionable para la amplificación del plásmido en *E. coli* es el gen de resistencia a la ampicilina.

- 20 La secuencia líder secretora se derivó de la secuencia de la cadena pesada de ratón, y la secuencia de ADN codificante contiene un intrón. Secuencia abajo de la secuencia líder hay un polienlazador con múltiples sitios de clonación y luego las regiones constantes de anticuerpos. Hay un vector pEU para cada isotipo de anticuerpo. La región variable se clona en el polienlazador entre la secuencia líder de secreción y el dominio constante, en el vector apropiado. La transcripción se conduce desde el promotor EF-1 α y termina con una secuencia poliA.

- 25 El origen de replicación del EBV, *oriP*, se clonó como un fragmento de EcoRI en el vector pEU. Se cree que *oriP* interactúa con la proteína EBNA-1 para mejorar la productividad posiblemente mediando la replicación episomal del plásmido de expresión y/o mejorando el transporte nuclear.

b. Construcción de vector EBNA (pmCEP4)

- 30 El plásmido pCEP4 se obtuvo de Invitrogen (Paisley, Reino Unido). El casete de expresión del promotor de CMV se eliminó utilizando digestión con XbaI y Sail. Se hizo un nuevo polienlazador mediante hibridación de secuencia específica codificante y oligonucleótidos sintéticos de cadena no codificante. Esto se insertó en la cadena principal del vector pCEP4 sin el promotor de CMV para generar el vector pmCEP4.

c. Construcción del vector pSI-GS de GS

5 El gen de glutamina sintetasa (GS) se obtuvo mediante amplificación por RT-PCR de ARN de tejido de hámster con cebadores diseñados con base en la secuencia del gen de GS de la base de datos de NCBI. El producto de la PCR se subclonó luego en un vector de expresión pSI disponible comercialmente (de Promega, Southampton, Reino Unido) que contiene el mejorador/promotor temprano de SV40 y la poli A tardía de SV40.

d. Construcción del vector de expresión pEU para la cadena pesada del anticuerpo

10 El vector de casete para la cadena pesada pEU contiene un casete de expresión para el gen de interés, el origen de replicación del EBV (oriP) y un marcador seleccionable NEO. El marcador seleccionable para la amplificación del plásmido en *E. coli* es el gen de resistencia a la ampicilina. La transcripción es controlada por el promotor alfa de EF-1 y finalizada por una señal de poli-A. Para construir vectores de expresión, la región variable se subclona en el sitio de clonación múltiple del polienlazador de VH.

e. Vector de expresión pEU para cadena ligera de anticuerpo

15 El vector de casete para la cadena ligera pEU contiene un casete de expresión para el gen de interés y el origen de replicación del EBV (oriP). El marcador seleccionable para la amplificación del plásmido en *E. coli* es el gen de resistencia a la ampicilina. La transcripción es controlada por el promotor alfa de EF-1 y finalizada por una señal poli-A. Para construir vectores de expresión, la región variable se subclona en el sitio de clonación múltiple polienlazador de VL. El vector se modificó para eliminar un marcador de selección de xantano guanina fosforribosiltransferasa (XGPRT).

f. Fuente y derivación de células CHO

20 La línea celular CHO.K1 se obtuvo a partir del número de ECACC No: 85051005. El cultivo celular adherente de CHOK1 se adaptó al cultivo celular en suspensión usando medio CD-CHO suplementado con glutamina 6 mM (Invitrogen, Paisley, Reino Unido).

Ejemplo 1: Técnicas generales.

a) Técnicas de ADN recombinante.

25 Se usaron métodos estándar para manipular el ADN como se describe en Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Se usaron kits moleculares y reactivos biológicos de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

b) Determinación de la secuencia de ADN

30 Las secuencias de ADN se determinaron mediante secuenciación de doble cadena utilizando la química fluorescente Big Dye® V3.1 de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Reino Unido). Las reacciones se analizaron utilizando un secuenciador capilar ABI 3700 analizador de ADN (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). Los datos de los cromatogramas de secuencia fueron compilados automáticamente por el analizador de ADN para generar información de secuencia de ADN. Las secuencias de cada reacción de secuenciación individual se compararon y alinearon con una secuencia de referencia utilizando Sequencher^{MR} versión 4.5 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan, EE. UU.). Las áreas de ambigüedad de secuencia se verificaron manualmente contra los cromatogramas de reacción de secuencia.

35 Big Dye® utiliza la química fluorescente del terminador colorante de secuenciación de ADN en la que se unen diferentes colorantes fluorescentes a los ddNTP (Didesoxirribonucleótidos). Los terminadores BigDye® utilizan moléculas individuales de transferencia de energía, que incluyen un colorante donante y aceptor de energía conectado por un enlazador de transferencia de energía altamente eficiente. En la estructura de la molécula BigDye®, el aceptor es un colorante de diclororrodamina. Un enlazador de transferencia de energía acopla los colorantes donante de fluoresceína y aceptor de dRodamina para una transferencia de energía eficiente en una sola molécula de colorante.

c) Análisis de secuencias de ADN y proteínas y gestión de datos de secuencias

45 El modelado de la secuencia de ADN se realizó utilizando MacVector v7.2.3 (Accelrys Software Inc, San Diego, California). La alineación de la secuencia de ADN se realizó con Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan).

d) Técnicas de cultivo celular

50 Se utilizaron técnicas estándar de cultivo celular. Las células CHO se mantuvieron en medio CD-CHO sin suero complementado con L-glutamina 6 mM (Invitrogen, Paisley, Reino Unido). Las células transfectadas establemente se mantuvieron en CD-CHO suplementado con metionina sulfoximina (MSX; Sigma-Aldrich, Dorset, Reino Unido)

y/o higromicina (Invitrogen, Paisley, Reino Unido). Para placas de múltiples pozos y matraces T25, los cultivos se incubaron en una incubadora humidificada a 36,5°C, 5% de CO₂.

5 Para agitar los cultivos en matraces Erlenmeyer con desfogue, los cultivos se incubaron en una incubadora humidificada a 36,5°C, 5% de CO₂, 140 rpm. Las células se dividieron nuevamente en 2×10^5 células viables/mL cada 3-4 días en medio CD-CHO (Invitrogen, Paisley, Reino Unido), CD-CHO suplementado con metionina sulfoximina (MSX; Sigma-Aldrich, Dorset, Reino Unido) y/o higromicina (Invitrogen, Paisley, Reino Unido).

e) Transfección estable de células huésped

10 El ADN linealizado se introdujo en células huésped mediante electroporación usando "GenePulser" de Bio-Rad. Las células se colocaron en placas de 96 pozos en medio no selectivo y se dejaron recuperar durante la noche antes de agregar medio selectivo.

Después de 3-4 semanas, se examinaron las placas para identificar colonias individuales.

f) Transfección transitoria de células CHO y CHO-EBNA-1/CHO-EBNA-1-GS para evaluar la productividad de las líneas celulares.

15 Para las transfecciones transitorias, se sembraron células del subcultivo continuo a razón de 5×10^5 células viables/mL en medio de mantenimiento. Después de 24 horas, las células en cultivos con agitación deben estar a razón de $0,9-1,2 \times 10^6$ células viables/mL. Las células se cotransfectaron de forma transitoria con el vector de cadena pesada del anticuerpo y el vector de cadena ligera del anticuerpo usando reactivos de transfección tales como PEI lineal de 25 kDa.

Los anticuerpos utilizados fueron:

20 MAb A (IgG humana $\gamma 1 - \lambda$)

MAb B (IgG humana $\gamma 2 - \lambda$)

MAb C (IgG humana $\gamma 1 - \lambda$)

MAb D (IgG humana $\gamma 4 - \lambda$)

25 Después de la cotransfección, los matraces se incubaron en una incubadora humidificada a 36,5°C, 5% de CO₂, 140 rpm.

Para cultivos alimentados, se añadió una alimentación nutriente concentrada como adiciones en bolo a lo largo del transcurso del cultivo.

30 Cada 2-4 días a lo largo de la vida del cultivo, se extrajo una muestra de células y se contó la densidad celular como se describió anteriormente para determinar la densidad y viabilidad celular. Una vez que la viabilidad del cultivo cayó a < 30%, se consideró que el crecimiento excesivo estaba completo. El sobrenadante clarificado se almacenó a -70°C hasta que se analizó mediante ELISA, HPLC con Proteína A u Octeto como se describe a continuación.

Las secuencias de los dominios variables de los anticuerpos anteriores se enumeran en el listado de secuencias adjunto como sigue:

Anticuerpo	Dominio	Secuencia
MAb A	V _H	SEQ ID No. 3
	V _L	SEQ ID No. 4
MAb B	V _H	SEQ ID No. 9
	V _L	SEQ ID No. 10
MAb C	V _H	SEQ ID No. 5
	V _L	SEQ ID No. 6

Anticuerpo	Dominio	Secuencia
MAb D	V _H	SEQ ID No. 7
	V _L	SEQ ID No. 8

g) Cuantificación de anticuerpos recombinantes en sobrenadantes de cultivos celulares

ELISA

- 5 Los anticuerpos en sobrenadantes de cultivos celulares se cuantificaron usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) que se capturó con un anticuerpo anti-Fc humano (Strattech Scientific, Suffolk, Reino Unido, número de catálogo 109-005-098) a una dilución de 1:400 en Marvel al 2% en PBS. Después de lavar 3 veces en solución salina regulada con fosfato con Tween (PBST), el anticuerpo unido se detectó con un anticuerpo de cadena ligera antihumana acoplado a peroxidasa (The Binding Site Ltd, Birmingham, Reino Unido, número de catálogo AP015 (kappa) o AP017 (lambda)) a una dilución de 1:2500 en M-PBS al 2%. Después de lavar tres veces en PBST,
- 10 se añadió el sustrato colorimétrico 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (Sigma-Aldrich, Dorset, Reino Unido), se dejó que la reacción colorimétrica se desarrollara durante 6 minutos antes de interrumpir con ácido sulfúrico 2 M (VWR (BDH), Leicestershire, Reino Unido). Se midió la absorbancia a 450 nm y se dedujeron las concentraciones de anticuerpos por comparación con una curva de calibración.

HPLC con Proteína A

- 15 Los anticuerpos en sobrenadantes de cultivos celulares también se cuantificaron utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento de proteína A (PA-HPLC) en un Agilent HP1100 o HP1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE. UU.) comparando el tamaño del pico de cada muestra con una curva de calibración.

Octeto

- 20 Alternativamente, los anticuerpos en cultivos celulares se cuantificaron utilizando el sistema OctetQ (Forté Bio, Menlo Park, California, EE. UU.) con los biosensores de cuantificación de la proteína A, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

h) Análisis de transferencia Western de la expresión de EBNA-1

- 25 Las células se recogieron mediante centrifugación (800 rpm, 5 minutos, Megafuge 1.0 de Hereaus) y se incubaron en regulador de lisis [10 mL de CytoBuster (Merck, Darmstadt, Alemania) más un comprimido de inhibidor completo de la Mini Proteasa completa (Roche Diagnostics Ltd, Burgess Hill, Reino Unido) y 2 µl de Benzonasa (Roche Diagnostics Ltd, Burgess Hill, Reino Unido)] durante 10 minutos en hielo. Después de la centrifugación a 16.000 x g, el sobrenadante soluble se transfirió a un tubo nuevo y se almacenó a -70°C hasta que fue necesario. Antes de su uso, el sobrenadante (extracto celular) se descongeló en hielo.

- 30 La SDS-PAGE se realizó utilizando el sistema de gel NuPAGE (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, los extractos celulares se combinaron con 5x de regulador de carga y 2-mercaptoetanol como agente reductor, se incubaron a 95°C durante 1 minuto y se cargaron en geles NuPAGE NoPax Bis/Tris al 4-12%. La separación de proteínas tuvo lugar en el regulador de proceso NuPAGE MES SDS. Para la transferencia electrónica de proteínas, se usó el sistema iBlot Dry-Blotting de Invitrogen de acuerdo con el protocolo del fabricante (programa preestablecido 2, transferencia de 6 minutos).

- 35 Después de la electrotransferencia, las membranas se bloquearon en leche desnatada en polvo al 5%-PBS-Tween (M-PBST) durante 1 hora. Se usó anticuerpo monoclonal de ratón contra EBNA-1 (Calbiochem número de catálogo DP15L) como el anticuerpo primario a una dilución de 1:1000 en M-PBST al 2,5%. Después de lavar durante 30 minutos en PBST (al menos 2 cambios de lavado), se usó un anticuerpo IgG Fc anti-ratón de cabra acoplado a peroxidasa (Alpha Diagnostics número de catálogo 40126) como un anticuerpo secundario a una dilución de 1:3000
- 40 en M-PBST al 2,5%.

Después de lavar durante 1 hora en PBST (al menos 4 cambios de lavado), los conjugados de peroxidasa unidos se detectaron por quimioluminiscencia utilizando reactivos de detección de transferencia Western Amersham ECL Plus y Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) y desarrollando manualmente la película utilizando reactivos de revelado y fijación Kodak.

