

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 830**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/67** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2015 PCT/EP2015/060593**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2015 WO15177022**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2015 E 15722206 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 3146052**

54 Título: **Procedimiento para la selección de una célula productora a largo plazo usando acilación de histonas como marcadores**

30 Prioridad:

**19.05.2014 EP 14168896**

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

**11.04.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GOEPFERT, ULRICH;  
BECKER, PETER y  
MORITZ, BENJAMIN**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 708 830 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

Procedimiento para la selección de una célula productora a largo plazo usando acilación de histonas como marcadores

El procedimiento reseñado en el presente documento está en el campo de la selección celular y la expresión/producción de polipéptidos. Con más detalle, en el presente documento se reseña un procedimiento para la selección de una célula que expresa o secreta polipéptido a largo plazo basado en la determinación de la acilación de histonas.

### Antecedentes de la invención

El ADN es una macromolécula que codifica las instrucciones de todos los organismos vivos conocidos (Avery, O.T., et al., J. Exp. Med. 79 (1944) 137-158). En células humanas, el ADN tiene una longitud de aproximadamente dos metros y se almacena principalmente en el núcleo, que tiene un diámetro de 10  $\mu\text{m}$  (Turner, B.M., Cell 111 (2002) 285-291). Para organizar esta cantidad de información, el ADN debe estar altamente compactado. Un grupo de pequeñas proteínas básicas conservadas llamadas histonas forman complejos con el ADN para generar una estructura ordenada y compacta denominada cromatina. Esas proteínas cargadas positivamente interactúan con la cadena principal fosfodiéster cargada negativamente de la doble hélice del ADN (Alberts, B.J.A., et al., Molecular Biology of the Cell; Meyers, R.A., Epigenetic Regulation and Epigenomics, WILEY-BLACKWELL, 1; Olins, E. D., Nat. Rev. Mol. Cell Biol. (2003)). Las cuatro histonas "centrales" H2A, H2B, H3 y H4 se combinan con el ADN para formar la unidad de repetición básica de la cromatina, llamada nucleosoma (Thomas, J.O. y Komberg, R.D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 2626-2630). La estructura central del nucleosoma de 225 kDa consiste en aproximadamente 147 pb de ADN enrollado alrededor de un octámero de histona, que comprende dos dímeros H2A/H2B y un tetrámero H3/H4 en 1,67 giros superhelicoidales hacia la izquierda (Arents, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 10148-10152; Arents, G. y Moudrianakis, E.N., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 10489-10493; Richmond, T.J., Scientist 13 (1999) 15-15). Dependiendo de la accesibilidad del ADN, la cromatina se distingue en dos tipos. Heterocromatina altamente compactada, que es menos accesible para la transcripción, y eucromatina transcripcionalmente activa débilmente empaquetada. La heterocromatina facultativa se puede formar en cualquier parte del núcleo, a menudo localizada en los promotores, y se establece de una manera regulada por el desarrollo o en respuesta a desencadenantes ambientales (Chen, T. y Dent, S.Y., Nat. Rev. Genet. 15 (2014), 93-106).

La pérdida gradual de productividad en el cultivo a largo plazo es un problema común con el desarrollo de líneas celulares de fabricación. La disminución de la expresión de proteínas recombinantes se puede deber a una pérdida de copias de transgén y/o silenciamiento del promotor transgénico. El silenciamiento está causado por modificaciones epigenéticas de la cromatina, tales como la metilación directa del ADN promotor en los sitios CpG y modificaciones postraduccionales de las histonas, que son los componentes proteínicos principales de la cromatina. Las modificaciones inactivadoras de las histonas se contrarrestan con otras modificaciones que son activadoras.

Barnes, L.M., et al., reseñan la definición molecular de los indicadores predictivos de la expresión de proteínas estables en células de mieloma NS0 recombinantes (Biotechnol. Bioeng. 85 (2004) 115-121). La correlación reseñada por Barnes et al. es débil y no es suficiente para una predicción de estabilidad.

En el documento WO 2004/056986 se reseñan medios y procedimientos para producir una proteína mediante abridores de cromatina que pueden hacer que la cromatina sea más accesible a los factores de transcripción.

En el documento WO 2011/128377 se ha reseñado que la metilación directa del promotor temprano inmediato principal del citomegalovirus humano (MIE de hCMV) se puede usar como marcador temprano para predecir la inestabilidad de producción de líneas celulares CHO recombinantes.

Osterlehner, A., et al., reseñan que la metilación del promotor y los números de copias de transgén predicen la producción inestable de proteínas en líneas celulares de ovario de hámster chino recombinantes (Biotechnol. Bioeng. 108 (2011) 2670-2681).

### Sumario de la invención

Se ha encontrado que la determinación del grado de metilación de un sitio CpG específico en el ácido nucleico promotor enlazado de forma funcional a un gen estructural que codifica un polipéptido en una célula o línea celular usada para la producción del polipéptido respectivo en combinación con la determinación de la acilación de las histonas cerca del promotor, es decir, en la cromatina promotora, se puede usar para predecir una disminución de la productividad durante el cultivo a largo plazo. Además, se puede determinar el número de copias del casete de expresión de la cadena ligera integrado en el genoma.

Un aspecto como se reseña en el presente documento es un procedimiento para seleccionar un clon celular/línea celular, que comprende un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica un polipéptido enlazado de

forma funcional a un ácido nucleico promotor, que comprende las siguientes etapas:

- a) determinar el nivel (relativo) de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 (H3ac/H3) cerca del ácido nucleico promotor para una primera multitud de clones celulares/líneas celulares, y
- b) seleccionar un clon celular/línea celular, que comprende un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica un polipéptido enlazado de forma funcional a un ácido nucleico promotor que tiene un nivel (relativo) de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 determinado en la etapa a) de 0,1 o más.

Un aspecto como se reseña en el presente documento es un procedimiento para seleccionar un clon celular/línea celular, que comprende un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica un polipéptido enlazado de forma funcional a un ácido nucleico promotor, que comprende las siguientes etapas:

- a) determinar para cada clon celular/línea celular de una primera multitud de clones celulares/líneas celulares, por el que cada clon/línea celular comprende un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica un polipéptido enlazado de forma funcional a un ácido nucleico promotor, el nivel promedio (relativo) de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 (H3ac/H3) cerca del ácido nucleico promotor basado en el nivel (relativo) de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 (H3ac/H3) determinado en al menos 10 células obtenidas de un cultivo de cada clon celular/línea celular, y
- b) seleccionar un clon celular/línea celular que tenga un nivel promedio (relativo) de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 (H3ac/H3) de 0,1 o más.

Un aspecto como se reseña en el presente documento es un procedimiento para seleccionar un clon celular/línea celular, que comprende un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica un polipéptido enlazado de forma funcional a un ácido nucleico promotor que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 01, que comprende las siguientes etapas:

- a) determinar el nivel (relativo) de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 (H3ac/H3) cerca del ácido nucleico promotor que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 01 para cada clon de una primera multitud de clones celulares/líneas celulares, y
- b) determinar la frecuencia de metilación del sitio CpG en la posición 425 de la SEQ ID NO: 01 para cada clon de una segunda multitud de clones celulares/líneas celulares, y
- c) seleccionar un clon celular/línea celular, que comprende un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica un polipéptido enlazado de forma funcional a un ácido nucleico promotor que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 01, que tiene un nivel (relativo) de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 determinado en la etapa a) de 0,1 o más, y que tiene una frecuencia de metilación del sitio CpG en la posición 425 determinada en la etapa b) de menos de un 5 %.

Un aspecto como se reseña en el presente documento es un procedimiento para seleccionar un clon celular/línea celular, que comprende un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica un polipéptido enlazado de forma funcional a un ácido nucleico promotor que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 01, que comprende las siguientes etapas:

- a) determinar para cada clon celular/línea celular de una primera multitud de clones celulares/líneas celulares, por el que cada clon/línea celular comprende un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica un polipéptido enlazado de forma funcional a un ácido nucleico promotor que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 01, el nivel promedio (relativo) de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 (H3ac/H3) cerca del ácido nucleico promotor que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 01 basada en el nivel (relativo) de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 (H3ac/H3) determinado en al menos 10 células obtenidas de un cultivo de cada clon celular/línea celular,
- b) determinar para cada clon celular/línea celular de una segunda multitud de clones celulares/líneas celulares, por el que cada clon/línea celular comprende un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica un polipéptido enlazado de forma funcional a un ácido nucleico promotor que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 01, la frecuencia de metilación promedio del sitio CpG en la posición 425 de la SEQ ID NO: 01 basada en la metilación determinada para al menos 10 células obtenidas de un cultivo de cada clon celular/línea celular,
- c) seleccionar un clon celular/línea celular que tenga un nivel promedio (relativo) de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 (H3ac/H3) de 0,1 o más, y que tenga una frecuencia de metilación en la posición 425 por debajo de un 5 %.

En un modo de realización, el nivel (relativo) de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 es de más de un 0,5.

5 En un modo de realización, el nivel (relativo) de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 es de 0,75 o más. En un modo de realización, el nivel (relativo) de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 es de 1,0 o más.

10 En un modo de realización preferente, el nivel (relativo) de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 es de más de un 0,5.

El ácido nucleico promotor tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 01 o comprende un fragmento funcional de la misma o una variante funcional de la misma. En un modo de realización, el sitio CpG está en la posición 425 de la SEQ ID NO: 01 o en una posición correspondiente a la misma en el fragmento o variante de la misma.

15 En un modo de realización de todos los aspectos, el procedimiento comprende además la siguiente etapa:

ab) determinar el número (de copias) de casetes de expresión de cadena ligera integrados de forma estable, por el que la etapa c) es:

20 seleccionar un clon celular/línea celular que tenga un nivel de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 determinado en la etapa a) de más de 0,5, que tenga una frecuencia de metilación del sitio CpG en la posición 425 determinada en la etapa b) de menos de un 5 %, y que tenga un número (de copias) de casetes de expresión de cadena ligera integrados de forma estable determinado en la etapa ab) de 10 o menos.

25 En un modo de realización preferente, el número de copias de casetes de expresión de cadena ligera integrados de forma estable determinado en la etapa ab) es 6 o menos.

30 En un modo de realización, el nivel (relativo) promedio de acetilación de histona 3 es el nivel (relativo) promedio de acetilación de histona 3 en los restos de lisina en la posición 4 y/o 9 y/o 14 y/o 18 y/o 27. En un modo de realización, los restos de lisina están en la posición 9 y/o 14 y/o 27.

En un modo de realización de todos los aspectos, el procedimiento comprende como primera etapa:

35 - transfectar una población de células con un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica un polipéptido enlazado de forma funcional a un ácido nucleico promotor que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 01, y obtener de la misma una primera y una segunda y, opcionalmente, una tercera multitud de clones celulares/líneas celulares.

40 En un modo de realización, la línea celular (seleccionada) tiene una tasa de producción después de 30-60 generaciones en cultivo de más de un 60 % de la tasa de producción al comienzo del cultivo.

45 Un aspecto como se reseña en el presente documento es un procedimiento para seleccionar un clon celular/línea celular, que comprende un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica al menos una cadena ligera de anticuerpo enlazado de forma funcional a un ácido nucleico promotor que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 01, que comprende las siguientes etapas:

50 a) determinar el nivel (relativo) de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 (H3ac/H3) cerca del ácido nucleico promotor que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 01 para cada clon de una primera multitud de clones celulares/líneas celulares, y

b) determinar el número (de copias) de casetes de expresión de cadena ligera integrados de forma estable para cada clon de una segunda multitud de clones celulares/líneas celulares, y

55 c) determinar la frecuencia de metilación del sitio CpG en la posición 425 de la SEQ ID NO: 01 para cada clon de una tercera multitud de clones celulares/líneas celulares, y

60 d) seleccionar un clon celular/línea celular, que comprende un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica un polipéptido enlazado de forma funcional a un ácido nucleico promotor que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 01, i) que tiene un nivel (relativo) de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 determinado en la etapa a) de 0,1 o más, ii) que tiene una frecuencia de metilación del sitio CpG en la posición 425 determinado en la etapa b) de menos de un 5 %, y iii) que tiene un número (de copias) de casetes de expresión de cadena ligera integrados de forma estable determinado en la etapa ab) de 10 o menos.

65 Un aspecto como se reseña en el presente documento es un procedimiento para seleccionar un clon celular/línea

celular, que comprende un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica al menos una cadena ligera de anticuerpo enlazado de forma funcional a un ácido nucleico promotor que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 01, que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) determinar para cada clon celular/línea celular de una multitud de clones celulares/líneas celulares, por el que cada clon/línea celular comprende un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica un polipéptido enlazado de forma funcional a un ácido nucleico promotor que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 01, el nivel promedio (relativo) de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 (H3ac/H3) cerca del ácido nucleico promotor que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 01 basada en el nivel (relativo) de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 (H3ac/H3) determinado en al menos 10 células obtenidas de un cultivo de cada clon celular/línea celular,
- 10 b) determinar para cada clon celular/línea celular de la multitud de clones celulares/líneas celulares el número (de copias) de casetes de expresión de cadena ligera integrados de forma estable en al menos 10 células obtenidas de un cultivo de cada clon celular/línea celular, y
- 15 c) determinar para cada clon celular/línea celular de la multitud de clones celulares/líneas celulares, por el que cada clon/línea celular comprende un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica un polipéptido enlazado de forma funcional a un ácido nucleico promotor que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 01, la frecuencia de metilación promedio del sitio CpG en la posición 425 de la SEQ ID NO: 01 basada en la metilación determinada para al menos 10 células obtenidas de un cultivo de cada clon celular/línea celular,
- 20 d) seleccionar un clon celular/línea celular, i) que tiene un nivel (relativo) promedio de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 (H3ac/H3) de 0,1 o más, ii) que tiene una frecuencia de metilación en la posición 425 por debajo de un 5 % y iii) que tiene un número (de copias) de casetes de expresión de cadena ligera integrados de forma estable determinado en la etapa ab) de 10 o menos.

30 En un modo de realización, el nivel (relativo) de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 es de 0,2 o más. En un modo de realización, el nivel (relativo) de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 es de 0,5 o más. En un modo de realización, el nivel (relativo) de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 es de 0,75 o más. En un modo de realización, el nivel (relativo) de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 es de 1,0 o más.

35 En un modo de realización preferente, el nivel (relativo) de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 es de 0,5 o más.

40 En un modo de realización, el nivel (relativo) promedio de acetilación de histona 3 es el nivel (relativo) promedio de acetilación de histona 3 en los restos de lisina en la posición 4 y/o 9 y/o 14 y/o 18 y/o 27. En un modo de realización, los restos de lisina están en la posición 9 y/o 14 y/o 27.

45 En un modo de realización, el ácido nucleico promotor tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 01 o comprende un fragmento funcional de la misma o una variante funcional de la misma. En un modo de realización, el sitio CpG está en la posición 425 de la SEQ ID NO: 01 o en una posición correspondiente a la misma en el fragmento o variante de la misma.

En un modo de realización preferente, el número de copias de casetes de expresión de cadena ligera integrados de forma estable determinado en la etapa b) es 6 o menos.

50 En un modo de realización, la determinación del nivel (relativo) de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 (H3ac/H3) comprende las siguientes etapas:

- 1) aislar la cromatina de cada uno de los clones celulares/líneas celulares,
- 55 2) tratar una primera alícuota de la cromatina mediante un anticuerpo que sea adecuado para determinar el nivel (relativo) de acetilación de histona 3, tal como, por ejemplo, un anticuerpo específico de acetilación de histona 3, y formar un precipitado de anticuerpo-cromatina, y tratar una segunda alícuota de cromatina mediante un anticuerpo que sea adecuado para determinar el nivel de histona 3, tal como, por ejemplo, un anticuerpo específico de histona 3, y formar y precipitar el anticuerpo-cromatina,
- 60 3) amplificar el ADN genómico de una tercera alícuota no tratada de la cromatina y de la primera y la segunda alícuota tratada con PCR cuantitativa en tiempo real,
- 65 4) determinar, con el resultado obtenido en la etapa 3), el nivel (relativo) de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3.

En un modo de realización, la determinación de la frecuencia de metilación comprende las siguientes etapas:

- 1) aislar el ADN de cada uno de los clones celulares/líneas celulares,
- 2) realizar, para cada ADN aislado individualmente, una reacción en cadena de la polimerasa específica de metilación,
- 3) determinar, con los resultados obtenidos en la etapa 2), la frecuencia de metilación.

En un modo de realización, la etapa 2) es

- 2) realizar, para cada ADN aislado individualmente, una reacción en cadena de la polimerasa con un cebador específico de metilación y un cebador universal.

También en un modo de realización, la etapa 2) es

- 2) digerir individualmente el ADN aislado con una enzima de restricción y realizar una reacción en cadena de la polimerasa para cada uno de los ADN digeridos con un cebador específico de metilación y un cebador universal.

En un modo de realización, los cebadores se seleccionan independientemente entre sí del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 06 a 20.

En un modo de realización, se seleccionan cebadores del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 11, 14 y 15, el cebador universal tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 09, y un cebador específico de metilación se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 17, 18 y 19.

En un modo de realización, los cebadores universales tienen la secuencia de la SEQ ID NO: 09 y 11 y los cebadores específicos de metilación tienen la secuencia de la SEQ ID NO: 11 y 18.

En un modo de realización, el nivel (relativo) de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 (H3ac/H3) se normaliza a un gen de referencia. En un modo de realización, el gen de referencia es Gusb.

En un modo de realización, la segunda multitud de clones celulares/líneas celulares comprende al menos un clon celular/línea celular comprendida también en la primera multitud de clones celulares/líneas celulares. En un modo de realización, la segunda multitud de clones celulares/líneas celulares es idéntica a la primera multitud de clones celulares/líneas celulares.

En un modo de realización, el clon celular/línea celular es un clon celular/línea celular eucariota. En un modo de realización, el clon celular/línea celular es un clon celular/línea celular de mamífero. En un modo de realización, el clon celular/línea celular se selecciona de CHO, BHK, HEK y Sp2/0. En un modo de realización, el clon celular/línea celular es un clon celular/línea celular CHO. En un modo de realización, el clon celular/línea celular es un clon celular/línea celular CHO K1.

En un modo de realización preferente, el clon celular/línea celular es un clon celular/línea celular CHO.

En un modo de realización, el polipéptido es i) un anticuerpo, o ii) un fragmento de anticuerpo, o iii) un conjugado de anticuerpo, o iv) una cadena ligera de anticuerpo y una cadena pesada de anticuerpo. En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.

Un aspecto como se reseña en el presente documento es un procedimiento para la producción de un polipéptido, que comprende las siguientes etapas:

- a) seleccionar un clon celular/línea celular con un procedimiento como se reseña en el presente documento,
- b) cultivar el clon celular/línea celular seleccionada, y
- c) recuperar el polipéptido del medio de cultivo y/o el clon celular/línea celular y producir de este modo el polipéptido.

En un modo de realización, el procedimiento comprende, antes de la etapa a), las siguientes etapas:

- a-3) proporcionar una célula de mamífero no humano,
- a-2) transfectar la célula proporcionada con un ácido nucleico, que comprende un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica un polipéptido enlazado de forma funcional a un ácido nucleico promotor que

tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 01,

- 5 a-1) i) opcionalmente, cultivar el clon celular/línea celular transfectada en presencia de un agente de selección, ii) depositar individualmente las células transfectadas, y iii) cultivar las células transfectadas depositadas individualmente en presencia de un agente de selección.

Un aspecto como se reseña en el presente documento es un procedimiento para la producción de un polipéptido, que comprende las siguientes etapas:

- 10 a) seleccionar un clon celular/línea celular con un procedimiento como se reseña en el presente documento,  
b) cultivar la célula/clon seleccionado, y  
15 c) recuperar el polipéptido del medio de cultivo y/o las células y producir de este modo un polipéptido.

En un modo de realización, el procedimiento comprende una etapa adicional

- d) purificar el polipéptido recuperado.

20 En un modo de realización, el procedimiento comprende, antes de la etapa a), las siguientes etapas:

- a-3) proporcionar una célula,

- 25 a-2) transfectar la célula proporcionada con un ácido nucleico que contiene un gen estructural que codifica el polipéptido enlazado de forma funcional a un ácido nucleico promotor,

- 30 a-1) i) opcionalmente, cultivar y propagar la célula transfectada en presencia de un agente de selección, ii) depositar individualmente las células, y iii) cultivar las células transfectadas depositadas individualmente en presencia de un agente de selección.

En un modo de realización, la etapa a) comprende:

- 35 i) proporcionar al menos una célula que comprende un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica el polipéptido enlazado de forma funcional a un ácido nucleico promotor,  
ii) determinar la metilación del sitio CpG en la posición 425 dentro del ácido nucleico promotor de la SEQ ID NO: 01, y  
40 iii) seleccionar una célula que produce un polipéptido en el que la metilación determinada en la etapa b) está por debajo de un valor umbral.

### **Descripción detallada de la invención**

45 Se requieren líneas celulares económicas que proporcionen una alta productividad y niveles de producción estables durante la propagación de pequeña a gran escala. La disminución de la productividad durante la ampliación constituye un grave riesgo durante el desarrollo de la línea celular (Barnes, L.M., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 81 (2003) 631-639). Una de las razones principales de la inestabilidad de la producción es la reducción de los números de copias activas a lo largo de los ciclos celulares, lo que podría atribuirse a la alteración/reorganización cromosómica como una característica inherente de las células CHO (Kim, M., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 108 (2011) 2434-2446) y/o una inducción por el proceso de amplificación génica (Kaufman, R.J., et al., *Mol. Cell. Biol.* (1983) 699-711). La disminución del ARNm en un número constante de copias de genes recombinantes es otra causa importante de la caída de la productividad (Barnes, L.M., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 85 (2004) 115-121; Chusainow, J., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 102 (2009) 1182-1196; Strutzenberger, K., et al., *J. Biotechnol.* 69 (1999) 215-226). Una explicación razonable para este suceso es el silenciamiento epigenético por metilación del promotor (Osterlehner, A., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 108 (2011) 2670-2681; Yang, Y., et al., *J. Biotechnol.* 147 (2010) 180-185) y modificaciones de histonas que se tipifican por desacetilación y metilación específica (Mutskov, V. y Felsenfeld, G., *EMBO J.* 23 (2004) 138-149; Paredes, V., et al., *Biotechnol. Lett.* 35 (2013) 987-993). Además, la propia secuencia recombinante, la formación de repeticiones en tándem de la secuencia y la ubicación genómica del transgén se proponen como iniciadores para el silenciamiento de genes (Kaufman, W.L., et al., *Nuc. Acids Res.* 36 (2008) e111).  
60 A partir de esto, la influencia de la cromatina adyacente en los sitios de integración se denomina "efecto de posición" (Lattenmayer, C., et al., *Cytotechnol.* 51 (2006) 171-182; Yin, Z., et al., *Genet. Mol. Res.* 11 (2012) 355-369).

65 El promotor en dirección 5' del gen recombinante inicia la transcripción del gen y puede afectar al nivel y la estabilidad de la expresión génica (Kaufman, W.L., et al., *Nuc. Acids Res.* 36 (2008) e111). El promotor génico temprano inmediato principal del citomegalovirus humano (MIE de hCMV) se usa comúnmente para dirigir la expresión recombinante en células de mamífero para investigación y fabricación para obtener altos niveles de

expresión en transfecciones transitorias y estables (Boshart, M., et al, Cell 41 (1985) 521-530; Chapman, B.S., et al., Nuc. Acids Res. 19 (1991) 3979-3986; Foecking, M.K. y Hofstetter, H. Gene 45 (1986) 101-105; Wright, A., et al., Hum. Gene Ther. 16 (2005) 881-892). Aunque el promotor MIE de hCMV proporciona altos niveles de expresión génica, muchos estudios han reseñado una disminución de la productividad a lo largo del cultivo a largo plazo (Bailey, L.A., et al., Biotechnol. Bioeng. 109 (2012) 2093-2103; Barnes, L.M., et al., Biotechnol. Bioeng. 73 (2001) 261-270; He, L., et al., Biotechnol. Bioeng. 109 (2012) 1713-1722). El silenciamiento del promotor MIE de hCMV se atribuye en gran parte (además de a la pérdida de números de copias) a los eventos epigenéticos de la metilación del ADN promotor y la modificación de histonas (Brooks, A.R., et al., J. Gene Med. 6 (2004) 395-404; Kim, M., et al., Biotechnol. Bioeng. 108 (2011) 2434-2446; Osterlehner, A., et al., Biotechnol. Bioeng. 108 (2011) 2670-2681; Paredes, V., et al., Biotechnol. Lett. 35 (2013) 987-993; Yang, Y., et al., J. Biotechnol. 147 (2010) 180-185).

Se sabe que la cromatina está implicada en la regulación de la expresión génica. La modificación del ADN o de la cromatina y/o las proteínas asociadas a la cromatina, tales como las histonas, tiene un impacto en la estructura de la cromatina y, por tanto, en la expresión génica. La modificación del ADN en células de mamífero puede ser por metilación de restos de citosina en dinucleótidos CpG. Las histonas, especialmente su parte del extremo N, se pueden modificar por acetilación, metilación, fosforilación o ubiquitinilación.

El contenido de ácido nucleico de una célula, es decir, su ADN, está presente en el núcleo celular en forma compactada junto con las histonas. Las histonas empaquetan y ordenan el ADN en nucleosomas. Hay cinco proteínas histonas principales en los seres humanos. Las histonas son proteínas altamente alcalinas. La histona H3 (histona 3) tiene un dominio globular principal y una cola en el extremo N. Tiene un tamaño de 137 restos de aminoácido. Las histonas en general tienen la función de proporcionar una estructura central alrededor de la que se localiza el ADN y regulan la expresión génica.

Las histonas se pueden modificar de muchas maneras diferentes, lo que se produce principalmente en los restos de la secuencia de aminoácidos del extremo N que varía de 13 a 40 aminoácidos de longitud, dependiendo de la histona específica. Este gran número de modificaciones incluso aumenta debido al hecho de que algunas modificaciones como la metilación de lisina comprenden hasta tres estados diferentes (Kouzarides, T., Cell 128 (2007) 693-705). Se han descubierto más de 100 modificaciones de histonas (Zentner, G.E. y Henikoff, S., Nat. Struct. Mol. Biol. 20 (2013) 259-266). Las modificaciones mejor estudiadas son la acetilación y la metilación de los restos de la cola de la histona H3 y de la histona H4. En general, se han encontrado 14 tipos característicos de modificaciones (Dawson, M.A. y Kouzarides, T., Cell 150 (2012) 12-27) y se enumeran en la siguiente tabla.

**Tabla:** K, lisina; R, arginina; S, serina; T, treonina; E, ácido glutámico; P, prolina; ac, acetilación; me, metilación; cit, citrulina; cr, crotonilación; pr, propionilación; bu, butirilación; fo, formilación; oh, hidroxilación; a, asimétrico; s, simétrico; >, conversión. Adoptado de (Dawson y Kouzarides, 2012).

Modificaciones de la cromatina	Restos modificados	Modificaciones de la cromatina	Restos modificados
acetilación	K-ac	Isomerización de prolina	P-cis > P-trans
metilación (lisinas)	K-me1, K-me2, K-me3	crotonilación	K-cr
metilación (argininas)	R-me1, R-me2a, R-me2s	propionilación	K-pr
fosforilación	S-ph, T-ph	butirilación	K-bu
ubiquitinilación	K-ub	formilación	K-fo
sumoilación	K-su	hidroxilación	Y-oh
ribosilación de ADP	E-ar	O-GlcNAcilación (serina y treonina)	S-GlcNAc; T-GlcNAc
desiminación	R > Cit		

La combinación de estas modificaciones, denominadas motivos PTM (modificación postraduccional) se asocian más a funciones que a las marcas individuales. La investigación sobre la combinación de modificaciones sugiere más de 200 motivos PTM diferentes (Feller, C., et al., Mol. Cell 57 (2015) 559-571). Las modificaciones son reversibles.

Se sabe que la metilación de la histona H3 en la lisina 9 (H3K9) y 27 (H3K27) son modificaciones que dan como resultado la represión de genes. Las modificaciones de histonas parecen proporcionar una represión transcripcional lábil, mientras que la metilación del ADN es una marca de silenciamiento altamente estable que no se invierte fácilmente (Cedar, H. y Bergman, Y., Nat. Rev. Gen. 10 (2009) 295-304).

La acetilación de histonas se descubrió en 1961 como la primera modificación de histonas (Phillips, D.M., Biochem. J. 87 (1963) 258-263). Los primeros estudios asocian genes transcritos activos con la hiperacetilación de histonas, lo que indica una función de la acetilación en el proceso de transcripción (Allfrey, V.G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 51 (1964) 786-794). Durante la fase S se observó un aumento global de los sitios de acetilación, tal como H3K56ac, seguido de una disminución durante la fase G2. Esto llevó a la conclusión de que la acetilación de



5 histonas podría facilitar la incorporación de histonas recién sintetizadas (Miller, K.M., et al., *Cell Cycle* 5 (2006) 2561-2565). Además de su función global durante la replicación del ADN, la acetilación de histonas forma patrones genómicos específicos que se correlacionan con la transcripción activa. De este modo, las regiones de heterocromatina están hipoacetiladas y los genes transcripcionalmente activos de la eucromatina están altamente acetilados (Kouzarides, T., *Cell* 128 (2007) 693-705). Los picos de acetilación se encuentran en sitios específicos en el promotor cerca de los sitios de inicio de la transcripción (TSS) (Wang, Z., et al., *Nat. Genet.* 40 (2008) 897-903). Los restos de lisina de las histonas de la cola del extremo N de la histona 3 en las posiciones 4, 9, 14, 18 y de histona 4 en las lisinas 5, 8 y 12 son predominantemente propensos a la acetilación. En conjunto, la regulación de la expresión génica, la replicación del ADN, la reparación y la recombinación están influenciadas por diferentes estados de acetilación de las histonas (Dawson, M.A. y Kouzarides, T., *Cell* 150 (2012) 12-27).

15 Las histona acetiltransferasas (HAT) generalmente median la expresión génica y la activación transcripcional (Cheung, P., et al., *Cell* 103 (2000) 263-271). Usando la inmunoprecipitación de cromatina, se ha encontrado que el ADN no metilado se ensambla principalmente en nucleosomas que contienen histonas acetiladas, que están asociadas con la cromatina abierta, mientras que la presencia de grupos metilo en secuencias de ADN idénticas se correlaciona con el ensamblaje de nucleosomas que contienen histona H3 y H4 no acetilada que da lugar a una cromatina más compacta (Cedar, H. y Bergman, Y., *Nat. Rev. Gen.* 10 (2009) 295-304; Eden, S., et al., *Nature* 394 (1998) 842-843; Hashimshony, T., et al., *Nat. Gen.* 34 (2003) 187-192). La histona H3 es la histona más modificada en exceso de las cinco histonas naturales.

20 En regiones de alta actividad transcripcional se puede encontrar un alto grado de acetilación de histonas. La acetilación de histonas está catalizada por la enzima histona-acetil-transferasa (HAT) que transfiere la parte acetilo de acetil-CoA al grupo  $\epsilon$ -amino de restos de lisina de las histonas específicos en la región del extremo N. La acetilación de histonas tiene lugar exclusivamente en los restos de lisina, tales como, por ejemplo, H3K9 (lisina en la posición 9 de la histona 3), H3K14 y H3K27 (Koch, C.M., et al., *Gen. Res.* 17 (2007) 691-707; Creighton, M.P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107 (2010) 21931-21936).

30 Comúnmente se observa durante el desarrollo de la línea celular y en la producción a gran escala que se produce el silenciamiento de la expresión génica recombinante durante el cultivo prolongado de células hospedadoras (gran escala). En células de mamífero, esto se puede deber, por ejemplo, a la formación de derivados de cromatina, que evita la transcripción del gen recombinante.

35 Esto da como resultado una población celular heterogénea después de tiempos de cultivo más largos, tal como en la producción a gran escala (incluyendo las fermentaciones de la serie de siembra y la fermentación principal). En esta población celular heterogénea, algunas células continúan expresando altos niveles de la proteína recombinante de interés, mientras que otras células expresan una cantidad baja o incluso nada de la proteína de interés (véanse, por ejemplo, Martin, D.I. y Whitelaw, E., *Bioessays* 18, (1996) 919-923; McBumey, M.W., et al., *Exp. Cell. Res.* 274 (2002) 1-8).

40 Las líneas celulares de producción son, en general, descendientes de una única célula parental. Estas células a menudo se amplían durante el cultivo y se cultivan durante mucho tiempo en fermentaciones a gran escala (fermentaciones de la serie de siembra y de producción), lo que da como resultado volúmenes de cultivo de hasta 25 000 litros y densidades celulares a menudo de más de un millón de células por mililitro. Dichas fermentaciones a gran escala pueden mostrar reducciones drásticas en la productividad (Migliaccio, A.R., et al., *Gene* 256 (2000) 197-214; Strutzenberger, K., et al., *J. Biotechnol.* 69 (1999) 215-226).

50 Para la selección de líneas celulares/clones celulares de producción, es decir, clones celulares/líneas celulares que están destinadas a usarse para la producción recombinante a gran escala de un polipéptido, tal como, por ejemplo, un anticuerpo, la estabilidad de producción/expresión, es decir, la pérdida de productividad de una generación a otra, del clon celular/línea celular es importante. Por lo tanto, las líneas celulares de mamífero para la producción de proteínas recombinantes necesitan mantener la productividad durante tiempos de cultivo prolongados. En general, la estabilidad de producción de un clon celular/línea celular se determina cultivando el clon celular/línea celular durante un largo período de tiempo, es decir, múltiples generaciones. A intervalos regulares, el medio se diluye con medio fresco y la productividad específica por célula se determina basada en el título del producto y la densidad de células viables. El cambio (normalmente una reducción) de la productividad específica es indicativo de la estabilidad de producción a largo plazo del clon celular/línea celular.

60 Los estudios de estabilidad a largo plazo requieren mucho tiempo y recursos, pero se realizan ampliamente para identificar y eliminar candidatos inestables durante el desarrollo de la línea celular. Dependiendo de los criterios diana, el estudio cubre de 30 a 60 divisiones celulares, lo que generalmente corresponde a 30 hasta 70 días. Por tanto, el material requerido y el tiempo de trabajo son notables. Esto se puede ver aún más por el hecho de que hasta un 75 % de las líneas celulares/clones celulares sometidos a prueba no son estables y, por tanto, se debe evaluar un gran número de líneas celulares/clones celulares.

65 Además de la pérdida de producción del transgén, la inestabilidad de las líneas celulares de fabricación se puede asociar con la metilación y el silenciamiento del promotor heterólogo usado para la expresión del transgén (véanse,

por ejemplo, Escher, G., et al. J. Lipid Res. 46 (2005) 356-365; Krishnan, M., et al., FASEB J. 20 (2006) 106-108; Yang, Y., et al., J. Biotechnol. 147 (2010) 180-185). El silenciamiento del promotor puede ser el resultado de la modificación epigenética de la cromatina (combinación o complejo de ADN y proteínas que forman el contenido del núcleo de una célula). Esta puede ser la metilación directa de los dinucleótidos CpG dentro del promotor, tal como, por ejemplo, el promotor/potenciador temprano inmediato principal del citomegalovirus humano (MIE de hCMV) y/o la modificación postraducciona de las histonas. Además de inactivar las modificaciones de las histonas, tales como la metilación de la lisina 9 o 27 de la histona 3, se conocen modificaciones de activación, tales como la metilación de la lisina 4 de la histona 3, o la acetilación global de las histonas 3 y 4 (véase, por ejemplo, Cedar, H. y Bergman, Y., Nat. Rev. Genet. 10 (2009) 295-304).

La modificación epigenética de la metilación de CpG del promotor MIE de hCMV se usó como un indicador de la estabilidad de producción a largo plazo (véase Osterlechner et al.).

En el presente documento se identificó la acetilación de lisina local (H3ac) como potenciales marcadores de predicción del silenciamiento de transgenes a largo plazo.

Se ha encontrado que el dinucleótido CpG en la posición 425 del promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano (SEQ ID NO: 01) está frecuentemente metilado en líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO) inestables que producen anticuerpos. Se ha establecido una qPCR en tiempo real específica de metilación para permitir la medición rápida y sensible de la metilación de MIE de hCMV.

Se ha encontrado además que la modificación postraducciona de la histona adyacente al promotor se puede usar como marcador adicional para identificar líneas celulares de expresión/producción estable. La presencia de una modificación inactivadora es un marcador de que el clon celular/línea celular respectiva es muy inestable y mostrará una disminución en la productividad durante el ciclo futuro del cultivo que está por encima del promedio (clon celular/línea celular de producción inestable a largo plazo). Por otro lado, la presencia de una modificación activadora es un marcador de que el clon celular/línea celular respectiva es muy estable y mostrará una disminución en la productividad durante el ciclo futuro del cultivo que está por debajo del promedio (clon celular/línea celular de producción estable a largo plazo).

Se ha encontrado que usando una combinación de los dos marcadores anteriores, es decir, la metilación en la posición 425 de la SEQ ID NO: 01 y el nivel relativo de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 (H3ac/H3) cerca del ácido nucleico promotor, se puede conseguir una mejora adicional en la determinación de líneas celulares/clones celulares recombinantes de producción estable a largo plazo. Una mejora adicional es posible si también se incluye el número (de copias) de casetes de expresión de cadena ligera integrados de forma estable en el caso de un anticuerpo.

Por tanto, en el presente documento se reseñan procedimientos para la selección de un clon celular/línea celular, así como un procedimiento para la producción de un polipéptido usando dicho clon celular/línea celular. La línea de clon celular/línea celular seleccionada es una célula productora a largo plazo. Dicho clon celular/línea celular se puede seleccionar como se reseña en el presente documento basándose en i) el nivel relativo de acetilación de histona 3 con relación al nivel de histona 3 (H3ac/H3) cerca del ácido nucleico promotor, o ii) la metilación del promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano (MIE de hCMV) en la posición 425 enlazado de forma funcional al gen estructural que codifica el polipéptido, o iii) una combinación de i) y ii). Los procedimientos se definen en el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

## A. Definiciones

El término "casi" indica que el valor que sigue a esta expresión es un valor central con cierta variabilidad. En un modo de realización, la variabilidad es de  $\pm 40\%$  del valor, en otro modo de realización la variabilidad es de  $\pm 30\%$ , y en un modo de realización adicional, la variabilidad es de  $\pm 20\%$ . Por tanto, la expresión casi constante indica que un valor está, en un modo de realización, en el intervalo de un  $60\%$  a un  $140\%$ , en otro modo de realización, en el intervalo de un  $70\%$  a un  $130\%$  y, en un modo de realización adicional, en el intervalo de un  $80\%$  a  $120\%$ .

El término "anticuerpo" indica una molécula que comprende al menos dos de los llamados polipéptidos de cadena ligera (cadena ligera) y dos de los llamados polipéptidos de cadena pesada (cadena pesada). Cada uno de los polipéptidos de cadena pesada y ligera comprende un dominio variable (región variable) (en general, la parte aminoterminal de la cadena polipeptídica) que comprende regiones de unión que pueden interactuar con un antígeno. Cada uno de los polipéptidos de cadena pesada y ligera comprende además una región constante (en general, la parte carboxiterminal). La región constante de la cadena pesada media en la unión del anticuerpo i) a las células que tienen un receptor Fc gamma (Fc $\gamma$ R), tales como las células fagocíticas, o ii) a las células que tienen el receptor Fc neonatal (FcRn), también conocido como el receptor Brambell. También media en la unión con algunos factores, incluyendo los factores del sistema del complemento clásico, tales como el componente (C1q).

El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpos, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos

multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que exhiban la actividad de unión a antígeno deseada.