- 45 Cuantificación de anticuerpos intracelulares mediante citometría de flujo

Las células se fijaron en la fase de crecimiento logarítmica media, generalmente tres o cuatro días después del subcultivo anterior. Se sedimentaron 1×10^7 células con una viabilidad > 90% mediante centrifugación a 120 g

- 5 durante 5 minutos. El medio de cultivo celular gastado se eliminó por aspiración y las células se lavaron dos veces con 5 mL de PBS de Dulbecco (Invitrogen 14190) a temperatura ambiente. Las células se resuspendieron en 5 mL de metanol al 70% previamente enfriado (-20°C) en PBS. Las muestras se taparon herméticamente para evitar la evaporación y se almacenaron a -20°C. Las muestras se utilizaron en un plazo de 2 meses para garantizar que no hubiera degradación.
- 10 Para la detección de GS, las células fijadas se sondaron con un anticuerpo primario contra GS (anti-GS de conejo, ab49873-00, Abcam, Cambridge, Reino Unido usado a razón de 5 µg/mL) y luego se usó un anticuerpo secundario, marcado, contra el primario como el anticuerpo de detección (anti-Conejo-APC, 111-136-144, Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, EE. UU., usado a razón de 2,5 µg/mL).
- 15 Para teñir las células, se lavaron 2 x 10⁶ células en metanol al 70%/PBS (es decir, 1 mL de la muestra anterior) dos veces con dPBS y luego las células se resuspendieron en el conjugado primario diluido. Las células se incubaron en hielo durante 30 minutos y luego se lavaron dos veces con dPBS. Las células se resuspendieron luego en el conjugado marcado con fluorescencia diluida y se incubaron en la oscuridad sobre hielo durante 30 minutos.
- Para los controles no teñidos, las células se sometieron al mismo proceso pero se usó PBS en lugar de los dos anticuerpos. Para los controles solo secundarios, el anticuerpo primario se sustituyó con PBS, pero las células se tiñeron con el anticuerpo secundario como se describió.
- La citometría de flujo se realizó en el FACSCalibur (Becton Dickinson) utilizando métodos estándar.
- Ejemplo 2: Construcción de líneas celulares CHO que expresan EBNA-1 o EBNA-1/GS
- 20 Se sabe que en las células HEK-293-EBNA, la interacción de EBNA-1 y *oriP* conduce a un aumento de los títulos de producto. Para investigar si se observó el mismo efecto en las células CHO, se creó una línea celular CHO, que expresaba de forma constitutiva EBNA-1.
- Para investigar si había una ventaja metabólica observada en la transfección transitoria utilizando una célula huésped, que expresa GS, se creó una línea CHO que expresaba GS y EBNA-1.
- 25 a) Transfección de células CHO con pmCEP4 para introducir el gen de EBNA-1 o cotransfección para introducir los genes de EBNA-1 y GS.
- Para producir una línea celular CHO que expresaba de forma estable solo EBNA-1, las células CHO se transfectaron con el plásmido pmCEP4. Después de permitir que las células se recuperaran durante la noche, se agregó la selección de higromicina a 400 µg/mL.
- 30 Para producir una línea celular CHO, que expresaba de forma estable tanto EBNA-1 como GS, las células CHO se cotransfectaron con pmCEP4 y pSI-GS en una proporción de 3:1. Después de permitir que las células se recuperaran durante la noche, se agregó la selección de MSX a 50 µM. Para investigar el papel de la selección, las células se seleccionaron con MSX 50 µM solo o con MSX 50 µM y 200 µg/mL de Higromicina en combinación. Para líneas celulares de selección doble, se agregó la selección de higromicina después de 2 semanas bajo la selección de MSX.
- 35 Después de 3-4 semanas, se identificaron colonias individuales.
- Se expandieron veinte colonias individuales para la transfección de CHO-EBNA-1, 20 colonias individuales para la transfección seleccionada de CHO-EBNA-1/GS MSX y 10 colonias individuales para la transfección de doble selección CHO-EBNA-1/GS a placas de 24 pozos. Después de un pase, las células se transfirieron a matraces de cultivo de células T25 (WorldWide Medical Products, Inc., Hamilton, New Jersey, EE. UU.) y después de un pase adicional se expandieron para agitar los cultivos. Entonces las células se mantuvieron rutinariamente en cultivos de agitación.
- 40 b) Selección de transfecciones para un huésped adecuado para la producción transitoria de proteínas
- Después de cuatro a cinco subcultivos en matraces Erlenmeyer, las células del subcultivo continuo se transfectaron transitoriamente como se describe en la sección de materiales y métodos. Los sobrenadantes de crecimiento excesivo se analizaron para determinar la expresión del anticuerpo expresado de forma transitoria mediante ELISA como se describió.
- 45 Las líneas celulares con la productividad más alta por transfección transitoria se identificaron para cada método de transfección y selección.
- 50 El mejor transfectante individual fue G22, de la transfección CHO-EBNA-1/GS, seleccionado solo con MSX, con un título de 47 mg/L. De la transfección equivalente que se seleccionó con MSX e higromicina, el productor más alto fue GH5, con alrededor de 41 mg/L.

El mejor transfectante de la transfección de CHO-EBNA-1 fue C1, con un título de 28 mg/L, con un número de transfectantes que alcanzaron títulos similares. La Figura 7 muestra la distribución de transfectantes de la transfección de células CHO con EBNA-1, seleccionadas con higromicina. La línea celular de mayor expresión fue C1, con un título de 28 mg/L.

5 A partir de estos datos, se aislaron las líneas celulares de expresión más alta de transfectantes que expresaban GS y EBNA-1.

d) Análisis de transferencia Western de líneas celulares con alta eficacia de expresión transitoria para confirmar la presencia de EBNA-1.

10 Con el fin de confirmar que las líneas celulares de alta expresión están expresando establemente la proteína EBNA-1, los extractos celulares se sondaron mediante transferencia Western usando anticuerpo anti-EBNA-1 como se describe en el Ejemplo 1. Extractos celulares de CHO-EBNA-1 y las líneas celulares CHO-EBNA-1/GS mostraron una banda positiva que migra conjuntamente con la proteína EBNA-1 (Autogen Bioclear UK Ltd, Calne, Wiltshire, Reino Unido. Número de catálogo: 10-523-001). En contraste, la línea de células huésped CHO de tipo silvestre no mostró una banda detectable. Esto se muestra en la Figura 6.

15 **Ejemplo 3: Efecto de la transfección de GS en la línea celular CHO-EBNA-1 (C1)**

Para confirmar la posible ventaja metabólica de la sobreexpresión de GS en una línea celular estable CHO-EBNA, solo se transfectó una línea celular CHO transfectada de manera estable con EBNA-1 con el gen de GS.

20 Para eliminar la posibilidad de que una mejora en la expresión pueda atribuirse al aislamiento de un clon de alta expresión de la población heterogénea C1, también se llevó a cabo una clonación por dilución limitada de la línea celular parental C1.

25 La línea celular CHO-EBNA C1 se transfectó por electroporación con el gen de GS transportado en el plásmido pSI-GS. Las células se sembraron en placas de 96 pozos con selección de MSX e higromicina. Para limitar la clonación por dilución de la línea celular CHO-EBNA C1, las células se colocaron en placas de 96 pozos a bajas concentraciones celulares para asegurar una alta probabilidad de derivar líneas celulares monoclonales. Después de tres semanas, se identificaron 100 colonias tanto de las transfecciones como de la clonación por dilución para un análisis adicional. Las células se agruparon en frascos T, donde se evaluó la productividad de las 200 líneas celulares en la transfección transitoria de constructos de anticuerpos.

30 El análisis de la concentración de IgG en los sobrenadantes de cultivo se realizó usando el sistema Octet. Las líneas celulares y los clones de dilución se clasificaron según su productividad y las células principales de cada una se agruparon para agitar los cultivos en matraz. La productividad de estas líneas celulares se evaluó nuevamente en la transfección transitoria de constructos de expresión de anticuerpos. Los datos para este conjunto de transfecciones se muestran en la Figura 8. La transfección del gen de GS en los fondos de CHO-EBNA confiere mayores niveles de expresión de anticuerpos en la transfección transitoria en comparación con CHO-EBNA-1 solo. En promedio, se observa un aumento de aproximadamente 2,2 veces en la productividad. La clonación de la línea celular CHO-EBNA 35 mostró poca mejora en la productividad con respecto a la línea celular original de los padres.

40 La Figura 7 muestra la distribución de los títulos de recolección de los 15 clones de la clonación de dilución limitante de C1 y los 20 transfectantes de la transfección de C1 con el gen de GS. Para comparación, se muestra la productividad del progenitor C1 (población heterogénea). La barra muestra el título medio de la población, mientras que los puntos muestran la distribución de los títulos dentro de la población. Para el C1 transfectado con GS, la media es significativamente más alta que el progenitor C1 o los clones de dilución C1 y la distribución de los transfectantes muestra un cambio en la población hacia niveles de expresión más altos. Dado que la única diferencia entre las poblaciones es que los transfectantes contienen y se seleccionan para el gen de GS, la marcada mejora en el título puede atribuirse a la coexpresión estable de GS en las líneas celulares que expresan EBNA-1.

Ejemplo 4: Evaluación de la expresión de anticuerpos en líneas celulares CHO-EBNA/GS y CHO-EBNA

45 Se crearon diferentes líneas celulares CHO estables como líneas celulares huésped para la expresión transitoria de proteína recombinante. Son los siguientes:

Línea celular C1: transfección de EBNA-1 solamente, selección con higromicina

Línea celular G22: cotransfección de constructos de EBNA-1 y GS, solo selección con MSX

Línea celular GH5: cotransfección de constructos de EBNA-1 y GS, selección con MSX e higromicina

50 Línea celular C1-GS: transfección secuencial de constructos de EBNA-1 y GS, selección con MSX e higromicina

Para confirmar el efecto beneficioso de la coexpresión estable de GS con EBNA-1 para la expresión transitoria de anticuerpos en líneas celulares CHO con respecto a CHO de control (sin EBNA-1 o GS) y líneas celulares CHO EBNA-1, se realizaron transfecciones transitorias con un panel de anticuerpos. Tres constructos de anticuerpos

diferentes MAb-A (IgG γ 1, λ) MAb-B (IgG γ 2, λ) y MAb-C (IgG γ 1, λ) se transfectaron transitoriamente en estas líneas celulares.

Los sobrenadantes de las transfecciones cultivados y clarificados se analizaron para determinar el anticuerpo expresado por HPLC con Proteína A.

5 Para las tres moléculas de anticuerpos, la coexpresión estable de GS con EBNA-1 en la línea celular huésped (G22, GH5 o C1-GS), dio como resultado un aumento en los niveles de producción de anticuerpos en relación con la expresión en la línea celular huésped (CHO tipo silvestre) o línea de células huésped que expresan EBNA-1 solamente (C1).

10 Entre los diferentes anticuerpos expresados hay, como se espera, diferentes niveles máximos de anticuerpos expresados, pero en todos los ejemplos, la coexpresión estable de GS y EBNA-1 conduce a anticuerpos expresados elevados.

15 La Figura 8 muestra la expresión de tres anticuerpos diferentes (MAb-A, B y C) de diferentes líneas celulares huésped CHO. Estas líneas celulares incluyen líneas celulares CHO estables que expresan solo EBNA-1 o EBNA-1 y GS (C1, G22, GH5 y C1-GS). Se incluyó CHO de tipo silvestre (sin EBNA-1 o GS) como control. Las líneas celulares se cotransfectaron transitoriamente con constructos de expresión de cadena ligera y cadena pesada para los anticuerpos apropiados. Se permitió que los cultivos crecieran en exceso y luego se analizaron los sobrenadantes de cultivo clarificados mediante HPLC con Proteína A para determinar la concentración del anticuerpo producido. Consistentemente para los tres anticuerpos expresados, la coexpresión estable tanto de EBNA-1 como de GS condujo a una mayor expresión transitoria del anticuerpo en estas líneas celulares en relación con las células huésped que expresan de manera estable solo EBNA-1 o bien EBNA-1 o GS.

Ejemplo 5: Caracterización de células CHO transfectadas con EBNA-1 y EBNA-1/GS

25 Con el fin de confirmar que los genes de EBNA-1 y GS transfectados se estaban expresando y la expresión de estos genes se correlacionaba con la expresión transitoria aumentada, las líneas celulares huésped transfectadas de manera estable, C1, G22 y C1-GS (y las células CHO WT y de control) se caracterizaron por PCR cuantitativa de transcriptasa inversa (Q-RT-PCR) para analizar la expresión de ARN de estos genes.

En primer lugar, el ARN libre de ADN genómico contaminante se preparó a partir de alícuotas de 3×10^6 células usando un kit de extracción Qiagen RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania) según las instrucciones del kit.

30 Brevemente, las células se lisan en un regulador que contiene tiocianato de guanidina, se agrega etanol y se agrega la muestra a una columna de membrana basada en sílice donde el ARN se une a la membrana, los contaminantes se lavan y el ARN purificado se eluye con agua.

En segundo lugar, se produjo ADNc tomando 500 ng de ARN y realizando la transcripción inversa (RT). Las muestras de ARN en un volumen de reacción de 50 μ l con oligo d(T) y cebadores hexámeros aleatorios se sometieron a la transcripción inversa utilizando la transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen Life Technologies, Rockville, MD) según las instrucciones del kit.

35 Para los conjuntos de cebadores de Q-RT-PCR (directo, inverso y sonda) específicos para los genes de EBNA-1 y GS se diseñaron para un análisis de Q-RT-PCR utilizando un sistema de PCR rápido en tiempo real ABI Prism 7900HT^{MR} (Applied Biosystems (Life Technologies), Carlsbad, California, EE. UU.).

Cebador/Sonda:	Secuencia (5' a 3'):
Cebador directo de PCR de GS	AGCCTATGGCAGGGATATCGT (SEQ ID NO: 11)
Cebador inverso de PCR de GS	CCTGTAATCTTGACCCCAGC (SEQ ID NO: 12)
Sonda del ensayo de GS	AGGCTCACTACCGCGCCTGCTTG (SEQ ID NO: 13)
Cebador directo de PCR de EBNA-1	GGATGCGATTAAGGACCTTGTT (SEQ ID NO: 14)
Cebador inverso de PCR de EBNA-1	CGTCAAAGCTGCACACAGTCA (SEQ ID NO: 15)

Cebador/Sonda:	Secuencia (5' a 3'):
Sonda de ensayo de EBNA-1	TGACAAAGCCCGCTCCTACCTGCA (SEQ ID NO: 16)

NB: Se realizó un ensayo de GAPDH específico de CHO (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) para permitir la normalización de los datos.

5 Los conjuntos de ADNc (reacciones de RT de las muestras de ARN) junto con ningún control de RT (para controlar el traspaso de cualquier ADN genómico) se analizaron con los ensayos de EBNA-1, GS y CHO GAPDH. Se analizaron aproximadamente 25 ng de cada reacción de RT por pozo de Q-PCR, y cada muestra se analizó por duplicado. Las reacciones se configuraron según el protocolo de mezcla maestra de PCR universal TaqMan^{MR} (Applied Biosystems). Todas las reacciones se sometieron a un ciclo térmico de la siguiente manera: 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto. Los

10 datos se recopilaron y analizaron con el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7900^{MR} (Applied Biosystems). Los niveles relativos de ARNm se determinaron frente a una curva estándar creada a partir de una dilución en serie de la secuencia objetivo en un ADN de plásmido, y se expresaron como el número de copias del gen objetivo expresado por nanogramo de ARN (normalizado contra CHO-GAPDH).

15 La Tabla 1 muestra los niveles relativos de ARNm para EBNA-1 y GS en las líneas celulares CHO WT, C1, G22 y C1-GS.

	ARNm de EBNA-1	ARNm de GS
CHO-WT	0,0	0,0
C1	7,5	7,5
G22	33,1	1.022,9
C1-GS	7,7	1.687,5

Los niveles de expresión para los genes de EBNA-1 y GS se calcularon como el número de copias del gen objetivo expresado por picogramo de ADNc detectado por el ensayo de normalización de CHO GAPDH.

20 El análisis confirma que no hay un nivel detectable de expresión de EBNA en las células huésped, pero el gen de EBNA-1 se expresa en las líneas celulares en las que se transfeció. La expresión de GS dentro de las células huésped no se detecta, y dentro de las células C1 en un nivel muy bajo. Cuando GS se transfecta en líneas celulares (G22 y C1-GS), los niveles de ARNm son 100-200 veces mayores que en la línea celular C1.

Ejemplo 6: Construcción de otras líneas celulares CHO que expresan EBNA-1 o EBNA-1/GS

25 Se realizó una segunda ronda de transfecciones para confirmar la incidencia de altos productores de la cotransfección de EBNA/GS.

a) Transfección de células CHO con pmCEP4 para introducir el gen de EBNA-1 o cotransfección para introducir los genes de EBNA-1 y GS.

30 Para producir una línea celular de CHO que exprese de manera estable solo EBNA-1, las células CHO se transfectaron con el plásmido pmCEP4. Después de permitir que las células se recuperaran durante la noche, se agregó la selección de higromicina a razón de 400 µg/mL.

Para producir una línea celular CHO que expresaba de manera estable tanto EBNA-1 como GS, las células CHO se cotransfectaron con pmCEP4 y pSI-GS en una proporción de 3:1. Después de permitir que las células se recuperaran durante la noche, se añadió la selección. Las células se seleccionaron con 50 µM de MSX y luego de dos semanas bajo la selección de MSX, se añadió la selección de higromicina a razón de 200 µg/mL.

35 Después de 3-4 semanas, se identificaron colonias individuales.

Se expandieron cuarenta y ocho colonias individuales para la transfección CHO-EBNA-1, y 48 colonias individuales para la transfección CHO-EBNA-1/GS de selección doble, y se subcultivaron continuamente hasta que se mantuvieron rutinariamente en cultivos de agitación.

b) Selección de transfecciones para un huésped adecuado para la producción transitoria de proteínas

Después de dos a tres subcultivos en matraces Erlenmeyer, las células del subcultivo continuo se transfirieron a matraces de cultivo (tubos de centrifugado) y se transfectaron de forma transitoria como se describe en la sección de materiales y métodos. Los sobrenadantes de crecimiento excesivo se analizaron para determinar la expresión del anticuerpo expresado de forma transitoria mediante ELISA como se describe.

Las líneas celulares con la productividad más alta por transfección transitoria se identificaron para cada método de transfección y selección.

La Figura 9 muestra la distribución de transfectantes de la transfección de células CHO con EBNA-1, seleccionadas con higromicina. La línea celular de mayor expresión fue CEP27, con un título de 83 mg/L de MAb A.

La Figura 10 muestra la distribución de transfectantes de la transfección de células CHO con EBNA-1 y GS, seleccionadas con MSX e higromicina. La línea celular de mayor expresión fue CO16, con un título de 113 mg/L de MAb A.

La Figura 11 muestra una comparación de la propagación de títulos de cada población de transfectantes. A partir de estos datos, se aislaron las líneas celulares de expresión más alta de transfectantes que expresaban GS y EBNA-1. Existe cierta superposición entre los de expresión baja de la población cotransfectada y los productores elevados de la transfección con EBNA-1 solamente. Para determinar la importancia de las diferencias entre las poblaciones, se realizaron dos análisis. La comparación analítica de las dos poblaciones mediante una prueba t de dos colas muestra que la diferencia entre las poblaciones es altamente significativa ($P < 0,0001$). El ANOVA de dos vías muestra la significancia en la diferencia entre poblaciones ($P = 0,0066$) pero no dentro de las poblaciones ($P = 0,6719$) (Análisis realizado utilizando GraphPad Prism v5.01 para Windows, GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, EE. UU.).

d) Comparación de productores altos, medios y bajos de las transfecciones de EBNA-1 solamente y las transfecciones de EBNA-1/GS.

Para permitir una comparación adicional y más detallada de las diferencias en el nivel de expresión dentro y entre las poblaciones, se seleccionaron unos pocos transfectantes a lo largo del intervalo del título.

Para la transfección solo con EBNA-1, los transfectantes seleccionados fueron:

Transfectante	Título en la selección inicial (mg/L)
CEP27	83
CEP47	60
CEP12	24
CEP2	12
CEP9	12
CEP54	12
CEP35	8
CEP39	8
CEP40	8

Para la transfección de EBNA-1/GS, los transfectantes seleccionados fueron:

Transflectante	Título en la selección inicial (mg/L)
CO16	113
CO32	110
CO8	66
CO27	63
CO34	58
CO12	31
CO23	30
CO31	29
CO15	6
CO18	6
CO35	6

Los transflectantes en las tablas anteriores se reactivaron a partir de nitrógeno líquido y se subcultivaron continuamente en cultivos de agitación como se describe en el Ejemplo 1. Después de seis subcultivos, los sedimentos celulares se congelaron para transferencia Western y para QPCR, y las células se pasaron para un subcultivo adicional sin higromicina antes de transfectar transitoriamente con MAb A como se describe en el Ejemplo 1. Las células transfectadas se dejaron crecer en exceso durante 14 días antes de tomar muestras para la cuantificación. El anticuerpo secretado se cuantificó utilizando HPLC con Proteína A como se describe en el Ejemplo 1. Las Figuras 12 y 13 muestran los títulos de estas transfecciones transitorias. Se incluyó G22 como control de transfección positivo y para permitir la comparación entre los transflectantes seleccionados en cada ronda.

c) Análisis de transferencia Western de líneas celulares con alta eficacia de expresión transitoria para confirmar la presencia de EBNA-1.

Para determinar la expresión de la proteína EBNA-1 en células de expresión alta, media y baja, se sondearon extractos de células mediante transferencia Western utilizando un anticuerpo anti-EBNA-1 según el método descrito en el Ejemplo 1. Sin embargo, en este caso, el anticuerpo primario utilizado fue IgG1 anti-EBNA de ratón (Clon M5042521, Stratech Scientific Ltd, Suffolk, Reino Unido, número de catálogo 10-E40H, diluido a razón de 6 µg/mL en M-PBST). Los extractos celulares de los transflectantes CHO-EBNA-1 de alta expresión mostraron una banda positiva que migra conjuntamente con la proteína EBNA-1. Por el contrario, los transflectantes de baja expresión y la línea de células huésped CHO de tipo silvestre no mostraron una banda detectable. (Figuras 14 a 17). Estos resultados muestran que solo las células que expresan EBNA-1 son capaces de una alta expresión de anticuerpos transitorios.

Confirmación de la presencia de GS por citometría de flujo

Las cinco líneas celulares de mayor expresión del panel de células cotransfectadas de manera estable (CO8, CO16, CO23, CO27 y CO32) se analizaron mediante citometría de flujo para la expresión de GS.

Los controles fueron un derivado de inactivación de GS de la línea celular CATS (GSKO), el huésped de tipo silvestre CATS (CATS, para determinar los niveles de GS endógenos). Se determinó una línea base nula utilizando el huésped CATS solo con el anticuerpo secundario (control de CATS). Esto produjo el nivel de señal que se debió únicamente al fondo. Cada transflectante se comparó a su vez con los tres controles. Se incluyeron las líneas celulares C1 y G22 de la ronda anterior de selecciones; se sabe que C1 es negativo para GS endógeno y G22 es positivo, lo que permitió la comparación de las nuevas líneas celulares con estas muestras conocidas.

Para todas las líneas celulares de CO, los resultados de flujo indican cualitativamente que hay expresión de GS transfectada (Figura 18).

Caracterización cuantitativa por RT-PCR de células CHO transfectadas con EBNA-1 y EBNA-1/GS

Con el fin de confirmar que los genes de EBNA-1 y GS transfectados se estaban expresando y la expresión de estos genes se correlacionaba con la expresión transitoria aumentada, las líneas celulares huésped transfectadas de manera estable, tanto CEP solo como las líneas celulares cotransfectadas CEP/GS (y las células de control CAT-S CHO WT) se caracterizaron por qRT-PCR para analizar la expresión de ARN de estos genes. Los resultados se muestran en la Figura 19.

Se realizó el aislamiento de la síntesis total de ARN y ADNc de 9* CEP únicamente, cotransfección de 12* CEP/GS (incluye G22), las células CEP C1 únicamente (comparador de referencia interno) y las células de control CAT-S WT utilizando el kit TaqMan® Cells-to-CT^{MR} de ABI (Applied Biosystems (Life Technologies), Carlsbad, California, EE. UU.) (Realizado por Invitrogen como un servicio personalizado).

Detalles del kit TaqMan Cells-to-CT: Este kit permite a los investigadores realizar fácilmente análisis de expresión utilizando células cultivadas sin purificación de ARN. El kit incluye reactivos para la lisis celular y la preservación del ARN, la eliminación del ADN genómico y la transcripción inversa (RT). El kit también incluye la mezcla maestra de expresión génica TaqMan® para su uso en el posterior análisis de PCR en tiempo real. Suministrado por ABI (Applied Biosystems (Life Technologies), Carlsbad, California, EE. UU.).

Los cebadores y las sondas de Q-RT-PCR personalizados, específicos para los transcritos de EBNA-1 y GS se diseñaron utilizando el software Primer Express v3.0 (ABI), y se ordenaron a ABI (Applied Biosystems (Life Technologies), Carlsbad, California, EE.UU.).

Las muestras se seleccionaron en pozos por triplicado utilizando los conjuntos de cebadores/sondas específicos de EBNA-1 y GS. Las muestras de ADNc también se seleccionaron mediante análisis qRT-PCR con un gen de mantenimiento de control GAPDH para permitir la normalización de los datos. Los datos fueron recopilados y analizados por el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7900 (Applied Biosystems).

Los datos de Ct tanto para el ARNm de mantenimiento y de EBNA-1 y GS se analizaron utilizando un método de $\Delta\Delta C_t$ que normaliza los datos primero contra el gen de mantenimiento y se realiza un análisis comparativo en relación con la línea celular C1 CEP únicamente (es decir, esta célula se establece arbitrariamente como línea de base tanto para la expresión de GS como de EBNA-1, por lo que el valor de $\Delta\Delta C_t$ es 1.000 tanto para el ARN de GS como de EBNA-1).

Referencias

1. Yates, J.L., Warren, N., Reisman, D. y Sugden, B, A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984. 81: páginas 3806-3810.
2. Yates, J.L., Warren, N. y Sugden, B., Plasmids derived from Epstein-Barr virus replicate stably in a variety of mammalian cells. *Nature (London)*, 1985. 313: páginas 812-815.
3. Chittenden, T., Lupton, S. y Levine, A., J., Functional limits of OriP, the Epstein-Barr virus plasmid origin of replication. *Journal of Virology*, 1989. 63: página 3016-3025.
4. Kirchmaier, A.L., y Sugden, B., Plasmid maintenance of derivatives of OriP of Epstein-Barr virus. *Journal of Virology*, 1995. 69(2): páginas 1280-1283.
5. Saeki, Y., Wataya-Kaneda, M., Tanaka, K. y Kaneda, Y., Sustained transgene expression in vitro and in vivo using an Epstein-Barr virus replicon vector system combined with HVJ liposomes. *Gene Therapy*, 1998. 5: páginas 1031-1037.
6. Cachianes, G., Ho, C., Weber, R.F., Williams, S.R., Goeddel, D.V. y Leung, D.W., Epstein-Barr virus-derived vectors for transient and stable expression of recombinant proteins. *Biotechniques*, 1993. 15(2): páginas 255-259.
7. Längle-Rouault, F., Patzel, V., Benavente, A., Taillez, M., Silvestre, N., Bompard, A., Sczakiel, G., Jacobs, E. y Rittner, K., Up to 100-fold increase of apparent gene expression in the presence of Epstein-Barr virus OriP sequences and EBNA-1: implications of the nuclear import of plasmids. *Journal of Virology*, 1998. 72(7): páginas 6181-6185.
8. Tomiyasu, K., Satoh, E., Oda, Y., Nishizaki, K., Kondo, M., Imanishi, J. and Mazda, O., Gene transfer in vitro and in vivo with Epstein-Barr virus-based episomal vector results in markedly high transient expression in rodent cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998. 253: páginas 733-738.
9. Krysan, P.K., y Calos, M. P., Epstein-Barr virus-based vectors that replicate in rodent cells. *Gene*, 1993. 136: páginas 137-143.