5 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de las cadenas pesadas, los anticuerpos se dividen en diferentes clases: clase IgA, clase IgD, clase IgE, clase IgG y clase IgM. Algunas de estas clases se dividen adicionalmente en subclases (isotipos), es decir, IgG en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, o IgA en IgA1 e IgA2. De acuerdo con la clase a la que pertenece un anticuerpo, las regiones constantes de cadena pesada se denominan  $\alpha$  (IgA),  $\delta$  (IgD),  $\epsilon$  (IgE),  $\gamma$  (IgG) y  $\mu$  (IgM), respectivamente. En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de la clase IgG. En otro modo de realización, el anticuerpo tiene una región constante humana o una región constante derivada de origen humano. En un modo de realización adicional, el anticuerpo es de la subclase IgG4 o la subclase IgG1, IgG2 o IgG3, que se modifica de tal manera que no se puede detectar la unión al receptor Fc $\gamma$  (por ejemplo, Fc $\gamma$ RIIIa) y/o la unión a C1q. En un modo de realización, el anticuerpo es de la subclase IgG4 humana o una subclase IgG1 humana mutada. En un modo de realización, el anticuerpo es de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A y L235A. En otro modo de realización, el anticuerpo es, respecto a la unión al receptor Fc $\gamma$ , de la subclase IgG4 o de la subclase IgG1 o IgG2, con una mutación en L234, L235 y/o D265, y/o contiene la mutación PVA236. En un modo de realización adicional, el anticuerpo tiene una mutación seleccionada de S228P, L234A, L235A, L235E, SPLE (S228P y L235E) y/o PVA236 (PVA236 significa que la secuencia de aminoácidos ELLG (dada en el código de aminoácidos de una letra) desde la posición de los aminoácidos 233 a 236 de IgG1 o EFLG de IgG4 se reemplaza por PVA). En un modo de realización, el anticuerpo es de la subclase IgG4 y tiene la mutación S228P de IgG4, o el anticuerpo es de la subclase IgG1 y tiene las mutaciones L234A y L235A.

El dominio variable de la cadena ligera o pesada de una inmunoglobulina comprende, a su vez, segmentos diferentes, es decir, cuatro regiones estructurales (FR) y tres regiones hipervariables (CDR).

25 La expresión "tratamiento con bisulfito" indica una reacción para la conversión de bases de citosina en un ácido nucleico en bases de uracilo en presencia de iones bisulfito, por lo que las bases de 5-metilcitosina no se convierten significativamente. Esta reacción para la detección de citosina metilada se describe en detalle por Frommer et al. (Frommer, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 1827-1831) y Grigg y Clark (Grigg, G.W. y Clark, S., Bioessays 16 (1994) 431-436; Grigg, G.W., DNA Seq. 6 (1996) 189-198). La reacción de bisulfito contiene una etapa de desaminación y una etapa de desulfonación que se puede realizar por separado o simultáneamente. La declaración de que las bases de 5-metilcitosina no se convierten significativamente únicamente tendrá en cuenta el hecho de que no se puede excluir que un pequeño porcentaje de las bases de 5-metilcitosina se convierta en uracilo, aunque se pretende convertir única y exclusivamente las bases de citosina (no metiladas).

35 El término "célula" o "célula hospedadora" indica una célula en la que se puede introducir/transfectar o se introduce/transfecta un ácido nucleico, por ejemplo, que codifica un polipéptido, opcionalmente heterólogo. El término "célula" incluye tanto las células procariontas, que se usan para la propagación de plásmidos, como las células eucariotas, que se usan para la expresión de un ácido nucleico. En un modo de realización, la célula es una célula eucariota y en un modo de realización adicional, la célula eucariota es una célula de mamífero. En otro modo de realización, la célula de mamífero se selecciona del grupo de células de mamífero que comprende células CHO (por ejemplo, CHO K1, CHO DG44), células BHK, células NS0, células SP2/0, células HEK 293, células HEK 293 EBNA, células PER.C6® y células COS. Como se usa en el presente documento, la expresión "célula" incluye la célula en cuestión y su descendencia. Por tanto, el término "célula" indica la célula primaria en cuestión y cultivos derivados de la misma independientemente del número de transferencias. También se entiende que toda la descendencia puede no ser exactamente idéntica en cuanto al contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o accidentales. Se incluye la descendencia variante que tiene la misma función o actividad biológica para la que se ha realizado el cribado en la célula transformada originalmente.

50 La expresión "sitio CpG" indica el dinucleótido CG dentro de un ácido nucleico que se puede reconocer por las enzimas metilantes de una célula y en el que la citosina se puede convertir en 5-metilcitosina. En un modo de realización, el sitio CpG está dentro de un ácido nucleico promotor.

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

60 La expresión "plásmido de expresión" indica un ácido nucleico que proporciona todos los elementos requeridos para la expresión del gen o de los genes estructurales comprendidos en una célula hospedadora. Típicamente, un plásmido de expresión comprende una unidad de propagación de plásmidos procariontas, por ejemplo, para E. coli, que comprende un origen de replicación y un marcador de selección, un marcador de selección eucariota y uno o más casetes de expresión para la expresión del gen o de los genes estructurales de interés, comprendiendo cada uno un ácido nucleico promotor, un gen estructural y un terminador de la transcripción que incluye una señal de poliadenilación. La expresión génica se coloca normalmente bajo el control de un ácido nucleico promotor, y dicho gen estructural se dice que está "enlazado de forma funcional al" ácido nucleico promotor. De forma similar, un elemento regulador y un ácido nucleico promotor mínimo están enlazados de forma funcional si el elemento regulador modula la actividad del ácido nucleico promotor mínimo.

La expresión "tiempo de generación" indica el tiempo requerido para que una célula se divida y produzca una célula hija. Por tanto, una célula que se ha dividido una vez tiene una edad de una generación. El término "generación" indica el número de divisiones celulares de una célula.

5 La expresión "alta frecuencia" indica que en este sitio de metilación la citosina se metila con más frecuencia que en otros sitios de metilación, basándose en el análisis de la metilación de un número estadísticamente significativo de células individuales o clones de ADN, respectivamente. Este número estadísticamente significativo es, en un modo de realización, al menos 10 células individuales o clones de ADN, respectivamente, en un modo de realización adicional, al menos 15 células individuales o clones de ADN, respectivamente y, en otro modo de realización, al menos 20 células individuales o clones de ADN, respectivamente. En un modo de realización, se analizan como máximo 400 células o clones de ADN, respectivamente.

15 La expresión "célula productora a largo plazo" indica una célula que produce un polipéptido, en un modo de realización un polipéptido heterólogo, por lo que la tasa de producción específica de la célula es casi constante durante al menos 30 generaciones. En un modo de realización, la célula productora a largo plazo tiene una tasa de producción específica que es casi constante durante al menos 30 generaciones, en otro modo de realización, durante al menos 45 generaciones y, en un modo de realización adicional, durante al menos 60 generaciones. En un modo de realización, la célula productora a largo plazo tiene una tasa de producción específica que es casi constante hasta 60 generaciones, en un modo de realización adicional, hasta 75 generaciones y, en otro modo de realización, hasta 90 generaciones.

25 El término "metilación" indica un proceso dentro de una célula que se ha transfectado con un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica un polipéptido enlazado de forma funcional a un promotor en el que una citosina del ácido nucleico promotor se convierte en 5-metilcitosina. Un ácido nucleico promotor en el que al menos una citosina se convierte en 5-metilcitosina se denomina ácido nucleico "metilado".

30 La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, denomina un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales comprendidos en la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes dichas variantes, en general, en cantidades insignificantes. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un único determinante en un antígeno. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo de haberse obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante una variedad de técnicas, que incluyen, pero no se limitan al procedimiento de hibridoma, procedimientos de ADN recombinante, procedimientos de presentación en fagos y procedimientos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los loci de inmunoglobulina humana; estando descritos en el presente documento dichos procedimientos y otros procedimientos ejemplares para preparar anticuerpos monoclonales. En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

45 La expresión "enlazado de forma funcional" indica una yuxtaposición de dos o más componentes, en la que los componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar de su manera pretendida. Por ejemplo, un promotor y/o potenciador están enlazados de forma funcional a una secuencia codificante si este actúa en cis para controlar o modular la transcripción de la secuencia unida. En general, pero no necesariamente, las secuencias de ADN que están "enlazadas de forma funcional" son contiguas y, si fuera necesario para unir dos regiones codificantes de proteínas tales como un líder secretor y un polipéptido, contiguas y en marco (de lectura). Sin embargo, aunque un promotor enlazado de forma funcional está localizado en general en dirección 5' de la secuencia codificante, no es necesariamente contiguo con ella. Los potenciadores no tienen que ser contiguos. Un potenciador está enlazado de forma funcional a una secuencia codificante si el potenciador aumenta la transcripción de la secuencia codificante. Los potenciadores enlazados de forma funcional pueden estar localizados en dirección 5', dentro o en dirección 3' de las secuencias codificantes y a distancia considerable del promotor. Un lugar de poliadenilación está enlazado de forma funcional a una secuencia codificante si está localizado en el extremo en dirección 3' de la secuencia codificante, de manera que la transcripción avanza a través de la secuencia codificante hacia la secuencia de poliadenilación. Un codón finalizador de la traducción está enlazado de forma funcional a una secuencia de ácido nucleico exónico si está localizado en el extremo en dirección 3' (extremo 3') de la secuencia codificante, de manera que la traducción avanza a través de la secuencia codificante hasta el codón finalizador y allí termina. El enlace se logra mediante procedimientos recombinantes conocidos en la técnica, por ejemplo, usando metodología de PCR y/o mediante ligamiento en lugares de restricción convenientes. Si no existen lugares de restricción convenientes, entonces se usan adaptadores o ligadores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

65 El término "polipéptido" indica un polímero que consiste en aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, ya sean

- 5 producidos de forma natural o sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 20 restos de aminoácido se pueden denominar "péptidos", mientras que moléculas que consisten en dos o más polipéptidos o que comprenden un polipéptido de más de 100 restos de aminoácido se pueden denominar "proteínas". Un polipéptido también puede comprender componentes no aminoacídicos, tales como grupos glucídicos, iones metálicos o ésteres de ácido carboxílico. Los componentes no aminoacídicos se pueden añadir por la célula en la que se expresa el polipéptido, y pueden variar con el tipo de célula. Los polipéptidos se definen en el presente documento en términos de la estructura de la cadena principal de aminoácidos o del ácido nucleico que codifica los mismos. Las adiciones tales como grupos glucídicos, en general, no se especifican, pero aun así pueden estar presentes.
- 10 El término "variante" de un ácido nucleico promotor indica que, dentro del ácido nucleico promotor, uno o más nucleótidos se cambian sin interferir con la función del ácido nucleico promotor. Dicho cambio puede ser para eliminar o introducir un sitio de restricción.
- 15 El término "producir" indica la expresión de un gen estructural insertado en un casete de expresión en una célula. El término incluye los procesos de transcripción y traducción de ácido nucleico. La producción se realiza en células procariontas o eucariotas apropiadas y el polipéptido expresado, es decir, producido, se puede recuperar de las células después de la lisis o del sobrenadante de cultivo.
- 20 La expresión "ácido nucleico promotor" indica una secuencia polinucleotídica que controla la transcripción de un gen/gen estructural o secuencia de ácido nucleico a la que está enlazado de forma funcional. Un ácido nucleico promotor incluye señales para la unión de la ARN polimerasa y la iniciación de la transcripción. El ácido nucleico promotor usado será funcional en la célula en la que se contempla la expresión del gen estructural seleccionado. En la técnica se conoce bien un gran número de ácidos nucleicos promotores, incluyendo promotores constitutivos, inducibles y reprimibles de una variedad de fuentes diferentes (y están identificados en bases de datos tales como GenBank) y están disponibles como o dentro de polinucleótidos clonados (a partir de, por ejemplo, depósitos tales como ATCC, así como otras fuentes comerciales o individuales).
- 25 Típicamente, un ácido nucleico promotor está localizado en la región no codificante o no traducida 5' de un gen, proximal al lugar de inicio de la transcripción de un gen estructural. Los elementos de secuencia dentro de ácidos nucleicos promotores que actúan en la iniciación de la transcripción a menudo se caracterizan por secuencias de nucleótidos consenso. Estos elementos incluyen sitios de unión a ARN polimerasa, secuencias TATA, secuencias CAAT, elementos específicos de diferenciación (DSE), elementos de respuesta a AMP cíclico (CRE), elementos de respuesta a suero (SRE), elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) y sitios de unión para otros factores de transcripción, tales como CRE/ATF, AP2, SP1, proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB) y factores octaméricos. Si un ácido nucleico promotor es un ácido nucleico promotor inducible, entonces la tasa de transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor, tal como un ácido nucleico promotor de CMV seguido de dos sitios de operador tet, los ácidos nucleicos promotores de la metalotioneína y de choque térmico. La tasa de transcripción no se regula por un agente inductor si el ácido nucleico promotor es un ácido nucleico promotor constitutivamente activo. Entre los ácidos nucleicos promotores eucariotas que se han identificado como ácidos nucleicos promotores fuertes para la expresión se encuentran el ácido nucleico promotor temprano de SV40, el ácido nucleico promotor tardío principal de adenovirus, el ácido nucleico promotor de la metalotioneína I de ratón, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, el factor de prolongación 1 alfa de hámster chino (CHEF-1), EF-1 alfa humano, ubiquitina y ácido nucleico promotor temprano inmediato principal de citomegalovirus humano
- 30 (MIE de hCMV).
- 35 La expresión "marcador de selección" indica 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 correspondiente. Típicamente, un marcador de selección conferirá resistencia a un fármaco o compensará un defecto metabólico o catabólico en la célula en la que se introduce. Un marcador de selección puede ser positivo, negativo o bifuncional. Un marcador de selección positiva útil es un gen de resistencia a antibiótico que permite la selección de células transformadas con el mismo en presencia del agente de selección correspondiente, por ejemplo, el antibiótico. Una célula no transformada no puede crecer ni sobrevivir en las condiciones selectivas, es decir, en presencia del agente de selección. Los marcadores de selección negativa permiten que las células que portan el marcador se eliminen selectivamente. Los marcadores de selección usados con células eucariotas incluyen, por ejemplo, los genes estructurales que codifican la aminoglucosido fosfotransferasa (APH), tales como, por ejemplo, los marcadores de selección de higromicina (hyg), neomicina (neo) y G418, la dihidrofolato reductasa (DHFR), la timidina cinasa (tk), la glutamina sintetasa (GS), la asparagina sintetasa, la triptófano sintetasa (agente de selección indol), la histidinol deshidrogenasa (agente de selección histidinol D) y ácidos nucleicos que confieren resistencia a puomicina, bleomicina, fleomicina, cloranfenicol, zeocina y ácido micofenólico.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65 La expresión "tasa de producción a corto plazo" indica la cantidad de polipéptido producido por una única célula en un día, que se determina a partir de la cantidad de polipéptido producido dentro de un período de tiempo dado y la densidad de células viables, en el que el período de tiempo es corto. En un modo de realización, el cultivo a corto plazo es de 2 a 20 días, en otro modo de realización, de 4 a 15 días y, en un modo de realización adicional, de 10 a 14 días.

La expresión "tasa de producción específica" o "tasa de producción" indica la cantidad de polipéptido producido por una única célula en un día, que se determina a partir de la cantidad de polipéptido producido dentro de un período de tiempo dado y la densidad de células viables. La tasa de producción específica (SPR) se puede calcular usando la siguiente fórmula:

$$SPR = P_2 - P_1 / ((D_2 + D_1) / 2 * \Delta t) \quad (\text{Fórmula 2})$$

con

SPR [pg/célula/d]: tasa de producción específica,

$P_1$  [µg/ml]: concentración de polipéptido al comienzo del período de tiempo,

$P_2$  [µg/ml]: concentración de polipéptido al final del período de tiempo,

$D_1$  [células/ml]: densidad de células viables al comienzo del período de tiempo,

$D_2$  [células/ml]: densidad de células viables al final del período de tiempo,

$\Delta t$  [d]: duración del período de tiempo.

La expresión "gen estructural" indica la región de un gen sin una secuencia señal, es decir, la región codificante.

## B. Los procedimientos como se reseñan en el presente documento

Las líneas celulares/clones celulares que producen un polipéptido, es decir, células transfectadas con un ácido nucleico que comprende un casete de expresión que contiene un gen estructural que codifica un polipéptido heterólogo, pueden agruparse en diferentes clases: En una primera clase de células, la tasa de producción específica es casi constante a lo largo de múltiples generaciones. En contraste con esto, en la segunda clase de células, la tasa de producción específica está disminuyendo, especialmente disminuyendo monótonamente, con cada generación a lo largo de múltiples generaciones. Sin limitarse a esta teoría, la disminución de la productividad de las células y líneas celulares productoras de polipéptidos, respectivamente, se debe al menos en parte a la metilación en constante aumento y, con ello, a la inactivación/silenciamiento del ácido nucleico promotor enlazado de forma funcional al gen estructural que codifica el polipéptido de interés. Además, la disminución puede ser por la pérdida de copias del gen estructural que codifica la proteína de interés.

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que el dinucleótido CpG en la posición 425 del promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano (MIE de hCMV) (SEQ ID NO: 01) se metila frecuentemente en líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO) inestables que producen anticuerpos. Esto se puede usar como marcador para la predicción de la estabilidad de la producción recombinante a largo plazo de un clon celular/línea celular recombinante que expresa una proteína de interés codificada por un gen estructural enlazado de forma funcional a un promotor MIE de hCMV (por ejemplo, de la SEQ ID NO: 01).

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la modificación postraduccional de la histona adyacente al promotor se puede usar como marcador adicional para identificar líneas celulares de expresión/producción estable. La presencia de una modificación inactivadora es un marcador de que el clon celular/línea celular respectiva es muy inestable y mostrará una disminución en la productividad durante el ciclo futuro del cultivo que está por encima del promedio (clon celular/línea celular de producción inestable a largo plazo). Por otro lado, la presencia de una modificación activadora es un marcador de que el clon celular/línea celular respectiva es muy estable y mostrará una disminución en la productividad durante el ciclo futuro del cultivo que está por debajo del promedio (clon celular/línea celular de producción estable a largo plazo).

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que usando una combinación de la metilación en la posición 425 de la SEQ ID NO: 01 y el nivel relativo de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 (H3ac/H3) cerca del ácido nucleico promotor se puede conseguir una mejora adicional en la determinación de líneas celulares/clones celulares recombinantes de producción estable a largo plazo.

### B.1. Metilación del promotor

Se ha encontrado que la presencia de metilación detectable en el ácido nucleico promotor del promotor MIE de CMV humano en la posición 425 que está enlazado de forma funcional al gen estructural que codifica un polipéptido proporciona información con respecto a la productividad a largo plazo de la línea celular o clon celular, respectivamente.

Cada ácido nucleico promotor usado para la expresión de un gen estructural comprende sitios propensos a la

metilación por las enzimas de la célula en la que se ha introducido, si el ácido nucleico promotor no está protegido por elementos protectores. Un sitio susceptible de metilación se denomina sitio CpG y comprende/consiste en el dinucleótido CG. Pero no todos los sitios CpG se metilan con la misma frecuencia relativa; algunos de los sitios CpG se metilan con mayor frecuencia que otros. Se ha encontrado que ciertos sitios, por ejemplo, dentro del promotor MIE de CMV humano se metilan con una frecuencia diferente y tienen un impacto diferente en el silenciamiento del promotor.

El siguiente procedimiento se puede usar para identificar un sitio CpG en una secuencia de ácido nucleico:

- 1) proporcionar una célula con una tasa de producción de un polipéptido que es, después de un tiempo de cultivo de 30 generaciones de la célula en ausencia de un agente de selección, menos de un 90 % de la tasa de producción de la célula después de la primera generación del cultivo,
- 2) aislar por separado el ADN de al menos 10 células de un cultivo de la célula de 1),
- 3) modificar la citosina del ADN aislado mediante tratamiento con bisulfito,
- 4) identificar un sitio CpG dentro del ácido nucleico promotor enlazado de forma funcional al gen estructural que codifica el polipéptido con una frecuencia de metilación de al menos 0,2, basado en el ADN obtenido en la etapa 3) e identificar de este modo un sitio CpG.

Un criterio, es decir, en un modo de realización para un clon celular/línea celular inestable, es una tasa de producción del clon celular/línea celular después de un tiempo de cultivo de 30 a 60 generaciones de un 60 % o menos de la tasa de producción del clon celular/línea celular después de la primera generación del cultivo.

En un modo de realización, la línea celular tiene una tasa de producción después de 30-60 generaciones en cultivo de más de un 60 % de la tasa de producción al comienzo del cultivo.

La etapa de modificar la citosina del ADN aislado mediante tratamiento con bisulfito puede comprender las siguientes etapas:

- 3-a) incubar el ADN aislado en presencia de iones sulfito, por lo que el ADN se desamina, y
- 3-b) incubar el ADN desaminado en condiciones alcalinas, por lo que el ADN desaminado se desulfona.

Un procedimiento para obtener un clon celular/línea celular que produce un polipéptido es un proceso que comprende al menos una etapa de transfección y al menos una etapa de selección que incluye el depósito de una única célula de células transfectadas con éxito directamente después de la transfección o después del crecimiento en presencia de un agente de selección. En la etapa de selección, las células se identifican basándose en su tasa de producción específica a corto plazo, es decir, basándose en la concentración de polipéptido en el sobrenadante después de un cultivo a corto plazo. Entre las células seleccionadas, algunas tienen una tasa de producción específica que es casi constante a lo largo de múltiples generaciones y otras tienen una tasa de producción específica que disminuye monótonamente a lo largo de múltiples generaciones. Por tanto, con los criterios de selección generalmente aplicados (a corto plazo) no se puede hacer una selección específica de una célula o células con una productividad estable a largo plazo.

En los procedimientos como se reseñan en el presente documento, se puede analizar cualquier clon celular/línea celular obtenida mediante transfección con un plásmido de expresión que comprende un casete de expresión que comprende un ácido nucleico promotor enlazado de forma funcional a un gen estructural que codifica un polipéptido de interés para que se produzca por la célula transfectada. El plásmido de expresión generalmente comprende también un marcador de selección. Por tanto, las células se cultivan en presencia de un agente de selección después de la etapa de transfección y antes de la etapa de selección. De forma alternativa, el procedimiento puede comprender cultivar las células sin depósito previo de una única célula o dilución limitada, es decir, como conjunto, en presencia de un agente de selección. Además, de forma alternativa, el procedimiento puede comprender cultivar las células después del depósito de una única célula o dilución limitante.

Después del cultivo/selección del conjunto, se debe realizar un depósito de una única célula. Si el depósito de una única célula se realiza después de una etapa de cultivo en conjunto, las células también se cultivan después del depósito de una única célula.

Para identificar líneas celulares o clones celulares con una tasa de producción específica que es casi constante durante múltiples generaciones, la concentración de polipéptidos en el sobrenadante y la densidad de células viables se deben determinar en tiempos de cultivo definidos en un cultivo a largo plazo durante múltiples generaciones. Los procedimientos adecuados, por lo tanto, son conocidos por los expertos en la técnica, tales como ELISA y FACS, respectivamente.

Un sitio CpG con una alta frecuencia de metilación se puede identificar mediante el tratamiento con bisulfito del ADN monocatenario, por ejemplo, a pH 5, con desulfuración alcalina subsiguiente. En el presente documento, los sitios CpG metilados y no metilados se pueden discriminar. En las condiciones de tratamiento específicas, la citosina, pero no la 5-metilcitosina, se desamina en la posición 4 del N-heterociclo y se convierte en uracilo. Las cadenas de ADN complementarias se convierten en dos cadenas, la cadena A y la cadena B, que ya no son complementarias. La determinación se puede basar en cualquiera de estas cadenas.

Este cultivo a largo plazo se debe realizar una sola vez para el ácido nucleico promotor o la combinación de ácido nucleico promotor y línea celular. Si el mismo ácido nucleico promotor o combinación de célula y promotor se usa por segunda vez, la selección se puede basar en los datos ya recogidos.

Se pueden aplicar varias técnicas para revelar diferencias de secuencia entre alelos metilados y no metilados después del tratamiento con bisulfito. Por ejemplo, la secuencia de interés (ya sea la cadena A o la cadena B) se puede amplificar por PCR en condiciones no específicas de metilación, es decir, con un cebador no sensible a los sitios metilados, y luego se puede analizar mediante procedimientos tales como secuenciación de ADN (con o sin clonación), análisis de punto de fusión de alta resolución, o análisis de micromatrices. En otro modo de realización, se puede realizar una PCR cuantitativa (qPCR) con un cebador o sondas sensibles a la metilación o específicas de metilación. En un enfoque alternativo, el ADN metilado se precipita con anticuerpos específicos para 5-metilcitosina, seguido de una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

La PCR específica de metilación (MSP) también se puede usar para abordar la secuencia del ADN tratado con bisulfito directamente sin la amplificación por PCR previa de la región de interés. Los cebadores usados en MSP comprenderán uno o más sitios CpG. Son complementarios de la 5-metilcitosina no convertida para la detección de ADN metilado o complementarios de uracilo convertido a partir de citosina para la detección de ADN no metilado.

La metilación del sitio CpG se determina para una serie de células. En un modo de realización, el número de células es al menos 10, en otro modo de realización, al menos 15 y, en un modo de realización adicional, al menos 20. Posteriormente, se calcula la frecuencia de metilación para el sitio CpG, es decir, se calcula el número de células metiladas en ese sitio CpG dividido por el número total de células analizadas. Un sitio CpG con una alta frecuencia de metilación es un sitio CpG que tiene una frecuencia de metilación de al menos 0,2, en un modo de realización de al menos 0,25, en un modo de realización de al menos 0,4, y en un modo de realización preferente de al menos 0,5.

Se ha encontrado que incluso niveles bajos de ácido nucleico promotor metilado, es decir, por encima de un valor umbral predeterminado, en una célula o línea celular usada para la producción de un polipéptido se pueden usar para predecir una disminución de la productividad durante el cultivo a largo plazo.

En la figura 1 se muestra el número de sitios CpG metilados del mismo ácido nucleico promotor obtenido de diferentes células.

El promotor MIE de CMV humano como una secuencia de ácido nucleico como se muestra a continuación (los sitios CpG están subrayados):

TATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCC  
GCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCA  
ATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACG  
CCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGG  
ACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTAGCATGGTGATGCGGTTTTGGCA  
GTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTCCCAAGTCTCCACCCATTGACGTC  
AATGGGAGTTTGTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCAT  
TGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCCGTTTGTAGTGAACG

(SEQ ID NO: 01).

En la SEQ ID NO: 01 hay presentes treinta y tres sitios CpG, que son sitios potenciales para la metilación del ácido nucleico. Con el procedimiento esbozado anteriormente, se pueden identificar los restos de citosina dentro del promotor MIE de CMV humano que están predominantemente metilados.

La cadena A con todos los sitios CpG conservados tiene la secuencia de nucleótidos



ATGTTGATATTGATTATTGATTAGTTATTAATAGTAATTAATTACGGGGTTATTAGTTTATAGTTTA  
TATATGGAGTTTCGCGTTATATAATTTACGGTAAATGGTTTCGTTTGGTTGATCGTTTAAACGATTTTC  
GTTTATTGACGTTAATAATGACGTATGTTTTTATAGTAACGTTAATAGGGATTTTTTATTGACGTTA  
ATGGGTGGAGTATTTACGGTAAATGTTTTATTTGGTAGTATATTAAGTGTATTATATGTTAAGTACG  
TTTTTTATTGACGTTAATGACGGTAAATGGTTTCGTTTGGTATTATGTTTAGTATATGATTTTTATGGG  
ATTTTTTTATTTGGTAGTATATTTACGTATTAGTTATCGTTATTAGTATGGTGATGCGGTTTTGGTA  
GTATATTAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGATTTACGGGGATTTTTAAAGTTTTTATTTTATTGACGTT  
AATGGGAGTTTGTTTTGGTATTAATAATTAACGGGATTTTTTAAATGTCGTAATAATTTTCGTTTTAT  
TGACGTTAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTTTATATAAGTAGAGTTTCGTTTAGTGAACG

(SEQ ID NO: 02) y la cadena A completamente desaminada tiene la secuencia de nucleótidos

5

ATGTTGATATTGATTATTGATTAGTTATTAATAGTAATTAATTATGGGGTTATTAGTTTATAGTTTA  
TATATGGAGTTTGTGTTATATAATTTATGGTAAATGGTTTGGTTGGTTGATTGTTTAAATGATTTTT  
GTTTATTGATGTTAATAATGATGTATGTTTTTATAGTAATGTTAATAGGGATTTTTTATTGATGTTA  
ATGGGTGGAGTATTTATGGTAAATGTTTTATTTGGTAGTATATTAAGTGTATTATATGTTAAGTATG  
TTTTTTATTGATGTTAATGATGGTAAATGGTTTGGTTGGTATTATGTTTAGTATATGATTTTTATGGG  
ATTTTTTTATTTGGTAGTATATTTATGTATTAGTTATTGTTATTAGTATGGTGATGIGGTTTTGGTA  
GTATATTAATGGGTGTGGATAGTGGTTTGATTTATGGGGATTTTTAAAGTTTTTATTTTATTGATGTT  
AATGGGAGTTTGTTTTGGTATTAATAATTAATGGGATTTTTTAAATGTTGTAATAATTTTGTTTTTAT  
TGATGTTAAATGGGTGGTAGGTGTGTATGGTGGGAGGTTTATATAAGTAGAGTTTTGTTTAGTGAATG

(SEQ ID NO: 03). La cadena B con todos los sitios CpG conservados tiene la secuencia de nucleótidos

CGTTTATTAAACGGAGTTTTGTTTATATAGATTTTTTATCGTATACGTTTATCGTTTATTTGCGTTA  
ATGGGGCGGAGTTGTTACGATATTTTGAAAGTTTCGTTGATTTGGTGTTAAAATAAATTTTTATT  
GACGTTAATGGGGTGGAGATTTGAAATTTTCGTGAGTTAAATCGTTATTTACGTTTATTGATGTAT  
TGTTAAAATCGTATTATTATGTTAATAGCGATGATTAATACGTAGATGTATTGTTAAGTAGGAAAGT  
TTTTATAAGGTTATGTATTGGGTATAATGTTAGGCGGGTTATTTATCGTTATTGACGTTAATAGGGGG  
CGTATTTGGTATATGATATATTTGATGTATTGTTAAGTGGGTAGTTTATCGTAAATATTTTATTTAT  
TGACGTTAATGGAAAGTTTTTATTGGCGTTATTATGGGAATATACGTTATTATTGACGTTAATGGGC  
GGGGGTGTTGGGCGTTAGTTAGGCGGGTTATTTATCGTAAGTTATGTAACGCGGAATTTTATATA  
TGGGTTATGAATTAATGATTTTCGTAATTGATTATTATTAATAATTAGTTAATAATTAATGTTAATAT

10

(SEQ ID NO: 04) y la cadena B en forma completamente desaminada tiene la secuencia de nucleótidos

**TGTTTATTAAATGGAGTTTTGTTTATATAGATTTTTTATGTATATGTTTATGTTTATTTGTGTTA  
ATGGGGTGGAGTTGTTATGATATTTTGGAAAGTTTTGTTGATTTTGGTGTAAATAAATTTTTATT  
GATGTTAATGGGGTGGAGATTTGGAAATTTTGTGAGTTAAATGTTATTTATGTTTATTGATGTAT  
TGTTAAAATGTATTATTATGTTAATAGTGATGATTAATATGTAGATGTATTGTTAAGTAGGAAAGT  
TTTATAAGGTTATGTATTGGGTATAATGTTAGGTGGGTTATTTATGTTATTGATGTTAATAGGGG  
TGATTTGGTATATGATATATTTGATGTATTGTTAAGTGGGTAGTTTATGTAAATATTTTATTTAT  
TGATGTTAATGGAAAGTTTTTATTGGTGGTTATTATGGGAATATATGTTATTATTGATGTTAATGGGT  
GGGGTTGTTGGGTGGTTAGTTAGGTGGGTTATTTATGTAAGTTATGTAATGTGGAATTTTATATA  
TGGGTTATGAATTAATGATTTTGTAAATTGATTATTATTAATAATTAGTTAATAATTAATGTTAATAT**

(SEQ ID NO: 05).

5 En la figura 4 se muestra la frecuencia de metilación en sitios CpG individuales en diferentes líneas celulares. Los números se han determinado analizando de 19 a 22 clones diferentes obtenidos de diferentes líneas celulares parentales CHO después de la transfección con un plásmido que comprende un casete de expresión para expresar un polipéptido de interés. Se muestra el patrón de metilación de los ADN individuales (parte inferior) y la frecuencia de metilación en los sitios CpG individuales (parte superior) para cada línea celular. La línea celular K18.1, por ejemplo, está altamente metilada (figura 4A). La frecuencia de metilación no es igual en los diferentes sitios CpG, pero parece tener centros en 3 agrupaciones, es decir, en el extremo 5', el extremo 3' y alrededor de la posición (o nucleótido, respectivamente) 400. Catorce de las 22 inserciones secuenciadas tenían una citosina en la posición 425. La metilación del ácido nucleico promotor en la línea celular 43-16 A10 se muestra en la figura 4E. La distribución de la metilación es similar a la distribución observada con la línea celular K18.1. Al igual que con K18.1, la posición 425 se metiló con mayor frecuencia: cinco de 20 inserciones secuenciadas contenían una citosina en esta posición.

20 En otras tres líneas celulares analizadas, la citosina se detecta esporádicamente, es decir, como eventos únicos, en diferentes sitios CpG (figuras 4B, 4C y 4D). Para obtener una significación estadística para las líneas celulares con una baja frecuencia de metilación global, se requeriría la secuenciación de cientos de inserciones. Además, estos eventos individuales también pueden representar eventos positivos falsos debido a la desaminación incompleta de la citosina en lugar de la metilación del promotor real.

25 Para la determinación fiable de la metilación específica de la posición CpG, se ha desarrollado un procedimiento de PCR específico de metilación. Para la metilación, se pueden usar cebadores de PCR específicos como se muestra en la siguiente tabla 1. Estos cebadores, ya sea en solitario o en combinación, también son aspectos como se reseñan en el presente documento.

30 **Tabla 1:** Cebadores que se pueden usar en PCR específica de metilación.

n.º de cebador (dirección)	metilación específica	secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO:
227 (directo)	no	ATGTTGATATTGATTATTGATTAG	06
228 (directo)	no	TATGGGATTTTTTTATTTGGTAGT	07
229 (inverso)	no	ACTCCTCTCCCAAAACATAAATCTA	08
237 (inverso)	no	CCAAAACAAACTCCCATTAAC	09
238 (directo)	no	GGGGTTATTAGTTTATAGTTTATA	10
239 (directo)	no	TGGTATTATGTTTAGTATATGATTTTAT	11
240 (directo)	no	GGATTTTTTTATTTGGTAGTATATT	12
254 (inverso)	sí	AAATCCCCGTAAATCAAACCG	13
263 (directo)	no	GGGATTTTTTTATTTGGTAGTATATT	14
264 (directo)	no	TATGGGATTTTTTTATTTGGTAGTA	15
265 (inverso)	sí	ATCCCCGTAAATCAAACCG	16
266 (inverso)	sí	TCCCCGTAAATCAAACCG	17
267 (inverso)	sí	CCCCGTAAATCAAACCG	18

268 (inverso)	sí	CCCGTAAATCAAACCGC	19
262 (inverso)	sí	AAATCCCCRTAAATCAAACCG	20

En el curso de la evaluación del cebador, se ha encontrado que los pares de cebadores específicos de metilación, que son altamente selectivos para el ADN promotor de CMV desaminado con una citosina en la posición 425, difieren en sus propiedades (véase la figura 6). En un modo de realización, los cebadores para la PCR específica de metilación tienen la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 14 y la SEQ ID NO: 18.

Por tanto, en un modo de realización de los procedimientos reseñados en el presente documento, es el ácido nucleico promotor, el ácido nucleico promotor de CMV humano de la SEQ ID NO: 01. En un modo de realización, el sitio CpG con alta frecuencia de metilación es el sitio CpG en la posición (pb) 425 de la SEQ ID NO: 01.

**Tabla 2:** Resultados esperados para pares de cebadores específicos de metilación (MSP) y pares de cebadores universales en qPCR.

Molde	n.º 11	n.º 62	n.º 01	n.º 04
posición 425	T	C	C	T
posición 437	T	C	T	C
	Amplificación			
par de cebadores específicos de metilación	-	+	+	-
par de cebadores universales	+	+	+	+

El par de cebadores universales debería amplificar los cuatro moldes, mientras que el par de cebadores MSP debería amplificar selectivamente el molde n.º 62 (SEQ ID NO: 22) y el molde n.º 01 (SEQ ID NO: 23). El valor de  $\Delta C_p$  debería ser lo más pequeño posible entre el par de cebadores MSP y el par de cebadores universales en el molde n.º 62 y el molde n.º 01. Por el contrario, los valores de  $C_p$  obtenidos con el par de cebadores MSP en los moldes n.º 11 (SEQ ID NO: 21) y n.º 04 (SEQ ID NO: 24) deberían ser lo más altos posible, es decir, la  $\Delta C_p$  comparada con la amplificación con el par de cebadores universales debería ser máxima.

El cebador específico de metilación debería poder detectar 5-metilcitosina en la posición 425 de manera selectiva, aunque otras dos posiciones de metilación adicionales están presentes en la posición 416 y 437.

La determinación de la metilación es posible con una frecuencia de metilación de un 1 % a un 100 %.

Se observaron resultados comparables con respecto a la extensión de la metilación con una PCR específica de metilación y mediante clonación y secuenciación, por lo que la PCR específica de metilación es mucho más sensible. Las líneas celulares con una productividad decreciente en la producción a largo plazo tienen una metilación en la posición 425 con una frecuencia de metilación por encima de un valor umbral. El valor umbral es en un modo de realización dos veces el ruido de fondo del procedimiento de determinación. Una línea celular con productividad estable a largo plazo tiene una frecuencia de metilación en el sitio CpG que está por debajo del valor umbral.

Para el análisis del punto de fusión de alta resolución, el ácido nucleico promotor se amplifica desde la posición 334 hasta la posición 487, es decir, 154 pb. Un ejemplo de análisis del punto de fusión se muestra en la figura 10A y su primera derivada en la figura 10B. Se puede ver que con un análisis de punto de fusión de alta resolución, un ácido nucleico promotor metilado (molde n.º 16, SEQ ID NO: 25) se puede distinguir de un ácido nucleico promotor no metilado (molde n.º 11). El fragmento de ácido nucleico promotor metilado se puede detectar a una frecuencia relativa de un 50 % o más. El fragmento promotor no metilado se puede detectar a una frecuencia relativa de un 10 % o más.

Estos datos muestran que la estabilidad de producción de las líneas celulares CHO recombinantes que contienen genes introducidos de forma recombinante cuya expresión está dirigida por el promotor/potenciador temprano inmediato principal del CMV humano se puede predecir midiendo el estado de metilación de la citosina en la posición 425.

Por tanto, se ha encontrado que la determinación de la metilación de C425 se puede usar como un marcador predictivo para determinar la estabilidad de la expresión del polipéptido en clones de células recombinantes generados. Esto permite la selección de clones estables con productividad estable durante el desarrollo de la línea celular. Además, se ha encontrado que la metilación de C425 de un 5 % o menos es un criterio adecuado para la selección de clones de células estables (esto tiene en cuenta el umbral del procedimiento de detección usado). También se ha encontrado que la fracción de clones celulares que se predice falsamente como estable (clones celulares negativos falsos) se puede reducir cultivándolos durante algún tiempo en ausencia de MTX antes de someterlos a prueba.

Por tanto, en el presente documento se reseña un procedimiento para el enriquecimiento de líneas celulares que expresan un polipéptido recombinante a largo plazo (estable) a partir de una población de células transfectadas seleccionando células que tienen una metilación relativa del promotor en la posición 425 de la SEQ ID NO: 01 de un 5 % o menos. Esta frecuencia de metilación relativa se puede determinar usando un procedimiento de qPCR específico de la metilación como se reseña en el presente documento con los cebadores como se reseñan en el presente documento.

Habiendo establecido un procedimiento de PCR sensible y preciso para cuantificar la metilación del nucleótido de MIE de hCMV en el sitio CpG 425, se ha evaluado la metilación en las líneas de células CHO recombinantes K18.1, 43 16 A10 y G45-2. El ADN tratado con bisulfito que se había analizado mediante secuenciación se usó como molde en la qPCR en tiempo real específica de metilación, ya sea directamente o después de la amplificación por PCR de la región MIE de hCMV completa (figuras 8A y 8B). Las dos configuraciones de ensayo proporcionaron resultados comparables. Más importante aún, los resultados se correlacionaron bien con los resultados de la secuenciación con bisulfito. Esto demuestra que el ensayo de qPCR específico de metilación del sitio CpG 425 se puede usar para medir la metilación de MIE de hCMV en el sitio CpG 425 en líneas celulares CHO recombinantes y se puede usar sin la amplificación por PCR previa del ADN diana.

En principio, se podrían explorar otros sitios CpG dentro del ADN promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV para predecir la inestabilidad de producción. Sin embargo, se encontró que la metilación en C425 es aproximadamente 5 veces más alta que la metilación promedio en todos los sitios CpG. Además, algunos sitios no se metilaron en absoluto incluso en clones de células altamente metiladas, por ejemplo, C280 y C289 (figuras 4F, 4J y 13). Al elegir el sitio CpG correcto, es decir modificado frecuentemente, para el análisis de metilación del promotor, el ensayo se vuelve más sensible. La metilación significativa de los clones G25-17, G25-10 y 43-16 A10, que es aproximadamente un 10 %, probablemente se pasaría por alto si se eligiera un sitio CpG al azar para el análisis.

La predicción de estabilidad al abordar el estado de metilación de un sitio pertinente de CpG dentro de un ácido nucleico promotor se puede usar también con otros ácidos nucleicos promotores heterogéneos.

Para evaluar la potencial correlación de la metilación del promotor temprano y la inestabilidad de producción, la metilación del sitio CpG 425 al inicio de un estudio de estabilidad se representó frente a la alteración relativa de la qP en presencia o en ausencia de un agente de selección (MTX). Los gráficos de correlación se muestran en las figuras 11A (con MTX) y 11B (sin MTX). Para la evaluación, las áreas del gráfico se dividieron en cuatro compartimentos con límites a un 5 % de metilación, lo que equivale dos a tres veces el fondo de la medición de metilación, es decir, el límite de detección, y una disminución de un 40 % en qP, que representa el límite de aceptación de estabilidad de producción (esto es también un modo de realización del procedimiento como se reseña en el presente documento). Se determinó el número de clones en los diferentes compartimentos. El análisis de contingencia del estado de estabilidad por estado de metilación usando una prueba de ji al cuadrado de Pearson demostró una asociación significativa con un valor p de 0,05 para el cultivo con MTX y una tendencia con un valor p de 0,13 para el cultivo sin MTX. Resultó que la mayoría de los clones con menos de un 5 % de metilación en el sitio CpG 425 se encontraron en la fracción de clones estables (menos de un 40 % de disminución en la qP con o sin MTX, que se muestra en los compartimentos superiores izquierdos).

Por tanto, resumiendo lo anterior, la pérdida de productividad durante el cultivo y la ampliación a largo plazo es un riesgo importante en el desarrollo de líneas celulares de fabricación. Por lo tanto, existe la necesidad de marcadores moleculares de inestabilidad de producción que se puedan determinar y examinar rápida y fácilmente. Se ha encontrado que la metilación del promotor se puede emplear para predecir una pérdida de productividad en líneas celulares CHO recombinantes. Para evaluar esto, se analizó la metilación del ADN de 33 sitios CpG dentro de una región de 603 pb del promotor/potenciador MIE de hCMV ampliamente usado. El nivel global de metilación de la región investigada varió entre aproximadamente un 1 % y un 18 % de todos los sitios CpG. Un uno por ciento de metilación aparente representa el fondo técnicamente alcanzable como resultado de la desaminación incompleta de las citosinas no metiladas. Además, dentro de los promotores metilados, el nivel de metilación varía enormemente entre los sitios CpG individuales y se acumula en tres agrupaciones con un máximo en el sitio CpG 425. La metilación en el sitio CpG 425 es aproximadamente 5 veces más alta que el grado promedio de metilación de todos los otros sitios CpG. Por otro lado, algunos sitios CpG parecen estar completamente no metilados, incluso en líneas celulares altamente metiladas. La metilación global de MIE de hCMV, así como la distribución de la metilación entre los sitios CpG individuales, pueden variar considerablemente entre los tipos de células y tejidos (véanse, por ejemplo, Kong, Q., et al., PLoS One 4 (2009) e6679; Krishnan, M., et al., FASEB J. 20 (2006) 106-108; Mehta, A.K., et al. Gene 428 (2009) 20-24).

Se ha encontrado que la metilación dominante del sitio CpG 425 es adecuada como marcador para la metilación de MIE de hCMV. Se ha establecido una qPCR específica de metilación del sitio CpG 425 como un procedimiento rápido y sensible con rendimiento medio. Al analizar un gran número de líneas celulares por qPCR específica de metilación del sitio CpG 425, se ha encontrado que la mayoría de los productores inestables presentaban más de un 5 % de metilación en el sitio CpG 425, incluso antes del cultivo a largo plazo, mientras que la mayoría de los productores estables mostraban menos de un 5 % de metilación en este sitio.

La metilación temprana del sitio de CpG 425 se encontró exclusivamente con clones que portaban más de diez copias del plásmido heterólogo. Informes anteriores han proporcionado alguna evidencia de que las repeticiones en tándem de múltiples copias de transgén son más susceptibles a la metilación y el silenciamiento en células de mamífero (Garrick, D., et al, Nat. Genet. 18 (1998) 56-59, McBurney, M.W., et al., Exp. Cell Res. 274 (2002) 1-8).

**B.2. Acilación de histonas**

Se determinaron las cantidades relativas de modificaciones de histonas cerca del promotor MIE de hCMV. Se examinaron las marcas H3ac y H3K4me3 (marcas de activación) y las marcas H3K9me3 así como H3K27me3 (marcas de represión). Esas modificaciones de histonas se examinaron en las posiciones 404 a 507 de la SEQ ID NO: 01 (secuencia promotora MIE de hCMV humano; tacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaatcaac gggactt) que indica una secuencia de -97 a -200 pb en dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción y contiene el sitio CpG en la posición C-425 (es decir, -179 pb en dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción) y que se puede amplificar con el par de cebadores 396/397.

Se investigaron los niveles de acetilación relativa de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 cerca del fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano como marcadores de predicción para la estabilidad de producción con y sin agente de selección.

Se descongelaron dos líneas celulares congeladas ejemplares desde el punto de inicio (banco de siembra primario) de cultivo y se determinaron las cantidades relativas de modificaciones de histonas específicas cerca del promotor MIE de hCMV. El proyecto T y el proyecto H se ejecutaron de forma independiente y cada línea celular se cultivó durante al menos 60 generaciones en las condiciones con (+) y sin (-) agente de selección (metotrexato 250 nM).

Se determinaron los datos de la tasa de metilación del promotor MIE de hCMV (mC-425), el número de copias por célula de (PSB), así como el porcentaje de alteración a lo largo de 60 generaciones de la productividad específica ( $\Delta$ qP). El registro de los datos se realizó como se describe anteriormente por Osterlehner et al.

**Tabla:** Datos de 12 líneas celulares del proyecto T. mC-425 es la media del porcentaje de metilación de la citosina en la posición 425 en dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción (TSS; -179 con relación al TSS) de MIE de hCMV al comienzo de la fase de cultivo (PSB);  $\Delta$ qP es el porcentaje de alteración de la productividad específica (qP) durante un período de tiempo de 60 generaciones de células; el número promedio de copias de la cadena ligera (LC) del transgén IgG se midió al comienzo del cultivo (PSB).

<b>Proyecto T: 12 líneas celulares CHO productoras de anticuerpos. Generadas por transfección de CHO-K1-M con plásmido p5057</b>				
N.º de muestra	mC-425 (%)	$\Delta$ qP (60 generaciones) en %		Copias de LC/célula
	PSB	+ MTX	- MTX	PSB
T-1	0,44	-35,40	-34,20	4,4
T-2	2,20	-30,60	-72,00	11,5
T-3	3,54	-81,60	-96,60	9,4
T-4	0,92	-23,40	-47,40	4,6
T-5	4,41	-15,60	-22,20	5,3
T-6	0,47	-14,40	-20,40	2,6
T-7	0,22	-16,20	-31,80	1,6
T-8	52,40	-64,80	-79,20	64,3
T-9	52,84	-27,60	-49,20	67,5
T-10	49,61	3,60	1,20	70,5
T-11	2,02	-10,20	-21,60	4,6
T-12	61,34	-32,40	-22,80	11,5

**Tabla:** Datos de 20 líneas celulares del proyecto H. mC-425 es la media del porcentaje de metilación de la citosina en la posición 425 en dirección 5' del TSS de MIE de hCMV al comienzo de la fase de cultivo (PSB);  $\Delta$ qP es el porcentaje de alteración de la productividad específica (qP) durante un período de tiempo de 60 generaciones de células; el número promedio de copias de la cadena ligera (LC) del transgén IgG se midió al comienzo del cultivo (PSB).

<b>Proyecto H: 20 líneas celulares CHO productoras de anticuerpos. Generadas por transfección de CHO-K1-M con plásmido p7672</b>				
N.º de muestra	me de C-425 (%)	ΔqP (60 generaciones) en %		Copias de LC/célula
	PSB	+ MSX	- MSX	PSB
H-1	15,7	-46,80	-80,20	168,8
H-2	9,9	-71,00	-70,30	2,0
H-3	16,5	-73,10	-89,60	3,2
H-4	10,5	-69,30	-69,50	2,9
H-5	11,0	-40,40	-48,80	1,8
H-6	7,1	-79,50	-71,70	37,6
H-7	4,8	-66,20	-81,50	53,0
H-8	4,4	-67,40	-75,70	30,6
H-9	23,4	-87,00	-77,00	95,1
H-10	26,2	-16,40	-73,30	48,8
H-11	0,2	-43,10	-96,10	3,3
H-12	0,1	-42,00	-33,00	1,5
H-13	1,3	8,00	-18,50	1,1
H-14	0,0	6,80	5,40	1,3
H-15	0,1	-16,50	-40,40	3,5
H-16	0,4	16,20	-32,80	3,0
H-17	1,0	-13,20	-31,30	4,2
H-18	46,3	-67,50	319,40	8,8
H-19	16,7	-11,20	2,70	10,1
H-20	21,8	-40,30	-80,60	4,8

5 Para la investigación de la cantidad relativa de modificación de histonas, se recolectaron células CHO viables, que portan un gen recombinante dirigido por el promotor MIE de hCMV. Después de la fijación en formaldehído al 3,7 %, la cromatina lisada se sonicó y los complejos de ADN-histona reticulados se purificaron de acuerdo con la modificación de histona apropiada. Posteriormente, los complejos de ADN-histona acumulados se degradaron con proteinasa K y se eluyeron los fragmentos de ADN. Las cantidades de varios fragmentos de ADN se compararon con qPCR, usando pares de cebadores específicos.

10 Para verificar la consistencia de unión de anticuerpo-histona con respecto a la modificación correspondiente de la región de referencia, se sometieron a prueba diversos genes para determinar la acumulación de una modificación de histona específica. En primer lugar, la cantidad de modificación de histonas filtradas por anticuerpos cerca de las regiones de referencia se comparó con la muestra purificada de un control no específico sin anticuerpo (simulado) en el proyecto T y el proyecto H en una muestra cada uno. Se usaron fragmentos de ADN de muestras purificadas con anticuerpo, muestras de entrada simuladas y no tratadas como moldes para qPCR. Se añadieron pares de cebadores de regiones de referencia potenciales a cada muestra y se realizó qPCR por triplicado. Los valores de Cq obtenidos se compararon como porcentaje de la muestra de entrada. En ambos proyectos, las muestras purificadas con anticuerpo obtuvieron valores más altos que los simulados en la región apropiada. Esto confirmó la unión adecuada. Además, las marcas de activación H3ac y H3K4me3 se acumulan en las regiones activas Eif3i y Gusb. En contraste, la región silenciada Fox2a tenía una mayor concentración de H3K9me3, mientras que H3K27me3 estaba localizado de manera sorprendente en la región de Gata5. Las diferentes modificaciones de histonas coincidían con las regiones de control correspondientes en ambos proyectos.

25 La estimación de la cantidad relativa de modificación de histonas en la región diana depende estrictamente de una región de referencia modificada estable.

La normalización de una modificación de histona específica cerca del promotor MIE de hCMV a una secuencia de referencia permite la comparación de diferentes líneas celulares. Con este fin, la secuencia de referencia debe tener niveles robustos y reproducibles de la respectiva modificación de histonas.

30 En la siguiente tabla se presentan los valores de Cq promedio y el coeficiente de variación (CV) de todas las líneas celulares, incluidas las tres réplicas biológicas para el proyecto T y el proyecto H.

**Tabla:** Regiones de referencia en el proyecto T y H. Los promedios y el coeficiente de variación (CV) apropiado de los valores de Cq de todas las muestras de ChIP, incluidos los triplicados biológicos, se calcularon para ambos

5 proyectos; las filas muestran las diferentes regiones de referencia dentro del genoma; las columnas contienen las modificaciones de histonas específicas; las regiones de control elegidas para las modificaciones epigenéticas apropiadas están marcadas en negrita; por lo tanto, la distancia Cq respecto al simulado y el CV fueron decisivos; en ambos proyectos, las marcas de activación H3ac, H3K4me3, así como la histona 3 total se acumulan de forma estable en las regiones de Gusb y Eif3i (CV de un 2%); los valores de Cq más bajos determinan Gusb como referencia para las marcas de activación; todas las regiones de referencia potenciales tenían valores de histona 3 total estables.

Proyecto T: Valores de Cq de las muestras de ChIP								
Diana	H3		H3ac		H3K4me3		H3K9me3	
	Media	CV	Media	CV	Media	CV	Media	CV
Eif3i 431	28,24	0,01	27,57	0,02	25,45	0,02	34,35	0,03
Gusb 386	<b>27,16</b>	<b>0,01</b>	<b>26,73</b>	<b>0,02</b>	<b>24,64</b>	<b>0,02</b>	33,38	0,03
Fox2a 484	<b>26,32</b>	<b>0,01</b>	36,43	0,05	36,20	0,05	<b>31,54</b>	<b>0,02</b>
Gata5 468	<b>25,49</b>	<b>0,02</b>	33,34	0,03	34,98	0,03	32,96	0,04
Rho 388	27,29	0,02	35,56	0,02	36,66	0,03	35,17	0,03
Unc13c 474	26,81	0,01	35,40	0,03	36,35	0,05	32,01	0,02
Proyecto H: Valores de Cq de las muestras de ChIP								
Diana	H3		H3ac		H3K4me3		H3K9me3	
	Media	CV	Media	CV	Media	CV	Media	CV
Eif3i 431	26,41	0,02	27,81	0,02	27,88	0,03	35,66	0,06
Gusb 386	<b>25,98</b>	<b>0,02</b>	<b>27,65</b>	<b>0,03</b>	<b>27,85</b>	<b>0,03</b>	34,96	0,06
Fox2a 484	25,96	0,02	34,98	0,06	35,45	0,07	34,69	0,06
Gata5 468	<b>25,75</b>	<b>0,02</b>	33,61	0,05	35,30	0,07	35,16	0,07
Rho 388	27,08	0,02	34,79	0,04	35,91	0,06	35,82	0,06
Unc13c 474	26,70	0,02	35,02	0,05	35,03	0,06	34,79	0,05

Proyecto T: Valores de Cq de las muestras de ChIP						
Diana	H3K27me3		Simulado		Muestra de entrada	
	Media	CV	Media	CV	Media	CV
Eif3i 431	35,11	0,03	35,80	0,03	22,38	0,01
Gusb 386	33,90	0,03	35,76	0,04	22,32	0,02
Fox2a 484	33,60	0,02	34,64	0,04	21,31	0,03
Gata5 468	<b>30,70</b>	<b>0,03</b>	34,61	0,04	21,72	0,01
Rho 388	35,15	0,02	36,26	0,02	22,91	0,02
Unc13c 474	34,03	0,02	34,73	0,18	22,50	0,01
Proyecto H: Valores de Cq de las muestras de ChIP						
Diana	H3K27me3		Simulado		Muestra de entrada	
	Media	CV	Media	CV	Media	CV
Eif3i 431	34,34	0,05	35,55	0,06	22,94	0,02
Gusb 386	33,69	0,04	35,01	0,06	22,63	0,03
Fox2a 484	30,86	0,03	35,46	0,08	22,96	0,03
Gata5 468	<b>30,09</b>	<b>0,03</b>	34,88	0,06	22,62	0,03
Rho 388	33,05	0,03	36,10	0,06	23,90	0,03
Unc13c 474	31,50	0,02	35,12	0,05	23,55	0,03

10 Gusb como la región de referencia para la modificación activa de histonas H3ac y H3K4me3 y Gata5 como una región estable para H3K27me3 difieren del control simulado apropiado y tenían valores de Cq consistentes. Las regiones de control activo Eif3i y Gusb son altamente estables. Para todas las regiones de control se observó una acumulación estable de histona 3 total (H3).

15 Se analizaron triplicados biológicos de líneas celulares CHO que expresan de forma recombinante un proyecto de anticuerpo para determinar la modificación de histonas cerca de la localización del promotor MIE de hCMV. Para esto, los fragmentos de cromatina se purificaron usando anticuerpos contra modificaciones de histonas específicas,

se digirieron para obtener ADN genómico sin proteínas y se cuantificaron mediante PCR en tiempo real (véase la figura 26). La normalización se ejecutó para cada región de referencia usada. Para determinar la eficiencia de amplificación de cada par de cebadores, se usó el programa informático LinReg PCR, versión 2014.5 (Ruijter, 2009, LinRegPCR). Las eficiencias de amplificación de todos los pares de cebadores y moldes son bastante similares. Por lo tanto, se usó el procedimiento de Livak para la normalización, que asume eficiencias de amplificación similares.

**Tabla:** Eficiencias de cebador. Las eficiencias de amplificación se determinaron para todas las líneas celulares, incluidos los triplicados biológicos; se usó el par de cebadores (396/397); con este fin, los datos sin procesar de qPCR se aplicaron al programa informático LinRegPCR, versión 2014.5 y se calcularon las eficiencias; las filas se distinguen por los diferentes pares de cebadores; la columna de media contiene las eficiencias de amplificación promedio de cada par de cebador-molde y la columna de DE contiene la desviación estándar apropiada; las distancias entre todas las eficiencias de amplificación son inferiores a un 2 %; por tanto, el procedimiento de Livak se usó para la normalización.

Eficiencia de amplificación con LinReg PCR					
Proyecto T			Proyecto H		
Pares de cebadores	Media	DE	Pares de cebadores	Media	DE
CMV 396/397	1,909	0,033	CMV 396/397	1,919	0,032
Gusb 386/387	1,923	0,036	Gusb 386/387	1,935	0,037
Eif3i 431/432	1,893	0,036	Eif3i 431/432	1,923	0,034
Fox2a 484/485	1,925	0,029	Fox2a 484/485	1,946	0,031
Gata5 468/467	1,914	0,033	Gata5 468/467	1,934	0,034
Rho 388/389	1,876	0,036	Rho 388/389	1,902	0,037
Unc13c 474/4745	1,904	0,032	Unc13c 474/4745	1,927	0,034

La normalización de Livak comprende dos etapas de normalización:

- en la primera etapa, la cantidad (Cq) de modificación de la histona 3 cerca del promotor MIE de hCMV se normaliza a la cantidad (Cq) de modificación de la histona 3 en la región de referencia →  $\Delta Cq$
- en la segunda etapa, la modificación de la histona 3 normalizada se establece a la histona total 3 normalizada cerca del promotor MIE de hCMV →  $\Delta\Delta Cq$

Esto finalmente presenta la cantidad relativa de modificación por histona 3 cerca del promotor MIE de hCMV.

La histona 3 total es estable en todas las regiones de referencia, lo que permite la normalización de la modificación de histonas y la histona 3 total con la misma región de referencia. Esto minimiza la variación dentro del proceso de normalización. Por ejemplo, la acetilación relativa de histonas por histona 3 se normalizó a la región de control Gusb, ya que la región Gusb comprende una cantidad estable de la histona modificada y la histona 3 total. La siguiente fórmula se usó para el cálculo:

$$\Delta\Delta Cq \rightarrow \text{proporción} = \frac{2^{\Delta Cq_{H3\_acetilacion}(Cq_{Gusb} - Cq_{CMV})}}{2^{\Delta Cq_{H3\_total}(Cq_{Gusb} - Cq_{CMV})}}$$

Las cantidades relativas de modificación de histonas por histona 3 ( $\Delta\Delta Cq$ ) e histona 3 total (Cq) cerca del promotor MIE de hCMV se representaron frente a los valores de  $\Delta qP$ . La histona 3 total cerca del promotor MIE de hCMV se normalizó a Gusb y se ajustó a los valores de  $\Delta qP$ . Además, se examinaron la histona 3 por número de copias relativo (H3/rCN) y la simulación por histona 3 (simulado/H3). H3/rCN resta idealmente el número de copias y es una medición de la densidad relativa de histona 3 (H3D) cerca del promotor MIE de hCMV. Simulado/H3 es el efecto inespecífico del ruido de fondo por histona 3.

Las correlaciones se examinaron con un modelo de ajuste de mínimos cuadrados estándar. Con este fin, se usó el programa informático JMP10 (JMP®10.0.1 publicación: 2, edición de 64 bits; SAS Institute Inc.).

**Tabla:** Medición del efecto de las modificaciones epigenéticas en la estabilidad de producción a largo plazo. Los valores p de los efectos en  $\Delta qP$  con (+) y sin (-) presión de selección (MTX 250 nM) se presentan en las columnas; todos los efectos se miden cerca del promotor MIE de hCMV y se ordenan en filas; se calcularon los efectos de la histona 3 normalizada (H3), la densidad de histona 3 por número de copias relativo (H3/rCN), el ruido de fondo por histona 3 (simulado/H3) y las modificaciones por histona 3 (H3ac/H3, H3K4me3/H3, H3K27me3/H3 y H3K9me3/H3) en un modelo estándar de mínimos cuadrados con el programa informático JMP10; en el proyecto H, la acetilación por histona 3 (H3ac/H3) tiene un efecto altamente significativo en  $\Delta qP$  si las células se cultivaban a presión de selección (+), también los eventos H3/rCN, Simulado/H3, H3K4me3, H3K27me3 y H3 dieron como resultado efectos



moderada a altamente significativos en la condición  $\Delta qP+$ .

Marcas epigenéticas	Modelo de influencia de efecto único: Valores p para un efecto epigenético resultante			
	Proyecto T		Proyecto H	
	$\Delta qP+$	$\Delta qP-$	$\Delta qP+$	$\Delta qP-$
H3	0,116	0,172	0,0013	0,036
H3/rCN	0,7981	0,5291	0,2273	0,8701
Simulado/H3	0,5319	0,4735	0,0286	0,9214
H3ac/H3	0,378	0,6866	<b>&lt;0,0001</b>	0,1449
H3K4me3/H3	0,637	0,8012	0,0102	0,8896
H3K27me3/H3	0,4676	0,8338	0,005	0,5864
H3K9me3/H3	0,4771	0,6858	n.d.	

n.d. = no determinado

5 El grado de acetilación por histona 3 (H3ac/H3) en el promotor MIE de hCMV tiene un efecto altamente significativo en la pérdida de productividad, obtenida durante 60 generaciones en presencia del agente de selección MTX.

10 Se observaron efectos significativos adicionales (enumerados del efecto más débil al más fuerte) para H3/rCN, Simulado/FB, H3K4me3/H3, H3K27me3/H3 y H3. En consideración de los niveles de efecto para Simulado/H3 y H3 en solitario, H3 en solitario tiene una influencia dominante en el efecto combinado X/H3. Se ha encontrado que los eventos epigenéticos con efectos mayores que H3 en solitario son un buen marcador de predicción: →H3ac/H3.

15 Se realizó un análisis de valores atípicos de Jackknife. De este modo, se encontró un valor atípico por triplicado al comparar  $\Delta qP$  de ambas condiciones del agente de selección. Con respecto al análisis, la línea celular H-18 se excluyó de las mediciones del efecto. Posteriormente, las muestras del proyecto H se analizaron nuevamente con el modelo de cribado de efectos después de la exclusión de la línea celular H-18. Se ha encontrado que la pérdida de acetilación por histona 3 (H3ac/H3) en el promotor MIE de hCMV tiene el efecto más significativo sobre la pérdida de productividad, obtenida en 60 generaciones en ambas condiciones de selección.

20 **Tabla:** Mediciones de efecto de modificaciones en la estabilidad a largo plazo en el proyecto H después de la exclusión de la línea celular H-18 atípica. Los valores p de los efectos en  $\Delta qP$  con (+) y sin (-) presión de selección (MTX 250 nM) se presentan en las columnas; todos los efectos se miden cerca del promotor MIE de hCMV y se ordenan en filas; se calcularon los efectos de la histona 3 normalizada (H3), la densidad de histona 3 por número de copias relativo (H3/rCN), el ruido de fondo por histona 3 (simulado/H3) y las modificaciones por histona 3 (H3ac/H3, H3K4me3/H3, H3K27me3/H3 y H3K9me3/H3) en un modelo estándar de mínimos cuadrados con el programa informático JMP10; el efecto más significativo en  $\Delta qP$  se pudo observar para H3ac/H3 en ambas condiciones de selección.

Modelo de influencia de efecto único del proyecto H: Valores p para un efecto epigenético resultante		
Marcas epigenéticas	$\Delta qP+$	$\Delta qP-$
H3	0,0005	0,0003
H3/rCN	0,2600	0,3016
Simulado/H3	0,0475	0,0485
H3ac/H3	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0001</b>
H3K4me3/H3	0,0138	0,3464
H3K27me3/H3	0,0072	0,0078

30 En el proyecto T, el gráfico de H3ac/H3 frente a  $\Delta qP$  muestra un aumento simultáneo de la estabilidad a largo plazo y la acetilación por histona 3, particularmente bajo presión de selección.

Para tener en cuenta los diferentes niveles de histona 3 en el promotor MIE de hCMV, la acetilación de histona 3 se normalizó adicionalmente a histona 3 (H3ac/H3).

35 Los niveles relativos de acetilación de histona 3 (H3ac/H3) se compararon con las alteraciones en la productividad específica ( $\Delta qP$ ) durante 60 generaciones en presencia (+) y en ausencia (-) del agente de selección MSX. Después de un análisis de valores atípicos, en el modelo de regresión de mínimos cuadrados estándar se alimentaron valores de H3ac/H3 de réplicas biológicas y los valores de  $\Delta qP$  de 19 líneas celulares CHO. Se detectó una correlación significativa de H3ac/H3 y  $\Delta qP$ .

Para los valores de H3ac/H3 se calculó un árbol de decisión con el programa informático jmp. El mejor nodo dividido y, por lo tanto, el mejor filtro se calculó con la estadística de LogWorth. La mejor división en condición (+) MSX se calculó que era de 0,58 acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 (H3ac/H3) para las muestras H. Para reducir el número de muestras negativas falsas, el filtro se ajustó a menor valor de  $A > 0,5$  H3ac/H3.

Las medias de delta SPR ( $\Delta qP$ ) en condiciones con o sin el agente de selección MTX o MSX, respectivamente, se calcularon para cada ventana de adquisición positiva y se compararon con la media no filtrada y se presentan a continuación:

muestras H-1 a H-17, H-19, H-20	N	Media de $\Delta SPR$ (+) MSX	Media de $\Delta SPR$ (-) MSX
sin filtrar	56	-0,39	-0,55
$A > 0,5$ H3ac/H3	23 (41 %)	-0,15	-0,38

muestras T-1 a T-12	N	Media de $\Delta SPR$ (+) MTX	Media de $\Delta SPR$ (-) MTX
sin filtrar	36	-0,29	-0,41
$A > 0,5$ H3ac/H3	7 (19 %)	-0,19	-0,32

El filtro  $A > 0,5$  H3ac/H3 aumenta la media de delta SPR en comparación con la condición sin filtrar.

### B.3. Combinación de metilación del promotor y acetilación de histonas

Se investigaron los niveles relativos de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 cerca del fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano y el porcentaje de metilación de C-425 del fragmento del promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano como marcadores de predicción para la estabilidad de producción con y sin agente de selección.

Las medias de delta SPR en condiciones con o sin el agente de selección se calcularon para cada ventana de adquisición positiva y se compararon con la media no filtrada y se presentan a continuación:

muestras H-1 a H-17, H-19, H-20	N	Media de $\Delta SPR$ (+) MSX	Media de $\Delta SPR$ (-) MSX
sin filtrar	56	-0,39	-0,55
$A > 0,5$ H3ac/H3	23 (41 %)	-0,15	-0,38
$B < 5$ % mC-425 [%] PSB	27 (48 %)	-0,24	-0,45
Filtro combinado ( $B \cap A$ )	20 (36 %)	-0,13	-0,36

muestras T-1 a T-12	N	Media de $\Delta SPR$ (+) MTX	Media de $\Delta SPR$ (-) MTX
sin filtrar	36	-0,29	-0,41
$A > 0,5$ H3ac/H3	7 (19 %)	-0,19	-0,32
$B < 5$ % mC-425 [%] PSB	24 (67 %)	-0,28	-0,43
Filtro combinado ( $B \cap A$ )	7 (19 %)	-0,19	-0,32

La combinación del filtro  $A > 0,5$  H3ac/H3 con el filtro  $B < 5$  % mC-425 [%] PSB aumenta la media de delta SPR en comparación con la condición sin filtro.

Con más detalle, se calculó un árbol de decisión usando el programa informático Jmp 10 para determinar el valor umbral de la proporción H3ac/H3 para permitir la exclusión de los productores defectuosos. La estadística de LogWorth se usó para identificar el mejor nodo dividido. El LogWorth se calcula como:  $-\log_{10}$  (valor p), en el que el valor p ajustado se calcula de una manera compleja que tiene en cuenta el número incalculable de formas en que se pueden producir las divisiones (Sail, 2002, Monte Carlo Calibration of Distributions of Partition Statistics; informe de SAS). La mejor división para la condición  $\Delta qP+$  fue de 0,47 acetilación por histona 3. Para minimizar los valores positivos falsos, el valor umbral se estableció en 0,5 H3ac/H3 y se transfirió a ambas condiciones en los proyectos H y T.

Además, el umbral del 5 % para la metilación del promotor MIE de hCMV (% mC-425) se determinó a partir de los datos de metilación registrados (véanse las tablas anteriores) para usar la combinación (sinérgica) de ambos

marcadores de predicción. Por tanto, se excluyeron muestras con más de un 5 % de metilación del ADN o menos de 0,5 acetilación por histona 3 en el promotor MIE de hCMV.

5 El promedio de  $\Delta qP$  se calculó para muestras filtradas positivas y se comparó con el promedio de  $\Delta qP$  de las muestras sin filtrar. Esto se hizo considerando si se añadía o no MTX al medio de cultivo.

El uso del marcador de predicción H3ac/H3 da como resultado un aumento de la estabilidad a largo plazo de las muestras incluidas.

10 Los promedios de  $\Delta qP$  después de la filtración fueron casi idénticos en ambos proyectos.

**Tabla:** Exclusión de los productores defectuosos. Se usaron muestras con valores por encima de 0,5 H3ac/H3 y por debajo de un 5 % de mC-425 para calcular el promedio de  $\Delta qP$ ; curiosamente, los  $\Delta qP$  filtrados fueron casi idénticos para ambos proyectos.

15

Proyecto T	N	Media de $\Delta qP$ +	Media de $\Delta qP$ -
sin filtrar	36	-0,29	-0,41
A >0,5 H3ac/H3	7 (19 %)	-0,19	-0,32
B <5 % mC-425	24 (67 %)	-0,28	-0,43
Proyecto T	N	Media de $\Delta qP$ +	Media de $\Delta qP$ -
sin filtrar	56	-0,39	-0,55
A >0,5 H3ac/H3	23 (41 %)	-0,15	-0,38
B <5 % mC-425	27 (48 %)	-0,24	-0,45

20 El grado de acetilación de histona 3 en el promotor MIE de hCMV tuvo un efecto significativo sobre la estabilidad. También la cantidad de H3 total y el grado de metilación en la posición C-425 (% mC-425) tuvieron efectos sobre la estabilidad a largo plazo. Además, la correlación negativa encontrada de H3ac/H3 y % mC-425 confirma la fiabilidad de estos marcadores.

La configuración del umbral da lugar a la exclusión de todos los productores defectuosos. Las células por encima de este valor son predominantemente estables.

25 **B.4. Combinación de metilación del promotor y acetilación de histonas y el número de copias del transgén**

30 La correlación de la acetilación de histona 3 con la metilación del ADN y el número de copias fue significativa, lo que proporciona evidencias de la interrelación del número de copias, la metilación del ADN y la acetilación de la histona 3. Se ha encontrado que el grado de metilación del ADN era contrario a la acetilación de la histona 3. Se ha encontrado además que el número de copias frente a la acetilación de histona 3 y la metilación del ADN proporcionan de hecho que las líneas celulares con un número de copias más alto en su mayoría no estén acetiladas y sean propensas a la metilación del ADN. Se han encontrado las correlaciones de número de copias y la alteración de la productividad a largo plazo en presencia y ausencia de agente de selección. Por tanto, el número de copias interactúa con el grado de marcas, que a su vez influye en la estabilidad de la producción a largo plazo.

35 Además, se promueve una acumulación no intencionada de líneas celulares inestables en el desarrollo de líneas celulares estándares mediante las líneas celulares de selección temprana de acuerdo con sus títulos de anticuerpos. Se supone que las líneas celulares con un número de copias bajo deben ser predominantemente activas, mientras que los productores con un número de copias alto pueden tener una gran cantidad de diferentes estados epigenéticos, desde la activación nula a moderada a alta de cada transgén individual, siempre que la suma de las transcripciones los transcritos sea comparable. Teniendo en cuenta esto, en la primera selección según el título de anticuerpos son preferentes las líneas celulares con números de copia altos que pueden tener sitios de integración estables por coincidencia o líneas celulares de número de copias bajo que están ligeramente obligadas a tenerlos. El número de copias desde el inicio de la fase de cultivo se representó en función de la estabilidad y se encontró que 45 las líneas celulares con un alto número de transgenes eran propensas a la inestabilidad.

50 Por tanto, en el presente documento se reseña como un aspecto un procedimiento/proceso de selección de línea celular de tres etapas. En la primera etapa, se expanden las células que expresan anticuerpos con un número de copias de cadena ligera bajo, en la segunda etapa se realiza una selección de acuerdo con sus grados de acetilación de histona 3. Posteriormente, se realiza una reducción rápida del agente de selección. De este modo, se obtienen líneas celulares con sitios de integración estables, un riesgo reducido de silenciamiento génico y de pérdida de número de copias, así como la identificación de subpoblaciones con mecanismos de desestabilización pretensados.

55 En un modo de realización, el número de copias de casetes de expresión de cadena ligera integrados de forma

estable es inferior a 50. En otro modo de realización, el número de copias de casetes de expresión de cadena ligera integrados de forma estable es inferior a 25. En un modo de realización adicional, el número de copias de casetes de expresión de cadena ligera integrados de forma estable es inferior a 10. En un modo de realización adicional, el número de copias de casetes de expresión de cadena ligera integrados de forma estable es inferior a 6.

Los siguientes ejemplos, listado de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

**Descripción de las figuras**

**Figura 1** Número de sitio CpG metilado del promotor/potenciador MIE de hCMV obtenido de diferentes líneas celulares.

**Figura 2** Mapa de plásmido de p5057.

**Figura 3** A: Tasa de producción específica en ausencia de un agente de selección de la línea celular K18.1 a lo largo de múltiples generaciones en una producción a largo plazo.

B: Tasa de producción específica en ausencia de un agente de selección de la línea celular G25-10 a lo largo de múltiples generaciones en una producción a largo plazo.

C: Tasa de producción específica en ausencia de un agente de selección de la línea celular G25-17 a lo largo de múltiples generaciones en una producción a largo plazo.

D: Tasa de producción específica en ausencia de un agente de selección de la línea celular G42-5 a lo largo de múltiples generaciones en una producción a largo plazo.

E: Tasa de producción específica en ausencia de un agente de selección de la línea celular 43-16 A10 a lo largo de múltiples generaciones en una producción a largo plazo.

**Figura 4** Figura superior: frecuencia de metilación dentro del ADN promotor/potenciador MIE de hCMV a partir de líneas celulares CHO recombinantes en diferentes sitios de metilación determinada por el análisis de 19-22 ácidos nucleicos promotores individuales; figura inferior: representación esquemática de los sitios CpG metilados dentro del ADN promotor/potenciador MIE de hCMV de líneas celulares CHO recombinantes, los sitios metilados se muestran en negro, la posición 425 se resalta con una flecha.

A: línea celular K18.1 - metilación de todos los sitios CpG: 12 %, metilación del sitio C425: 64 %, metilación del sitio C591: 27 %, metilación del sitio C96: 32 %;

B: línea celular G25-10 - metilación de todos los sitios CpG: 0,5 %, metilación del sitio C425: 0 %, metilación del sitio C591: 5 %, metilación del sitio C96: 0 %;

C: línea celular G25-17 - metilación de todos los sitios CpG: 0,3 %, metilación del sitio C425: 0 %, metilación del sitio C591: 0 %, metilación del sitio C96: 0 %;

D: línea celular G42-5 - metilación de todos los sitios CpG: 0,6 %, metilación del sitio C425: 0 %, metilación del sitio C591: 0 %, metilación del sitio C96: 0 %;

E: línea celular 43-16 A10 - metilación de todos los sitios CpG: 4,4 %, metilación del sitio C425: 25 %, metilación del sitio C591: 15 %, metilación del sitio C96: 10 %.

**Figura 5** Discriminación del promotor/potenciador MIE de hCMV que está metilado en el sitio 425 del MIE de hCMV que no está metilado en el sitio 425 por qPCR en tiempo real específico de metilación; curvas de amplificación por PCR para los moldes n.º 11 (A), n.º 62 (B), n.º 01 (C) y n.º 04 (D).

**Figura 6** Curvas de amplificación por PCR para diferentes cebadores específicos de metilación y pares de cebadores.

**Figura 7** Recuperación del promotor/potenciador MIE de hCMV metilado en el sitio 425 en el fondo del promotor/potenciador MIE de hCMV no metilado mediante qPCR en tiempo real específica de metilación.

**Figura 8** Metilación del ácido nucleico promotor/potenciador MIE de hCMV en el sitio de metilación 425 obtenido con el cebador n.º 239 y n.º 267 con preamplificación (A) y directamente del ADN genómico tratado con bisulfito (B).