10. Mizuguchi, H., Hosono, H. y Hayakawa, T., Long-term replication of Epstein-Barr virus-derived episomal vectors in the rodent cells. *FEBS Letters*, 2000. 472: páginas 173-178.
11. Durocher, Y., Perret, S. y Kamen, A., High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Research*, 2002. 30(2): página E9.
- 5 12. Baldi, L., Muller, N., Picasso, S., Jacquet, R., Girard, P., Thanh, H. P., Derow, E. y Wurm, F. M., Transient gene expression in suspension HEK-293 cells: Application to large-scale protein production. *Biotechnology Progress*, 2005. 21: páginas 148-153.
- 10 13. Baldi, L., Hacker, D. L., Adam, M. y Wurm, F.M., Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. *Biotechnology Letters*, 2007. 29: páginas 677-684.
14. Meissner, P., Pick, H., Kulangra, A., Chatellard, P., Freidrich, K. y Wurm, F.M., Transient gene expression: recombinant protein production with suspension-adapted HEK293-EBNA cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000. 75(2): páginas 197-203.
- 15 15. Prett, J., Daramola, L., Cohen, M., Davies, S., Field, R. y Hatton, D., Rapid production of IgG from ScFv (Poster). *Second European BioTechnology Workshop*, Suiza, 2002.
16. Derouazi, M., Girard, P., Van Tilbourgh, F., Iglesias, K., Muller, N., Bertschinger, M y Wurm, F.M., Serum-free large-scale transient transfection of CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004. 87(4): páginas 537-545.
- 20 17. Muller, N., Derouazi, M., Van Tilborgh, F., Wulhfard, S., Hacker, D.L., Jordan, M y Wurm, F.M., Scalable transient gene expression in Chinese hamster ovary cells in instrumented and non-instrumented cultivation systems. *Biotechnology Letters*, 2007. 29: páginas 703-711.
18. Liu, C., Dalby, B., Chen, W., Kilzer, J.M. y Chiou, H.C., Transient transfection for high-level recombinant protein production in suspension cultured mammalian cells. *Molecular Biotechnology*, 2008. 39: páginas 141-153.
19. Kunaparaju, R., Liao, M y Sunstrom, N.-A., Epi-CHO, an episomal expression system for recombinant protein production in CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005. 91(6): páginas 670-677.
- 25 20. Birch, J.R., Mainwaring, D.O. y Racher, A.J., Use of the glutamine synthetase (GS) expression system for the rapid development of highly productive mammalian cell processes. *Modern Biopharmaceuticals* (Ed. Knäblein) (c) 2005 Wiley-VCH Verlag GmbH & co. KGaA, Weinheim, 2005.
21. Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 3ra edición, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 30 22. Ausubel et al. eds., *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 4a edición 1999.
23. Pak et al., *Cytotechnology* 22 (1996) 139-146.
24. Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., página 726, 1988.
- 35 25. Köhler y Milstein, *Nature*, 256: 495-497, 1975.
26. Holliger & Hudson (2005) *Nature Biotechnology* 23(9): 1126-1136.
27. Persic, L., Roberts, A., Wilton, J., Cattaneo, A., Bradbury, A. Hoogenboon, H. R. *Gene* 187 (1997) 9-18.
28. Aiyar, A., Aras, S., Washington, A., Singh, G. y Luftig, R. B. (2009). *Virology Journal*. 6: 29.
- Listado de secuencias
- 40 <110> MedImmune Limited
- <120> CELLS FOR TRANSIENT EXPRESSION AND USES THEREOF
- <130> MED0511.PCT
- <150> US61/242,478
- < 151> 2009-09-15
- 45 <160> 16

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

< 211> 641

< 212> protein

5 < 213> Human herpesvirus 4 type 1 (Epstein-Barr virus type 1)

<220>

< 223> EBNA-1

<400> 1

MSDEGPGTGP	GNGLGEEKGDT	SGPEGSGGSG	PQRRGGDNHG	RGRGRGRGRG	GGRPGAPGGS	60
GSGPRHRDGV	RRPQKRPSCI	GCKGTHGGTG	AGAGAGGAGA	GGAGAGGGAG	AGGGAGGAGG	120
AGGAGAGGGA	GAGGGAGGAG	GAGAGGGAGA	GGGAGGAGAG	GGAGGAGGAG	AGGGAGAGGG	180
AGGAGAGGGA	GGAGGAGAGG	GAGAGGAGGA	GGAGAGGAGA	GGGAGGAGGA	GAGGAGAGGA	240
GAGGAGAGGA	GGAGAGGAGG	AGAGGAGGAG	AGGGAGGAGA	GGGAGGAGAG	GAGGAGAGGA	300
GGAGAGGAGG	AGAGGGAGAG	GAGAGGGGRG	RGGSGGRGRG	GSGGRGRGGS	GGRRGRGRER	360
ARGGSRERAR	GRGRGRGEKR	PRSPSSQSSS	SGSPRRRPPP	GRRPFFHPVG	EADYFEYHQE	420
GGPDGEPDVP	PGAIEQGPAD	DPGEGPSTGP	RGQGDGGRRK	KGWFGKHRG	QGGSNPKFEN	480
IAEGLRALLA	RSHVERTTDE	GTWVAGVFVY	GGSKTSLYNL	RRGTALAIPQ	CRLTPLSRLP	540
FGMAPGPGPQ	PGPLRESIVC	YFMVFLQTHI	FAEVLKDAIK	DLVMTKPAPT	CNIRVTVCSF	600
DDGVDLPPWF	PPMVEGAAAE	GDDGDDGDEG	GDGDEGEEGQ	E		641

10 <210> 2

< 211> 1122

< 212> DNA

< 213> Hamster

<220>

15 < 223> Glutamine synthetase

<400> 2

atggccacct	cagcaagttc	ccacttgaac	aaaaacatca	agcaaatgta	cttgtgcctg	60
ccccagggtg	agaaagtcca	agccatgtat	atctgggttg	atggtactgg	agaaggactg	120

ES 2 699 718 T3

```

cgctgcaaaa cccgcaccct ggactgtgag cccaagtgtg tagaagagtt acctgagtgg      180
aattttgatg gctctagtag ttttcagtct gaggggtcca acagtgacat gtatctcagc      240
cctgttgcca tgtttcggga ccccttccgc agagatccca acaagctggg gttctgtgaa      300
gttttcaagt acaaccggaa gcctgcagag accaatttaa ggcactcgtg taaacggata      360
atggacatgg tgagcaacca gcaacctcgg tttggaatgg aacaggagta tactctgatg      420
ggaacagatg ggcacccttt tggttggcct tccaatggct ttcttgggcc ccaaggtccg      480
tattactgtg gtgtgggggc agacaaagcc tatggcaggg atatcgtgga ggctcactac      540
cgcgcctgct tgtatgctgg ggtcaagatt acaggaacaa atgctgaggt catgcctgcc      600
cagtgggaat tccaaatagg accctgtgaa ggaatccgca tgggagatca tctctgggtg      660
gcccgtttca tcttgcacgc agtatgtgaa gactttgggg taatagcaac ctttgacccc      720
aagcccattc ctgggaactg gaatgggtgca ggctgccata ccaactttag caccaaggcc      780
atgcgggagg agaatggtct gaagcacatc gaggaggcca tcgagaaact aagcaagcgg      840
caccggtacc acattcgagc ctacgatccc aagggggggc tggacaatgc ccgtcgtctg      900
actgggttcc acgaaacgtc caacatcaac gacttttctg ctggtgtcgc caatcgagc      960
gccagcatcc gcattccccg gactgtcggc caggagaaga aaggttactt tgaagaccgc     1020
cgccctctg ccaattgtga cccctttgca gtgacagaag ccacgtccg cacatgcctt     1080
ctcaatgaga ctggcgacga gcccttccaa taaaaaact aa                          1122