- Figura 9** Metilación del ácido nucleico promotor/potenciador MIE de hCMV en el sitio de metilación 425 obtenido con el cebador (negro) 239 + 237 y 239 + 267, (blanco) 263 + 237 y 263 + 267, (líneas horizontales) 264 + 237 y 264 +267 y (líneas verticales) 239 + 237 y 239 + 266.
- 5 **Figura 10** Ejemplo de análisis de curva de fusión normalizada de alta resolución (A) y su primera derivada, es decir, picos de fusión (B).
- Figura 11** Correlación del grado de metilación en C425 antes del cultivo a largo plazo y la alteración relativa del SPR después del cultivo de 60 generaciones con MTX 250 nM (A) o sin MTX (B).
- 10 **Figura 12** Correlación del grado de metilación en C425 antes del cultivo a largo plazo y el grado de metilación después del cultivo de 60 generaciones con MTX 250 nM.
- 15 **Figura 13** Representación esquemática de los sitios CpG metilados dentro del ADN promotor/potenciador MIE de hCMV del clon 44-28. Los sitios metilados se muestran en negro. La posición del nucleótido 425 está resaltada por una flecha. Metilación de todos los sitios CpG: 18 %; metilación en C425: 80 %; metilación en C591: 70 %; metilación en C96: 60 %.
- 20 **Figura 14** Números de copias del gen de la cadena ligera antes y después de la prueba de estabilidad sin MTX.
- Figura 15** Los niveles relativos de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 cerca del promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano se normalizaron al gen de referencia Gusb. Las varianzas entre las 3 réplicas biológicas se presentan mediante la desviación estándar.
- 25 **Figura 16** Los niveles relativos de metilación triplicada de la lisina 4 de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 cerca del fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano se normalizaron al gen de referencia Gusb. Las varianzas entre las 3 réplicas biológicas se presentan mediante la desviación estándar.
- 30 **Figura 17** Gráfico de lo real frente a lo previsto del efecto H3K4me3/H3 para las muestras H-1 a H-20 con 3 réplicas biológicas. Las curvas de confianza para la línea de ajuste se muestran en líneas discontinuas para proporcionar una indicación visual de si la prueba de interés es significativa al nivel del 5 %. Las curvas deben cruzar la línea horizontal para que haya significación.
- 35 **Figura 18** Gráfico de lo real frente a lo previsto del efecto H3ac/H3 para las muestras H-1 a H-20 con 3 réplicas biológicas. Las curvas de confianza para la línea de ajuste se muestran en líneas discontinuas para proporcionar una indicación visual de si la prueba de interés es significativa al nivel del 5 %. Las curvas deben cruzar la línea horizontal para que haya significación.
- 40 **Figura 19** Gráfico de lo real frente a lo previsto del efecto mC-425 [%] para las muestras H-1 a H-20. Las curvas de confianza para la línea de ajuste se muestran en líneas discontinuas para proporcionar una indicación visual de si la prueba de interés es significativa al nivel del 5 %. Las curvas deben cruzar la línea horizontal para que haya significación.
- 45 **Figura 20** Análisis de valores atípicos del proyecto H con distancias de Jackknife para delta SPR con y sin MSX como condición. La muestra H-18 está muy por encima del límite superior de control (UCL), lo que indica claramente que la muestra es un valor atípico.
- 50 **Figura 21** Gráfico de lo real frente a lo previsto del efecto H3K4me3/H3 para las muestras H-1 a H-17, H-19 y H-20 con 3 réplicas biológicas. Las curvas de confianza para la línea de ajuste se muestran en líneas discontinuas para proporcionar una indicación visual de si la prueba de interés es significativa al nivel del 5 %. Las curvas deben cruzar la línea horizontal para que haya significación.
- 55 **Figura 22** Gráfico de lo real frente a lo previsto del efecto H3ac/H3 para las muestras H-1 a H-17, H-19 y H-20 con 3 réplicas biológicas. Las curvas de confianza para la línea de ajuste se muestran en líneas discontinuas para proporcionar una indicación visual de si la prueba de interés es significativa al nivel del 5 %. Las curvas deben cruzar la línea horizontal para que haya significación.
- 60 **Figura 23** Gráfico de lo real frente a lo previsto del efecto mC-425 [%] para las muestras H-1 a H-17, H-19 y H-20. Las curvas de confianza para la línea de ajuste se muestran en líneas discontinuas para proporcionar una indicación visual de si la prueba de interés es significativa al nivel del 5 %. Las curvas deben cruzar la línea horizontal para que haya significación.
- 65 **Figura 24** Valores de delta SPR de las muestras H-1 a H-17, H-19 y H-20 representados en histogramas. Se muestran diferentes condiciones de selección y filtro. La línea horizontal dentro de la caja representa

la mediana. El rombo de confianza contiene la media, el 95 % superior e inferior de la media. El centro del rombo representa la media. Los puntos superior e inferior del rombo representan el 1° cuartil y el 3° cuartil. La caja tiene líneas que se extienden desde cada extremo, llamadas bigotes. Los bigotes se extienden desde los extremos de la caja hasta el punto de datos más externo que está dentro de las distancias calculadas como 1° cuartil  $-1,5*$  (intervalo intercuartil) y 3° cuartil  $+ 1,5*$  (intervalo intercuartil). Si los puntos de datos no alcanzan los intervalos calculados, entonces los bigotes se determinan por los valores de punto de datos superior e inferior (sin incluir los valores atípicos). El corchete fuera de la caja identifica la mitad más corta, que es el 50 % más denso de las observaciones (Rousseuw y Leroy 1987).

**Figura 25** Valores de delta SPR del proyecto T representados en histogramas. Se muestran diferentes condiciones de selección y filtro.

**Figura 26** Esquema para la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) del ADN de la línea celular CHO.

**Figura 27** Estudios de correlación de marcas epigenéticas, número de copias y estabilidad. A: Gráfico de la metilación de C-425 frente a la acetilación por histona 3 en el promotor MIE de hCMV. B: gráfico de la alteración de la productividad específica en 60 generaciones de células CHO en ausencia (-) y presencia (+) del agente de selección MSX después de la exclusión de la línea celular H-18. Se determinó un alto comportamiento correlativo de estabilidad de líneas celulares con y sin agente de selección. C: El gráfico muestra la correlación del número de copias y la acetilación de histona 3, lo que indica que únicamente las líneas celulares con un número de copias bajo se acetilaron en la histona 3. D: El gráfico muestra la correlación del número de copias y la metilación del ADN, mientras que únicamente las líneas celulares con un número de copias alto se metilan predominantemente en el promotor MIE de hCMV. E y F: los gráficos muestran la correlación del número de copias y la alteración de la productividad a lo largo de 60 generaciones en presencia (+) y ausencia (-) de agente de selección. Por lo tanto, las líneas celulares de número de copias alto son propensas a silenciamiento.

**Figura 28** Plásmido que expresa anticuerpo humano de la clase IgG. El casete de expresión de ambas cadena ligera y pesada de la inmunoglobulina humana estaba bajo el control de un promotor y potenciador temprano inmediato principal de CMV humano (SEQ ID NO: 01) (MIE de hCMV).

### Ejemplo 1

#### Técnicas generales

#### Soluciones

<b>Tampón de lisis celular CHIP</b>
Tris-HCl 20 mM pH 8,0
KCl 85 mM
NP40 al 0,5 % (Nonidet P-40/octilfenolpolietoxietanol)
H2O destilada dos veces
<b>Tampón de lisis nuclear</b>
Tris-HCl 50 mM pH 8,0
EDTA 10 mM pH 8,0
SDS al 1 %
H2O destilada dos veces
1 comprimido de Roche Complete por 10 ml
<b>Tampón de lavado bajo en sal</b>
SDS al 0,1 %
Triton X 100 al 1 %
EDTA 2 mM
Tris-HCl 20 mM pH 8,0
NaCl 150 mM
H2O destilada dos veces
<b>Tampón de lavado alto en sal</b>
SDS al 0,1 %

Triton X 100 al 1 %
EDTA 2 mM
Tris-HCl 20 mM pH 8,0
NaCl 500 mM
<b>Tampón TE</b>
Tris-HCl 10 mM pH 8,0
EDTA 1 mM
<b>Tampón de elución (IP)</b>
NaHCO <sub>3</sub> 50 mM
SDS al 1 %
H <sub>2</sub> O destilada dos veces
<b>Tampón de dilución IP</b>
SDS al 0,01 %
Triton X 100 al 1,1 %
EDTA 1,2 mM
Tris-HCl 16,7 mM pH 8,1 (8,0)
NaCl 167 mM
H <sub>2</sub> O
<b>Tampón de bloqueo IP</b>
<b>Tampón de dilución IP</b>
BSA
ADN de esperma de salmón
Inhibidor de proteasa de Roche Complete

### **Técnicas de ADN recombinante**

- 5 Se usaron procedimientos estándares para manipular ADN como se describe en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). Se usaron los reactivos biológicos moleculares de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### **Determinación de las secuencias de ADN**

- 10 La secuenciación del ADN se realizó en SequiServe GmbH (Vaterstetten, Alemania).

### **Análisis de secuencias de ADN y proteínas y gestión de datos de secuencias**

- 15 El paquete de programas informáticos EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite) y Vector NTI versión 9.1 de Invitrogen se usaron para la creación, cartografiado, análisis, anotación e ilustración.

### **Determinación de proteínas**

- 20 Se usó un procedimiento cromatográfico para cuantificar la cantidad de anticuerpo presente en una muestra. Se usó una columna Poros A que se une a la región Fc del anticuerpo. El anticuerpo se une a la columna y se eluye posteriormente en condiciones de pH bajo. La concentración de proteína se determinó determinando la densidad óptica (DO) a 280 nm, con una longitud de onda de referencia de 320 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado sobre la base de la secuencia de aminoácidos.

### **Electroforesis en gel de agarosa**

- 25 La electroforesis en gel de agarosa se realizó para analizar la calidad, el tamaño y la cantidad de fragmentos de ADN lineales (Chong, 2001). De acuerdo con el tamaño de los fragmentos de ADN, se disolvieron soluciones de agarosa al 1 % (p/v) en una solución de TAE 1x mediante ebullición. Los geles contenían una concentración final de 30 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Las muestras se prepararon añadiendo 1/6 (v/v) de colorante de carga de ADN 6x. Se usó una escala de ADN como patrón de tamaño. La electroforesis se realizó en TAE 1x aplicando 10 V/cm de longitud de gel (no más de 250 V). Después de la separación, el ADN se examinó con luz UV (254-366 nm) en un sistema de documentación de gel (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Goettingen, Alemania).

### **Extracción de gel**

- 35

Después de la electroforesis en gel de agarosa, la sección de gel con la banda favorecida se cortó con bisturí y la sección de gel se extrajo adicionalmente con el kit de extracción de gel QIAquick® (Qiagen, Hilden, Alemania). Después de esto, se añadieron 3 volúmenes de Tampón QG a 1 volumen de gel (100 mg ~ 100 µl) y se incubaron durante 10 minutos a 50 °C. Se añadió un volumen de gel de isopropanol al gel disuelto y se mezcló. Los fragmentos de ADN se adhirieron a la columna de centrifugación QIAquick mediante centrifugación de un minuto a 13 000 rpm y se lavaron con 0,75 ml de tampón PE y centrifugación posterior (13 000 rpm, 1 min). El segundo lavado en otro tubo de recogida eliminó el tampón de lavado residual. Finalmente, el ADN se eluyó en 30 µl de H<sub>2</sub>O sin ARNasa en un tubo de muestra mediante centrifugación (13 000 rpm, 1 minuto). El ADN se puede verificar en Flash-gel (sistemas FlashGel™, Lonza, Colonia, Alemania).

### **Quantificación de ADN**

Se usó Nanodrop 2000 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Alemania) para cuantificar la concentración de ADN midiendo la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 260 nm. La pureza del ADN se puede juzgar por la proporción de DO 260/280 y 260/230. Las preparaciones de ADN puro deberían tener una proporción  $\geq 1,8$  y 2,0.

### **Transformación de bacterias competentes**

Cuarenta y cinco microlitros de E. coli NEB 5 alfa químicamente competente (NEB, Alemania) se descongelaron en hielo durante 10 minutos y luego se incubaron con 1 pg - 100 ng de ADN plasmídico (1-5 µl) durante 30 minutos en hielo. La suspensión celular se sometió a choque térmico a 42 °C durante 45 segundos y se enfrió inmediatamente en hielo durante 5 minutos. Se añadieron novecientos cincuenta microlitros de SOC o LB a temperatura ambiente y la suspensión se incubó a 37 °C durante 60 minutos con agitación (250 rpm). Las bacterias transformadas se colocaron en placas de agar precalentadas que contenían ampicilina. Las placas se incubaron durante la noche a 37 °C.

### **Preparación de plásmidos**

Los plásmidos se prepararon usando los kits Qiagen Plasmid Mini y Maxi (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **Purificación de ADN**

El ADN genómico se aisló y se purificó con el kit Allprep DNA/RNA Mini (50) (n.º de ref. 80204, Qiagen, Hilden, Alemania) y el kit DNase Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La purificación de los fragmentos se hizo con el kit High Pure PCR Product Purification (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **Extracción con fenol/cloroformo**

La concentración del plásmido y la purificación se hicieron mediante extracción con fenol/cloroformo. Todas las etapas se realizaron bajo una campana química. Quinientos microlitros de plásmido linealizado se mezclaron con un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico Roti® (25:24:1) (n.º de ref. A156, Roth, Alemania) y se agitaron en vórtex durante 30 segundos. Posteriormente, la emulsión se transfirió en un tubo Phase Lock Gel™ Light centrifugado previamente (n.º de ref. 0032005.101, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) para la centrifugación (13 000 rpm, 1 minuto). La fase acuosa superior se transfirió a un nuevo tubo y se repitió la extracción. Posteriormente, la fase acuosa superior se mezcló con 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y se repitieron las etapas de extracción una vez más. La fase superior se transfirió a un nuevo tubo y se mezcló con 0,1 volumen de inicio de 3 mol/l de tampón de acetato de sodio (pH 4,8-5,2) y 0,7 volumen de inicio de isopropanol al 100 % (20-30 °C) invirtiendo el tubo 4-6 veces. Después de 20 minutos de incubación a -80 °C seguido de centrifugación (13 000 rpm, 30 minutos a 4 °C), se desechó el sobrenadante. El sedimento se lavó con 1 ml enfriado de etanol al 70 %, se centrifugó (13 000 rpm, 5 minutos a 4 °C) y se desechó el sobrenadante. La etapa de lavado se repitió en condiciones estériles y el sobrenadante residual se eliminó completamente. El sedimento se secó durante 5-10 minutos en aire estéril y, posteriormente, se recogió en un 0,5 volumen inicial de agua destilada dos veces.

### **Determinación del número de copias de transgén**

Las determinaciones del número de copias de transgén, así como la tasa de metilación de C-425 del promotor MIE de hCMV se realizaron de acuerdo con las recomendaciones de Osterlehner et al. (supra).

El número de copias relativo (rCN) se calculó mediante dos elevado a la diferencia del valor Cq de la muestra de entrada de referencia (por ejemplo, Gusb) respecto al valor Cq del promotor MIE de hCMV de la muestra de entrada diana.

$$\text{Número de copias relativo} = 2^{(C_q \text{ muestra de entrada}_{diana} - C_q \text{ muestra de entrada}_{referencia})}$$



**Inmunoprecipitación de cromatina**

Las líneas celulares CHO se recolectaron con una viabilidad mayor de un 90 %, preferentemente mayor de un 97 %. Antes de la fijación, se prepararon microesferas para limpieza previa y precipitación. Se generaron microesferas de limpieza previa mediante incubación (1 hora, TA durante la rotación) de 15 µl de suspensión de agarosa de proteína A (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) con 2 µl de IgG de conejo purificada (n.º de ref. PP64B, Millipore, Alemania) en 120 µl de tampón de dilución ChIP por muestra. Se realizaron dos etapas de lavado con cada volumen de tampón de dilución ChIP para la purificación, seguido de la resuspensión de las microesferas en 85 µl de tampón de dilución ChIP. Se bloquearon quince microlitros de microesferas de agarosa A para la precipitación en 1 ml de tampón de dilución ChIP con 5 mg/ml de BSA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón precalentado (10 minutos a 95 °C y 5 minutos sobre hielo; n.º de ref. 15632-011, Invitrogen, Alemania). El sedimento resuspendido se incubó durante 4-5 horas a 4 °C mientras se rotaba, posteriormente se lavó tres veces y se montó en 2 volúmenes de tampón de dilución ChIP.

Se fijaron aproximadamente  $1 \times 10^7$  células por muestra mediante la adición de formaldehído en los medios hasta una concentración final de un 3,7 % y se incubaron durante 10 minutos a TA como se describe previamente (Beneke, S., et al. PLoS One 7 (2012) e32914). La fijación se detuvo añadiendo glicina hasta conseguir una solución de factor uno. Después de dos etapas de lavado con PBS enfriado en hielo y centrifugación a 2000 x g durante 3 minutos, el sedimento se resuspendió en 1 ml de PBS que contenía inhibidor de proteasa Roche Complete (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). La suspensión se sedimentó por centrifugación (3000 x g, 5 minutos, 4 °C). El sobrenadante se desechó.

La lisis del sedimento se realizó añadiendo 1 ml de tampón de lisis celular más Roche Complete (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) e incubación en hielo durante 10 minutos. Después de la centrifugación (2300 x g, 4 minutos, 4 °C), el sedimento de núcleos se resuspendió en 300 µl de solución de lisis de núcleos y se sonicó (salida 5, ciclo de trabajo 90 %, 15 segundos de sonicación seguida de 2-3 minutos de incubación en hielo durante 6 ciclos; Branson Sonifier B15, Dietzenbach, Alemania). Se añadieron setecientos microlitros de solución de lisis de núcleos a los núcleos sonicados seguido de centrifugación (13 000 rpm, 15 minutos, 4 °C). El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo para su almacenamiento a -80 °C hasta su uso. El grado de sonicación se sometió a prueba después de la digestión de proteínas en un gel de agarosa.

La cromatina se aclaró previamente con 80 µl de una suspensión de agarosa de proteína A preparada mediante incubación (2 horas a 4 °C mientras se rotaba) y centrifugación (13 000 rpm, 6 minutos, 4 °C, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se determinó la concentración de proteínas (kit de ensayo de proteína BCA Pierce®, Thermo Scientific, Rockford, EE. UU.). Se montaron de veinticinco a cien microgramos de cromatina por inmunoprecipitación (IP) en 200 µl de tampón de lisis de núcleos y se añadieron a 300 µl de tampón de dilución ChIP que comprendía 3 µg de anticuerpo apropiado. La inmunoprecipitación se realizó durante la noche a 4 °C mientras se rotaba. Las muestras de entrada sin diluir se almacenaron a -20 °C. Después de la incubación durante la noche, se añadieron 40 µl de microesferas de agarosa de proteína A bloqueadas a la solución IP y se incubaron (1 hora a 4 °C mientras se rotaban). El precipitado se lavó dos veces con tampón de lavado bajo en sal, una vez con tampón de lavado alto en sal, una vez con tampón de lavado de LiCl y una vez con tampón de lavado TE. Cada lavado se realizó en 1 ml de tampón durante 5 minutos sobre una plataforma giratoria, seguido de centrifugación (500 x g, 30 segundos, 4 °C). Después de la última etapa de lavado, las microesferas se centrifugaron con 500 x g durante 1 minuto. Los sedimentos de microesferas se combinaron con 200 µl de tampón de elución IP, mientras que simultáneamente 25-100 pg de muestra de entrada de cromatina se llenaron hasta 200 µl con tampón de elución IP y se incubaron durante 30 minutos a 65 °C mientras se agitaban. Posteriormente, los tubos se incubaron durante 30 minutos a 37 °C después de añadir 0,5 µl de ARNasa sin ADNasa (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) a cada tubo. Para la digestión final de proteínas, se añadieron 10 µl de NaCl 4 M (conc. final. 0,2 M) y 2 µl de proteinasa K (conc. final. 100-200 µg/ml, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) a las muestras de reacción y se incubaron durante 1,5 horas a 65 °C. El ADN se purificó mediante el kit PCR Purificación de Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).

**Conversión con bisulfito**

Para la conversión de citosinas no metiladas en uracilo, se usó el kit EZ-96 DNA methylation-lightning™ (formato de pocillo profundo) (ZymoResearch, Freiburg, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, el ADNg se extrajo con el kit DNase blood & tissue (Qiagen, Hilden, Alemania) y la concentración se midió con Nanodrop 2000 (PEQFAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Alemania) para ajustar la concentración a 350 ng ADNg en 20 µl de agua destilada dos veces. Se mezclaron veinte microlitros de ADNg con 130 µl de reactivo de conversión Lightning en una placa de conversión. Las placas se incubaron a 98 °C durante 8 minutos, luego a 54 °C durante 60 minutos y finalmente se almacenaron temporalmente a 4 °C. Se montó una placa de unión Zymo-Spin™ I-96 que contenía 600 µl de tampón de unión M por pocillo en una placa de recogida. Las muestras de la placa de conversión se añadieron a la placa de unión Zymo-Spin™ I-96, se mezclaron y se centrifugaron (3000 x g durante 5 minutos). Las placas se lavaron con 400 µl de tampón de lavado M y se centrifugaron (3000 x g, 5 minutos). Se añadieron 200 µl de tampón de desulfonación L a cada pocillo, se incubaron (20-30 °C, 20 minutos) y posteriormente se

centrifugaron (3000 x g durante 5 minutos). Se completó una etapa de lavado adicional con 10 minutos de centrifugación a 3000 x g y el ADN convertido se eluyó en 30 µl de tampón de elución M. El ADN convertido se almacenó a -20 °C hasta su uso.

5 **Amplificación del promotor MIE de hCMV convertido e integrado**

Para la investigación de la metilación de CpG del promotor MIE de hCMV, los pares de cebadores para la región del promotor distal (F1 y R1) y proximal (F2 y R2) se diseñaron de la siguiente manera:

UG_730_Bisul_CMV1 F1	GATATTGATTATTGATTAGTTATTAATAGTAATTAA	SEQ ID NO: 44
UG_731_Bisul_CMV1 R1	CAAATAAAAAAATCCCATAAAATCATATACTAA	SEQ ID NO: 45
UG_732_Bisul_CMV2 F2	TTAGTATATGATTTTATGGGATTTTTTTTATTG	SEQ ID NO: 46
UG_733_Bisul_CMV2 R2	TTCTAATACTAAACTCCTCTCCCAA	SEQ ID NO: 47

10 Se añadieron diez picomoles de cada cebador (0,5 µl) a 12,5 µl de la premezcla de ADN polimerasa ZymoTaq™ (ZymoResearch, Alemania), 3 µl de molde de ADNg y se llenaron hasta 25 µl con agua destilada dos veces. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó con Mastercycler nexus X1 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), las condiciones de PCR fueron las siguientes:

15

95 °C	10 min	
94 °C	30 s	2 ciclos
49 °C	2 min	
68 °C	2 min	
94 °C	30 s	
54 °C	2 min	34-43 ciclos
68 °C	2 min	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

Los amplicones se purificaron con el kit PCR purification de Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) en 30 a 40 µl de tampón de elución. La concentración se definió con Nanodrop 2000 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Alemania) y el tamaño de los amplicones se presentó mediante electroforesis en gel de agarosa.

20 **PCR inversa**

La reacción en cadena de la polimerasa inversa (iPCR) es un procedimiento para determinar los sitios de integración de un vector integrado al azar. A partir de esto, la secuencia del vector conocida cerca del sitio de corte se usará para generar cebadores de al menos 20 pb de longitud. Esos cebadores están orientados en direcciones opuestas.

El genoma se digirió con enzimas de corte frecuente (cortador de 4 pb) que no cortaban entre los sitios de unión del cebador y en el sitio de linealización del vector. Los fragmentos resultantes se ligan en condiciones muy diluidas para favorecer el ligamiento intramolecular. La secuencia circularizada ahora se puede amplificar con los cebadores inversos.

El ADN genómico se aisló con el kit Blood & cell culture DNA prep. midi de Qiagen (Qiagen, Hilden, Alemania) de  $2 \times 10^7$  células (~90 µg de ADN) por condición (el ADN genómico se puede almacenar a -20 °C durante varios meses) y se disolvió en 90 µl de agua destilada dos veces.

35 El ADN genómico aislado se digirió con diferentes endonucleasas de restricción a la temperatura de trabajo apropiada durante un mínimo de 16 horas. Para la digestión del ADNg, se usaron las enzimas CviQI, MseI y MspI para la iPCR en dirección 5' del sitio de integración de PvuI y las enzimas MseI, Bfal y MluCI para la iPCR en dirección 3' del sitio de integración de PvuI. Se usaron diez microgramos de ADN genómico por digestión ( $3,8 \times 10^6$  copias).

40 Digestión:

Componente	Volumen/80 µl	Cantidad final
Molde de ADNg	x µl	10 µg
Tampón NE 10x	8 µl	
BSA 10x (si es necesario)	8 µl	
agua destilada dos veces	Añadir a 80 µl	
Endonucleasa de restricción	x µl	50 U*

El ADN digerido se purificó con el kit de PCR-purification de Roche y se eluyó en x µl (200 µl) de tampón de elución. El alto grado de dilución del ADN favorece el ligamiento intramolecular.

5

Ligamiento:

ADN ligasa T4 Neb (M0202S) para iPCR	
ADN digerido	20 µl (1 µg) (3,8 x 10 <sup>5</sup> copias)
Tampón de ligamiento, 10x	50 µl
ADN ligasa T4 (400 U * µl <sup>-1</sup> )	1 µl
WFI (agua destilada dos veces)	429 µl

10

Para generar fragmentos de ADN circulares, el ADN digerido se ligó durante la noche a 16 °C usando ADN ligasa T4 (NEB, Frankfurt/Main, Alemania). El ADN ligado se eluyó en 50 µl de tampón de elución del kit High Pure PCR Purification (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y se añadió a 10 ng de ADN molde. Como grupo de control, se investigó el ADNg no transfectedo para la línea celular CHO.

Cebador	Secuencia	Localización	SEQ ID NO:
UG_574_16110 Btsl_rev	CTGTCATGCCATCG TAAGATGCT	Sitio de integración de 5' PvuI	48
UG_575_16110 Btsl_for	GCGGCCAACTTACT TCTGACAACG		49
UG_576_16110 Acelll_rev	AAGGCGAGTTACA TGATCCCCCAT	Sitio de integración de 3' PvuI	50
UG_577_16110 Acelll_for	CACCACGATGCCTG TAGCAATGG		51

15

Las condiciones de iPCR para 5' iPCR se describen a continuación.

Desnaturalización inicial	94 °C	7 min	28 ciclos
Desnaturalización	94 °C	45 s	
Reasociación	60 °C	45 s	
Prolongación	68 °C	4 min	
Prolongación final	68 °C	7 min	
Almacenamiento corto	4 °C	∞	

20

Cinco microlitros de fragmento de PCR se mezclaron con Orange G (5 µl) y agua destilada dos veces (10 µl) y se cargaron en gel de agarosa para verificar la distribución de los fragmentos. Para 5' iPCR de fragmentos cortados con MseI y MluCI, se obtuvieron buenos resultados y no se detectó ninguna banda inespecífica en los carriles de control.

Los amplicones 5' de cada muestra (cortados con MseI y MluCI) se combinaron y se purificaron con un kit High Pure PCR Purification (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) en 40 µl de tampón de elución.

25

#### **Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa**

30

Para cada qPCR se usó el colorante fluorescente no específico LightCycler®480 SYBR Green I Master en el sistema LightCycler®480 Instrument II (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). SYBR Green se excita usando luz azul ( $\lambda_{\text{máx}} = 488 \text{ nm}$ ) y emite luz verde ( $\lambda_{\text{máx}} = 522 \text{ nm}$ ). El tinte SYBR Green se une a todo el ADN bicatenario en la PCR. Como resultado, la intensidad de la fluorescencia y la cantidad de producto de ADN aumentan simultáneamente, lo que se puede detectar por el sistema LightCycler® después de cada ciclo. Para la cuantificación, la fluorescencia se representó frente al número de ciclos en una escala logarítmica. Ligeramente por

encima del fondo emitido, el sistema LightCycler® estableció el umbral para la detección de fluorescencia basada en ADN. El número de ciclos en el que la fluorescencia pasa el umbral se denomina ciclo de cuantificación (Cq) (Bustin, S.A., et al., Clin. Chem. 55 (2009) 611-22). Durante la fase de amplificación exponencial, se espera una duplicación del ADN diana en cada nuevo ciclo. Sin embargo, la eficiencia de la amplificación es a menudo variable entre los cebadores y los moldes. El análisis de la temperatura de fusión de los fragmentos de ADN amplificados da los primeros indicios de la especificidad de los pares de cebadores usados y la cantidad de dímeros de cebadores.

La eficiencia de combinación del molde y el cebador se puede evaluar mediante un experimento de titulación para crear una curva patrón o mediante un programa de cálculo de eficiencia como LinRegPCR. El programa usa datos no corregidos respecto a las medidas iniciales del Sistema LightCycler®, realiza una corrección respecto a las medidas iniciales en cada muestra por separado, determina una ventana de linealidad y luego usa el análisis de regresión lineal para ajustar una línea recta a través del conjunto de datos de PCR. A partir de la pendiente de esta línea se calcula la eficiencia de PCR de cada muestra individual.

Para la cuantificación relativa, la cantidad de secuencia diana se comparó con una secuencia de referencia, restando Cq (diana) de Cq (referencia). Esta normalización se denomina procedimiento de  $\Delta Cq$  (Scheffe, J.H., et al., J. Mol. Med. (Berlín) 84 (2006) 901-910). La secuencia de referencia debe tener valores muy estables, considerablemente más altos que los valores de fondo (simulado). Por lo tanto, para cada secuencia de referencia, se calculó el promedio y el coeficiente de variación de todas las muestras dentro de un proyecto y se comparó con los niveles de fondo. Los valores de Cq de las diferentes condiciones se mostraron como el % de la muestra de entrada, visualizando la distancia hasta el control simulado.

$$\% \text{ de muestra de entrada} = 100 * 2^{\Delta Cq(\text{muestra de entrada} - \text{muestra CHIP})}$$

Con respecto al gran número de muestras, todas las qPCR se realizaron en placas de 384 pocillos. En cada pocillo se transfirieron los siguientes ingredientes.

Volumen (µl) de placa de 384 pocillos	Solución
5	Mezcla maestra Sybr Green
0,5	Cebador (10 pM) directo
0,5	Cebador (10 pM) inverso
1,5	H2O
2,5	ADN (X ng/µl)
10	Total

El programa qPCR se diseñó de la siguiente manera:

Aparato	Temperatura (°C)	Tiempo	Grad. (°C/s)	Ciclos
<b>Predesnaturalización</b>	95	10 min	4,8	1
<b>Amplificación</b>	95	10 s	4,8	40
	60	5 s (única)	2,5	
	72	15 s	4,8	
<b>Curva de fusión</b>	95	5 s	4,8	1
	70	1 min	2,5	
	95	(continuamente)		
<b>enfriamiento</b>				

En el caso de la cuantificación relativa de la modificación de histonas, la normalización de la muestra (tratada) a la muestra de entrada (no tratada) se reemplaza directamente por la normalización de la secuencia diana tratada a la secuencia de referencia tratada. El cálculo adicional de modificación de histonas por histona hace que la normalización de la muestra de entrada sea redundante.

La cantidad relativa de modificación de histonas específica cerca del fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano se estimó con el procedimiento de Livak, también conocido como procedimiento de delta delta Cq ( $\Delta\Delta Cq$ ) (Livak, K.J. y Schmittgen, T.D., Methods 25 (2001) 402-408), siempre que las eficiencias del cebador-molde sean cercanas a 2 y cercanas entre sí (< 2 % de diferencia de la media de Cq).

El procedimiento se puede usar para la cuantificación relativa de una diana con respecto a una referencia. La cuantificación relativa de la acetilación de histona 3 y los niveles de histona 3 cerca del fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano se normalizaron a la acetilación de histona 3 y los niveles de histona 3 cerca del gen de referencia en dos etapas. Primero,  $\Delta Cq$  se calculó de la siguiente manera:

$$\Delta Cq = \text{control} - \text{muestra}$$

5  $\Delta Cq$  es la distancia de los ciclos de cuantificación (Cq) entre el control (por ejemplo, el valor de muestra ChIP de Gusb) y la diana (por ejemplo, el valor de muestra de ChIP de MIE de hCMV) de la misma muestra, amplificada con diferentes pares de cebadores. Para identificar el nivel de modificación de histona 3 por histona 3, se usó el procedimiento de  $\Delta\Delta Cq$ .

$$10 \quad \Delta\Delta Cq \rightarrow \text{proporción} = \frac{2^{\Delta Cq_{\text{diana}}(\text{muestra de control})}}{2^{\Delta Cq_{\text{ref}}(\text{muestra de control})}}$$

### 10 **Procedimientos de secuenciación**

La secuenciación de Sanger se realizó por la empresa SequiServe (SequiServe GmbH, Vaterstetten, Alemania).

15 La secuenciación de la siguiente generación se realizó por GATC (GATC-biotech, Konstanz, Alemania) y Active Motif (La Hulpe, Bélgica) usando la tecnología de secuenciación de Illumina.

### **Quantificación de proteínas**

20 Las concentraciones de proteína se estimaron en comparación con un patrón de proteína con el kit de ensayo de proteína BCA Pierce® (Thermo Scientific, Rockford, EE. UU.).

### **Fraccionamiento de proteínas en compartimentos**

25 Las proteínas se fraccionaron en proteínas de membrana/citoplásmicas y nucleares (Misawa, Y, 2006). Después de esto, se sedimentaron las células CHO ( $1 \times 10^7$  células por muestra) mediante centrifugación (300 x g, 3 minutos a 4 °C) y el sedimento se lavó dos veces en PBS enfriado con hielo complementado con Roche Complete (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). El sedimento lavado se lisó con 1 ml de tampón de lisis Triton X-100 al 0,5 % y se incubó en hielo durante 15 minutos. Los núcleos insolubles se separaron por centrifugación (13 000 rpm, 15 minutos a 4 °C). El sobrenadante que contenía la membrana/citoplasma se transfirió a un nuevo tubo y se enfrió en hielo. El sedimento nuclear se enjuagó con tampón de lisis una vez y se resuspendió en 300  $\mu$ l de tampón de lisis que contenía SDS al 0,5 % seguido de sonicación (5 segundos, salida 2, ciclo de trabajo 90 %, Branson Sonifier 450, Dietzenbach, Alemania). Se añadieron setecientos microlitros de tampón de lisis y la muestra se centrifugó a 13 000 rpm, 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante que contenía los núcleos se transfirió a un nuevo tubo y las fracciones de proteína se almacenaron a -80 °C.

### **Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS)**

40 Para la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS desnaturizante, se usaron geles NuPAGE (4-12 %) (NuPAGE® Novex® gel de Bis-Tris al 10 % de 1,0 mm x 12 pocillos, n.º de ref. NP0302BOX, Invitrogen, Alemania) en combinación con el sistema de electroforesis NuPAGE®. De acuerdo con la tarjeta de referencia rápida (minigeles de Bis-Tris NuPAGE®), el gel se fijó en la cámara y el casete interno se llenó con tampón de procesamiento MOPS 1x (tampón de procesamiento en SDS MOPS de NuPAGE 20x, n.º de ref. NP0001, Invitrogen, Alemania). La cámara externa también se llenó hasta dos tercios de su volumen. Se retiró el peine y se purgaron los carriles con una pequeña pipeta. Se añadieron 30  $\mu$ l de muestra a 10  $\mu$ l de tampón de muestra de LDS NuPAGE 4x (n.º de ref. NP0007, Invitrogen, Alemania), 2  $\mu$ l de DTT 1 M (concentración final 50 mM) y se incubaron a 95 °C durante 5 minutos. Se transfirieron muestras (20  $\mu$ l/carril) y marcadores ((10  $\mu$ l/carril) marcador SeeBlue preteñido, n.º de ref. LC 5625, Invitrogen; (5  $\mu$ l/carril) anti-IgG MagicMark XP, n.º de ref. LC5602, Invitrogen, Alemania) a los carriles y el gel se aplicó a 30 voltios durante 50 minutos con el sistema de electroforesis NuPAGE®.

### **PAGE-SDS y transferencia de Western**

55 Las proteínas separadas inducidas por PAGE-SDS se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa activada por metanol de acuerdo con el protocolo NuPAGE para la electroforesis desnaturizante (guía técnica de NuPAGE®, número de pieza del manual IM1001, Invitrogen, Alemania) en un módulo de transferencia XCell II (Invitrogen, Alemania) con los reactivos apropiados. La transferencia se realizó en la cámara de PAGE-SDS a 30 voltios durante 50 minutos. La membrana de proteína transferida se transfirió a una nueva cámara y se lavó 3 veces durante 10 minutos en tampón de lavado TBS 1x (TBS 10x: Tris-Base 0,5 M, NaCl 1,5 M, pH 7,5) seguido de 5 minutos de incubación en solución de Ponceau (0,1 %) para la detección general de proteínas. La solución de Ponceau se desechó y los residuos se lavaron dos veces con una etapa de lavado con TBS de 1 minuto.

65 La membrana se bloqueó durante 1 hora a 20-30 °C en solución de bloqueo al 1 % (solución de bloqueo: caseína 1/10 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), TBS 1x). Posteriormente, la membrana se incubó en solución de anticuerpo primario (solución de bloqueo al 1 % + anticuerpo) a 4 °C durante la noche mientras se agitaba. La membrana se lavó tres veces en TBST 1x durante 10 minutos a 20-30 °C seguido de una etapa de

lavado de 1 minuto en TBS 1x. La membrana se incubó en solución de anticuerpo secundario (solución de bloqueo al 1 % + anticuerpo) durante 45 minutos a 20-30 °C o a 4 °C durante la noche mientras se agitaba. La membrana se lavó tres veces en TBST 1x durante 10 minutos a 20-30 °C, seguido de dos veces la etapa de lavado de 1 minuto en TBS 1x para eliminar el Tween.

5

Nombre del anticuerpo	Dilución (WB)	Hospedador	Empresa	N.º de ref.
H4K16ac-ab	1:5000	Conejo	Millipore	07-329
AntiGFP	1:2000	Ratón	SIGMA	G 6539
AntiFlag	1:1000-10 000	Ratón	SIGMA	F 3165
Ga14(DBD+O1679)	1:100-1000	Conejo	Santa Cruz Biotech	Sc-577
Alfa-tubulina	1:10 000	Ratón	SIGMA	T 9026
Cabra anticonejo	1:2000	Cabra	Millipore	12-348
Cabra antirratón	1:2500	Cabra	Millipore	

La detección de la unión del anticuerpo se hizo con el sistema de transferencia de Western Lumi-LightPLUS (Roche, Penzberg, Alemania).

10 **Descongelación de líneas celulares CHO**

Se prepararon tubos Falcon con 5 ml de un medio apropiado. Los crioviales se almacenaron en hielo seco hasta descongelarlos en un baño de agua (37 °C). Después, las células CHO se recogieron en tubos Falcon preparados y se centrifugaron durante 3 minutos a 500 x g para eliminar el DMSO residual. El sedimento se resuspendió en 5 ml de medio y se propagó en matraces de agitación de 125 ml desechables (contienen 20 ml de medio apropiado) en condiciones humidificadas estándares (95 % de HR, 37 °C, y 5 % a 8 % de CO<sub>2</sub>) a una velocidad de agitación constante de 120 rpm/min a 150 rpm/min. La viabilidad (> 95 %) y la concentración celular se pueden someter a prueba con el Cedex HiRes Analyzer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).

20 **Cultivo de líneas celulares CHO**

Las células CHO no transfectadas se dividieron cada 3-4 días y se sembraron con una concentración de 2-3 x 10<sup>5</sup> células/ml en medio de cultivo. Las células transfectadas se sembraron con diversas concentraciones de metotrexato (MTX) o metionina sulfoximina (MSX) como agente de selección. Después de la recuperación de la viabilidad celular (3-4 semanas), se seleccionaron células transfectadas de manera estable en medio sin timidina y sin proteínas que contenía metotrexato (MTX) 20 nM a 1200 nM o metionina sulfoximina (MSX) 140 a 160 µM como agente de selección. Las células se propagaron en matraces de agitación con ventilación de 125 ml en condiciones humidificadas estándares (95 % de HR, 37 °C, y 5 % de CO<sub>2</sub>) a una velocidad de agitación constante de 120 rpm/min a 150 rpm/min. Cada 3-4 días, las células se dividieron en medios frescos con una concentración celular de 2-3 x 10<sup>5</sup> células/ml. La densidad y la viabilidad de los cultivos se determinaron usando el contador de células CASY TT o Cedex HiRes (Roche Innovates AG, Bielefeld, Alemania).

**Transfección transitoria y estable**

35 La transfección se hizo con el kit Nucleofector® V de línea celular Amaxa® (Lonza, Colonia, Alemania) y las plataformas de transfección Nucleofector™ 2b Device y el sistema Shuttle™ de 96 pocillos (Lonza, Colonia, Alemania).

40 Se centrifugaron 5 x 10<sup>6</sup> células CHO por transfección (200 x g, 5 minutos) y se desechó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 100 µl de solución Nucleofector V complementada y se añadieron 1,2 pmol de plásmido estéril pipeteando dentro y fuera. El plásmido se linealizó para la transfección estable, para la transfección transitoria se mantuvo la forma circular. La suspensión se montó en una cubeta sin burbujas y se activó el programa U-24 para la transfección de la línea celular CHO. Después del pulso, se montaron 500 µl de medio precalentado en la cubeta y la suspensión completa se transfirió en 8 ml de medio precalentado. Las células se transfirieron a la incubadora y las células estaban listas para los primeros exámenes dos días después.

**Recuento celular con Cellavista**

50 Se mezclaron 60 µl de suspensión de células CHO con 60 µl de azul tripano (0,1 µm) en 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron a 20-30 °C durante 5 minutos. Después, la suspensión de células CHO tratadas se diluyó 1:50 con medio y se transfirieron 200 µl a 96 pocillos de fondo plano (Greiner, Alemania). La centrifugación lenta (500 x g, 5 minutos) dio como resultado una rápida sedimentación de las células.

55 Para un recuento celular preciso, se tomaron fotografías del centro del pocillo, para evitar presentar errores en las imágenes que se acercan al borde de cada pocillo. El generador de imágenes de células Cellavista (SynenTec,

Múnich, Alemania) se usó con fines de recuento celular. Cada muestra se hizo por duplicado y las 10 imágenes completas se usaron para calcular el recuento celular.

#### **Recuento celular con analizador Cedex HiRes**

Para el recuento celular de un número de muestra de hasta 40, se usó el analizador Cedex HiRes (Roche, Alemania). Después de esto, las células CHO se diluyeron en una proporción de 1: 5 en medio HiRes y se transfirieron 300 µl a tubos. El cálculo de las células se realizó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las muestras se analizaron por duplicado para verificar el número de células.

#### **Preparación de muestras para análisis de anticuerpos**

Se calculó la concentración celular y se centrifugaron 2 ml por muestra (500 x g, 5 minutos a 20-30 °C). El sobrenadante se transfirió a nuevas placas de 96 pocillos profundos y se almacenó a -20 °C hasta su uso. El sobrenadante congelado se descongeló durante la noche a 4 °C, se invirtió 6 veces y se centrifugó (4000 rpm, 30 minutos a 20-30 °C). Se filtraron 310 µl con una placa Millipore de múltiples filtros sobre una placa redonda de 96 pocillos con código de barras mediante centrifugación (1200 rpm, 3 minutos a 20-30 °C).

#### **Cuantificación de la producción de anticuerpos con HPLC**

Se usó un procedimiento cromatográfico para cuantificar la cantidad de anticuerpo presente en una muestra. Se usó una columna Poros A que se une a la región Fc del anticuerpo. El anticuerpo se une a la columna y se eluye posteriormente en condiciones de pH bajo. La concentración de proteína se estableció determinando la densidad óptica (DO) a 280 nm, con una longitud de onda de referencia de 320 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar calculado sobre la base de la secuencia de aminoácidos.

#### **Cuantificación de la producción de anticuerpos con ELISA**

La técnica ELISA (ensayo de inmovilización enzimática) se basa en el principio de emparejamiento de anticuerpos. Un anticuerpo de captura específico para el analito de interés, por ejemplo, la parte Fc de IgG se une a una placa de microvaloración para crear la fase sólida. Después de las etapas de bloqueo y lavado, las muestras, los patrones (series de dilución del anticuerpo de referencia) y los controles se incuban entonces con el anticuerpo en fase sólida, que captura el analito. Después de eliminar por lavado el analito no unido, se añade un anticuerpo de detección conjugado (por ejemplo, conjugado con POD). Este anticuerpo de detección se une a un epítipo diferente de la molécula que se mide, completando el emparejamiento. El sustrato de ELISA de quimioluminiscencia de POD BM (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) proporciona una solución de sustrato de un sistema de detección secundario basado en peroxidasa (POD, HRP). La tasa de generación de señal en un inmunoensayo es directamente proporcional a la cantidad de enzima marcadora unida a la fase sólida. La concentración de anticuerpos se calculó por la pendiente de dilución del patrón.

#### **Generación de líneas celulares CHO recombinantes que comprenden el promotor MIE de hCMV**

Las líneas celulares recombinantes que expresan constructos de anticuerpos humanos de clase IgG se generaron mediante transfección transitoria o estable de células en crecimiento en suspensión CHO-K1. Los casetes de expresión de la cadena ligera y pesada de la inmunoglobulina humana estaban bajo el control de un promotor y potenciador temprano inmediato principal de CMV humano.

El vector también comprendía una secuencia de ácido nucleico que codifica la dihidrofolato reductasa (DHFR) murina. La transfección de células se realizó mediante el sistema de nucleofección Amaxa (Lonza Cologne GmbH, Colonia, Alemania).

La suspensión de CHO-K1 M se transfectó con ADN plasmídico circular para la expresión transitoria del anticuerpo, usando el dispositivo Nucleofector en combinación con el kit Nucleofector V (Lonza Cologne GmbH, Colonia, Alemania) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Las suspensiones celulares transfectadas transitorias se sembraron en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 5 días.

Las suspensiones celulares transfectadas estables se sembraron en placas de 384 o 6 pocillos que contenían medio sin timidina con metotrexato (MTX) 250 a 1600 nM como agente de selección. Después de tres a cuatro semanas, los grupos de células que expresaban anticuerpos se examinaron para determinar la estabilidad a largo plazo durante un período de uno a tres meses. Los clones de una única célula que expresaban anticuerpos se sembraron en placas de 384 y 96 pocillos. Después de tres semanas, las líneas celulares que expresaban anticuerpos se identificaron midiendo los títulos de anticuerpo en el medio de cultivo mediante ELISA. Los pocillos en crecimiento se seleccionaron al azar y, en interés del ensayo de estabilidad a largo plazo, los clones celulares se expandieron en volúmenes más altos (3 ml por pocillo en placas de 6 pocillos) y la concentración de anticuerpo se determinó mediante HPLC de proteína A y ELISA al final de cada pase.

Las células se propagaron en matraces de agitación con ventilación de 125 ml desechables o placas de 6 pocillos en condiciones humidificadas estándares (95 % de HR, 37 °C, y 5 % a 8 % de CO<sub>2</sub>) a una velocidad de agitación constante de 120 rpm/min a 150 rpm/min. Cada 3-4 días las células se dividieron en medios frescos. La densidad y la viabilidad de los cultivos se determinaron usando el contador de células Cedex HiRes (Roche Innovates AG, Bielefeld, Alemania) o Cellavista CV3.1 (SynenTec Bio Services GmbH, Múnich, Alemania).

#### **Cultivo y producción a largo plazo de líneas celulares CHO que comprenden el promotor MIE de hCMV**

Las células se sometieron a prueba para determinar la estabilidad fenotípica (es decir, la producción) durante 2 a 3 meses después de la transfección en presencia del agente de selección MTX. Las células se cultivaron de forma continua en matraces de agitación de 125 ml con ventilación que contenían 20-40 ml de medio o placas de 6 pocillos que contenían 2-4 ml de medio con agente de selección y se diluyeron dos veces a la semana con medio fresco. La densidad de siembra fue de 2 a 3 x 10<sup>5</sup> células/ml. Antes del pase, se determinaron la densidad de células viables y la viabilidad.

La concentración de anticuerpo del sobrenadante (título de anticuerpo) se determinó mediante HPLC de proteína A y ELISA al final de cada pase. A partir de estos datos, se calculó la productividad específica de célula (qP) para cada pase mediante la siguiente fórmula:

$$qP = \frac{P_2 - P_1}{(D_2 - D_1) / 2 * \Delta t}$$

qP [pg/célula/d]: productividad específica de célula,

P<sub>1</sub> [µg/ml]: título de anticuerpo al comienzo del pase,

P<sub>2</sub> [µg/ml]: título de anticuerpo al final del pase,

D<sub>1</sub> [células/ml]: densidad de células viables al comienzo del pase,

D<sub>2</sub> [células/ml]: densidad de células viables al final del pase,

Δt [d]: duración del pase.

Los valores de qP se representaron frente a la edad de cultivo al final del pase respectivo en generaciones. Se calculó una línea de tendencia lineal sobre todos los puntos de datos de qP y la alteración relativa de la qP (en porcentaje) durante el período se calculó internamente, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\Delta qP = \frac{m * a}{qP_0 * 100}$$

ΔqP [%]: porcentaje de alteración de qP,

m [pg/célula/d/generación]: pendiente de la línea de tendencia lineal,

a [n.º de generaciones]: edad del cultivo,

qP<sub>0</sub>: intersección con el eje de ordenadas de la línea de tendencia lineal.

Con respecto al menor número de puntos de datos obtenidos para cada muestra, el promedio de los últimos tres valores de qP se dividió por el promedio de los primeros dos valores de qP y se presentó en porcentaje para obtener ΔqP.

$$\Delta qP = \frac{\text{promedio de qP EOS}}{\text{promedio de qP PSB}} * 100$$

Promedio de qP EOS: promedio de los últimos tres valores de qP

Promedio de qP PSB: promedio de los dos primeros valores de qP

#### **Tratamiento de líneas celulares CHO recombinantes, usadas para la identificación de marcadores epigenéticos**

Se usaron 32 líneas celulares CHO de dos proyectos para identificar marcadores epigenéticos, que predicen la expresión del gen diana con dos meses de anticipación. Para los datos de ambos proyectos, incluida la



5 concentración de anticuerpo, se recogió el estado de metilación de C-425 del promotor MIE de hCMV y el número de copias a lo largo de un período de 60 generaciones (~2 meses). El proyecto H comprende 20 líneas celulares CHO-K1 que expresan un anticuerpo humano de clase IgG bajo el control del promotor MIE de hCMV. El vector comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica la glutamina sintetasa, lo que hace que las células sean susceptibles a la selección con metionina sulfoximina (MSX). El proyecto T comprende 12 líneas celulares CHO-K1 que expresan un anticuerpo humano de clase IgG bajo el control del promotor MIE de hCMV. Esas líneas celulares son propensas a la selección con metotrexato (MTX) debido al transgén de la dihidrofolato reductasa murina. Los cultivos de inicio congelados se descongelaron y se cultivaron en medios apropiados que comprendían MTX 250 nM o MSX 140 µM. Después de dos semanas (punto temporal PSB) de cultivo las células se recolectaron y se realizó inmunoprecipitación de cromatina con los siguientes anticuerpos.

10 **Lista para el proyecto T**

Diana	Nombre	Empresa	Grado ChIP	hospedador	N.º de ref.
H3K4me3	ChIPAb + trimetilhistona H3 (Lys4)	Millipore	v	conejo monoclonal	17-614
H3K27me3	ChIPAb + trimetilhistona H3 (Lys27)	Millipore	v	conejo policlonal	17-622
H3K9me3	Anticuerpo antihistona H3 (trimetil K9)	Abcam	v	conejo policlonal	ab8898
H3	Anticuerpo antihistona H3	Abcam	v	conejo policlonal	ab1791
H3ac	Antiacetilhistona H3	Millipore	v	conejo policlonal	06-599

15 **Lista para el proyecto H**

Diana	Nombre	Empresa	Grado ChIP	hospedador	N.º de ref.
H3K4me3	Anticuerpo contra histona H3K4me3 (pAb)	Activemotif	√	conejo policlonal	39915
H3ac	Anticuerpo antiacetilhistona H3	Millipore	√	conejo policlonal	06-599
H3K9me3	ChIPAb + trimetilhistona H3 (Lys9)	Millipore	v	policlonal	17-625
H3K27me3	ChIPAb + trimetilhistona H3 (Lys27)	Millipore	v	conejo policlonal	17-622
H3	Anticuerpo antihistona H3	Abcam	√	conejo policlonal	ab1791

La PCR cuantitativa se realizó con los siguientes cebadores.

SEQ ID NO:	N.º de cebador:	Diana	Secuencia
32	396	MIE de hCMV directo 1	TACATCAATGGGCGTGGATA
33	397	MIE de hCMV inverso 1	AAGTCCCGTTGATTTTGGTG
34	386	Gusb directo 1	CAGGGTGGGATGCTCTTC
35	387	Gusb inverso 1	GCCGGTTTTCCGAGAAGT
36	431	Eif3i directo 1	GTTCCCGGCACTGACACT
37	432	Eif3i inverso 2	ACTTGATCTGCGTGATGGAC
38	484	Fox2a directo 1	ATCACCCGTACTGCTGCTCT
39	485	Fox2a inverso	GAGGCTTCTGGGGATCTCTT
40	468	Gata5 directo 1	CACCTACCCCATCCTGTCTG
41	469	Gata5 inverso 1	GAGGAGGTGAAGGCAAAGTCT
42	388	Rho directo 1	AGCCTCGGTCTCTATTGACG
43	389	Rho inverso 1	CGTTGGAGAAGGGCACATAA
52	474	UNC13c directo 1	GGGTGCTTTACGGAACTGA
53	475	UNC13c inverso 1	GCTTCTTATGCCCCAGGTTT

20 **Determinación del número de copias de transgén**

El examen del número de copias de transgén se realizó como se describe anteriormente (Osterlehner, et al. 2011). Las copias de transgén por muestra ( $LC_s$  o  $HC_s$ ) se extrapolan a partir de una curva patrón de una serie de dilución. Suponiendo que cada célula contenga aproximadamente 6 pg de ADN, el número de transgenes por célula ( $LC_{célula}$ ) se calculó de la siguiente manera.

$$LC_{célula} = \frac{LC_s}{50000} * 6 \qquad HC_{célula} = \frac{HC_s}{50000} * 6$$

### **Análisis informático con JMP**

El porcentaje de metilación de C-179 y la acetilación por histona 3 cerca de MIE de hCMV al inicio de la fase de cultivo se representaron frente a la alteración a lo largo de 60 generaciones de productividad específica ( $\Delta qP$ ) en un modelo estándar de ajuste por mínimos cuadrados. Por lo tanto, se usó el programa informático JMP10 (JMP®10.0.1 publicación: 2, edición de 64 bits; SAS Institute Inc.) y se calcularon los valores de p del gráfico de influencia del efecto. Además, se realizaron análisis de valores atípicos empleando la técnica de Jackknife. La estadística de LogWorth se realizó para identificar el mejor nodo dividido para subdividir las poblaciones celulares por la estabilidad y el grado de modificación epigenética (Sail 2002).

### **Ejemplo 2**

#### **Generación de líneas celulares CHO recombinantes**

Se generaron líneas celulares recombinantes que expresan un anticuerpo humano de clase IgG mediante transfección estable de células de crecimiento en suspensión CHO-K1 o CHO-DG44 con un vector que codifica la cadena ligera y pesada del anticuerpo, que comprende una cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana y una cadena pesada gamma 1 o gamma 4 de inmunoglobulina humana. El vector comprendía además un ácido nucleico que codifica la dihidrofolato reductasa (DHFR) o la glutamina sintetasa (GS) murina. Los casetes de expresión de la cadena ligera y pesada estaban ambos bajo el control de un promotor y potenciador temprano inmediato principal de CMV humano (SEQ ID NO: 01). La transfección de células se realizó mediante nucleofección (Lonza Cologne GmbH o Amaxa Biosystems) o mediante electroporación usando Gene Pulser XCell (BIO-RAD).

Por ejemplo, la suspensión de CHO-K1 o CHO-DG44 se transfectó con ADN plasmídico linealizado, usando el dispositivo Nucleofector en combinación con el kit Nucleofector V (Lonza Cologne GmbH, Colonia, Alemania) o mediante electroporación usando el Gene Pulser XCell (Bio-Rad, Hercules, CA), de acuerdo con los protocolos de los fabricantes. Las células transfectadas se sembraron en placas de 96 o 384 pocillos que contenían medio sin timidina con diversas concentraciones de metotrexato (MTX) como agente de selección o metionina sulfoximina (MSX) como agente de selección. Después de tres semanas, las líneas celulares que expresaban anticuerpos se identificaron midiendo los títulos de anticuerpo en el medio de cultivo mediante ELISA. Los productores principales se expandieron a volúmenes mayores, se subclonaron mediante dilución limitante y se crioconservaron.

Se seleccionaron células transfectadas de manera estable en medio sin timidina ni proteínas que contenía metotrexato (MTX) 20 nM a 1200 nM o metionina sulfoximina (MSX) 140 a 160  $\mu$ M como agente de selección. Las células o líneas celulares que expresaban anticuerpo se identificaron midiendo los títulos de anticuerpo en el medio de cultivo y se subclonaron mediante dilución limitante y/o depósito de célula única por FACS.

Las células se propagaron en matraces de agitación con ventilación de 50 ml o 125 ml desechables en condiciones humidificadas estándares (95 % de HR, 37 °C, y 5 % a 8 % de CO<sub>2</sub>) a una velocidad de agitación constante de 120 rpm/min a 150 rpm/min. Cada 3-4 días las células se dividieron en medio fresco. La densidad y la viabilidad de los cultivos se determinaron usando el contador de células CASY TT o Cedex HiRes (Roche Innovates AG, Bielefeld, Alemania).

Además, se aplicaron técnicas estándares de cultivo celular como se describe, por ejemplo, en Current Protocols in Cell Biology, Bonifacino, J.S. et al. (Eds), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (2000).

### **Ejemplo 3**

#### **Cultivo y producción a largo plazo**

Las líneas celulares CHO obtenidas de acuerdo con el ejemplo 2 se investigaron para la productividad a largo plazo.

Las células se sometieron a prueba para la estabilidad fenotípica, es decir, la producción, durante 35 a 70 generaciones en ausencia de un agente de selección. Las células se cultivaron de forma continua en matraces de agitación de 125 ml con ventilación que contenían 50 ml de medio sin agente de selección y se diluyeron dos veces a la semana con medio fresco. La densidad de siembra fue de 2 a 3 x 10<sup>5</sup> células/ml. Antes del pase, se determinaron la densidad de células viables y la viabilidad. La edad del cultivo en generaciones al final de cada pase

se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$a_2 = a_1 + \ln(D_2/D_1)/\ln 2 \quad (\text{Fórmula 1})$$

5 con

$a_2$  [n.º de generaciones]: edad del cultivo al final del pase,

10  $a_1$  [n.º de generaciones]: edad del cultivo al comienzo del pase, es decir, edad del cultivo al final del pase anterior,

$D_1$  [células/ml]: densidad de células viables al comienzo del pase,

$D_2$  [células/ml]: densidad de células viables al final del pase.

15 La concentración de anticuerpo en el sobrenadante (título de anticuerpo) se determinó mediante HPLC de proteína A al final de cada pase. A partir de estos datos, se calculó la tasa de producción específica (SPR) para cada pase usando la siguiente fórmula:

$$SPR = P_2 - P_1 / ((D_2 + D_1) / 2 * \Delta t) \quad (\text{Fórmula 2})$$

20 con

SPR [pg/célula/d]: tasa de producción específica,

25  $P_1$  [µg/ml]: título de anticuerpo al comienzo del pase,

$P_2$  [µg/ml]: título de anticuerpo al final del pase,

30  $D_1$  [células/ml]: densidad de células viables al comienzo del pase,

$D_2$  [células/ml]: densidad de células viables al final del pase,

$\Delta t$  [d]: duración del pase.

35 Los valores de SPR se representaron frente a la edad de cultivo al final del pase respectivo en generaciones. Se calculó una línea de tendencia lineal sobre todos los puntos de datos de SPR y la alteración relativa de la SPR (en porcentaje) durante el período de prueba se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\Delta SPR = m * a / SPR_0 * 100 \quad (\text{Fórmula 3})$$

40 con

$\Delta SPR$  [%]: alteración porcentual de SPR,

45  $m$  [pg/célula/d/generación]: pendiente de la línea de tendencia lineal,

$a$  [n.º de generaciones]: edad del cultivo,

50  $SPR_0$ : intersección con el eje de ordenadas de la línea de tendencia lineal.

Casi todas las líneas celulares mostraron una disminución en la productividad, por lo que la pérdida de productividad tiende a ser más fuerte en condiciones sin agente de selección.

55 **Tabla 3:** Cambio en SPR durante el cultivo de cinco líneas celulares en presencia y/o ausencia de agente de selección.

Línea celular parental	Agente de selección	
CHO-K1	MTX	
N.º de muestra	$\Delta SPR$ (-) MTX 30 generaciones	$\Delta SPR$ (-) MTX 60 generaciones
K18.1	-59 %	n.d.
G25-10	-29 %	-57 %
G25-17	-73 %	n.d.

ES 2 708 830 T3

Línea celular parental	Agente de selección	
CHO-K1	MTX	
N.º de muestra	$\Delta$ SPR (-) MTX 30 generaciones	$\Delta$ SPR (-) MTX 60 generaciones
G42-5	0 %	-1 %

n.d. = no determinado.

Línea celular parental	Agente de selección	
CHO-DG44	MTX	
N.º de muestra	$\Delta$ SPR (-) MTX 30 generaciones	$\Delta$ SPR (-) MTX 60 generaciones
43-16 A10	-49 %	n.d.

n.d. = no determinado.

Línea celular parental	Agente de selección	
CHO-K1	MSX	
N.º de muestra	$\Delta$ SPR (+) MSX 60 generaciones	$\Delta$ SPR (-) MSX 60 generaciones
H-1	-47 %	-80 %
H-2	-71 %	-70 %
H-3	-73 %	-90 %
H-4	-69 %	-70 %
H-5	-40 %	-49 %
H-6	-80 %	-72 %
H-7	-66 %	-82 %
H-8	-67 %	-76 %
H-9	-87 %	-77 %
H-10	-16 %	-73 %
H-11	-43 %	-96 %
H-12	-42 %	-33 %
H-13	8 %	-19 %
H-14	7 %	5 %
H-15	-17 %	-40 %
H-16	16 %	-33 %
H-17	-13 %	-31 %
H-18	-68 %	e.e.m.
H-19	-11 %	3 %
H-20	-40 %	-81 %

e.e.m. = error en la medición

Línea celular hospedadora	Agente de selección	
CHO-K1	MTX	
N.º de muestra	$\Delta$ SPR (+) MTX 60 generaciones	$\Delta$ SPR (-) MTX 60 generaciones
T-1	-35 %	-34 %
T-2	-31 %	-72 %

Línea celular hospedadora	Agente de selección	
CHO-K1	MTX	
N.º de muestra	$\Delta$ SPR (+) MTX 60 generaciones	$\Delta$ SPR (-) MTX 60 generaciones
T-3	-82 %	-97 %
T-4	-23 %	-47 %
T-5	-16 %	-22 %
T-6	-14 %	-20 %
T-7	-16 %	-32 %
T-8	-65 %	-79 %
T-9	-28 %	-49 %
T-10	4 %	1 %
T-11	-10 %	-22 %
T-12	-32 %	-23 %

#### **Ejemplo 4**

##### **5 Identificación de sitios CpG metilados dentro del ADN promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano mediante tratamiento con bisulfito y secuenciación de ADN**

El fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano (SEQ ID NO: 01) usado para la expresión de los genes de cadena ligera y pesada del anticuerpo contiene 33 sitios CpG.

10 El ADN genómico se aisló de las líneas celulares CHO K18.1, G25-10, G25-17, G42-5 y 43-16 A10 usando el kit Allprep DNA/RNA Mini de Qiagen (Hilden, Alemania). Se escindieron cinco microgramos de ADN con la enzima Dral y se cuantificaron midiendo la extinción a 260 nm. Cien nanogramos de ADN se sometieron a tratamiento con bisulfito y se purificaron usando el kit de bisulfito EpiTect (Qiagen, Hilden, Alemania). El ADN tratado con bisulfito se recuperó en 20  $\mu$ l de agua sin ARNasa (Qiagen, Hilden, Alemania).

15 Para amplificar la cadena A (directo) del fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano (SEQ ID NO: 02), se combinó 1  $\mu$ l de ADN tratado con bisulfito con 24  $\mu$ l de mezcla maestra de PCR y se sometió a PCR usando el sistema de PCR Gene Amp® 9700 (Applied Biosystems Inc., EE. UU.).

20 La mezcla maestra de PCR de 24  $\mu$ l comprendía:

1  $\mu$ l de cebador directo 227 de la SEQ ID NO: 06 (10 pmol/ $\mu$ l),

1  $\mu$ l de cebador inverso 229 de la SEQ ID NO: 08 (10 pmol/ $\mu$ l),

25 22  $\mu$ l de Platinum® PCR SuperMix HighFidelity (Invitrogen Corp., EE. UU.).

El cebador directo 227 es complementario del extremo 5' del fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano. El cebador inverso 229 se une en dirección 3' dentro de la 5'-UTR de los genes de inmunoglobulina.

30

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

		Temp.	Duración
Etapa 1	Desnaturalización	95 °C	10 min
Etapa 2: PCR	Desnaturalización	94 °C	30 s
N.º de ciclos: 45	Reasociación	50 °C	2 min
	Extensión	68 °C	2 min
Etapa 3	Extensión final	72 °C	10 min
Etapa 4	Impregnación	4 °C	indefinido

35 Se comprobó el tamaño y la pureza del producto de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa y se clonó en el vector pCR4 (Invitrogen Corp., EE. UU.) usando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen Corp., EE. UU.). Los clones plasmídicos se aislaron y analizaron por digestión de restricción y electroforesis en gel de agarosa. Para cada línea

celular, se secuenciaron de 19 a 22 plásmidos que contenían la inserción. Para estimar la eficiencia de desaminación del tratamiento con bisulfito en sitios que no son CpG, se determinó el número de citosinas residuales en sitios que no son CpG. La eficiencia de desaminación porcentual se calculó de la siguiente manera:

$$E_{\text{mod}} = 100 - (C_{\text{res}} / C_{\text{total}} * 100) \quad (\text{Fórmula 4})$$

con

$E_{\text{mod}}$  [%]: eficiencia de desaminación,

$C_{\text{res}}$ : número de citosinas residuales en sitios que no son CpG en todas las inserciones analizadas, sitios de cebadores de PCR excluidos,

$C_{\text{total}}$ : número de citosinas en el fragmento promotor/potenciador de CMV no tratado con bisulfito, sitios de cebadores de PCR excluidos, multiplicado por el número de inserciones analizadas, es decir,  $107 * 20$ .

Se encontró que la eficiencia de desaminación en citosina que no es de CpG era superior a un 99 % en todas las muestras (tabla 4).

**Tabla 4:** Eficiencia de desaminación en citosina que no es de CpG.

	Línea celular K18.1	Línea celular G25-10	Línea celular G25-17	Línea celular G42-5	Línea celular 43-16 A10
$E_{\text{mod}}$	99,1 %	99,3 %	99,5 %	99,3 %	99,3 %

La protección de la 5-metilcitosina de la desaminación se confirmó mediante tratamiento con bisulfito y posterior clonación y secuenciación del ADN plasmídico aislado de *E. coli dcm<sup>+</sup>*. *E. coli dcm<sup>+</sup>* metila los restos de citosina internos dentro de las secuencias CCAGG o CCTGG (sitios dcm). Se encontró que la eficiencia de desaminación fue de un 99 % en los sitios sin dcm y de menos de un 5 % en la citosina interna dentro de los sitios con dcm.

Para cuantificar la extensión de la metilación del ADN en los sitios CpG dentro del fragmento promotor/potenciador de CMV tratado con bisulfito, se determinó el número de citosinas encontrado en cada sitio CpG y se representó para cada célula analizada.

La línea celular K18.1 está altamente metilada (figura 3A). La frecuencia de metilación se acumula en 3 agrupaciones, una en el extremo 5', una en el extremo 3' y otra en la posición 400 aproximadamente. El mayor grado de metilación se encontró en la posición 425. Catorce de las veintidós inserciones secuenciadas tenían una citosina en esta posición.

La metilación del promotor de CMV de la línea celular 43-16 A10 fue notable (figura 3E). La distribución de la metilación fue similar a la distribución observada con la línea celular K18.1. La posición 425 se metilaba con mayor frecuencia. Cinco de las veinte inserciones secuenciadas contenían una citosina en esta posición.

En las otras tres líneas celulares investigadas, la citosina se detectó solo esporádicamente en los sitios CpG (figuras 3B, 3C y 3D).

### Ejemplo 5

#### **PCR específica de metilación cuantitativa de ADN promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano tratado con bisulfito**

En este ejemplo, se describe una qPCR en tiempo real específica de metilación como procedimiento para detectar la metilación en una posición CpG, para ser más precisos, en la posición 425 del ácido nucleico promotor de hCMV.

Se diseñaron dos conjuntos de cebadores:

- un par de cebadores específicos de metilación (par de cebadores MSP) que amplifica selectivamente el ADN del promotor de CMV desaminado con una citosina en la posición 425 que representa el ADN que está metilado en la posición 425, y
- un par de cebadores universales que amplifica el ADN promotor de CMV desaminado independientemente del estado de metilación.

El par de cebadores universales se usó para la normalización. Para que se usen en la misma ejecución de PCR, ambos pares de cebadores deberían tener puntos de fusión similares.

El diseño de los cebadores que detectan la metilación en la posición 425 se complicó por la presencia de dos sitios CpG adicionales en estrecha proximidad (posición 416 y posición 437). Los cebadores sensibles a la metilación deberían detectar 5mC425 independientemente del estado de metilación de la posición 416 y la posición 437.

5 Cuatro fragmentos promotores/potenciadores tempranos inmediatos principales de CMV humano desaminados aislados en el ejemplo 4 que representan las posibles variaciones de secuencia en las posiciones 425 y 437: n.º 11, n.º 62, n.º 01 y n.º 04 (tabla 5, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22) se han usado como moldes de qPCR para PCR específica de metilación y pares de cebadores universales.

10 **Tabla 5:** Resultados esperados para MSP y pares de cebadores universales en qPCR.

Moldes	n.º 11	n.º 62	n.º 01	n.º 04
Pos. 425	T	C	C	T
Pos. 437	T	C	T	C
	Amplificación			
Par de cebadores MSP	-	+	+	-
Par de cebadores universales	+	+	+	+

15 Con el cebador universal, los cuatro moldes se pueden amplificar de manera comparable, mientras que el par de cebadores específicos de metilación puede amplificar selectivamente el molde n.º 62 y el molde n.º 01. La  $\Delta C_p$  debería ser lo más pequeña posible entre el par de cebadores específicos de metilación y el par de cebadores universales en el molde n.º 62 y el molde n.º 01. Los valores de  $C_p$  obtenidos con el par de cebadores específicos de metilación en el molde n.º 11 y el molde n.º 04 deberían ser lo más altos posible, es decir, la  $\Delta C_p$  comparada con la amplificación con el par de cebadores universales debe ser máxima.

20 Para qPCR se empleó el sistema LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y las muestras se prepararon usando el LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Una solución de molde de cinco microlitros que contenía 0,05 ng de ADN se combinó con 15  $\mu$ l de mezcla maestra de PCR en un pocillo de una placa de múltiples pocillos de 96 pocillos.

25 La mezcla maestra de PCR de 15  $\mu$ l comprendía:

- 4,2  $\mu$ l de agua,
- 0,4  $\mu$ l de cebador directo 239, 263 o 264 (también posible cebador 227, 228, 240, 238) (10 pmol/ $\mu$ l),
- 0,4  $\mu$ l de cebador inverso 237, 254, 262, 265, 266, 267 o 268 (también posible cebador 229) (10 pmol/ $\mu$ l),
- 10  $\mu$ l de SYBR Green I Master.

35 La placa de múltiples pocillos se selló con una lámina de sellado LightCycler® 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y se centrifugó a 1500 x g durante 2 minutos. Posteriormente, la placa se montó en el sistema LightCycler® 480 y se sometió a qPCR. Cada muestra se sometió a prueba por duplicado, triplicado o cuadruplicado. Para permitir la determinación de los números de copias absolutos, se generaron curvas patrón para el transgén LC y el HC, usando el plásmido de expresión linealizado como patrón. Las diluciones del patrón contenían  $2,5 \times 10^7$ ,  $2,5 \times 10^6$ ,  $2,5 \times 10^5$ ,  $2,5 \times 10^4$  o  $2,5 \times 10^3$  copias de plásmidos. El ADN genómico se sometió a prueba por triplicado; los patrones se ejecutaron por cuadruplicado.

Las condiciones de PCR usadas fueron:

	Etapas	N.º de ciclos	T [°C]	t [min:s]	Tasa de aumento [°C s-1]	Adquisición
desnaturalización		1	95	10:00	4,40	-
PCR en tiempo real	desnaturalización	45	95	00:10	4,40	-
	reasociación		57 a 59	00:15	2,20	-
	prolongación		72	00:07	4,40	-
	detección		66	00:01	2,20	único
curva de fusión	desnaturalización	1	95	00:05	4,40	-

	reasociación		60	01:00	2,20	-
	fusión		90	00:00	0,11	continuo
enfriamiento		1	40	00:30	2,2	

La recogida y el análisis de los datos se hicieron con el programa informático LightCycler® 480 versión 1.5. El grado aparente de metilación se calculó usando la siguiente fórmula, en la que se asumió la eficiencia de amplificación ideal (E = 2).

5

$$mC_{app} = 2^{Cp(t)-Cp(m)} * 100 \quad \text{(Fórmula 5)}$$

con

10  $mC_{app}$  [%]: grado aparente de metilación,

Cp(t): valor de Cp obtenido con cebadores universales,

15 Cp(m): valor de Cp obtenido con cebadores específicos de metilación.

15

Durante la evaluación del cebador, se encontró que el diseño del cebador específico de metilación, que es altamente selectivo para el ADN promotor de CMV desaminado con una citosina en la posición 425 ("metilado"), se debe realizar con cuidado. Los cebadores 266 y 267 mostraron la diferencia máxima entre Cp (n.º 11) y Cp (n.º 62), es decir, la mayor selectividad para el ADN "metilado". Los cebadores 265, 268 y 254 mostraron una selectividad mínima. El par de cebadores universales 263/237 se sometió a prueba como control para la  $\Delta Cp$  mínima (figura 6 y tabla 6).

20

**Tabla 6:** Resultados de la evaluación del cebador.

Cebador	Molde	Media de Cp	DE de Cp	$\Delta Cp$ [Cp (n.º 11) - Cp (n.º 62)]	DE $\Delta Cp$ [Cp (n.º 11) - Cp (n.º 62)]
263+237	n.º 11	11,71	0,06	0,23	0,06
	n.º 62	11,48	0,01		
263+254	n.º 11	15,22	0,08	3,89	0,19
	n.º 62	11,32	0,17		
263+265	n.º 11	20,29	0,23	8,74	0,23
	n.º 62	11,55	0,02		
263+266	n.º 11	23,76	0,04	12,31	0,16
	n.º 62	11,45	0,16		
263+267	n.º 11	24,74	0,14	13,05	0,16
	n.º 62	11,69	0,07		
263+268	n.º 11	21,75	0,06	10,25	0,10
	n.º 62	11,51	0,09		

25

En la figura 5, se muestran los resultados obtenidos con el par de cebadores específicos de metilación 239/267 (SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 18) en combinación con el par de cebadores universales 239/237 (SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 09). El par de cebadores universales 239/237 amplificó los cuatro moldes aproximadamente igual de bien, mientras que el par de cebadores específicos de metilación 239/267 amplificó los moldes n.º 62 y n.º 01. Los moldes n.º 11 y n.º 4 únicamente se amplifican muy poco por el par de cebadores 239/267.

30

La frecuencia de metilación calculada a partir de los valores de Cp fue casi de un 100 % para el molde n.º 62 y el molde n.º 01 y casi de un 0 % para el molde n.º 11 y el molde n.º 04 (tabla 7A). Esto muestra que el par de cebadores específicos de metilación 239/267 en combinación con el par de cebadores universales 239/237 se puede usar para discriminar el ADN promotor de CMV que está metilado en la posición 425 del ADN promotor de CMV que no está metilado en la posición 425 por qPCR en tiempo real.

35

Se encontraron pares de cebadores específicos de metilación y universales adicionales y se caracterizan en las tablas 7A y 7B.

40

**Tabla 7A:** Cebador inverso específico de metilación 267 y cebador inverso no específico de metilación 237 combinados con tres cebadores directos diferentes.



molde	sitio de metilación		pares de cebadores universales					
			239 (directo) + 237 (inverso)		263 (directo) + 237 (inverso)		264 (directo) + 237 (inverso)	
	425	437	Cp(u)	DE	Cp(u)	DE	Cp(u)	DE
n.º 11	T	T	16,41	0,23	15,65	0,01	15,73	0,1
n.º 62	C	C	16,73	0,04	16	0,08	16,38	0,25
n.º 01	C	T	17,51	0,24	16,64	0,08	16,87	0,21
n.º 04	T	C	17,58	0,24	16,18	0,16	16,54	0,22
molde	sitio de metilación		pares de cebadores específicos de C425					
			239 (directo) + 267 (inverso)		263 (directo) + 267 (inverso)		264 (directo) + 267 (inverso)	
	425	437	Cp(m)	DE	Cp(m)	DE	Cp(m)	DE
n.º 11	T	T	30,71	0,23	26,84	0,28	28,01	0,14
n.º 62	C	C	16,74	0,13	16	0,38	16,82	0,29
n.º 01	C	T	17,52	0,18	16,91	0,36	17,06	0,17
n.º 04	T	C	25,34	0,24	23	0,14	23,68	0,27
molde	sitio de metilación		$\Delta Cp = Cp(m) - Cp(u)$					
			$\Delta Cp$	DE	$\Delta Cp$	DE	$\Delta Cp$	DE
n.º 11	T	T	14,3	0,33	11,19	0,28	12,28	0,17
n.º 62	C	C	0,01	0,14	0	0,39	0,44	0,38
n.º 01	C	T	0,01	0,30	0,27	0,37	0,19	0,27
n.º 04	T	C	7,76	0,34	6,82	0,21	7,14	0,35
molde	sitio de metilación		mCapp [%]					
			mCapp	DE	mCapp	DE	% rel.	DE
n.º 11	T	T	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
n.º 62	C	C	99,3	9,4	100,0	26,9	73,7	19,6
n.º 01	C	T	99,3	20,7	82,9	21,2	87,7	16,4
n.º 04	T	C	0,5	0,1	0,9	0,1	0,7	0,2

**Tabla 7B:** Cebador inverso específico de metilación 266 y cebador inverso no específico de metilación 237 combinados con dos cebadores directos diferentes.

molde	sitio de metilación		pares de cebadores universales			
			263 (directo) + 237 (inverso)		264 (directo) + 237 (inverso)	
	425	437	Cp(u)	DE	Cp(u)	DE
n.º 11	T	T	15,32	0,18	15,88	0,08
n.º 62	C	C	15,73	1,07	16,22	0,57
n.º 01	C	T	15,42	0,19	16,35	0,22
n.º 04	T	C	15,4	0,24	16,8	1,12
molde	sitio de metilación		pares de cebadores específicos de C425			
			263 (directo) + 267 (inverso)		264 (directo) + 267 (inverso)	
	425	437	Cp(m)	DE	Cp(m)	DE
n.º 11	T	T	28,33	0,62	28,27	0,44
n.º 62	C	C	15,64	0,25	16,32	0,35
n.º 01	C	T	15,83	0,34	16,59	0,01
n.º 04	T	C	22,39	0,15	22,83	0,88
molde	sitio de metilación		$\Delta Cp = Cp(m) - Cp(t)$			
			$\Delta Cp$	DE	$\Delta Cp$	DE
n.º 11	T	T	13,01	0,65	12,39	0,45
n.º 62	C	C	-0,09	1,10	0,1	0,67
n.º 01	C	T	0,41	0,39	0,24	0,22

n.º 04	T	C	6,99	0,28	6,03	1,42
<b>molde</b>	<b>sitio de metilación</b>		<b>mCapp [%]</b>			
	425	437	mCapp	DE	% rel.	DE
n.º 11	T	T	0,0	0,0	0,0	0,0
n.º 62	C	C	106,4	81,1	93,3	43,3
n.º 01	C	T	75,3	20,3	84,7	12,9
n.º 04	T	C	0,8	0,2	1,5	1,5

Para la cuantificación del grado de metilación sobre amplio intervalo, el molde n.º 62 se mezcló en diferentes proporciones con el molde n.º 11. La qPCR se realizó como se describe anteriormente usando los pares de cebadores 239/237 y 239/267 y se calculó la recuperación del molde n.º 62 en el fondo del molde n.º 11.

5 Para el cálculo de la fracción de ADN del molde n.º 62, se determinaron las eficiencias de amplificación de los pares de cebadores en las condiciones usadas. Las diluciones en serie de los moldes n.º 62 y n.º 11 de n = 0,005 ng a 0,5 ng de ADN se sometieron a qPCR y los valores de Cp determinados se representaron frente al log (n). Se calculó una línea de regresión lineal usando el ajuste XL (Microsoft). La eficiencia de amplificación se calculó usando la siguiente fórmula:

$$E = 10^{-1/m} \quad (\text{Fórmula 6})$$

con

E: eficiencia de amplificación,

m: pendiente de la línea de tendencia lineal.