```

<210> 3

< 211> 354

< 212> DNA

5 < 213> Homo sapiens

<220>

< 223> Antibody A VH

<400> 3

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccaggtc     120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggttag cacatactac     180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat     240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc aagagatcta     300
attcacgggg tgacgcggaa ctggggccag gggacactgg tcaccgtctc ctca              354

```

10 <210> 4

< 211> 336

< 212> DNA

< 213> Homo sapiens

<220>

15 < 223> Antibody A VL

ES 2 699 718 T3

<400> 4

aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tgggagtctc cggggaagac ggtaaccatc	60
tcctgcaccc gcagcagtgg cagccttgcc aactactatg tgcagtggta ccaacagcgc	120
ccgggcagtt cccccacat tgtgatcttt gcgaataacc aaagaccctc tggggctcct	180
gatcgattct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga	240
ctgaagactg aggacgaggg tgactactac tgccagacgt acgacccta cagcgtggtg	300
ttcggcggag ggaccaagct ggaccaagct gaccgtcta ggtgag	336

<210> 5

< 211> 363

5 < 212> DNA

< 213> Homo sapiens

<220>

< 223> Antibody C VH

<400> 5

gagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaaac ctggggccac agtgaaaatc	60
tcctgcaagg tttatggata ctttttcacc gactacaaca tttactgggt gcgacaggcc	120
cctggaaaag ggcttgagt gatgggactt attgatcctg acaatgggtga gacattttac	180
gcagagaagt tccagggcag agccaccatg accgcggaca cgtcttcaga cagagcctac	240
atggaattga gcagcctgag atttgaggac acggccgtgt attattgtgc aacagtgatg	300
gggaagtgga tcaagggggg ctatgactac tggggccggg gcaccctggt caccgtctcc	360

10	tca	363
----	-----	-----

<210> 6

< 211> 333

< 212> DNA

< 213> Homo sapiens

15 <220>

< 223> Antibody C VL

<400> 6

cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
tcctgcactg ggagcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtacactg gtatcagcaa	120
cttcaggaa cagccccaa actcctcatc tatgataatt tcaatcggcc ctgaggggtc	180
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
caggctgaag atgaggctga ttattattgc cagtctatg acagccccac cctcacctcc	300
cccttcggaa ccggggacaa gctgaccgtc cta	333

<210> 7

20 < 211> 366

< 212> DNA

< 213> Homo sapiens

<220>

< 223> Antibody D VH

5

<400> 7

cagggtccagc	tggtgcagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcctgcaagg	cttctgggta	cacctttaca	aattatggtc	tcagctgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggatgg	atcagcgcta	ataatggcga	cacaaattat	180
ggacaggaat	tccagggcag	agtcaccatg	accacagata	catccacgag	cacagcctac	240
atggagttga	ggagcctgag	atctgacgac	acggccggtt	attactgtgc	gagagactcc	300
agcagcagct	gggcccgtg	gtttttcgat	ctctggggcc	gggggacact	ggtcaccgtc	360
tcctca						366

<210> 8

< 211> 327

< 212> DNA

10

< 213> Homo sapiens

<220>

< 223> Antibody D VL

<400> 8

tcctatgtgc	tgactcagcc	accctcggtg	tcagtggccc	caggaaagac	ggccaggatt	60
acctgtgggg	gaaacatcat	tggaagtaaa	cttgtacact	ggtagcagca	gaagccaggc	120
caggcccctg	tgctgggtcat	ctatgatgat	ggcgaccggc	cctcagggat	ccctgagcga	180
ttctctggct	ccaactctgg	gaacacggcc	accctgacca	tcagcagggt	cgaggccggg	240
gatgaggccg	actattattg	tcagggtgtg	gatactggta	gtgatcccgt	ggatttcggc	300
ggagggacca	agctgaccgt	cctaggt				327

15

<210> 9

< 211> 378

< 212> DNA

< 213> Artificial Sequence

<220>

20

< 223> VH chain

<400> 9

ES 2 699 718 T3

	gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct	120
	ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac	180
	gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat	240
	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaacccttg	300
	tactactatg atgaacaata tggcgtagta tatgatgctt ttgtctgggg ccgggggaca	360
	ctggtcaccg tctcctca	378
	<210> 10	
	< 211> 336	
5	< 212> DNA	
	< 213> Artificial Sequence	
	<220>	
	< 223> VL chain	
	<400> 10	
	cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc	60
	tcctgcactg ggagcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtacactg gtaccagcag	120
	cttcaggga cagccccaa gctcctcatc tatggtgaca cccatcggcc ctcaggggtc	180
	cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc	240
	caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acaccgtacg tctccaccat	300
10	gtgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc ctaggt	336
	<210> 11	
	< 211> 21	
	< 212> DNA	
	< 213> Artificial Sequence	
15	<220>	
	< 223> primer	
	<400> 11	
	agcctatggc agggatatcg t	21
	<210> 12	
20	< 211> 20	
	< 212> DNA	
	< 213> Artificial Sequence	
	<220>	
	< 223> primer	
25	<400> 12	
	cctgtaatct tgacccagc	20

<210> 13
 < 211> 23
 < 212> DNA
 < 213> Artificial Sequence
 5 <220>
 < 223> probe
 <400> 13
 aggctcacta ccgcgctgc ttg 23
 <210> 14
 10 < 211> 22
 < 212> DNA
 < 213> Artificial Sequence
 <220>
 < 223> primer
 15 <400> 14
 ggatgcgatt aaggacctg tt 22
 <210> 15
 < 211> 21
 < 212> DNA
 20 < 213> Artificial Sequence
 <220>
 < 223> primer
 <400> 15
 cgtcaaagct gcacacagtc a 21
 25 <210> 16
 < 211> 24
 < 212> DNA
 < 213> Artificial Sequence
 <220>
 30 < 223> probe
 <400> 16
 tgacaaagcc cgctcctacc tgca 24

REIVINDICACIONES

1. Una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) de expresión mejorada derivada de una línea celular progenitora, comprendiendo la línea celular de expresión mejorada ácido nucleico que codifica el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr o un derivado funcional, análogo o variante del mismo; y que además comprende:
5 (a) un ácido nucleico que codifica una glutamina sintetasa exógena;
(b) un ácido nucleico que codifica una glutamina sintetasa endógena, en el que la glutamina sintetasa endógena se dispone para tener una actividad enzimática mejorada y/o una expresión aumentada en relación con la línea celular parental en condiciones comparables mediante
(i) la adición de un promotor más fuerte en relación con un promotor GS endógeno;
10 (ii) la adición de un mejorador;
(iii) la adición de un mejorador más fuerte en relación con un mejorador de GS endógeno; y proporcionar copias adicionales del mejorador de GS endógeno; o
(iv) una combinación de tales métodos; o
(c) tanto (a) como (b),
15 en donde el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1) y la glutamina sintetasa (GS) exógena se transfectan establemente en la línea celular.
2. La línea celular CHO de expresión mejorada de la reivindicación 1, en la que el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1) y/o glutamina sintetasa (GS) se expresan de forma constitutiva en la línea celular.
20