20 Las eficiencias de amplificación de ambos pares de cebadores se calcularon en aproximadamente 1,7. La siguiente fórmula se empleó para calcular la fracción del molde n.º 62 de ADN:

$$mC = 1,7^{Cp(t)-Cp(m)} * 100 \quad (\text{Fórmula 7})$$

25 con

mC [%]: fracción de ADN metilado en la posición 425,

Cp(t): valor de Cp obtenido con el par de cebadores universales,

30 Cp(m): valor de Cp obtenido con el par de cebadores específicos de metilación.

35 Las fracciones determinadas de ADN del molde n.º 62 de dos experimentos independientes se representaron frente a los valores esperados (figura 7). Se puede realizar una cuantificación de la metilación entre un 1 % y un 100 %.

### Ejemplo 6

40 **Identificación del estado de metilación de C-425 en el ADN promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano mediante tratamiento con bisulfito y PCR cuantitativa en tiempo real**

#### Tratamiento con bisulfito del ADN genómico de líneas celulares CHO

45 El ensayo se realizó como se describe en Osterlehner et al. (supra). El ADN genómico se aisló de las líneas celulares CHO usando el kit Allprep DNA/RNA Mini de Qiagen (Hilden, Alemania). Se escindieron cinco microgramos de ADN con la enzima Dral y se cuantificaron midiendo la extinción a 260 nm. Cien nanogramos de ADN se sometieron a tratamiento con bisulfito y se purificaron usando el kit de bisulfito EpiTect (Qiagen, Hilden, Alemania). El ADN tratado con bisulfito se recuperó en 20 µl de agua sin ARNasa (Qiagen, Hilden, Alemania).

50 Para amplificar la cadena A (directo) del fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano (SEQ ID NO: 02), se combinó 1 µl de ADN tratado con bisulfito con 24 µl de mezcla maestra de PCR y se sometió a PCR usando el sistema de PCR GeneAmp® 9700 (Applied Biosystems Inc., EE. UU.).

La mezcla maestra de PCR de 24 µl comprendía

55 1 µl de cebador directo 227 de la SEQ ID NO: 06 (10 pmol/µl),

1 µl de cebador inverso 229 de la SEQ ID NO: 08 (10 pmol/µl),

22 µl de Platinum® PCR SuperMix HighFidelity (Life Technologies, Carlsbad, CA).

5 El cebador directo 227 es complementario del extremo 5' del fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano. El cebador inverso 229 se une en dirección 3' dentro de la 5'-UTR de los genes de inmunoglobulina.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

		Temp.	Duración
Etapa 1	Desnaturalización	95 °C	10 min
Etapa 2: PCR N.º de ciclos: 45	Desnaturalización	94 °C	30 s
	Reasociación	50 °C	2 min
	Extensión	68 °C	2 min
Etapa 3	Extensión final	72 °C	10 min
Etapa 4	Impregnación	4 °C	indefinido

10

Se comprobó el tamaño y la pureza del producto de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa.

**PCR cuantitativa en tiempo real específica de metilación**

15 El sistema LightCycler 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) en combinación con el LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) se usó para realizar la qPCR. Se usaron como moldes cincuenta picogramos de ADN plasmídico, 3 µl de ADN genómico tratado con bisulfito, o 5 µl de una dilución 1:50 000 del producto de PCR de los cebadores 227 y 229 (SEQ ID NO: 06/08) con ADN genómico tratado con bisulfito. Para la qPCR, los moldes se mezclaron con 4 o 12 pmol de cebador directo e inverso, 10 µl de  
20 LightCycler 480 SYBR Green I Master y agua sin nucleasa, para completar un volumen total de 20 µl. Para cuantificar el ADN del fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano total, se usó el par de cebadores 239/237 (SEQ ID NO: 11/09), el ADN metilado en la posición C-425 (SEQ ID NO: 01) se detectó con el par de cebadores 239/267 (SEQ ID NO: 11/18). La mezcla de PCR se añadió a una placa de múltiples pocillos.

25

La placa de múltiples pocillos se selló con una lámina de sellado LightCycler® 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y se centrifugó a 1500 x g durante 2 minutos. Posteriormente, la placa se montó en el sistema LightCycler® 480 y se sometió a qPCR. Cada muestra se sometió a prueba por duplicado, triplicado o cuadruplicado.

30

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

	Etapa	N.º de ciclos	T [°C]	t [min:s]	Tasa de aumento [°C s <sup>-1</sup> ]	Adquisición
desnaturalización		1	95	10:00	4,40	-
PCR en tiempo real	desnaturalización	45	95	00:10	4,40	-
	reasociación		57 a 59	00:15	2,20	-
	prolongación		72	00:07	4,40	-
	detección		66	00:01	2,20	único
curva de fusión	desnaturalización	1	95	00:05	4,40	-
	reasociación		60	01:00	2,20	-
	fusión		90	00:00	0,11	continuo
enfriamiento		1	40	00:30	2,2	

35 La recogida y el análisis de datos se realizaron con el programa informático LightCycler 480 versión 1.5 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). La metilación de mC se expresó en porcentaje mediante la siguiente ecuación:

$$mC = E^{Cq(\hat{\theta}) - Cq(m)} * 100 \quad (\text{Fórmula 8})$$

Cq (t) es el ciclo de cuantificación obtenido con el par de cebadores universales 239/237, Cq(m) representa el ciclo de cuantificación obtenido con el par de cebadores específicos de metilación 239/267, y E es la eficiencia de amplificación (directrices MIQE). E fue aproximadamente 1,7 para 0,2 pmol/μl de concentración de cebador y 2,0 para 0,6 pmol/μl de concentración de cebador.

**Ejemplo 7**

**Correlación de metilación del promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano con productividad a largo plazo**

**qPCR específica de metilación con la cadena A del promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano preamplificada**

Como se reseña en el ejemplo 4, el ADN genómico se aisló de las líneas celulares CHO K18.1, G25-10, G25-17, G42-5 y 43-16 A10, se escindió con la enzima *Dral* y se desaminó mediante tratamiento con bisulfito. La cadena A del promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano se amplificó usando el cebador 227 y 229.

El producto de PCR se diluyó 1:50 000. Se usaron cinco microlitros de cada dilución para qPCR en tiempo real. Los cebadores 239 y 237 se emplearon para la cuantificación del ADN promotor de CMV total; los cebadores 239 y 267 se emplearon para la cuantificación del ADN promotor/potenciador de CMV metilado en la posición 425. Las muestras se sometieron a prueba por triplicado. Los moldes n.º 11, n.º 62 y n.º 01 se usaron como controles.

La qPCR se configuró como se reseña en el ejemplo 5 combinando 5 μl de molde con 15 μl de mezcla maestra de PCR. Las condiciones de la PCR fueron las reseñadas en el ejemplo 5. La temperatura de reasociación del cebador fue de 58 °C.

**qPCR específica de metilación con ADN genómico tratado con bisulfito**

El ADN genómico se extrajo de las líneas celulares CHO K18.1, G25-10, G25-17, G42-5 y 43-16 A10, se escindió con la enzima *Dral* y se desaminó mediante tratamiento con bisulfito. Se usaron dos microlitros de ADN desaminado diluido en 3 μl de agua como molde en qPCR en tiempo real, aplicando el par de cebadores 239/237 para la amplificación de la cadena A del promotor/potenciador de CMV total y el par de cebadores 239/267 para la amplificación de la cadena A del promotor/potenciador de CMV metilado en la posición 425. Las muestras se sometieron a prueba por triplicado. Los moldes n.º 11 y n.º 62 se usaron como controles.

Se configuró la PCR y se realizó qPCR como se describe en el ejemplo 5. La temperatura de reasociación del cebador fue de 58 °C.

Para a) y b) la fracción del ADN promotor metilado en la posición 425 se calculó del siguiente modo:

$$mC = 1,7^{Cp(t)-Cp(m)} * 100 \quad (\text{Fórmula 7})$$

con

mC [%]: fracción de ADN metilado en la posición 425,

Cp(t): valor de Cp obtenido con el par de cebadores universales 239/237,

Cp(m): valor de Cp obtenido con el par de cebadores específicos de metilación 239/267.

Ambas configuraciones de ensayo proporcionaron resultados comparables. La desviación estándar dentro de los triplicados fue mayor sin preamplificación de la cadena A del promotor de CMV (figuras 8A y 8B). La metilación de la posición 425 del ácido nucleico promotor de CMV en las líneas celulares K18.1, G25-10, G25-17 y 43-16 A10 fue mayor que el fondo de desaminación incompleta, que se encontró que era aproximadamente de un 1 %. La metilación en la línea celular G42-5 fue inferior a o como máximo el nivel de fondo. Para la línea celular K18.1 se determinó la metilación más alta (más de un 60 %).

La configuración del ensayo a) se realizó con otros pares de cebadores universales y específicos de metilación. Para el cálculo de la fracción de ADN metilado en la posición 425, se asumió que la eficiencia de amplificación para todos los pares de cebadores es 2:

$$mC = 2^{Cp(t)-Cp(m)} * 100 \quad (\text{Fórmula 5'})$$

con

mC [%]: fracción de ADN metilado en la posición 425,

Cp(t): valor de Cp obtenido con el par de cebadores universales,

Cp(m): valor de Cp obtenido con el par de cebadores específicos de metilación.

La tabla 8 muestra un resumen de las combinaciones de pares de cebadores que se han sometido a prueba en moldes de ADN clonado o en ADN genómico con o sin preamplificación del ADN promotor de CMV.

**Tabla 8:** Combinaciones de pares de cebadores.

Combinación	universal	específico de posición 425
1	239+237	239+266
2	263+237	263+266
3	264+237	264+266
4	239+237	239+267
5	263+237	263+267
6	264+237	266+267

**Ejemplo 8**

**Metilación del promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano y predicción de la inestabilidad de producción de la línea celular CHO recombinante**

Las células CHO-K1 se transfectaron con un plásmido que codifica un anticuerpo IgG4 humano y se seleccionaron clones estables usando el sistema DHFR/MTX. Los clones parentales de alta producción se subclonaron mediante dilución limitante. El MTX se mantuvo en el medio de crecimiento durante el proceso completo de generación de líneas celulares. Se seleccionaron 16 subclones de 10 clones parentales.

Las células seleccionadas se volvieron a cultivar con MTX 250 nM. Tan pronto como mostraron un crecimiento estable, se sometió a prueba la estabilidad de producción a largo plazo a lo largo de 60 a 80 generaciones en presencia y en ausencia de MTX. Se calculó la alteración relativa de SPR a lo largo de 60 generaciones. La metilación de C425 se determinó al comienzo del estudio con células cultivadas con MTX y al final del estudio a partir de células que se habían cultivado sin MTX.

La metilación de C425 al inicio del estudio se representó frente a la alteración relativa de SPR en presencia (figura 11A) y en ausencia de MTX (figura 11B). La mayoría de los clones con menos de un 5 % de metilación en C425 se pueden encontrar en la fracción de clones estables (menos de un 40 % de disminución de SPR con o sin MTX), mientras que la mayoría de los clones con más de un 5 % de metilación en C425 se agrupan en la fracción de clones inestables. Esto fue independiente de si la metilación se correlacionaba con la estabilidad en presencia o en ausencia de MTX (véase también la tabla 9). La mayoría de los clones estables, que pierden menos de un 20 % de productividad con MTX y menos de un 30 % de productividad sin MTX, muestran menos de un 5 % de metilación en C425.

**Tabla 9:** Correlación de la metilación con la estabilidad en presencia o en ausencia de MTX (A) y número de copias del plásmido (B).

A - 16 clones	número de clones con metilación en C425 al inicio de menos de un 5 %	número de clones con metilación en C425 al inicio de más de un 5 %
SPR <sub>rel_Fin</sub> ≥ 60 % (cultivo en presencia de MTX)	8	3
SPR <sub>rel_Fin</sub> < 60 % (cultivo en presencia de MTX)	1	4
SPR <sub>rel_Fin</sub> ≥ 60 % (cultivo en ausencia de MTX)	6	2
SPR <sub>rel_Fin</sub> < 60 % (cultivo en ausencia de MTX)	3	5
B - 16 clones	número de copias del plásmido menor de 10	número de copias del plásmido igual o superior a 10
SPR <sub>rel_Fin</sub> > 60 % (cultivo en presencia de MTX)	7	4
SPR <sub>rel_Fin</sub> < 60 %	0	5

(cultivo en presencia de MTX)		
SPR <sub>rel_Fin</sub> > 60 % (cultivo en ausencia de MTX)	6	2
SPR <sub>rel_Fin</sub> < 60 % (cultivo en ausencia de MTX)	1	7

Este hallazgo muestra que la determinación de la metilación en C425 se puede usar como un marcador predictivo para determinar la estabilidad de la expresión polipeptídica en los clones celulares generados y, de ese modo, permitir la selección de clones estables con una productividad estable durante el desarrollo de la línea celular. Se ha encontrado que la metilación en C425 de un 5 % o menos es un criterio adecuado para la selección de clones de células estables.

Además, se ha encontrado que dos clones celulares estables intermedios, así como dos clones muy inestables que no estaban metilados al comienzo del estudio, aumentan por encima de un 5 % en la metilación durante las pruebas de estabilidad sin MTX (véase también la figura 12). Esto muestra que la fracción de clones celulares que se predice falsamente como estable (clones celulares negativos falsos) se puede reducir cultivándolos durante algún tiempo en ausencia de MTX antes de someterlos a prueba.

Para confirmar la metilación de C425 mediante un segundo procedimiento, se realizó una secuenciación con bisulfito con el clon 44-28 altamente metilado (figura 13). El grado de metilación en C425 se encontró que era de un 80 %. Esto fue coherente con el resultado de la PCR específica de metilación, considerando la variación de ambos ensayos. Al igual que con los clones K18.1 y 43-16 A10 (figura 4), C425 se metiló con mayor frecuencia entre todos los sitios CpG dentro del ADN promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano. Otros eventos de metilación se agruparon en el extremo 5' y el extremo 3'. El grado promedio de metilación en todos los sitios fue de un 18 %.

### **Ejemplo 9**

#### **La metilación temprana coincide con un alto número de copias del transgén**

Las copias integradas de los genes de la cadena ligera y pesada de inmunoglobulina al principio y al final de las pruebas de estabilidad se determinaron utilizando un ensayo de qPCR múltiple basado en el principio TaqMan. Se usaron dos conjuntos de cebadores que consisten en un cebador directo, un cebador inverso y una sonda de hidrólisis: uno específico para el gen de la cadena kappa humana y otro específico para los genes de la cadena pesada gamma humana. Para permitir la determinación de los números de copias absolutos, el plásmido de expresión linealizado, que se había usado para la transfección, se usó como patrón. Se aseguró igual eficiencia de amplificación de las muestras y el patrón.

Para qPCR se empleó el sistema LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y las muestras se prepararon usando el LightCycler® 480 Probes Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).

Una solución de molde de 5 µl que contenía 50 ng de ADN genómico se combinó con 15 µl de mezcla maestra de PCR en el pocillo de una placa de microvaloración de 96 pocillos. En el caso del patrón, la solución de molde contenía  $2,5 \times 10^7$ ,  $2,5 \times 10^6$ ,  $2,5 \times 10^5$ ,  $2,5 \times 10^4$  y  $2,5 \times 10^3$  copias del ADN plasmídico linealizado correspondiente.

La mezcla maestra de PCR de 15 µl comprendía:

- 10 µl de LightCycler® 480 Probes Master
- 1 µl de cebador directo n.º 133 (10 pmol/µl)
- 1 µl de cebador inverso n.º 132 (10 pmol/µl)
- 0,5 µl de sonda n.º 166 (10 pmol/µl)
- 1 µl de cebador directo n.º 178 (10 pmol/µl)
- 1 µl de cebador inverso n.º 180 (10 pmol/µl)
- 0,5 µl de sonda n.º 185 (10 pmol/µl)

La placa se selló con una lámina de sellado LightCycler® 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y se centrifugó a 1500 x g durante 2 minutos. Posteriormente, la placa se montó en el sistema LightCycler® 480 y se sometió a qPCR. Cada muestra se sometió a prueba por triplicado, los patrones se ejecutaron por cuadruplicado.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

	Etapa	N.º de ciclos	T [°C]	t	Tasa de aumento	Adquisición
				[min:s]	[°C s-1]	
desnaturalización		1	95	10:00	4,40	-
PCR en tiempo real	desnaturalización	45	95	00:10	4,40	-
	reasociación		60	00:05	2,20	-
	prolongación		72	00:01	4,40	único
enfriamiento		1	37	01:00	2,2	

5 La recogida y el análisis de los datos se realizaron usando el programa informático LightCycler® 480 versión 1.5. Básicamente, los valores medios de Cp de las diluciones de patrón plasmídico se representaron frente a los números de copias del gen respectivo para generar una curva patrón a partir de la que se extrapolaron los transgenes de la muestra.

10 El número de transgenes por célula se calculó asumiendo que el contenido promedio de ADN por célula es jgg:

$$N_c = N_s / 50000 * 6$$

N<sub>c</sub>: número de copias del transgén por célula

15

N<sub>s</sub>: número de copias del transgén en la muestra

**Tabla 10:** Secuencias del cebador.

N.º de cebador	Secuencias del cebador (5' -> 3')	SEQ ID NO:
133	TCACAGAGCAGGACAGCAAG	26
132	GACTTCGCAGGCGTAGACTT	27
166	(FAM)-AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC-(BHQ1)	28
178	CGAACCGGTGACGGTGT	29
180	GAGGGCACGGTCACCAC	30
185	(Cy5)-CACACCTTCCCGGCTGTCCTACAG-(BHQ3)	31

20

La figura 14 representa los números de copias del gen de la cadena ligera de células metiladas y no metiladas antes y después de las pruebas de estabilidad. No es sorprendente que se hayan encontrado números de copias idénticos en el gen de la cadena pesada porque las células se habían transfectado con un vector de gen doble que portaba ambos genes (datos no mostrados). La metilación temprana, es decir, la metilación antes de las pruebas de estabilidad, se encontró exclusivamente con células que portaban más de 10 copias del transgén, mientras que algunos clones con menos de 10 copias del transgén adquirieron metilación durante las pruebas de estabilidad. Como consecuencia, la selección de clones con bajos números de copias del transgén antes de las pruebas de estabilidad enriquece igualmente clones con una productividad estable (tabla 11).

25

30 **Tabla 11:** Correlación de las copias del transgén con la estabilidad en presencia o en ausencia de MTX.

16 clones	Copias de plásmido <10	Copias de plásmido ≥ 10
qP <sub>rel_Fin</sub> + MTX ≥ 60 %	7	4
qP <sub>rel_Fin</sub> + MTX < 60 %	0	5
qP <sub>rel_Fin</sub> - MTX ≥ 60 %	6	2
qP <sub>rel_Fin</sub> - MTX < 60 %	1	7

Además, se observa que la inestabilidad de producción no estaba asociada en general con una pérdida de copias del transgén. Los clones 1A5-05, 1A5-21, 1A5-24 y 2B1-02 perdieron copias del transgén, 2B-13 se mantuvo estable y 14-13, así como 14-23, tuvieron un aumento en las copias del gen (véase también la figura 11B).

35

**Ejemplo 10**

**Identificación de las presentes modificaciones de histonas cerca del ADN promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano mediante inmunoprecipitación de cromatina y PCR en tiempo real**

**Inmunoprecipitación de cromatina de líneas celulares CHO**

5 El fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano (SEQ ID NO: 01) usado para la expresión de cadena ligera y pesada del anticuerpo está cerca de las histonas compactadoras de ADN (cromatina) en líneas celulares productoras estables. Se medirá una acumulación de histonas modificadas cerca del fragmento  
10 promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano con el ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

Treinta y dos líneas celulares CHO (muestras H-1 a H-20 y T-1 a T-12, véase la tabla 3) se fijaron en formaldehído al 3,7 % durante 10 min, a temperatura ambiente. La fijación se detuvo en glicina al 10 % durante 5 min. Las células se lisaron durante 10 min sobre hielo en tampón de lisis celular, se centrifugaron a 5000 rpm, 4 min a 4 °C. Los  
15 sedimentos se resuspendieron en tampón de lisis nuclear y la cromatina se sonico hasta un tamaño de fragmento promedio de 200-500 pb con Branson Sonifier B15. Las concentraciones de fragmentos de cromatina se determinaron con el kit de ensayo de proteína BCA Pierce® (Thermo Scientific, Rockford, EE. UU.). Se añadieron 2,5 µg-100 µg de fragmentos de cromatina a 1,5 volúmenes de tampón de dilución IP que contenía 3 µl-12 µl de anticuerpo y se incubaron durante la noche a 4 °C mientras giraban con 25 rpm.

Las microesferas de agarosa de proteína A (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) se bloquearon en tampón de dilución IP con 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón (Invitrogen, Carlsbad, EE. UU.) y 5 mg/ml de BSA (seroalbúmina bovina, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) durante la noche a 4 °C. Los precipitados de anticuerpo-cromatina se purificaron mediante incubación en microesferas de agarosa bloqueadas durante 1 hora, seguido de incubación durante 5 min a 4 °C en tampón de dilución bajo en sal 2x, alto en sal 1x, de LiCl 1x y TE 1x cada uno. Los anticuerpos se eluyeron de las microesferas de agarosa con 200 µl de tampón de elución IP, durante 30 min. a 65 °C. Se añadieron 0,5 µl de ARNasa sin ADNasa (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) para digerir el ARN a 37 °C durante 30 minutos. Para la digestión de proteínas, se añadieron NaCl (concentración final 0,2 M) y proteinasa K (concentración final 100-200 µg/ml) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y la solución se incubó durante 1,5 horas a 65 °C. El ADN se recuperó con el kit de purificación de PCR Roche en 150 µl de H<sub>2</sub>O de calidad PCR (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).  
25  
30

**Tabla 12:** Tampón para la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

<p><b>Tampón de lisis celular CHIP</b> Tris-HCl 20 mM pH 8,0 KCl 85 mM NP40 al 0,5 % (octilfenolpolietoxietanol) agua destilada dos veces</p>	<p><b>Tampón de lavado de LiCl</b> LiCl 0,25 M (<i>Villagra et al. CHIP</i>) NP40 al 1 % desoxicolato al 1 % (<i>ácido desoxicólico</i>) EDTA 1 mM</p>
<p><b>Tampón de lisis nuclear</b> Tris-HCl 50 mM pH 8,0 EDTA 10 mM pH 8,0 SDS al 1 % agua destilada dos veces 1 comprimido de Roche Complete por 10 ml</p>	<p>Tris 20 mM, pH 8,0 agua destilada dos veces</p>
<p><b>Tampón de lavado bajo en sal</b> SDS al 0,1 % Triton X 100 al 1 % EDTA 2 mM Tris-Cl 20 mM, pH 8,0 NaCl 150 mM agua destilada dos veces</p>	<p><b>Tampón TE</b> Tris-HCl 10 mM pH 8,0 EDTA 1 mM</p>
	<p><b>Tampón de elución (IP)</b> NaHCO<sub>3</sub> 50 mM SDS al 1 % agua destilada dos veces</p>
	<p><b>Tampón de dilución IP</b> Triton X 100 al 1,1 % EDTA 1,2 mM Tris-HCl 16,7 mM pH 8,1 (8,0)</p>

35



**Tampón de lavado alto en sal**

SDS al 0,1 %  
 Triton X 100 al 1 %  
 EDTA 2 mM  
 Tris-Cl 20 mM, pH 8,0  
 NaCl 500 mM  
 NaCl 167 mM  
 H<sub>2</sub>O

**Tabla 13:** Anticuerpos específicos para histonas o modificaciones de histonas.

Diana	Nombre	Empresa	Grado ChIP	hospedador	N.º de ref. lote
H3K4me3	ChIPAb + trimetilhistona H3 (Lys4)	Millipore	v	conejo monoclonal	17-614 ng1848343
H3K27me3	ChIPAb + trimetilhistona H3 (Lys27)	Millipore	v	conejo policlonal	17-622 dam1850974
H3K9me3	Anticuerpo antihistona H3 (trimetil K9)	Abcam	v	conejo policlonal	ab8898 gr58934-1
H3	Anticuerpo antihistona H3	Abcam	v	conejo policlonal	ab1791 GR103799
H3ac	Antiacetilhistona H3	Millipore	v	conejo policlonal	06-599 2068182
Diana	Nombre	Empresa	Grado ChIP	hospedador	N.º de ref. lote
H3K4me3	Anticuerpo contra histona H3K4me3 (pAb)	Activemotif	√	conejo policlonal	39915 + 14013006
H3ac	Anticuerpo antiacetilhistona H3	Millipore	√	conejo policlonal	06-599 2153150
H3K9me3	ChIPAb + trimetilhistona H3 (Lys9)	Millipore	v	policlonal	17-625 2190636
H3K27me3	ChIPAb + trimetilhistona H3 (Lys27)	Millipore	v	conejo policlonal	17-622 2034145
H3	Anticuerpo antihistona H3	Abcam	√	conejo policlonal	Ab1791 GR135321

5

**PCR cuantitativa en tiempo real de ADN ChIP**

La PCR cuantitativa en tiempo real se usó para detectar una acumulación de modificaciones de histonas específicas en el fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano (SEQ ID NO: 01) en las líneas celulares CHO midiendo la cantidad relativa del fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano por inmunoprecipitación de cromatina.

10

El ADN genómico de la muestra de entrada no tratada (IS) y los fragmentos de cromatina purificados con anticuerpo se amplificaron con PCR cuantitativa en tiempo real usando LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) usando el sistema LightCycler 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Para cuantificar la cantidad de fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano (SEQ ID NO: 01) se usó un cebador específico para los posibles genes de referencia y para el fragmento promotor/potenciador temprano inmediato de CMV humano.

15

**Tabla 14:** Secuencias del cebador para PCR cuantitativa en tiempo real.

SEQ ID NO:	N.º de cebador:	Diana	Secuencia
32	396	MIE de hCMV directo 1	TACATCAATGGGCGTGGATA
33	397	MIE de hCMV inverso 1	AAGTCCCGTTGATTTTGGTG
34	386	Gusb directo 1	CAGGGTGGGATGCTCTTC
35	387	Gusb inverso 1	GCCGGTTTTCCGAGAAGT

36	431	Eif3i directo 1	GTTCCCGGCACTGACACT
37	432	Eif3i inverso 2	ACTTGATCTGCGTGATGGAC
38	484	Fox2a directo 1	ATCACCCGTA CTGCTGCTCT
39	485	Fox2a inverso	GAGGCTTCTGGGGATCTCTT
40	468	Gata5 directo 1	CACCTACCCCATCCTGTCTG
41	469	Gata5 inverso 1	GAGGAGGTGAAGGCCAAAGTCT
42	388	Rho directo 1	AGCCTCGGTCTCTATTGACG
43	389	Rho inverso 1	CGTTGGAGAAGGGCACATAA

5 Se mezclaron 2,5 µl de fragmentos de ADN eluido, 1 µl (10 pmol/µl) de cebador directo 396 (SEQ ID NO: 32) y 1 µl (10 pmol/µl) de cebador inverso 397 (SEQ ID NO: 33) para el fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano (SEQ ID NO: 01), 5 µl de LightCycler 480 SYBR Green I Master y agua sin nucleasa, hasta un volumen total de 10 µl. Los genes de referencia se cuantificaron en la misma placa. La mezcla se aplicó a una placa de 384 pocillos (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).

10 La placa se selló con una lámina de sellado LightCycler® 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y se centrifugó a 1200 x g durante 3 minutos. Posteriormente, la placa se montó en el sistema LightCycler® 480 y se sometió a qPCR en tiempo real. Cada muestra se sometió a prueba por triplicado.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

	Etapas	N.º de ciclos	T [°C]	t [min:s]	Tasa de aumento [°C s-1]	Adquisición
desnaturalización		1	95	15:00	4,40	-
PCR en tiempo real	desnaturalización	45	95	00:15	4,40	-
	reasociación		60	00:10	2,20	único
	prolongación		72	00:15	4,40	-
curva de fusión	desnaturalización	1	95	00:05	4,40	-
	reasociación		60	01:00	2,20	-
	fusión		90	00:00	0,11	continuo
enfriamiento		1	40	00:30	2,2	

15 La recogida y el análisis de los datos se hicieron con el programa informático LightCycler® 480 versión 1.5.

### Ejemplo 11

20 **Cuantificación relativa del fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano en modificaciones de histonas en PCR en tiempo real**

#### Estabilidad de genes de referencia

25 En este ejemplo, la estabilidad de los posibles genes de referencia para modificaciones de histonas específicas se calculó con el programa "Normfinder". El modelo y el marco estadístico subyacente a "NormFinder" se describen en Andersen, C.L., et al. Cancer Res. 64 (2004) 5245-5250.

30 El "complemento de NormFinder" para Excel proporciona el valor de estabilidad para cada gen, que es una medida directa de la variación de expresión estimada. El gen con el valor de estabilidad más pequeño es el gen más estable. Se supone que los datos de entrada están en una escala lineal, por tanto, se usó el Procedimiento de Entrada Porcentual para linealizar las cantidades de expresión de escala usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de muestra de entrada} = 100 * 2^{\Delta Cq(\text{muestra de entrada} - \text{muestra ChIP})} \quad (\text{Fórmula 9})$$

35 Cinco genes (véase la tabla 15) se sometieron a prueba con "Normfinder". Veinte muestras (H-1 a H20) en tres réplicas biológicas se investigaron para determinar la estabilidad de la acetilación de la histona 3, la metilación triple de la lisina 4 de la histona 3 y la histona 3 cerca del fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano y los genes de referencia.

**Tabla 15:** Valores de estabilidad de posibles genes de referencia y el fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano.

% de H3ac de la muestra de entrada		% de H3 de la muestra de entrada		% de H3K4me3 de la muestra de entrada	
Nombre del gen	Valor de estabilidad	Nombre del gen	Valor de estabilidad	Nombre del gen	Valor de estabilidad
MIE de hCMV	10,729	MIE de hCMV	0,571	MIE de hCMV	5,399
Eif3i	0,160	Eif3i	0,138	Eif3i	1,792
Fox2a	0,491	Fox2a	0,181	Fox2a	1,711
Gata5	0,481	Gata5	0,141	<b>Gusb</b>	<b>1,680</b>
<b>Gusb</b>	<b>0,093</b>	<b>Gusb</b>	<b>0,136</b>		

5 El gen de referencia Gusb es más estable en las condiciones de ChIP elegidas que los otros controles. Gusb se usó como gen de referencia para la normalización de la acetilación de la histona 3, la metilación triple de la lisina 4 de la histona 3 y los niveles de histona 3.

10 **Estimación de la eficiencia de amplificación de pares de cebadores con el programa informático LinRegPCR**

15 En este ejemplo, la eficiencia de amplificación del par de cebadores 396/397 para el fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano y del par de cebadores 386/387 para el gen de referencia Gusb se estimó con el programa informático LinRegPCR (<http://www.hartfaalcentrum.nl>) para las muestras H-1 a H20. El programa determina la fluorescencia inicial y realiza una sustracción de la medida inicial. Luego se establece una ventana de linealidad y se calculan las eficiencias de PCR por muestra (véase Ramakers, et al., NeuroSci Lett. 2003; Ruijter et al., Nucleic Acids Research 2009).

$$E_f = 10^{\text{pendiente}} \quad (\text{Fórmula 11})$$

20 La eficiencia de la PCR individual ( $E_f$ ) se deduce de la pendiente de la línea de regresión lineal y se define un aumento factorial por ciclo. Puede variar entre 1 y 2. Una eficiencia de 2 representa una duplicación perfecta del amplicón en cada ciclo.

25 **Tabla 16:** Eficiencia de amplificación del par de cebadores de Gusb de referencia y del par de cebadores de MIE de hCMV diana.

Eficiencia de amplificación:		
Par de cebadores	Eficiencia media	DE
MIE de hCMV 396/7	1,911	0,0068
Gusb 386/7	1,930	0,0068

30 Los pares de cebadores 396/397 y 386/387 produjeron eficiencias de amplificación estables y comparables con 20 muestras y 3 réplicas biológicas independientemente de si las muestras de entrada de ChIP se midieron o el ADN se precipitó con anticuerpos contra histona 3, histona 3 acetilada o metilación triple de la lisina 4 de la histona 3. Se usaron los pares de cebadores 396/397 y 386/387 para la cuantificación relativa de la acetilación de la histona 3, la metilación triple de la lisina 4 de la histona 3 y los niveles de histona 3 cerca del fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano con relación a la histona 3 y los niveles de modificación de histona 3 cerca del gen de referencia Gusb.

35 **Procedimiento de delta delta Cq para la cuantificación relativa de la modificación de histonas en relación con el nivel de histona**

40 La cuantificación relativa de la acetilación de la histona 3, la metilación triple de la lisina 4 de la histona 3 y los niveles de histona 3 cerca del fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano se estimaron con el procedimiento de Livak, también conocido como procedimiento de delta delta Cq ( $\Delta\Delta Cq$ ).

45 El procedimiento se puede usar para la cuantificación relativa de una diana con respecto a una referencia. En este ejemplo, la cuantificación relativa de la acetilación de la histona 3, la metilación triple de la lisina 4 de la histona 3 y los niveles de histona 3 cerca del fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano se normalizaron a la modificación de histona 3 y los niveles de histona 3 cerca del gen de referencia Gusb en dos etapas.

El primer delta Cq se calculó de la siguiente manera:

$$\Delta Cq = \text{muestra de entrada} - \text{muestra} \quad (\text{Fórmula 12})$$

5 Delta Cq ( $\Delta Cq$ ) es la diferencia entre los ciclos de cuantificación (Cq) de la condición no tratada (muestra de entrada) y tratada (muestra CHIP) de la misma muestra, amplificadas con el mismo par de cebadores. La delta Cq se usa para representar un valor relativo a la condición no tratada dentro de la misma muestra. Para comparar diferentes muestras, se usó el procedimiento de delta delta Cq.

$$10 \quad \Delta\Delta Cq \rightarrow \text{proporción} = \frac{2^{\Delta Cq_{\text{MIE}}(\text{control}-\text{muestra})}}{2^{\Delta Cq_{\text{Gusb}}(\text{control}-\text{muestra})}} \quad (\text{Fórmula 13})$$

En este ejemplo, delta delta Cq es la diferencia entre delta Cq del MIE de hCMV diana y delta Cq del Gusb de referencia para todas las muestras H-1 a H-20. Las cantidades relativas de ADN determinadas usando valores de delta delta Cq se pueden comparar entre muestras.

15 Finalmente, se normalizaron los niveles de acetilación de la histona 3 y metilación triple de la lisina 4 de la histona 3 al nivel de histona 3 para las 20 líneas celulares CHO H-1 a H-20 en tres réplicas biológicas. Los resultados con la desviación estándar se presentan en las figuras 15 y 16.

20 **Ejemplo 12**

**La acetilación de la histona 3 y la metilación triple de la lisina 4 de la histona 3 cerca del fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano, así como la metilación de C425 del fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano se correlacionan con estabilidad a largo plazo**

La acetilación relativa y los niveles de metilación triple de la lisina 4 en relación con el nivel de histona 3 (H3ac/H3 y H3K4me3/H3) cerca del fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano, así como el porcentaje de metilación de C425 del fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano (mC-425[%]), se investigaron en un modelo de ajuste con el carácter de "mínimos cuadrados estándar" y el "modelo de influencia del efecto" para detectar efectos que influyan en la estabilidad a largo plazo de las líneas celulares productoras H-1 a H-20. Para el cálculo se usó el programa informático JMP versión 10 (SAS, Boeblingen, Alemania).

35 Los valores de modificación de histonas y el porcentaje de metilación de C-425 de las muestras H-1 a H-20 se alimentaron como un efecto en el modelo de forma individual. La alteración porcentual de la tasa de producción específica (delta SPR) después de 60 generaciones se alimentó como respuesta. Los gráficos de influencia resultantes se presentan en las figuras 17 a 19. El número de parámetros asociados con el efecto (Nparm) y los grados de libertad son 1.

40 RSquare (RSq) estima la proporción de variación en la respuesta que se puede atribuir al modelo en lugar de a un error aleatorio. Un  $R^2$  más cercano a 1 indica un mejor ajuste. Un  $R^2$  más cercano a 0 indica que el ajuste no predice la respuesta mejor que la media de respuesta general. El error de la media cuadrática (RMSE) estima la desviación estándar del error aleatorio. Es la raíz cuadrada de la media cuadrática del error en el informe Análisis de varianza. Prob>F enumera el valor p para la prueba de efecto, que informa sobre la significación de un efecto.

**Tabla 17:** Valores p de los efectos alimentados H3K4me3/H3 y H3ac/H3 calculados en la prueba de efecto. Calculado en tres réplicas biológicas para muestras H.

Prob>F muestra el valor p para la prueba de efecto		
Efecto	Condición de selección	
	Con MSX	Sin MSX
H3K4me3/H3	0,0102 *	0,889
H3ac/H3	<0,0001 *	0,1449
mC-425 [%]	0,0898	0,0041 *
* los valores de 0,05 o menos se consideraron evidencia de un efecto significativo en el modelo.		

50 La tabla 17 muestra la significación de mC-425 [%] en condiciones (-) MTX. El efecto de H3ac/H3 y H3K4-me3/H3 es significativo en la condición (+) MSX.

55 Los valores reales de delta SPR se representaron frente a los valores previstos en los gráficos de influencia, respecto al efecto y la condición de selección a lo largo de 60 generaciones (figura 17-19). Este gráfico de lo real

frente a lo previsto muestra lo bien que se ajusta el modelo a los datos. Los valores p más bajos se detectaron para el efecto H3ac/H3 con el agente de selección (figura 18) seguido del efecto mC-425 [%] sin el agente de selección (figura 19).

5 **Análisis de valores atípicos que compara las condiciones con y sin agente de selección MSX para valores de delta SPR de las muestras H-1 a H-20**

10 Los gráficas de influencia de la condición sin agente de selección ((-) MSX) tienen valores notablemente aberrantes para delta SPR en la muestra H-18. Por lo tanto, se realizó un análisis de valores atípicos que muestra las distancias de Jackknife (figura 20).

15 Esto verifica que el aumento de delta SPR en la muestra H-18 bajo la condición (-) MSX es anómalo en comparación con todas las demás muestras. Por lo tanto, los análisis de influencia se repitieron sin muestra H-18. Los valores p calculados de la prueba de efecto para 19 muestras H-1 a H-17 y H-19 a H-20 se muestran en la tabla 18.

**Tabla 18:** Valores p de los efectos alimentados H3K4me3/H3 y H3ac/H3 calculados en la prueba de efecto. Valores p calculados de 19 muestras (H-1 a H-17, H-19, H-20) en tres réplicas biológicas.

Prob>F muestra el valor p para la prueba de efecto		
Efecto	Condición de selección	
	Con MSX	Sin MSX
H3K4me3/H3	0,0136 *	0,3464
H3ac/H3	<0,0001 *	0,0001 *
mC-435 [%]	0,1171	0,0908
* Los valores de 0,05 o menos se consideraron evidencia de un efecto significativo en el modelo.		

20 La tabla 18 muestra la alta significación de H3ac/H3 en ambas condiciones de selección. El efecto de H3K4-me3/H3 es significativo en la condición (+) MSX.

25 Los valores reales de delta SPR se representaron frente a los valores previstos en los gráficos de influencia, respecto al efecto y la condición de selección a lo largo de 60 generaciones (figura 20-22). Los gráficos de lo real frente a lo previsto muestran lo bien que se ajusta el modelo a los datos. El mejor ajuste se observó para el efecto H3ac/H3 (figura 21).

**Ejemplo 13**

30 **Predicción de la inestabilidad de producción en líneas celulares CHO recombinantes usando modificaciones de histonas cerca del promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano y la metilación de C425 del fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano como marcador.**

35 **Media de SPR delta aumentada de muestras del proyecto H rechazando las líneas celulares productoras defectuosas con configuraciones de filtro**

Como se reseña en el ejemplo 12, los valores de la muestra H-18 se excluyeron de investigaciones adicionales para establecer el marcador de predicción.

40 Se investigaron los niveles de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 cerca del fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano y el porcentaje de metilación de C-425 del fragmento del promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano como marcadores de predicción para la estabilidad de producción con y sin agente de selección.

45 Como se describe en Osterlehner et al. el filtro para los valores de mC-425 [%] se estableció en un 5 %. Los valores superiores a un 5 % se rechazaron para aumentar la media de SPR delta de las muestras restantes.

50 Para los valores de H3ac/H3 de las muestras H-1 a H-17, H-19 y H-20, se calculó un árbol de decisión con el programa informático jmp. El mejor nodo dividido y, por lo tanto, el mejor filtro se calculó con la estadística de LogWorth. El LogWorth se calcula como:

$$-\log_{10}(\text{valor } p) \quad (\text{Fórmula 14})$$

55 en el que el valor p ajustado se calcula de una manera compleja que tiene en cuenta el número de formas diferentes en que se pueden producir las divisiones. Este cálculo es muy justo en comparación con el valor p no ajustado, que favorece a las X con muchos niveles, y el valor p de Bonferroni, que favorece a las X con un número pequeño de

niveles (informe: "Monte Carlo Calibration of Distributions of Partition Statistics").

5 La mejor división en la condición (+) MSX para las muestras H-1 a H-17, H-19 y H-20 fue 0,58 de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 (H3ac/H3). Para reducir el número de muestras falsas negativas, el filtro se ajustó al valor más bajo de  $A > 0,5 \text{ H3ac/H3}$ .

10 Ambos filtros se usaron por separado y en combinación. Las medias de delta SPR en condiciones con o sin el agente de selección MSX se calcularon para cada ventana de adquisición positiva y se compararon con la media no filtrada (tabla 19).

**Tabla 19:** Medias calculadas de delta SPR con y sin agente de selección y en condiciones de filtro  $A > 0,5 \text{ H3ac/H3}$  y  $B < 5 \% \text{ mC-425 } [\%] \text{ PSP}$ . Los valores se calcularon para las muestras H-1 a H-17, H-19 y H-20 en referencia a las configuraciones del filtro.

	n	Media de $\Delta\text{SPR}$ (+) MSX	Media de $\Delta\text{SPR}$ (-) MSX
sin filtrar	56	-0,39	-0,55
$A > 0,5 \text{ H3ac/H3}$	23 (41 %)	-0,15	-0,38
$B < 5 \% \text{ mC-425 } [\%] \text{ PSB}$	27 (48 %)	-0,24	-0,45
Filtro combinado ( $B \cap A$ )	20 (36 %)	-0,13	-0,36

15 Cada filtro puede aumentar la media de delta SPR en comparación con la condición sin filtrar. La intersección de los filtros A y B aumenta la media de delta SPR del filtro  $A > 0,5 \text{ H3ac/H3}$ . Para la visualización de los valores de delta SPR alterados, los histogramas de cada condición y filtro se presentan en la figura 23.

20 Las configuraciones de filtro establecidas del proyecto H se adoptaron para el proyecto T para confirmar efectos positivos

25 También se analizaron doce líneas celulares (T-1 a T-12) con configuraciones de filtro como se determina anteriormente (véase la tabla 20). Para la visualización de los valores de delta SPR alterados, los histogramas de cada condición y filtro se presentan en la figura 25.

**Tabla 20:** Medias calculadas de delta SPR con y sin agente de selección. Los valores se calcularon para 12 muestras T-1 a T-12 en referencia a las configuraciones del filtro.

	n	Media de $\Delta\text{SPR}$ (+) MTX	Media de $\Delta\text{SPR}$ (-) MTX
sin filtrar	36	-0,29	-0,41
$A > 0,5 \text{ H3ac/H3}$	7 (19 %)	-0,19	-0,32
$B < 5 \% \text{ mC-425 } [\%] \text{ PSB}$	24 (67 %)	-0,28	-0,43
Filtro combinado ( $B \cap A$ )	7 (19 %)	-0,19	-0,32

30 Aumento observado de la media de delta SPR en comparación con las muestras filtradas y no filtradas en condición (-) MTX.

35 El uso de la configuración del filtro de  $A > 0,5 \text{ H3ac/H3}$  da como resultado un aumento de la media de SPR delta en comparación con los datos sin filtrar.

Esto muestra que la acetilación de la histona 3 en relación con el nivel de histona 3 cerca del fragmento promotor/potenciador temprano inmediato principal de CMV humano es un marcador de predicción valioso.

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> F. Hoffmann-La Roche AG Ludwigs-Maximilians Universitaet München	
	<120> Procedimiento para la selección de una célula productora a largo plazo usando acilación de histonas como marcadores	
10	<130> P32137-WO	
	<150> EP14168896.0	
	<151> 19/05/2014	
15	<160> 53	
	<170> PatentIn versión 3.5	
20	<210> 1	
	<211> 603	
	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 1	
	atggttgacat tgattattga ctagttatta atagtaatca attacggggt cattagttca	60
	tagcccatat atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccgct ctggctgacc	120
	gcccacacgac ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat	180
	agggactttc cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgcc acttggcagt	240
	acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaattggcc	300
	cgctggcat tatgcccagt acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta	360
	cgtattagtc atcgctatta gcatggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg	420
	atagcggttt gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt	480
	gttttggcac caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac	540
	gcaaattgggc ggtaggcgtg tacggtggga ggtctatata agcagagctc cgtttagtga	600
25	acg	603
	<210> 2	
	<211> 603	
	<212> ADN	
30	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 2	
	atggttgatat tgattattga ttagttatta atagtaatta attacggggt tattagttta	60
	tagtttatat atggagtttc gcgttatata atttacggta aatggttcgt ttggttgatc	120
	gtttaacgat tttcgtttat tgacgttaat aatgacgtat gtttttatag taacgttaat	180
	agggattttt tattgacgtt aatgggtgga gtatttacgg taaattgttt atttggtagt	240
	atattaagtg tattatatgt taagtacgtt ttttattgac gttaatgacg gtaaattggtt	300
	cgtttgggat tatgtttagt atatgatttt atgggatttt tttatttggg agtatattta	360

ES 2 708 830 T3

cgtattagtt atcgttatta gtatggtgat gcggttttgg tagtatatta atgggcgtgg 420  
 atagcggttt gatttacggg gatttttaag tttttatfff attgacgtta atgggagttt 480  
 gttttggtat taaaattaac gggatttttt aaaatgtcgt aataatttcg ttttattgac 540  
 gtaaaggggc ggtaggcgtg tacggtggga ggtttatata agtagagttt cgtttagtga 600  
 acg 603

5 <210> 3  
 <211> 603  
 <212> ADN  
 <213> Citomegalovirus humano

<400> 3  
 atggtgatat tgattattga ttagttatta atagtaatta attatggggg tattagttta 60  
 tagtttatat atggagtttt gtgttatata atttatggta aatggtttgt ttggttgatt 120  
 gtttaatgat ttttgtttat tgatgttaat aatgatgat gtttttatag taatgttaat 180  
 agggattttt tattgatggt aatgggtgga gtatttatgg taaattgttt atttggtagt 240  
 atattaagtg tattatatgt taagtatggt ttttattgat gttaatgatg gtaaaggtt 300  
 tgtttggtat tatgtttagt atatgatttt atgggatttt tttatttggg agtatattta 360  
 tgtattagtt attgttatta gtatggtgat gtggttttgg tagtatatta atgggtgtgg 420  
 atagtggttt gatttatggg gatttttaag tttttatfff attgatgtta atgggagttt 480  
 gttttggtat taaaattaat gggatttttt aaaatgttgt aataattttg ttttattgat 540  
 gtaaagggg ggtaggtgtg tatggtggga ggtttatata agtagagttt tgtttagtga 600  
 atg 603

10 <210> 4  
 <211> 603  
 <212> ADN  
 <213> Citomegalovirus humano

15 <400> 4  
 cgtttattaa acggagtttt gtttatatag attttttattc gtatacgttt atcgtttatt 60  
 tgcgttaatg gggcggagtt gttacgatat tttggaaagt ttcggtgatt ttggtgtaa 120  
 aataaatttt tattgacgtt aatgggtgga agatttgga aatttcgtga gttaaatcgt 180  
 tatttacgtt tattgatgta ttgttaaaat cgtattatta tgttaatagc gatgattaat 240  
 acgtagatgt attgttaagt aggaaagttt tataaggta tgtattgggt ataagtttag 300  
 gcgggttatt tatcgttatt gacgttaata gggggcgtat ttggtatatg atatatttga 360  
 tgtattgta agtgggtagt ttatcgtaaa tttttatfff attgacgtta atggaaagtt 420  
 tttattggcg ttattatggg aatatacgtt attattgacg ttaatgggcg ggggtcgttg 480



ES 2 708 830 T3

	ggcggtagt taggcgggtt atttatcgta agttatgtaa cgcggaattt tataatggtg	540
	ttatgaatta atgatttcgt aattgattat tattaataat tagttaataa ttaatgttaa	600
	tat	603
	<210> 5	
	<211> 603	
5	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 5	
	tgtttattaa atggagtttt gtttatatag attttttatt gtatatgttt attgtttatt	60
	tgtgttaatg gggaggagt gttatgatat tttggaaagt tttgttgatt ttgggtgtaa	120
	aataaatttt tattgatggt aatgggggtgg agatttggaa atttttgtga gttaaattgt	180
	tatttatggt tattgatgta ttgttaaaat tgtattatta tgtaaatagt gatgattaat	240
	atgtagatgt attgttaagt aggaaagttt tataaggta tgtattgggt ataattgtag	300
	gtgggttatt tattgttatt gatgttaata ggggggtgat ttggtatatg atatatttga	360
	tgtattgta agtgggtagt ttattgtaa tattttattt attgatgta atggaaagtt	420
	ttattgggtg ttattatggg aatatatggt attattgatg ttaatgggtg ggggttgggtg	480
	gggtggttagt taggtgggtt atttattgta agttatgtaa tgtggaattt tataatggtg	540
	ttatgaatta atgattttgt aattgattat tattaataat tagttaataa ttaatgttaa	600
	tat	603
10	<210> 6	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador 227	
	<400> 6	
20	atggtgatat tgattattga ttag	24
	<210> 7	
	<211> 24	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador 228	
30	<400> 7	
	tatgggattt ttttatttgg tagt	24
	<210> 8	
	<211> 24	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

	<223> Cebador 229	
	<400> 8	
5	<b>actcctctcc caaaactaaa tcta</b>	<b>24</b>
	<210> 9	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador 237	
	<400> 9	
15	<b>ccaaaacaaa ctoccattaa c</b>	<b>21</b>
	<210> 10	
	<211> 24	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador 238	
25	<400> 10	
	<b>ggggttatta gtttatagtt tata</b>	<b>24</b>
	<210> 11	
	<211> 28	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador 239	
35	<400> 11	
	<b>tgggtattatg tttagtatat gattttat</b>	<b>28</b>
	<210> 12	
40	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Cebador 240	
	<400> 12	
	<b>ggattttttt atttgtagt atatt</b>	<b>25</b>
50	<210> 13	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador 254	
	<400> 13	
60	<b>aaatccccgt aaatcaaacc g</b>	<b>21</b>
	<210> 14	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	

	<223> Cebador 263	
	<400> 14	
5	<b>gggatttttt tatttggtag tatatt</b>	26
	<210> 15	
	<211> 25	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador 264	
	<400> 15	
15	<b>tatgggattt ttttatttgg tagta</b>	25
	<210> 16	
	<211> 19	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador 265	
25	<400> 16	
	<b>atccccgtaa atcaaaccg</b>	19
	<210> 17	
	<211> 18	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador 266	
35	<400> 17	
	<b>tccccgtaaa tcaaaccg</b>	18
	<210> 18	
40	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Cebador 267	
	<400> 18	
	<b>ccccgtaaat caaaccg</b>	17
50	<210> 19	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador 268	
	<400> 19	
60	<b>cccgtaaatc aaaccgc</b>	17
	<210> 20	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	

ES 2 708 830 T3

	<223>	Cebador 262	
	<400>	20	
5		aaatccccrt aaatcaaacc g	21
	<210>	21	
	<211>	628	
	<212>	ADN	
10	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Molde n.º 11	
	<400>	21	
		atgttgatat tgattattga ttagttatta atagtaatta attatgggggt tattagttta	60
		tagttcatat atggagtttt gtggtatata atttatggta aatggtttgt ttggttgatt	120
		gtttaatgat ttttgtttat tgatgttaat aatgatgat gtttttatag taatgttaat	180
		agggattttt tattgatggt aatgggtgga gtatttatgg taaattggtt atttggtagt	240
		atattaagtg tattatatgt taagtatggt ttttattgat gttaatgatg gtaaaggtt	300
		tgtttggtat tatgtttagt atatgatttt atgggatttt tttatttggt agtatattta	360
15		tgtattagtt attgttatta gtatggtgat gtggttttgg tagtatatta atgggtgtgg	420
		atagtggttt gatttatggg gatttttaag tttttatttt attgatgta atgggagttt	480
		gttttggtat taaaattaat gggatttttt aaaatggtt aataattttg ttttattgat	540
		gtaaaggtt gtaggtgtg tatggtggga ggtttatata agtagagttt tgtttagtga	600
		atgtagatt tagttttggg agaggagt	628
	<210>	22	
20	<211>	629	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
25	<223>	Molde n.º 62	
	<400>	22	
		atgttgatat tgattattga ttagttatta atagtaatta attatgggggt tattagttta	60
		tagtтыatat atggagttty gygttatata atttatgrta aatggtttgt ttggttgatt	120
		gtttaatgat ttttgtttat tgatgttaat aatgatgat gtttttatag taatgttaat	180
		agggattttt tattgatggt aatgggtgga gtatttatgg taaaytggtt atttggtagt	240
		atattaagtg tattatatgt taagtatggt ttttattgat gttaatgatg gtaaaggtt	300
		tgtttggtat tatgtttagt atatgatttt atgggatttt tttatttggt agtatattta	360
		ygtattagtt atygttatta gtatggtgat gtggttttgg tagtatatta atgggcgtgg	420
		atagcggttt gatttacggg gatttttaag tttttatttt attgatgta atgggagttt	480

ES 2 708 830 T3

gttttggtat taaaattaat gggatTTTTT aaaatgTtGt aataaTTTTg ttttattgat 540  
 gtaaattgggt ggtaggtgtg tacggtggga ggtttatata agtagagttt cgttttagtga 600  
 atcgtttagat ttagttttgg gagaggagt 629

5 <210> 23  
 <211> 629  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Molde n.º 01

<400> 23  
 atgTtgatAt tgattattga ttagttatta atagtaatta attatggggT tattagttta 60  
 tagtttatAt atggagtttt gtgTtatata atttatggta aatggTttgt ttggTtgatt 120  
 gtttaAtgat ttttgTttat tgatgttaAt aatgatgtat gtttttatag taatgttaAt 180  
 agggatTTTT tattgatgtt aatgggtgga gtatttatgg taaattgTtt atttggcagt 240  
 atattaagtG tattatatgt taagtatgtt ttttattgat gTtaAtgatG gtaaattggTt 300  
 cgtttggTat tatgttttagt atAtgatttt atgggatttt tttatttggT agtatattta 360  
 tgtattagtt attgttatta gtatggTgat gtggTtttgg tagtatatta atgggtgtgg 420  
 atagcggTtt gatttatggg gatttttaag tttttatttt attgatgtta atgggagttt 480  
 gttttggTat taaaattaat gggatTTTTT aaaatgTtGt aataaTTTTg ttttattgat 540  
 gtaaattgggt ggtaggtgtg tacggtggga ggtttatata agtagagttt tgTtttagtga 600  
 attgttagat ttagttttgg gagaggagt 629

15 <210> 24  
 <211> 629  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Molde n.º 04

<400> 24  
 atgTtgatAt tgattattga ttagttatta atagtaatta attatggggT tattagttta 60  
 tagtttatAt atggagtttt gtgTtatata atttatggta aatggTttgt ttggTtgatt 120  
 gtttaAtgat ttttgTttat tgatgttaAt aatgatgtat gtttttatag taatgttaAt 180  
 agggatTTTT tattgatgtt aatgggtgga gtatttatgg taaattgTtt atttggtagt 240  
 atattaagtG tattatatgt taagtatgtt ttttattgat gTtaAtgatG gtaaattggTt 300  
 tgTttggTat tatgttttagt atAtgatttt atgggatttt tttatttggT agtatattta 360  
 tgtattagtt attgttatta gtatggTgat gtggTtttgg tagtatatta atgggtgtgg 420

ES 2 708 830 T3

	atagtggttt gatttacggg gatttttaag tttttatttt attgatgtta atgggagttt	480
	gttttggtat taaaattaat gggatttttt aaaatgttgt aataattttg ttttattgat	540
	gtaaaggggt ggtaggtgtg tacgggtggga ggtttatata agtagagttt tgtttagtga	600
	attgtttagat ttagtttttg gagaggagt	629
	<210> 25	
	<211> 629	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Molde n.º 16	
10	<400> 25	
	atgttgatat tgattattga ttagttatta atagtaatta attatgggggt tattagttta	60
	tagtttatat atggagtttt gtgttatata atttacggta aatggtttgt ttggttgatc	120
	gtttaacgat tttcgtttat tgatgttaat aatgacgtat gtttttatag taatgttaat	180
	agggattttt tattgatggt aatgggtgga gtatttacgg taaattgttt atttggtagt	240
	atattaagtg tatttatatgt taagtatggt ttttattgat gttaatgatg gtaaaggtt	300
	tgtttggtat tatgtttagt atatgatttt atgggacttt cttatttggt agtatattta	360
	cgtattagtt atcgttatta gtatggtgat gtggtttttg tagtatatta atgggcgtgg	420
	atagcggttt gatttacggg gatttttaag tttttatttt attgatgtta atgggagttt	480
	gttttggtat taaaattaat gggatttttt aaaatgttgt aataattttg ttttattgat	540
	gtaaaggggt ggtaggtgtg tatggtggga ggtttatata agtagagttt tgtttagtga	600
	attgtttagat ttagtttttg gagaggagt	629
	<210> 26	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador 133	
	<400> 26	
	tcacagagca ggacagcaag	20
25	<210> 27	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador 132	
	<400> 27	
	gacttcgcag gcgtagactt	20
35	<210> 28	

	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador 166	
	<400> 28	
	<b>agcacctaca gcctcagcag cacc</b>	<b>24</b>
10	<210> 29	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador 178	
	<400> 29	
20	<b>cgaaccggtg acggtgt</b>	<b>17</b>
	<210> 30	
	<211> 17	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador 180	
30	<400> 30	
	<b>gagggcacgg tcaccac</b>	<b>17</b>
	<210> 31	
	<211> 24	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador 185	
40	<400> 31	
	<b>cacaccttcc cggctgtcct acag</b>	<b>24</b>
	<210> 32	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> 396 - MIE de hCMV directo 1	
	<400> 32	
	<b>tacatcaatg ggcgtggata</b>	<b>20</b>
55	<210> 33	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> 397 - MIE de hCMV inverso 1	
	<400> 33	
	<b>aagtcccgtt gattttggtg</b>	<b>20</b>
65		

ES 2 708 830 T3

	<210> 34	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Gusb directo 1	
	<400> 34	
10	<b>caggggtggga tgctcttc</b>	18
	<210> 35	
	<211> 18	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Gusb inverso 1	
20	<400> 35	
	<b>gccgggttttc cgagaagt</b>	18
	<210> 36	
	<211> 18	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Eif3i directo 1	
30	<400> 36	
	<b>gttcccggca ctgacact</b>	18
	<210> 37	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Eif3i inverso 2	
	<400> 37	
	<b>acttgatctg cgtgatggac</b>	20
45	<210> 38	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Fox2a directo 1	
	<400> 38	
	<b>atcacccgta ctgctgctct</b>	20
55	<210> 39	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Fox2a inverso	
	<400> 39	
65	<b>gaggcttctg gggatctctt</b>	20



	<210> 40	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Gata5 directo 1	
10	<400> 40	
	<b>cacctacccc atcctgtctg</b>	<b>20</b>
	<210> 41	
	<211> 21	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Gata5 inverso 1	
20	<400> 41	
	<b>gaggaggtga aggcaaagtc t</b>	<b>21</b>
	<210> 42	
25	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Rho directo 1	
	<400> 42	
	<b>agcctcggtc tctattgaag</b>	<b>20</b>
35	<210> 43	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Rho inverso 1	
	<400> 43	
45	<b>cgttggagaa gggcacataa</b>	<b>20</b>
	<210> 44	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> UG_730_Bisul_CMV1 F1	
	<400> 44	
55	<b>gatattgatt attgattagt tattaatagt aattaa</b>	<b>36</b>
	<210> 45	
	<211> 33	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> UG_731_Bisul_CMV1 R1	

	<400> 45		
	<b>caaataaaaa aatcccataa aatcatatac taa</b>		<b>33</b>
5	<210> 46 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> UG_732_Bisul_CMV2 F2		
	<400> 46		
	<b>ttagtatatg attttatggg atttttttat ttg</b>		<b>33</b>
15	<210> 47 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> UG_733_Bisul_CMV2 R2		
	<400> 47		
25	<b>ttctaataact aaactcctct cccaa</b>		<b>25</b>
30	<210> 48 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> UG_574_16110 BtsI_rev		
35	<400> 48		
	<b>ctgtcatgcc atcgtaagat gct</b>		<b>23</b>
40	<210> 49 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> UG_575_16110 BtsI_for		
45	<400> 49		
	<b>gcgggccaact tactttctgac aacg</b>		<b>24</b>
50	<210> 50 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
55	<220> <223> UG_576_16110 AcellI_rev		
	<400> 50		
	<b>aaggcgagtt acatgatccc ccat</b>		<b>24</b>
60	<210> 51 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220>		

ES 2 708 830 T3

<223> UG\_577\_16110 AcellI\_for  
<400> 51  
**caccacgatg cctgtagcaa tgg** 23  
5  
<210> 52  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
10  
<220>  
<223> UNC13c directo 1  
<400> 52  
15 **gggtgcttta cggaaactga** 20  
<210> 53  
<211> 20  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> UNC13c inverso 1  
25 <400> 53  
**gcttcttatg ccccaggttt** 20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un procedimiento para seleccionar un clon celular/línea celular, que comprende un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica un polipéptido enlazado de forma funcional a un ácido nucleico promotor que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 01, que comprende las siguientes etapas:
- 10 a) determinar el nivel de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 (H3ac/H3) cerca del ácido nucleico promotor que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 01 para una primera multitud de clones celulares/líneas celulares, y
- 15 b) determinar la frecuencia de metilación del sitio CpG en la posición 425 de la SEQ ID NO: 01 para una segunda multitud de clones celulares/líneas celulares, y
- 20 c) seleccionar un clon celular/línea celular, que comprende un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica un polipéptido enlazado de forma funcional a un ácido nucleico promotor que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 01, que tiene un nivel de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 determinado en la etapa a) de 0,5 y que tiene una frecuencia de metilación del sitio CpG en la posición 425 determinada en la etapa b) de menos de un 5 %.
- 25 2. Un procedimiento para seleccionar un clon celular/línea celular, que comprende un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica un polipéptido enlazado de forma funcional a un ácido nucleico promotor que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 01, que comprende las siguientes etapas:
- 30 a) determinar para cada clon celular/línea celular de una primera multitud de clones celulares/líneas celulares, por el que cada clon/línea celular comprende un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica un polipéptido enlazado de forma funcional a un ácido nucleico promotor que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 01, el nivel promedio de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 (H3ac/H3) cerca del ácido nucleico promotor que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 01 basada en el nivel de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 (H3ac/H3) determinado en al menos 10 células obtenidas de un cultivo de cada clon celular/línea celular,
- 35 b) determinar para cada clon celular/línea celular de una segunda multitud de clones celulares/líneas celulares, por el que cada clon/línea celular comprende un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica un polipéptido enlazado de forma funcional a un ácido nucleico promotor que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 01, la frecuencia de metilación promedio del sitio CpG en la posición 425 de la SEQ ID NO: 01 basada en la metilación determinada para al menos 10 células obtenidas de un cultivo de cada clon celular/línea celular,
- 40 c) seleccionar un clon celular/línea celular que tenga un nivel promedio de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 (H3ac/H3) de 0,5 o más, y que tenga una frecuencia de metilación en la posición 425 por debajo de un 5 %.
- 45 3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el polipéptido es una cadena ligera de anticuerpo, que comprende la siguiente etapa:
- 50 ab) determinar el número de copias de casetes de expresión de cadena ligera integrados de forma estable, por el que la etapa c) es:
- 55 seleccionar un clon celular/línea celular que tenga un nivel de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3 determinado en la etapa a) de más de 0,5, que tenga una frecuencia de metilación del sitio CpG en la posición 425 determinada en la etapa b) de menos de un 5 %, y que tenga un número de copias de casetes de expresión de cadena ligera integrados de forma estable determinado en la etapa ab) de 10 o menos.
- 60 4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la primera multitud de células y la segunda multitud de células son la misma multitud de células.
- 65 5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la determinación del nivel de acetilación de histona 3 con relación al nivel de histona 3 (H3ac/H3) comprende las siguientes etapas:

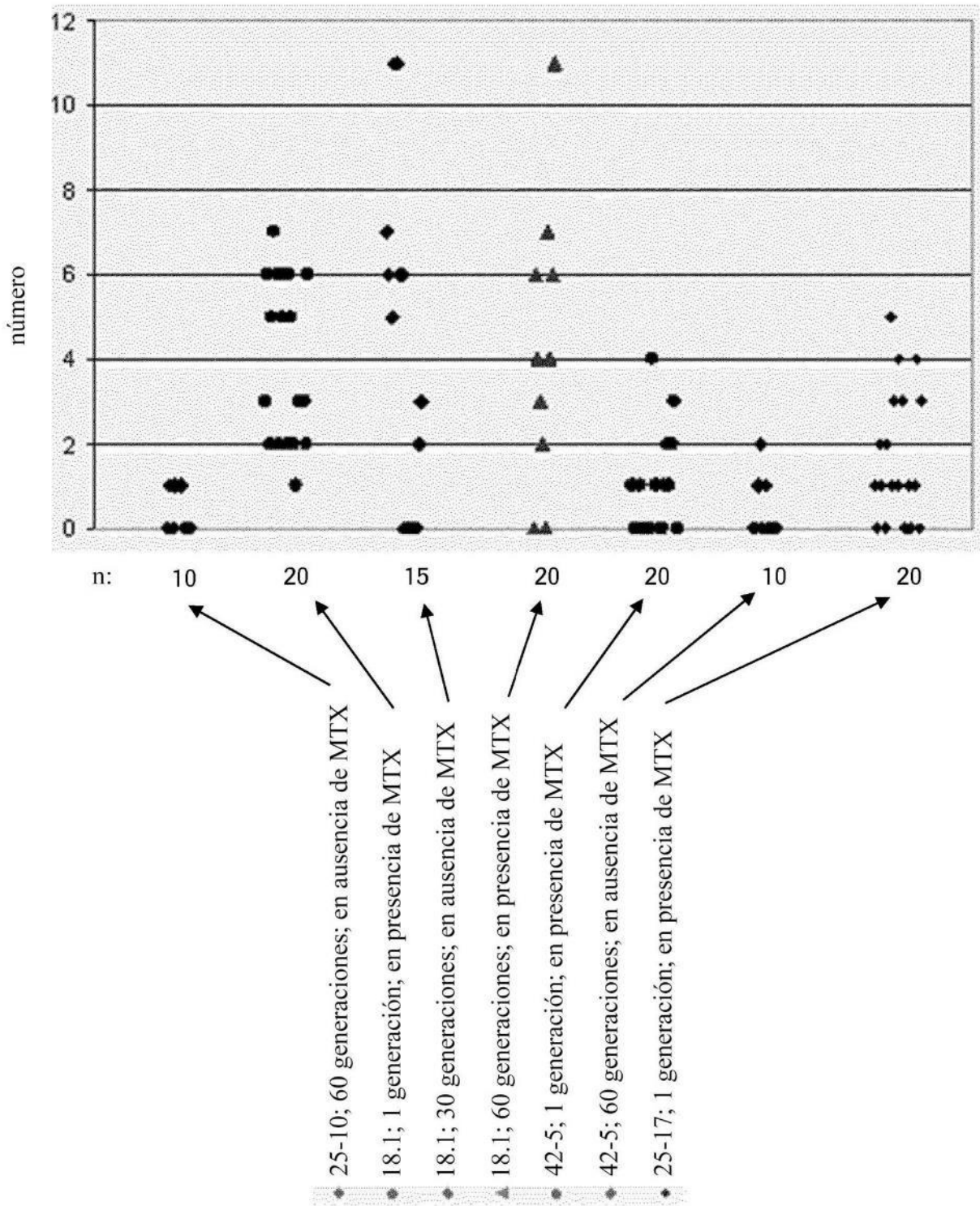
- 1) aislar la cromatina de cada uno de los clones celulares/líneas celulares,
  - 2) tratar una primera alícuota de la cromatina mediante un anticuerpo específico de acetilación de la histona 3 o un anticuerpo específico de histona 3 y formar un precipitado de anticuerpo-cromatina, y tratar una segunda alícuota de la cromatina mediante un anticuerpo específico de histona 3 y formar y precipitar el anticuerpo-cromatina,
  - 3) amplificar el ADN genómico de una tercera alícuota no tratada de la cromatina y de la primera y la segunda alícuota tratada con PCR cuantitativa en tiempo real,
  - 4) determinar, con el resultado obtenido en la etapa 3), el nivel de acetilación de histona 3 en relación con el nivel de histona 3.
6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la determinación de la frecuencia de metilación comprende las siguientes etapas:
- 1) aislar el ADN de cada uno de los clones celulares/líneas celulares,
  - 2) realizar, para cada ADN aislado individualmente, una reacción en cadena de la polimerasa específica de metilación,
  - 3) determinar, con los resultados obtenidos en la etapa 2), la frecuencia de metilación.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la etapa 2) es
- 2) realizar, para cada ADN aislado individualmente, una reacción en cadena de la polimerasa con un cebador específico de metilación y un cebador universal.
8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que los cebadores universales tienen la secuencia de la SEQ ID NO: 09 y 11 y el cebador específico de metilación tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 11 y 18.
9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el nivel de acetilación de histona 3 con relación al nivel de histona 3 (H3ac/H3) se normaliza a un gen de referencia.
10. El procedimiento de acuerdo la reivindicación 9, caracterizado por que el gen de referencia es Gusb.
11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la segunda multitud de clones celulares/líneas celulares comprende al menos un clon celular/línea celular comprendida también en la primera multitud de clones celulares/líneas celulares.
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la segunda multitud de clones celulares/líneas celulares es idéntica a la primera multitud de clones celulares/líneas celulares.
13. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el clon celular/línea celular es un clon celular/línea celular CHO.
14. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 y 4 a 13, en el que el polipéptido es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo o un conjugado de anticuerpo.
15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.
16. Un procedimiento para la producción de un polipéptido, que comprende las siguientes etapas:
- a) seleccionar un clon celular/línea celular con un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15,
  - b) cultivar el clon celular/línea celular seleccionada, y
  - c) recuperar el polipéptido del medio de cultivo y/o el clon celular/línea celular y producir de este modo el polipéptido.
17. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el procedimiento comprende, antes de la etapa a), las siguientes etapas:
- a-2) transfectar una célula de mamífero con un ácido nucleico, que comprende un ácido nucleico que comprende un gen estructural que codifica un polipéptido enlazado de forma funcional a un ácido

nucleico promotor que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 01,

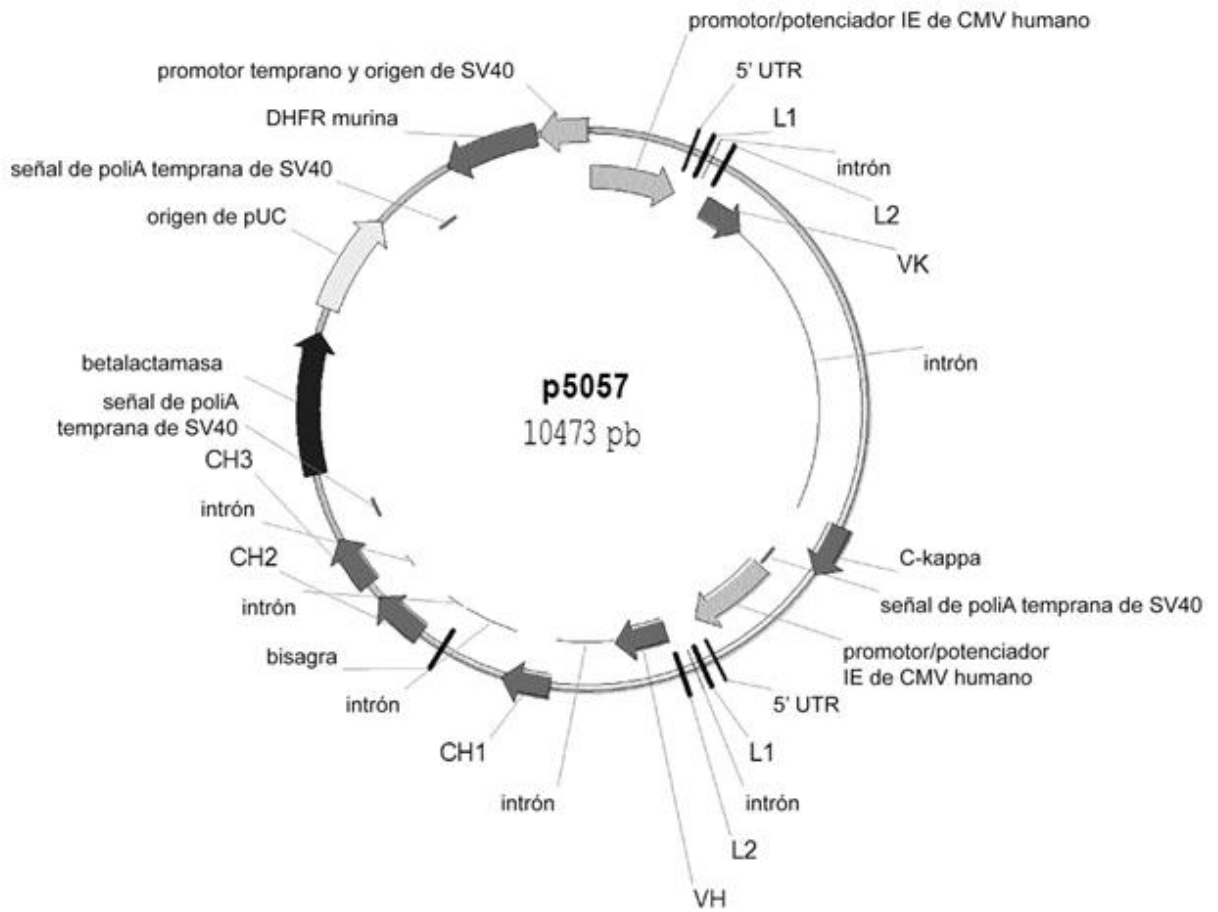
- a-1) i) opcionalmente, cultivar el clon celular/línea celular transfectada en presencia de un agente de selección, ii) depositar individualmente las células transfectadas, y iii) cultivar las células transfectadas depositadas individualmente en presencia de un agente de selección.