3. La línea celular CHO con expresión mejorada de la reivindicación 1, en la que la línea celular tiene una glutamina sintetasa endógena (GS) mejorada y se transfecta de manera estable con el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1).
- 25 4. La línea celular CHO con expresión mejorada de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la línea celular comprende ácido nucleico que codifica tanto una glutamina sintetasa endógena como una glutamina sintetasa exógena.
- 30 5. La línea celular CHO de expresión mejorada de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la línea celular comprende además un ácido nucleico que codifica un polipéptido exógeno.
6. La línea celular de expresión mejorada de la reivindicación 5, en la que el ácido nucleico que codifica el polipéptido exógeno está localizado trans con relación al ácido nucleico que codifica EBNA-1 y/o el ácido nucleico que codifica GS.
35
7. La línea celular de expresión mejorada de la reivindicación 5 o 6, en la que el ácido nucleico que codifica el polipéptido exógeno codifica además una secuencia de unión a EBNA-1.
- 40 8. La línea celular CHO de expresión mejorada de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en la que el polipéptido exógeno es una cadena pesada de anticuerpo y/o una cadena ligera de anticuerpo, o un fragmento de las mismas.
9. La línea celular CHO de expresión aumentada de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en la que el polipéptido exógeno se selecciona de uno cualquiera del grupo que comprende profármaco, enzima, fragmento de enzima, inhibidor de enzima, activador de enzima, polipéptido biológicamente activo, proteína de erizo, proteína

morfogenética ósea, factor de crecimiento, eritropoyetina, trombopoyetina, G-CSF, interleuquina, interferón, inmunoglobulina y fragmento de inmunoglobulina, o combinaciones de los mismos.

- 5 10. La línea celular de expresión mejorada de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en la que el polipéptido exógeno no es glutamina sintetasa y/o EBNA-1.
11. La línea celular de expresión mejorada de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en la que el ácido nucleico que codifica el polipéptido exógeno es episomal.
- 10 12. La línea celular de expresión mejorada de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en la que se proporcionan uno o más marcadores de selección en el ácido nucleico que codifica el polipéptido exógeno y, opcionalmente, en el que los marcadores de selección no son ácido nucleico que codifica una glutamina sintetasa.
13. Un método para obtener una línea celular CHO de expresión mejorada a partir de una línea celular parental, que comprende:
 - 15 (a) proporcionar una línea celular parental; y
 - (b) transfectar de manera estable la línea celular parental con ácido nucleico que codifica el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr, o un derivado, análogo o variante del mismo; y
 - (c) transfectar de manera estable la línea celular parental con ácido nucleico exógeno que codifica una glutamina sintetasa; y
 - 20 (d) adaptar opcionalmente la línea celular para mejorar la expresión y/o la actividad enzimática de una glutamina sintetasa endógena.
14. El método de la reivindicación 13, en el que el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1) y/o la glutamina sintetasa (GS) se expresan de forma constitutiva en la línea celular.
- 25 15. El método de la reivindicación 13, en el que la línea celular se transfecta de manera estable con el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1) y se adapta para mejorar la expresión y/o la actividad enzimática de una glutamina sintetasa endógena.
- 30 16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que la línea celular se transfecta adicionalmente con ácido nucleico que codifica un polipéptido exógeno.
17. El método de la reivindicación 16, en el que el ácido nucleico que codifica el polipéptido exógeno está localizado trans con respecto al ácido nucleico que codifica EBNA-1 y/o el ácido nucleico que codifica GS.
- 35 18. El método de las reivindicaciones 16 o 17, en el que el ácido nucleico que codifica el polipéptido exógeno codifica además una secuencia de unión a EBNA-1.
19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que el polipéptido exógeno es una cadena pesada de anticuerpo y/o una cadena ligera de anticuerpo, o un fragmento de las mismas.
- 40 20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que el polipéptido exógeno se selecciona de uno cualquiera del grupo que comprende profármaco, enzima, fragmento de enzima, inhibidor de enzima, activador de enzima, polipéptido biológicamente activo, proteína de erizo, proteína morfogenética ósea, factor de crecimiento, eritropoyetina, trombopoyetina, G-CSF, interleuquina, interferón, inmunoglobulina y fragmento de inmunoglobulina, o combinaciones de los mismos.
- 45

21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, en el que el polipéptido exógeno no es glutamina sintetasa y/o EBNA-1.

5 22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, en el que el ácido nucleico que codifica el polipéptido exógeno es episomal.

10 23. El método de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22, en el que el ácido nucleico que codifica el polipéptido exógeno se selecciona mediante uno o más marcadores de selección y, opcionalmente, en el que los marcadores de selección no son ácido nucleico que codifica una glutamina sintetasa.

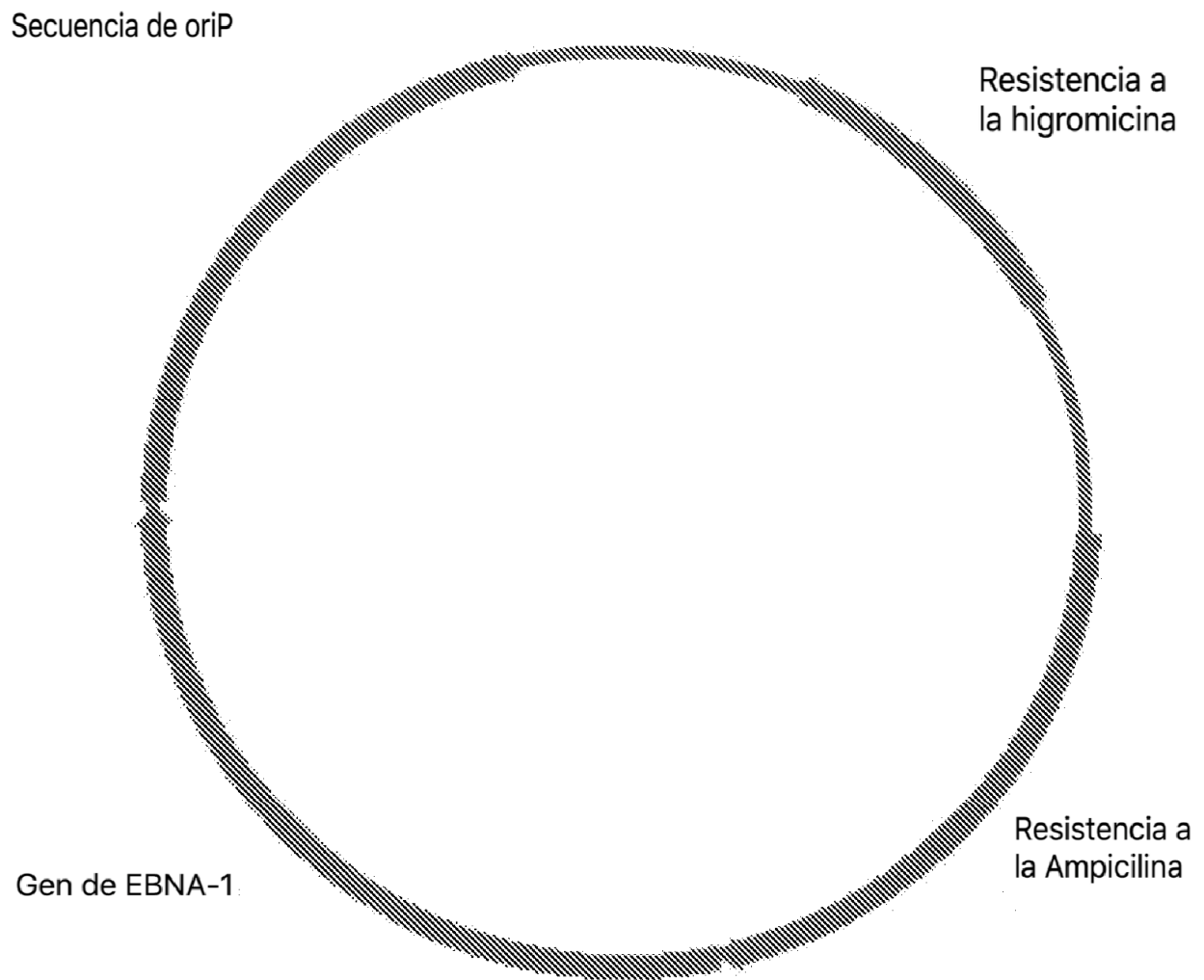


Figura 1

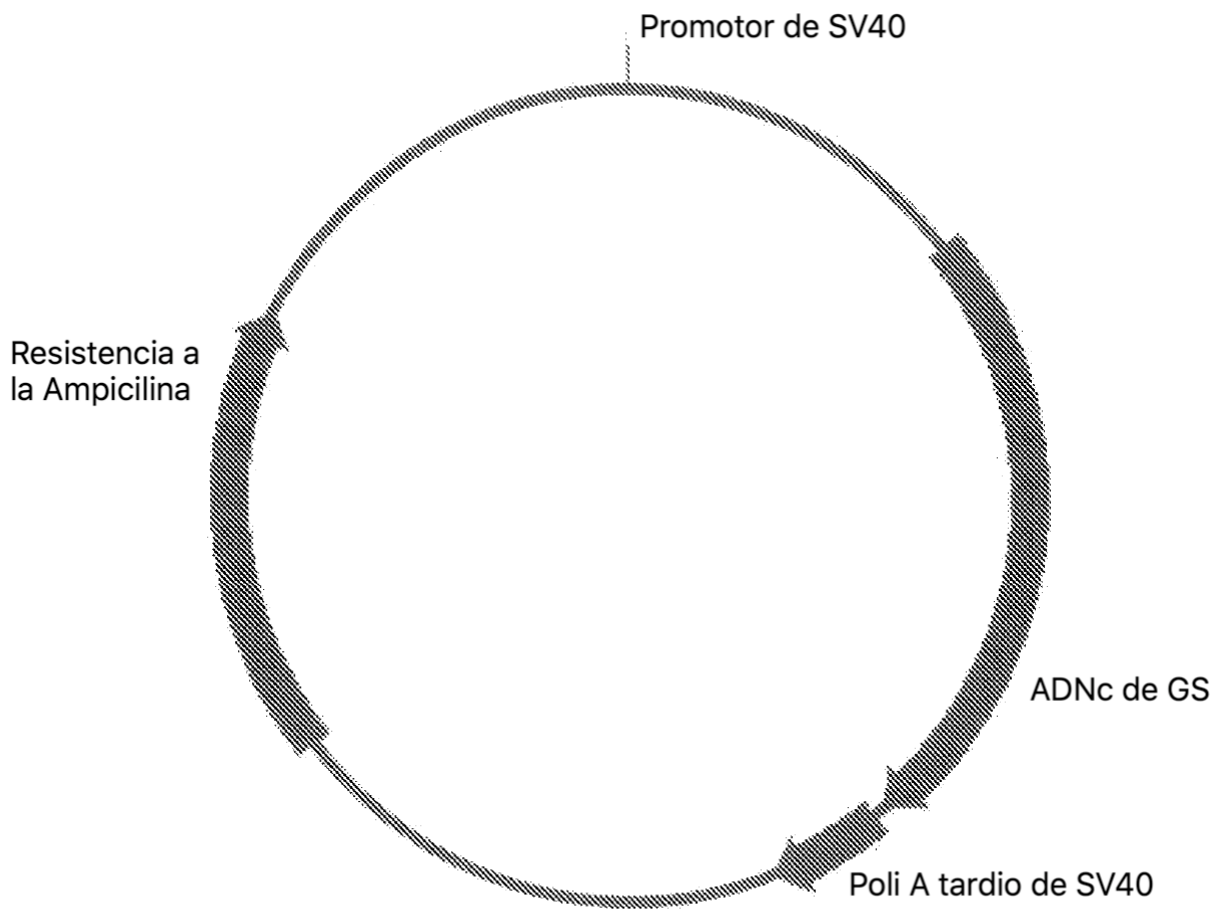


Figura 2

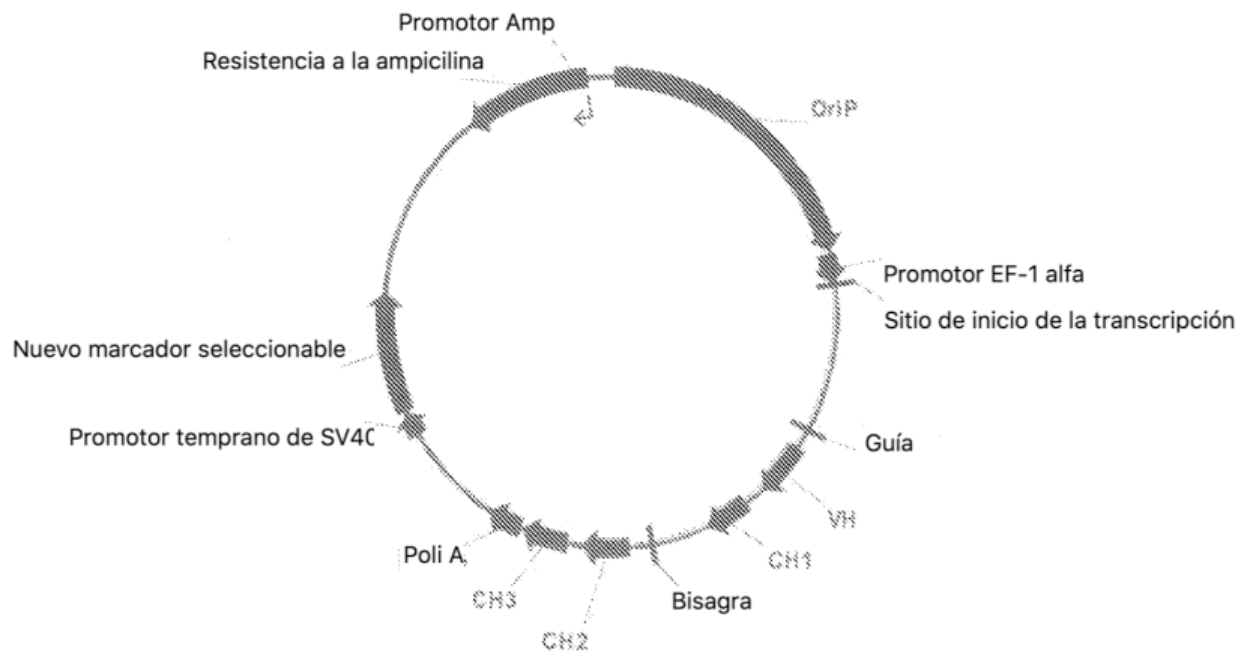


Figura 3

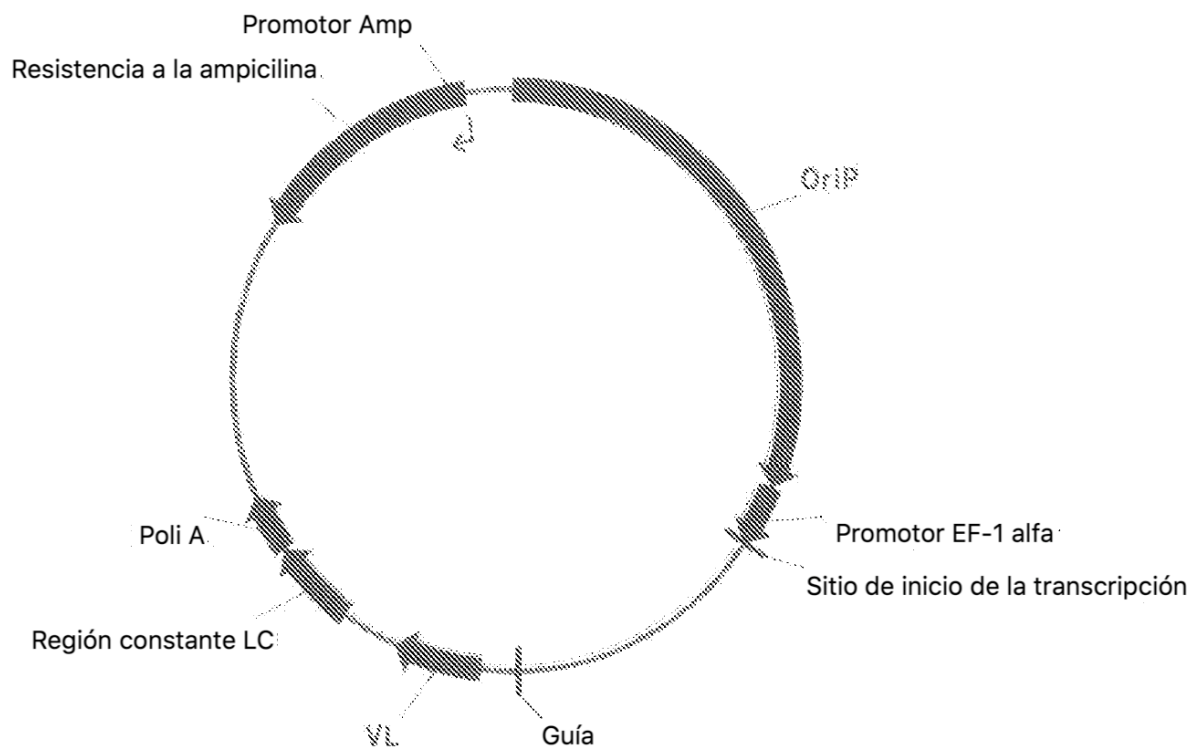


Figura 4

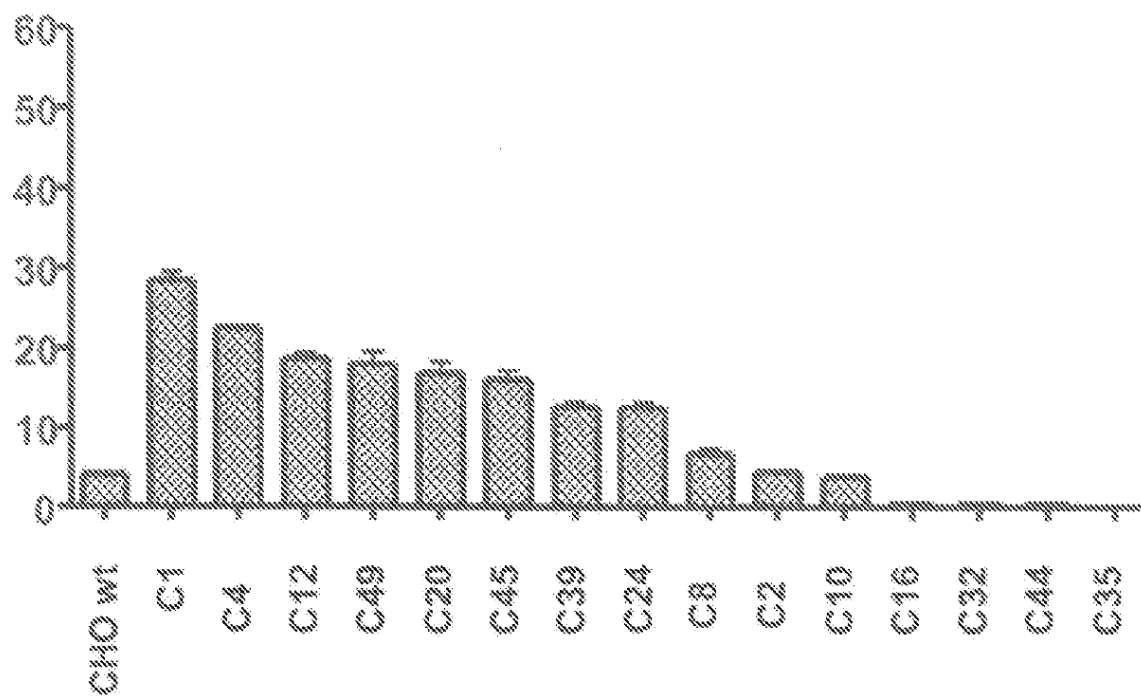


Figura 5

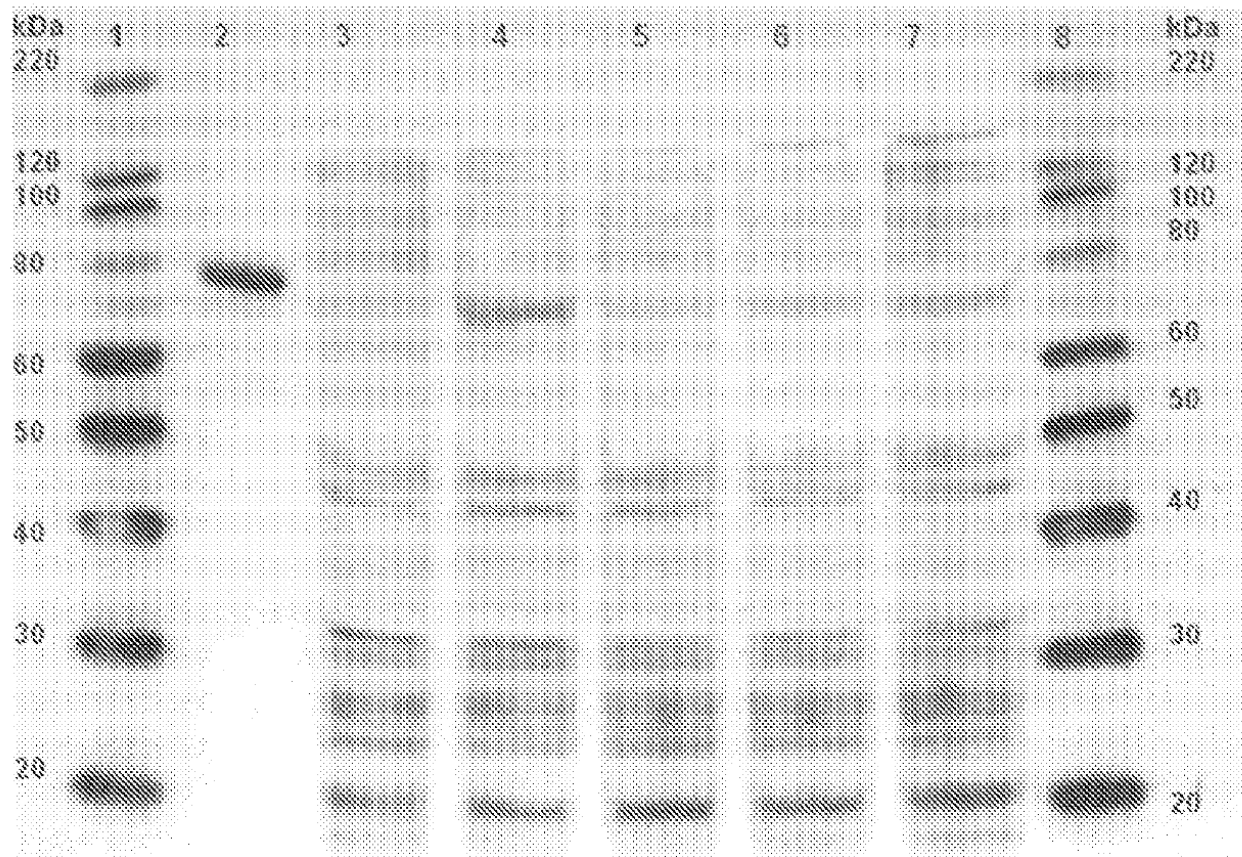


Figura 6

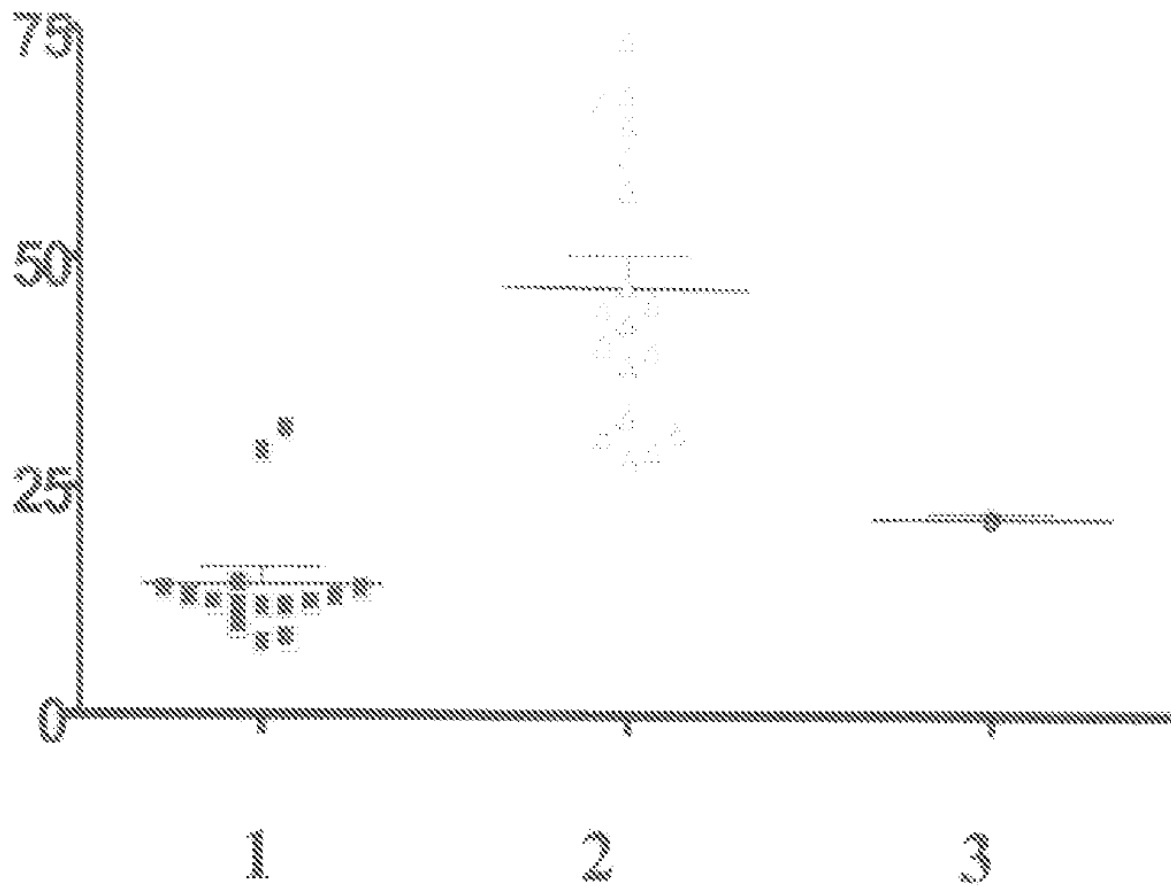


Figura 7

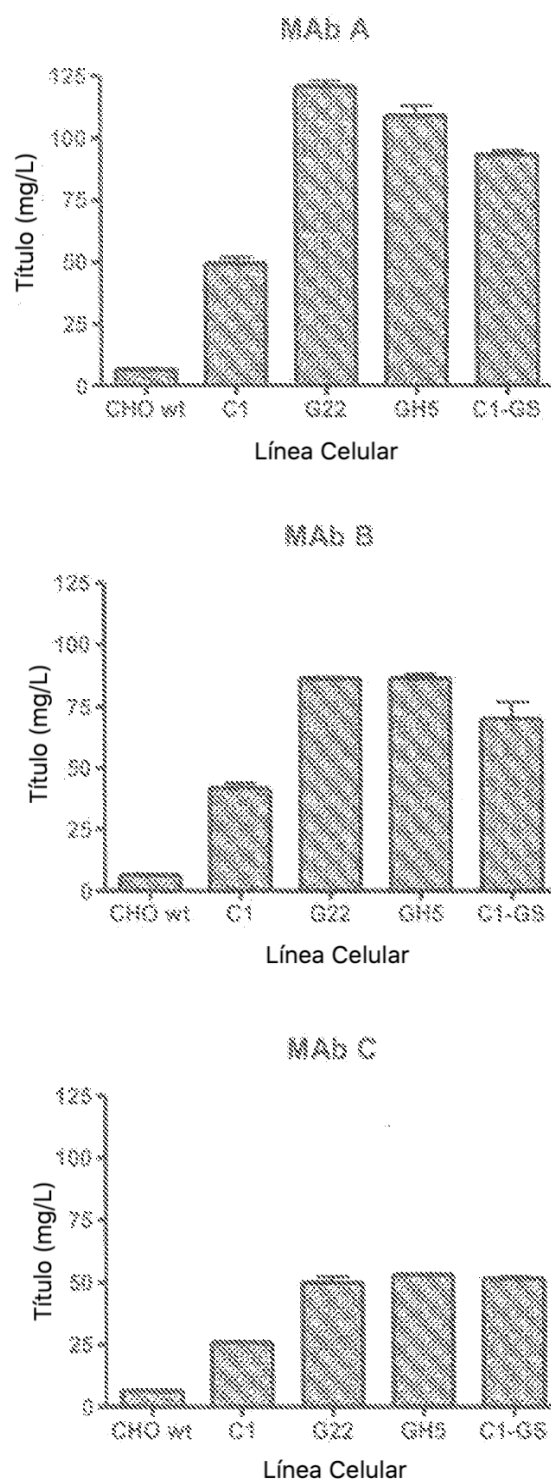


Figura 8

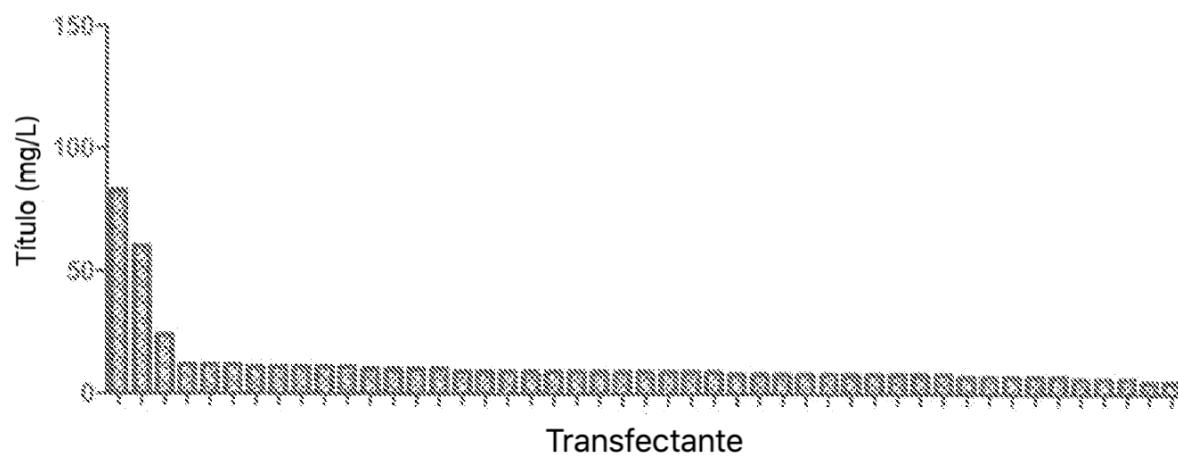


Figura 9

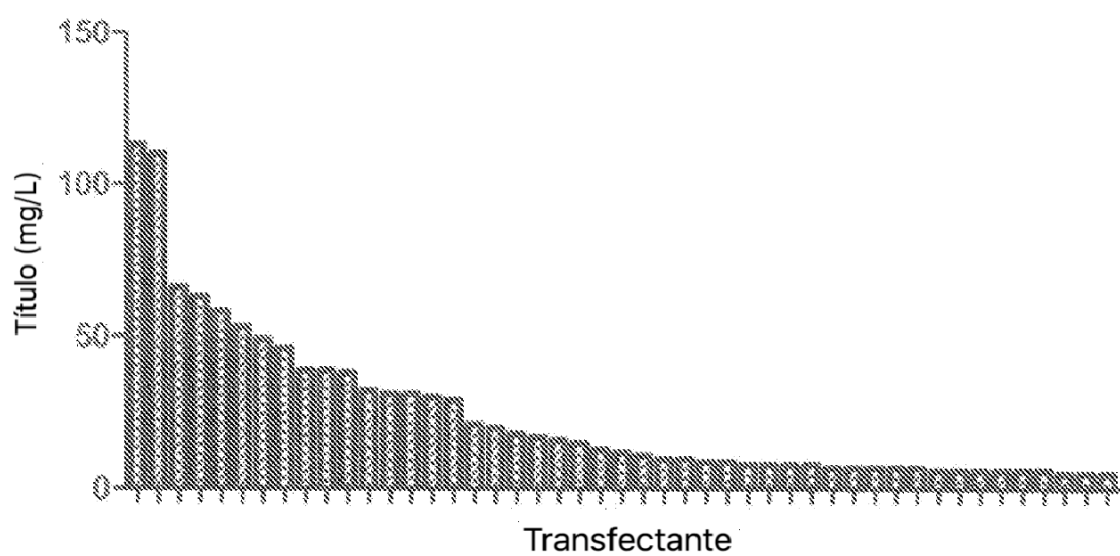


Figura 10

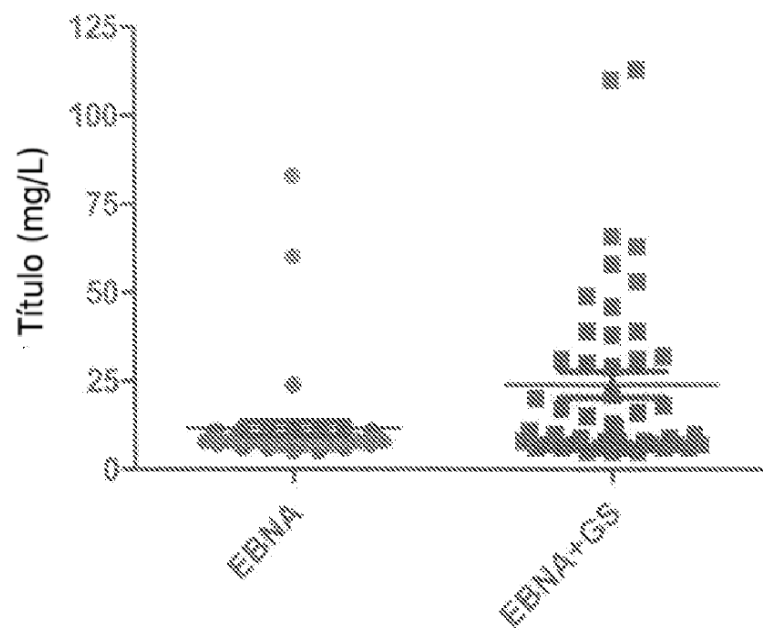


Figura 11

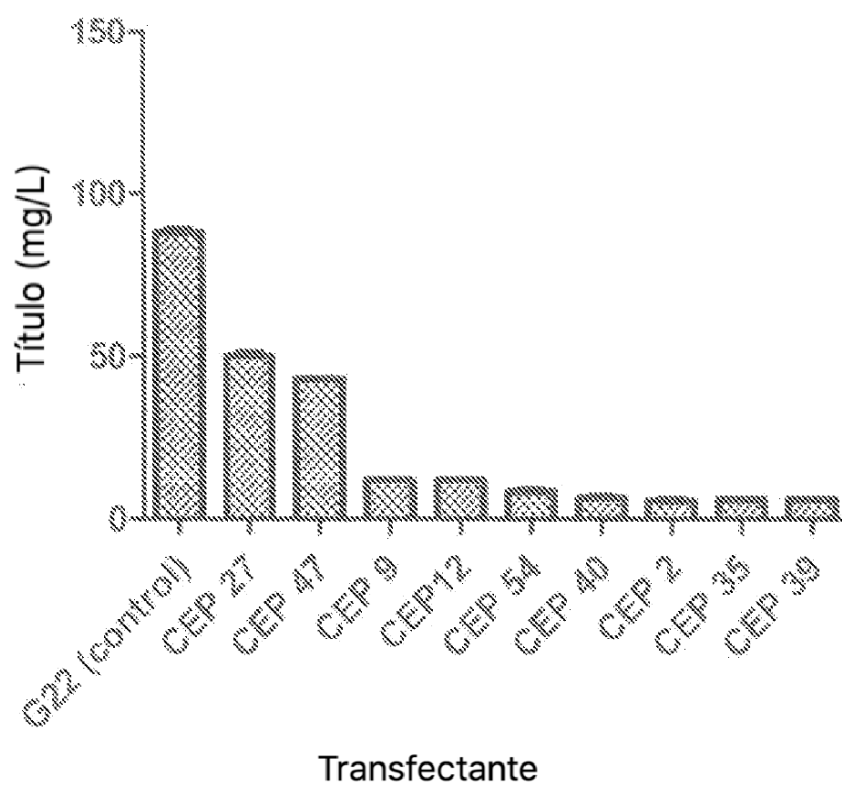


Figura 12

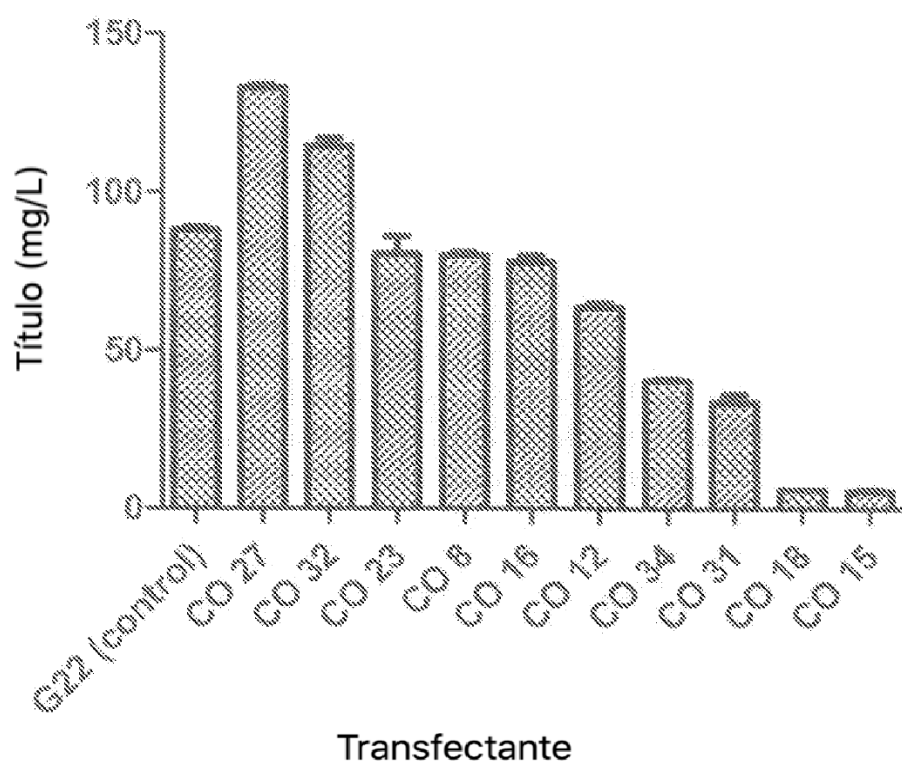


Figura 13

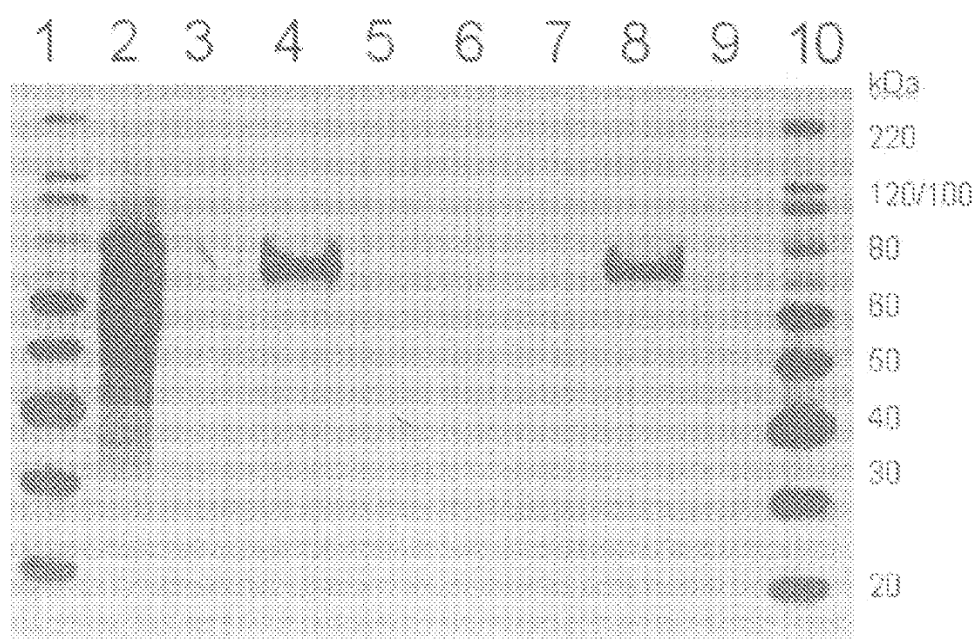


Figura 14

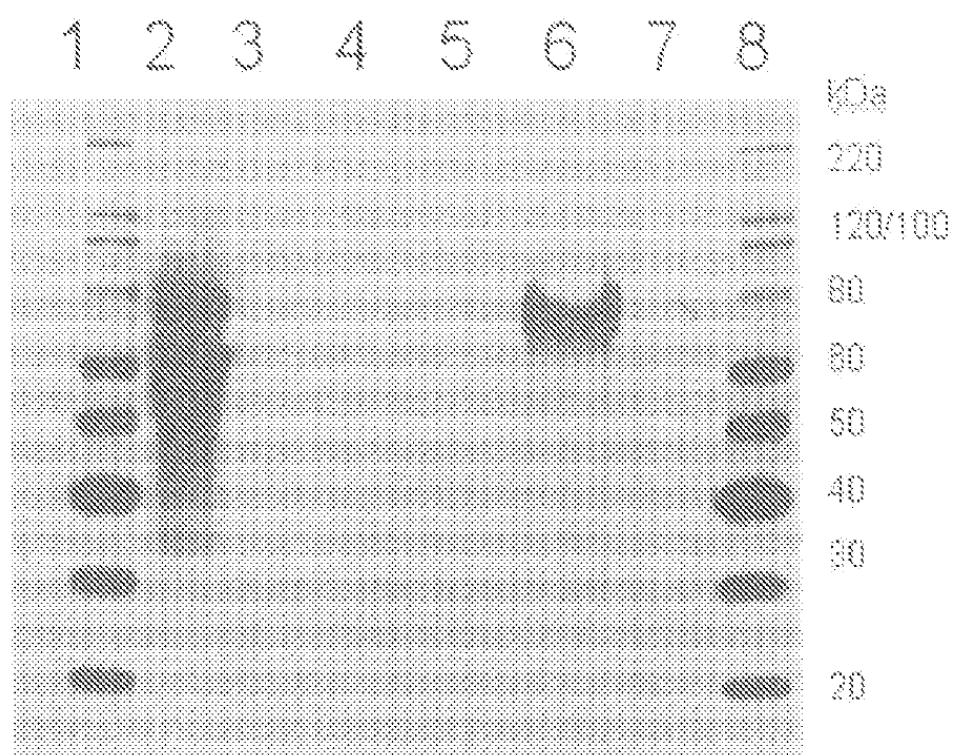


Figura 15

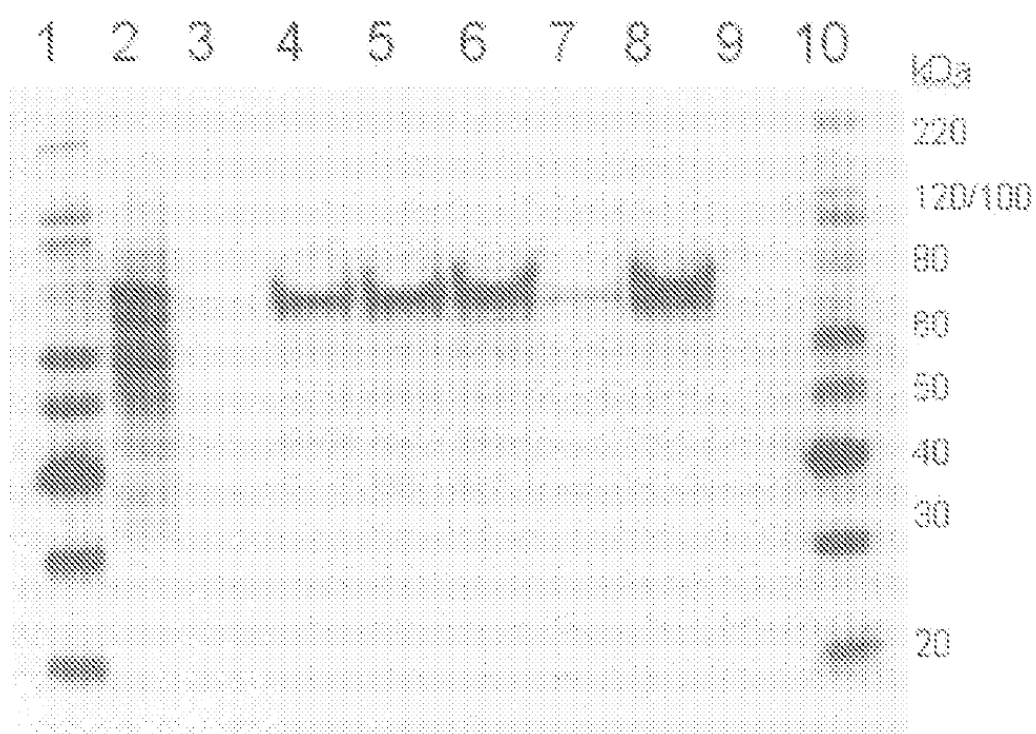


Figura 16

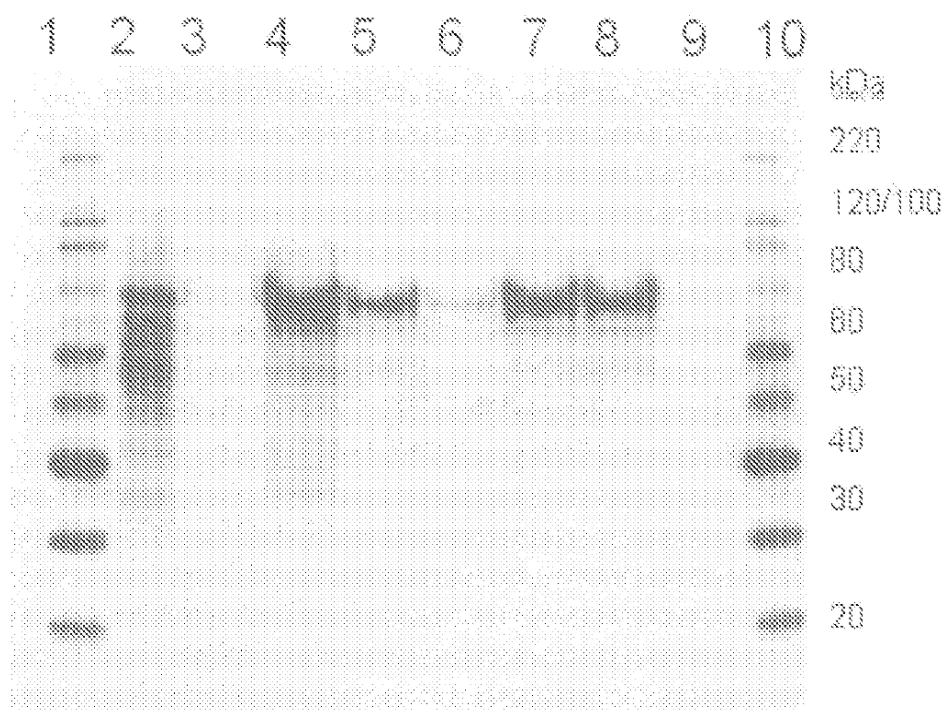


Figura 17

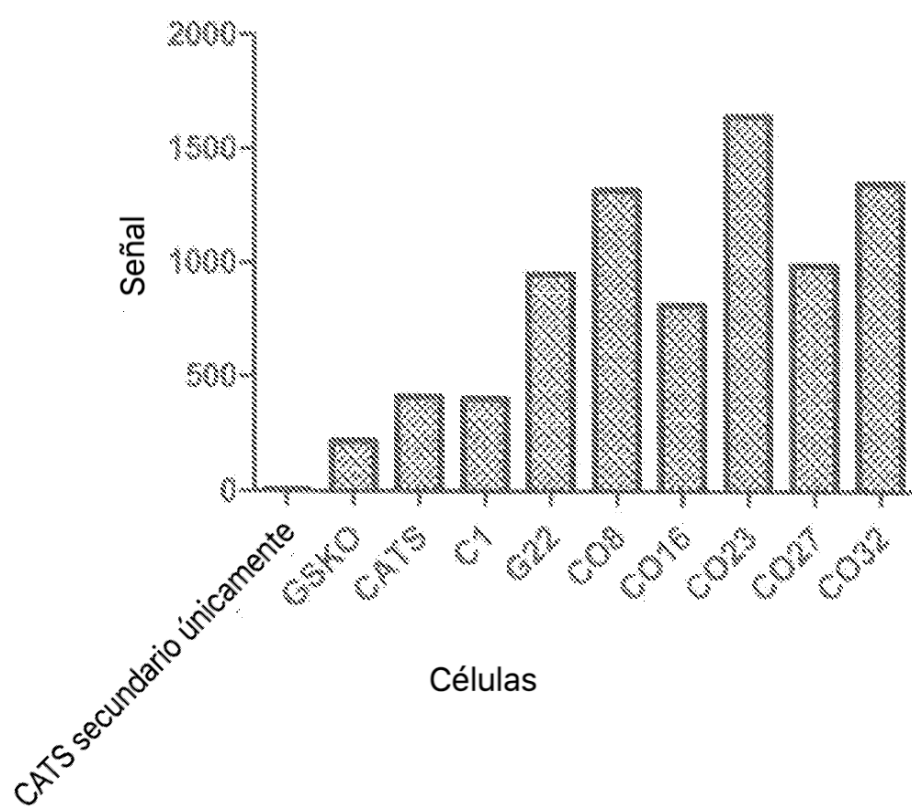


Figura 18

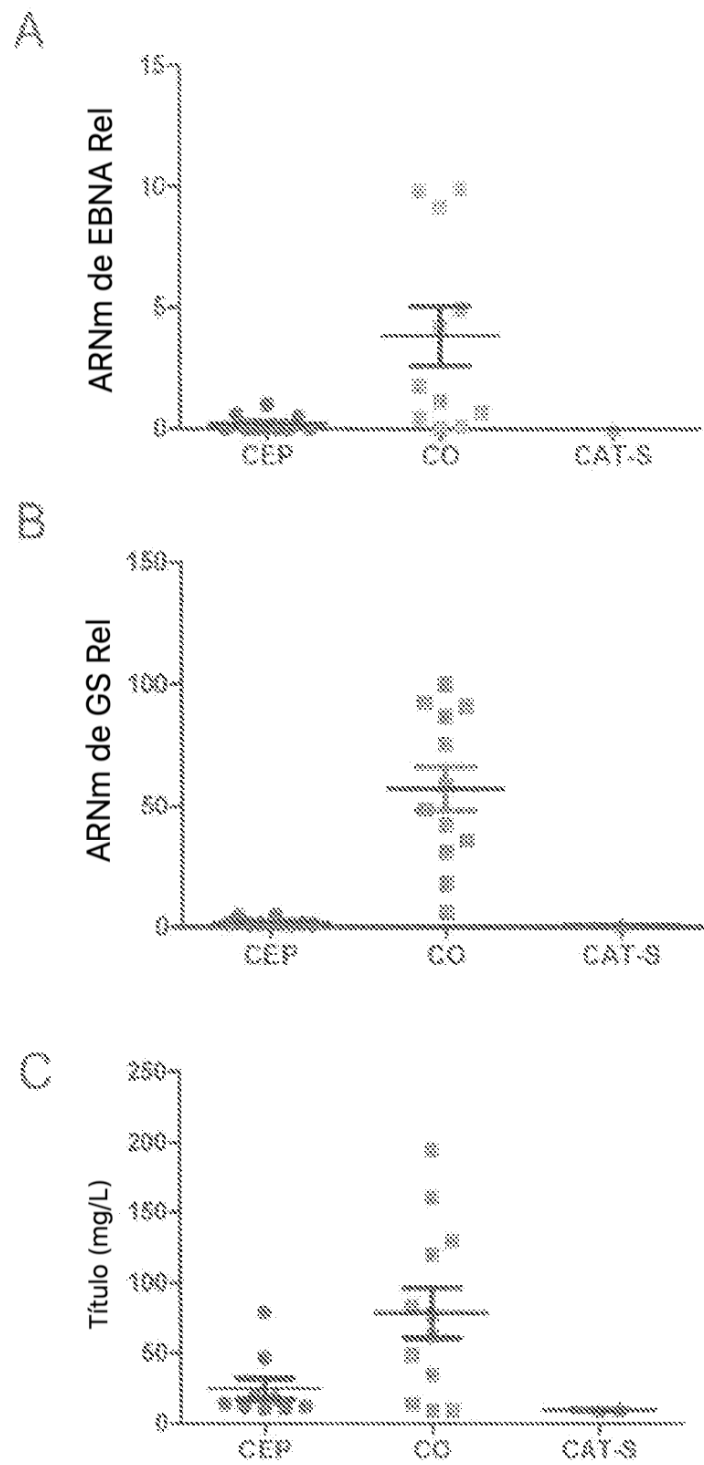


Figura 19