5

Fig. 1

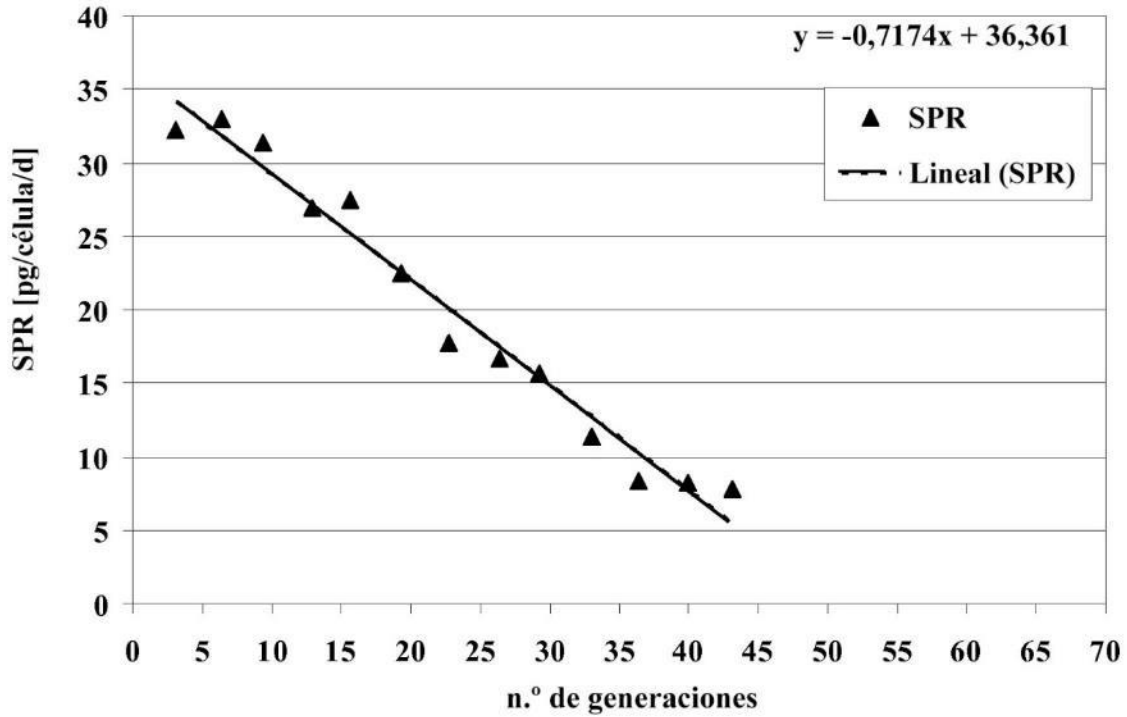


**Fig. 2**

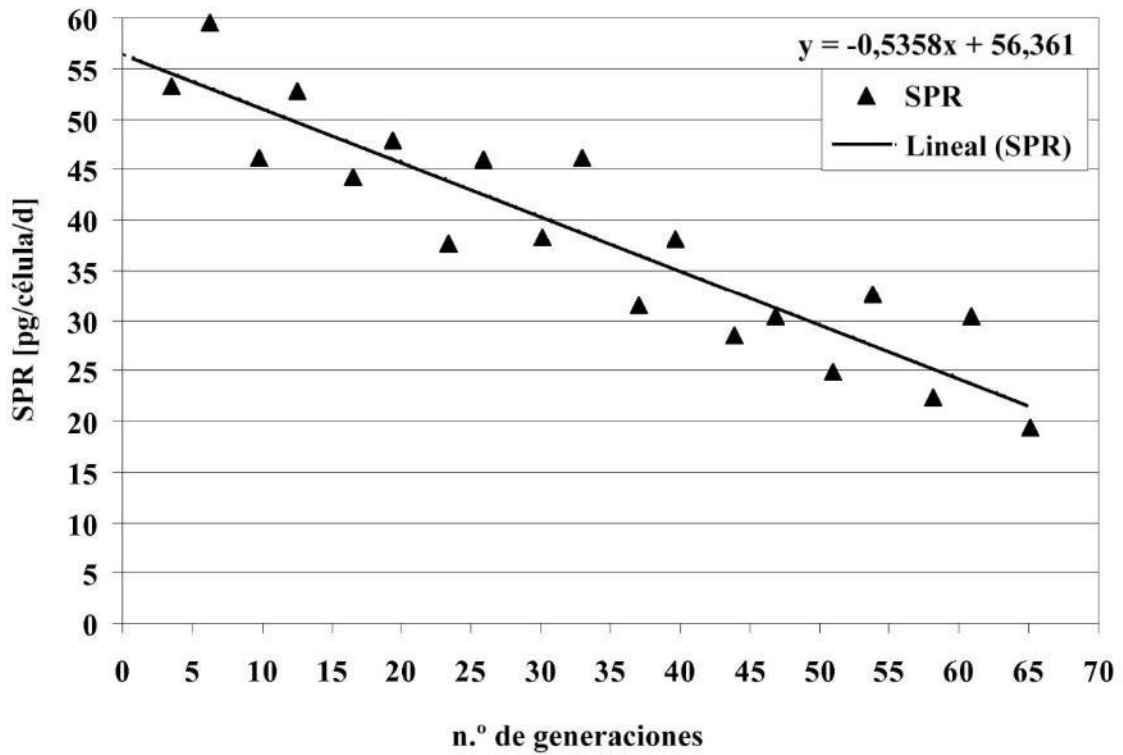




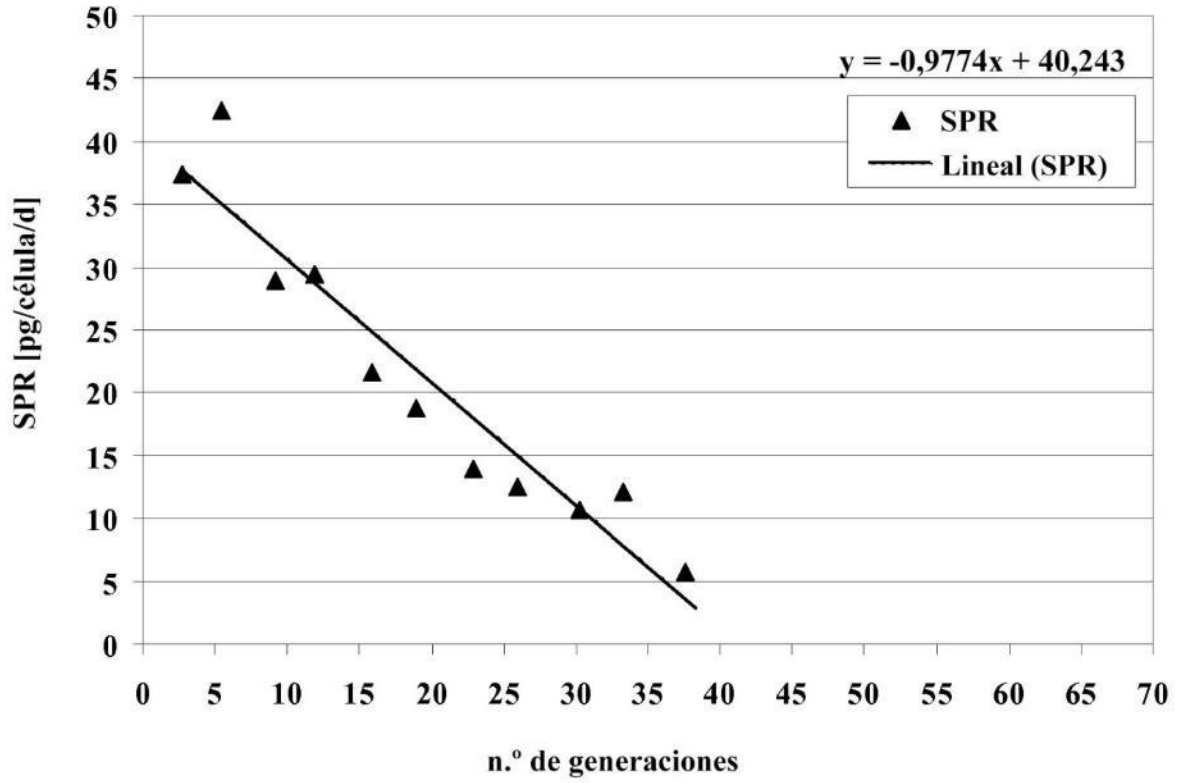
**Fig. 3 A**



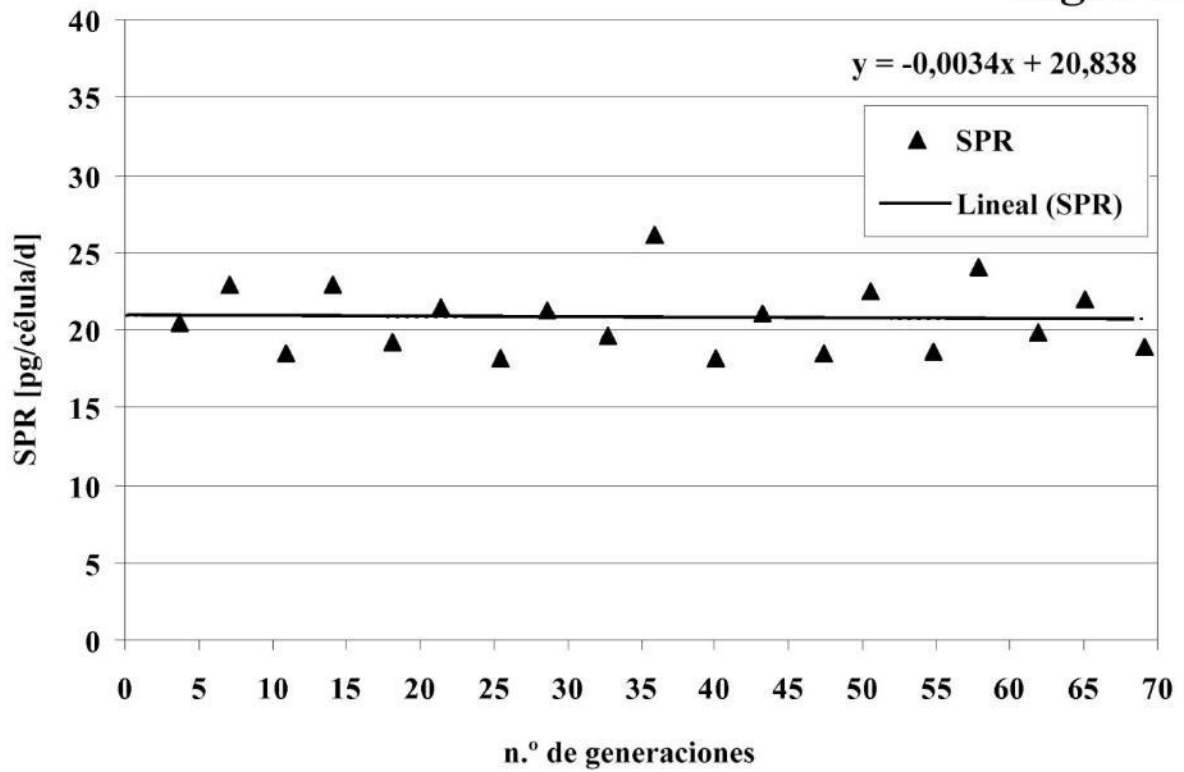
**Fig. 3 B**



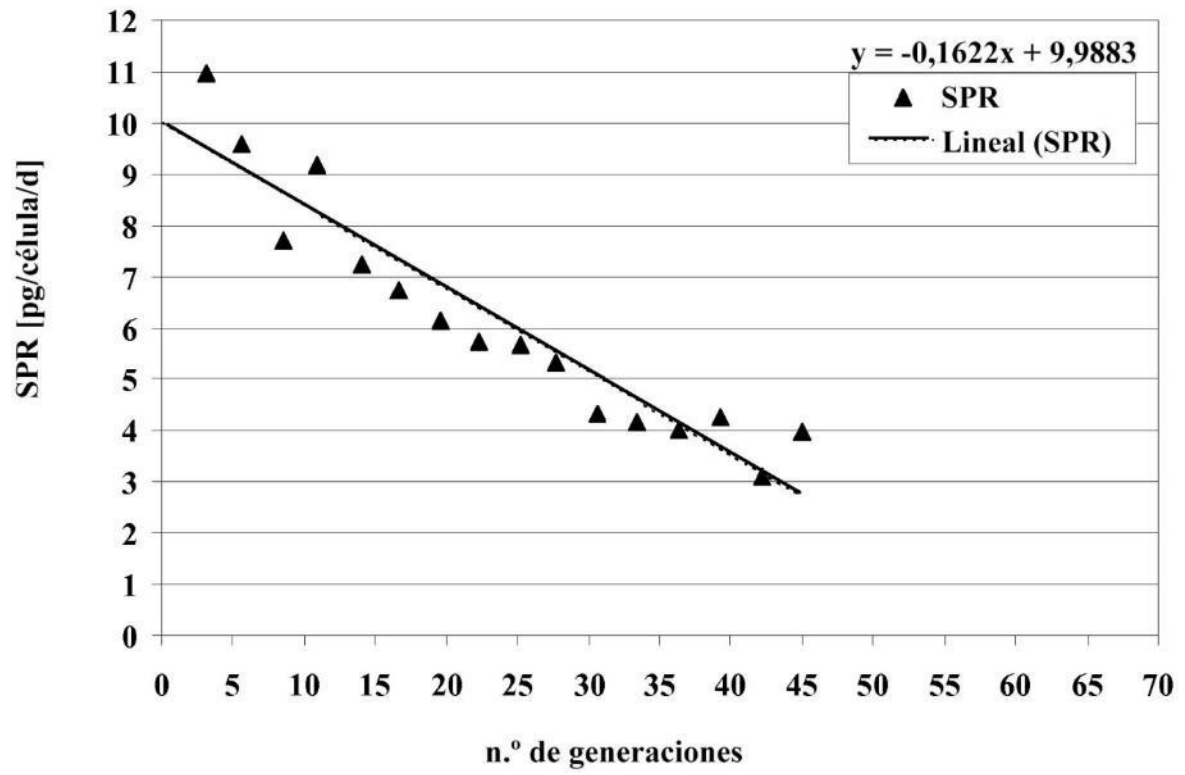
**Fig. 3 C**



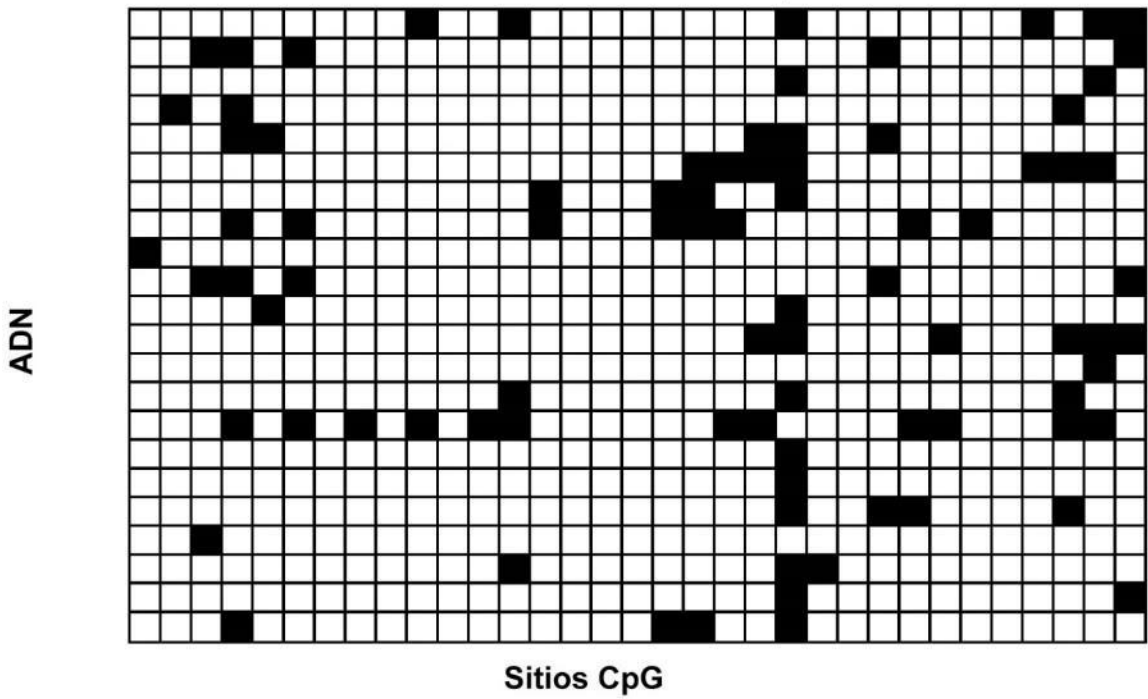
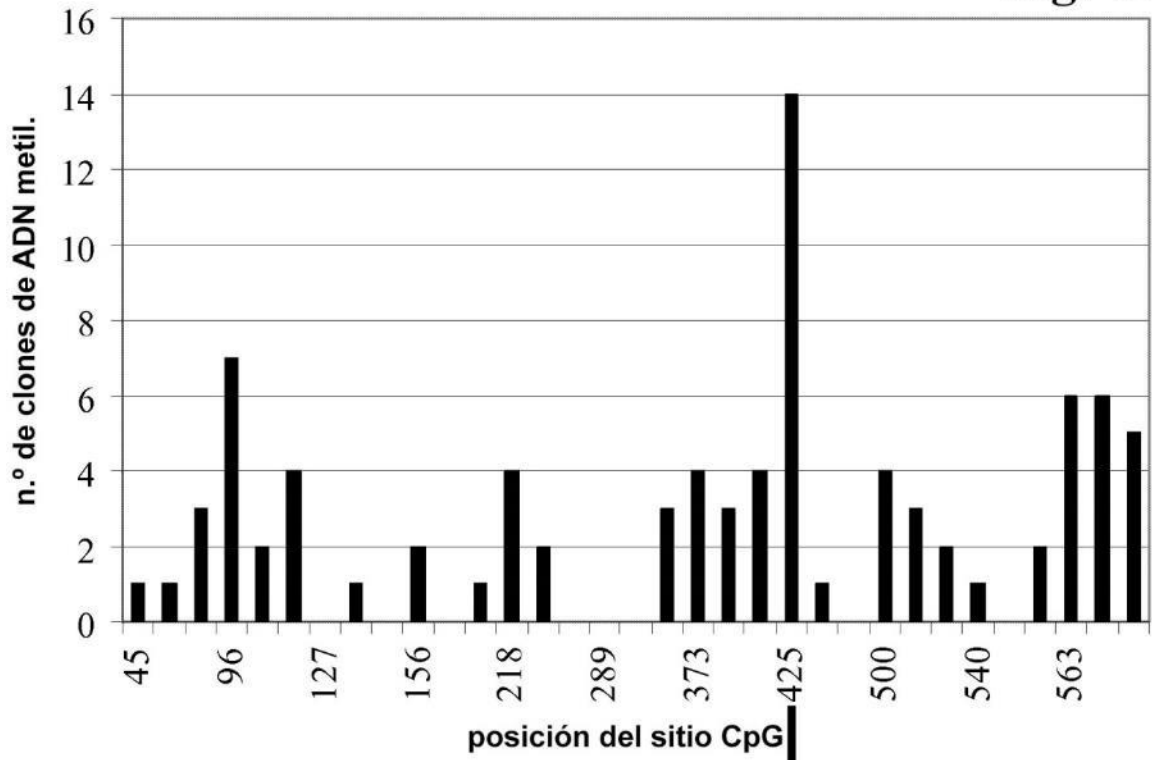
**Fig. 3 D**



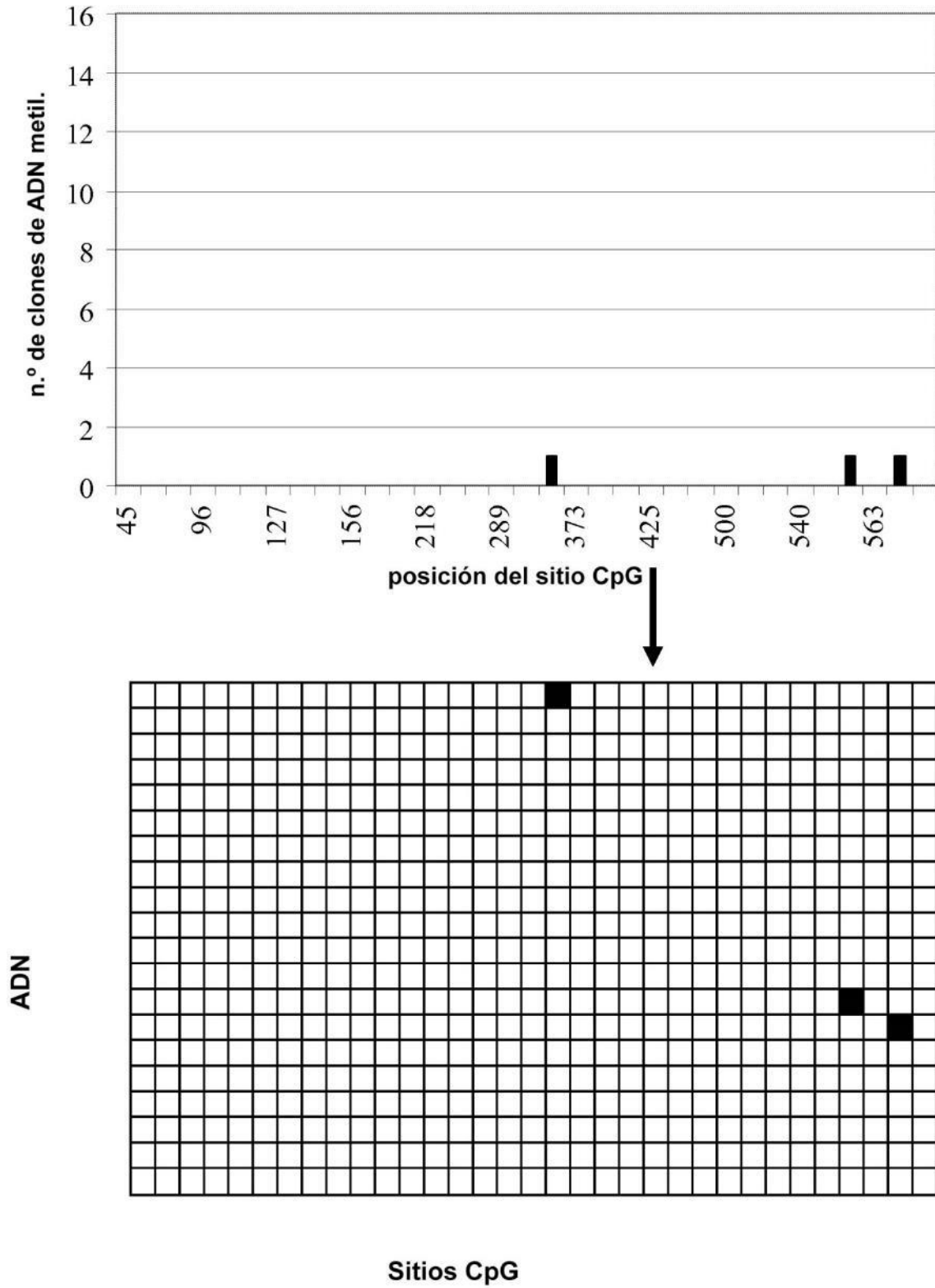
**Fig. 3 E**



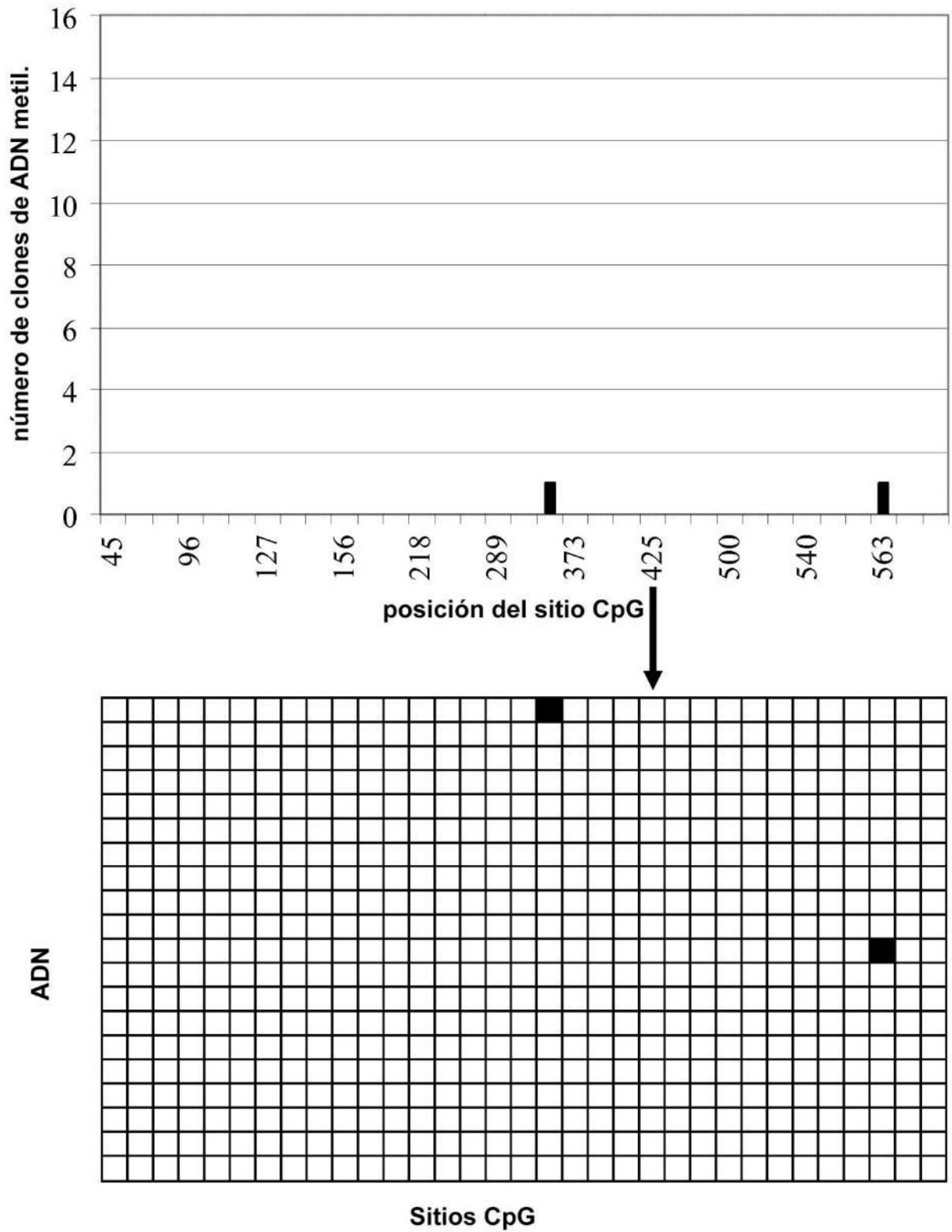
**Fig. 4 A**



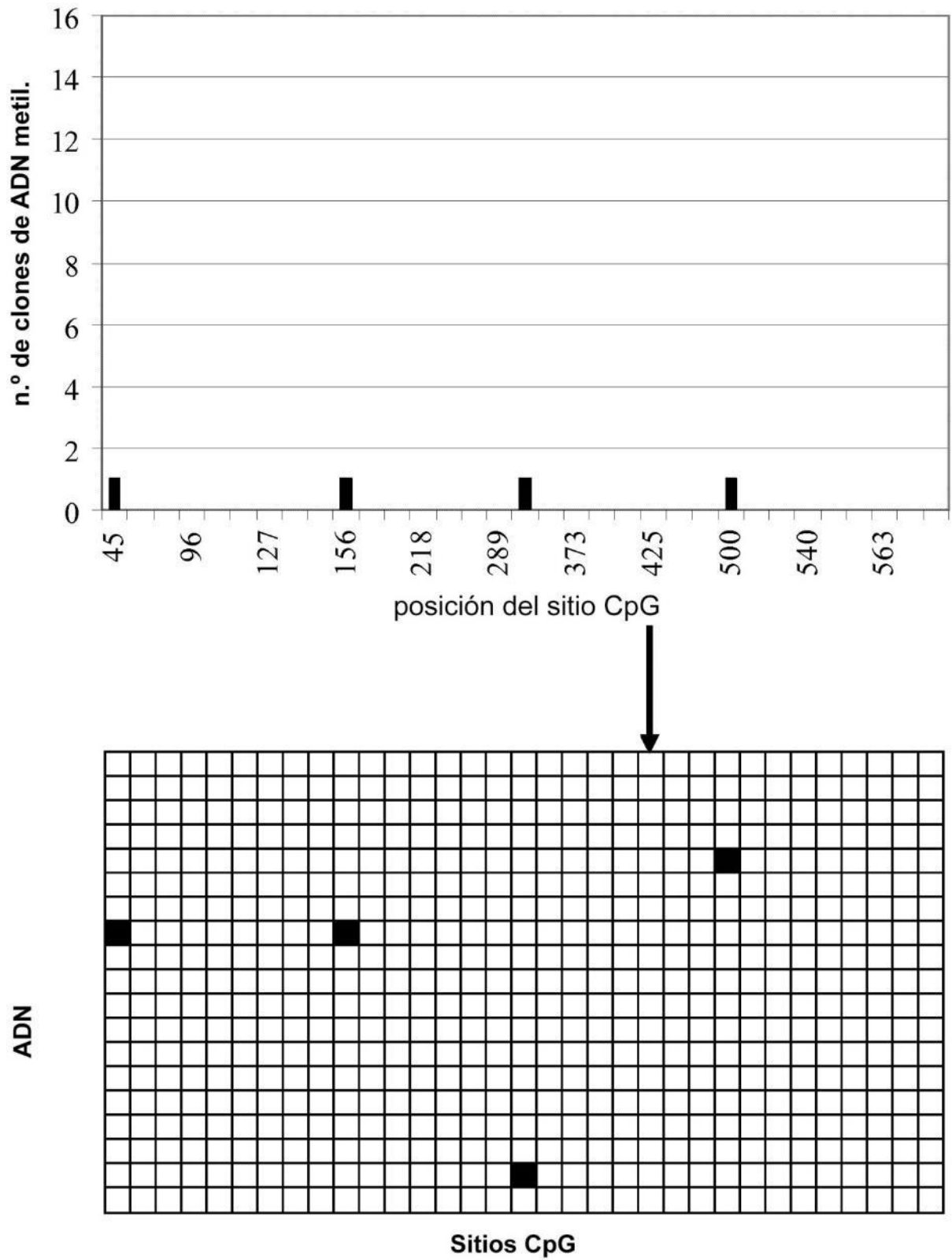
**Fig. 4 B**



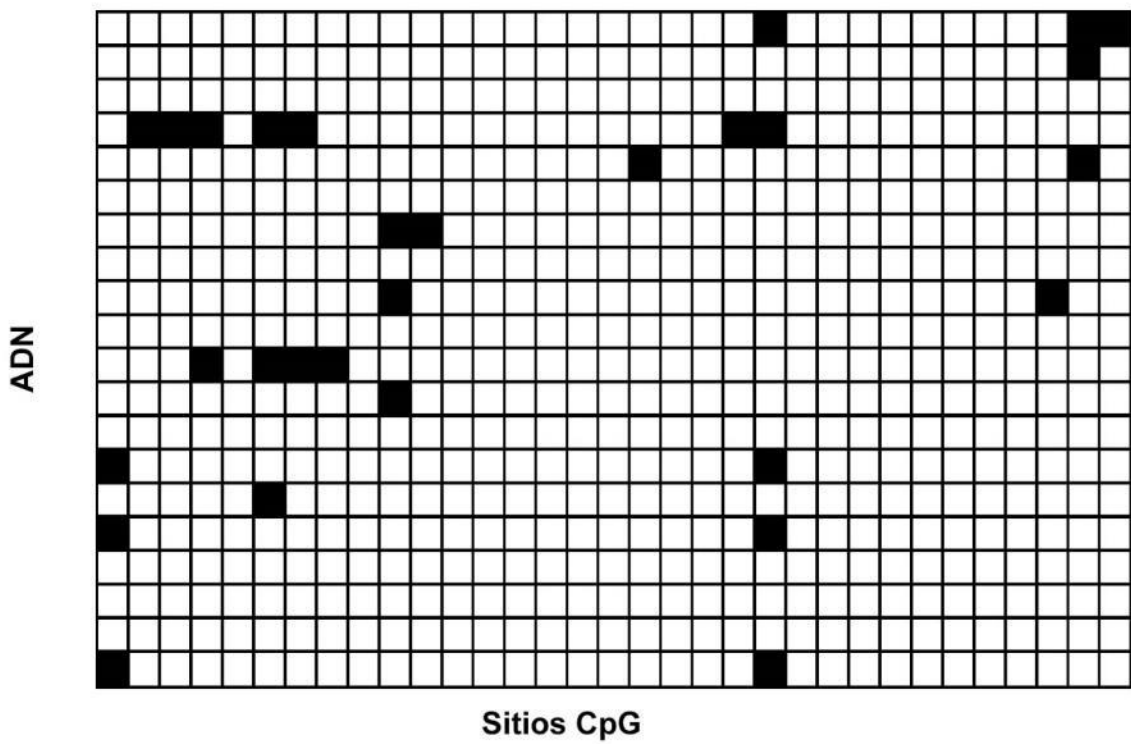
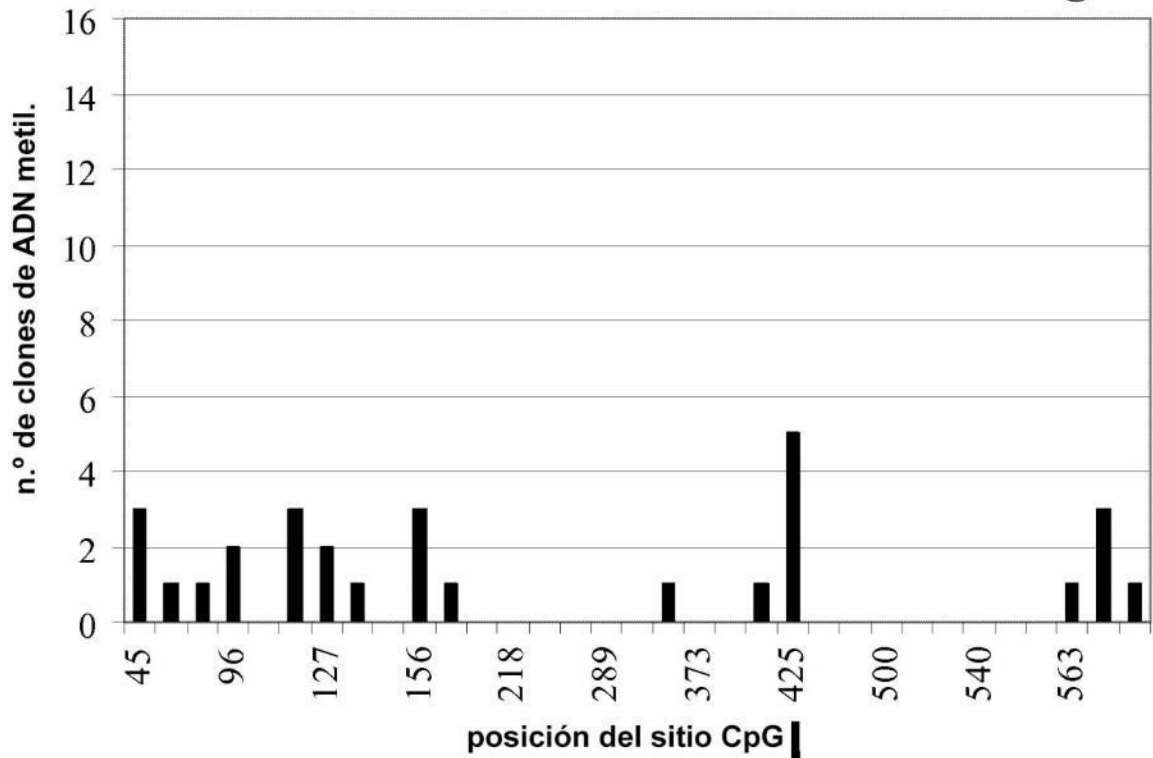
**Fig. 4 C**



**Fig. 4 D**

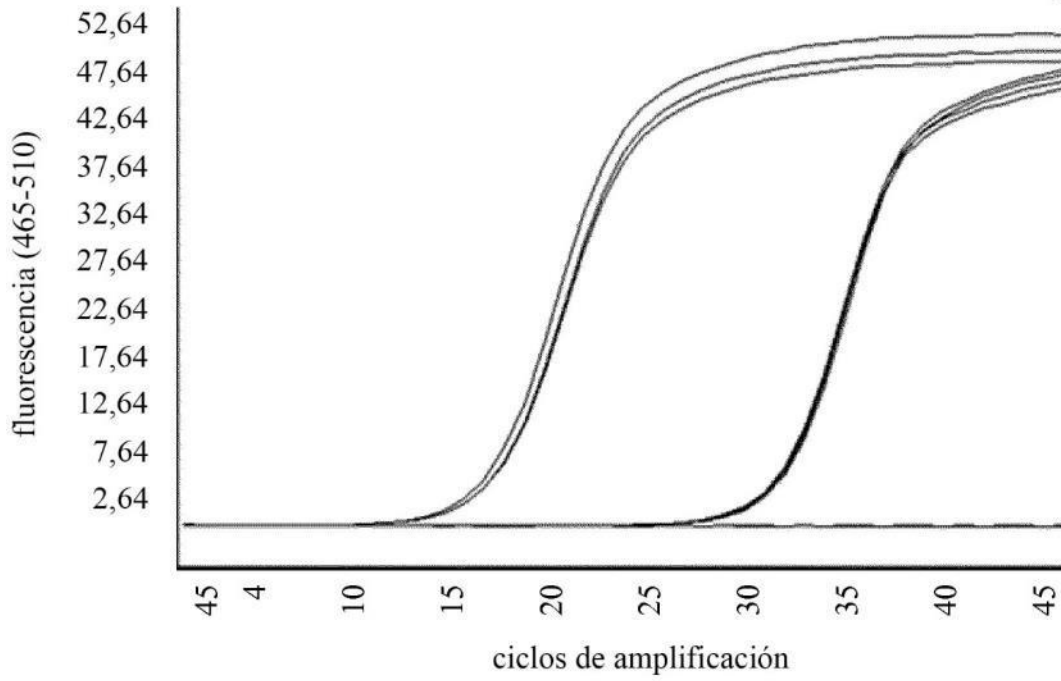


**Fig. 4 E**

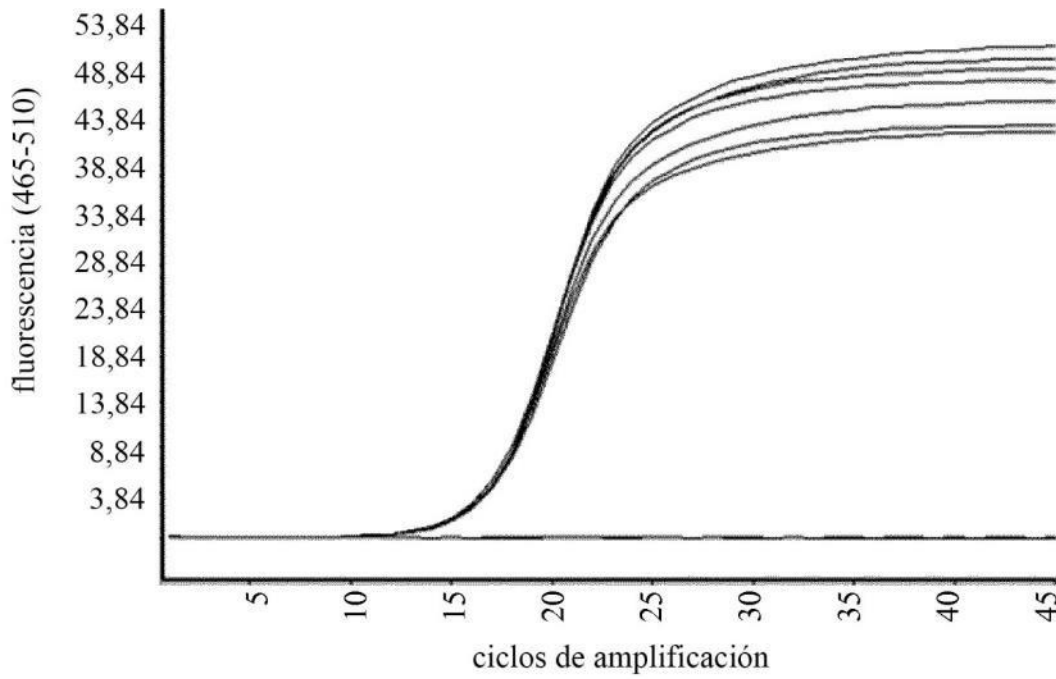




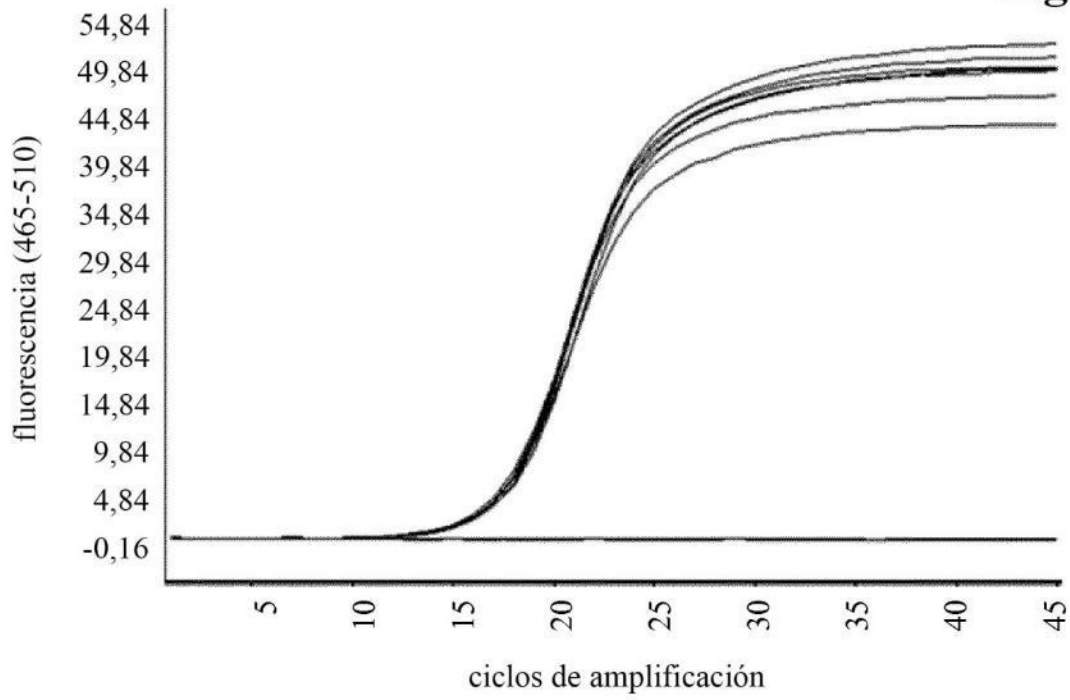
**Fig. 5 A**



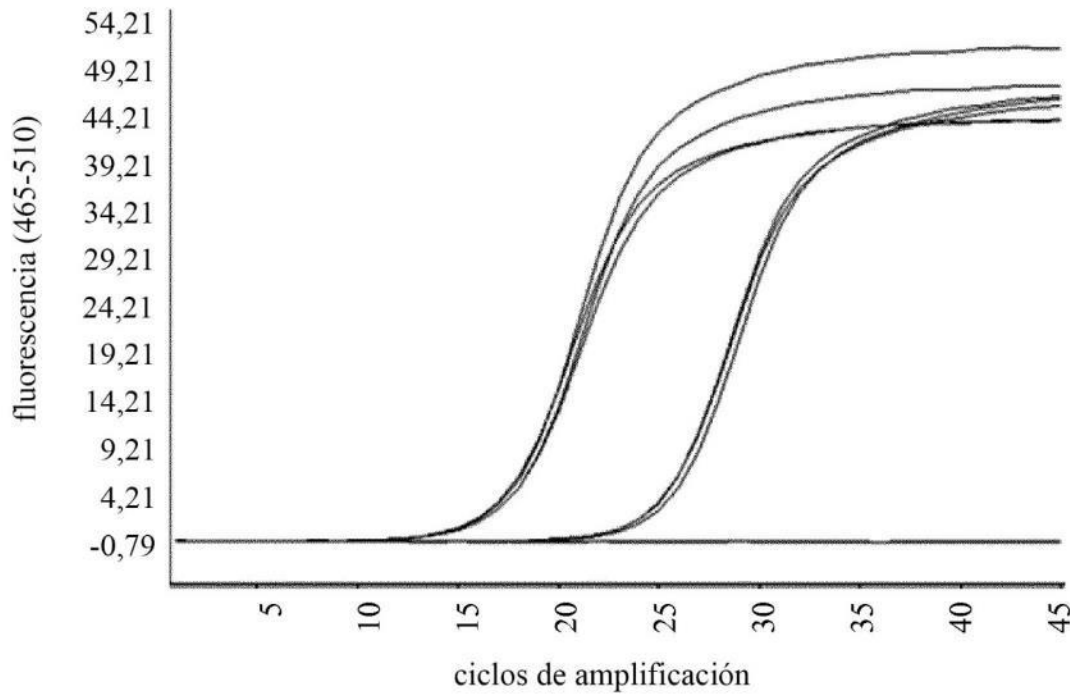
**Fig. 5 B**



**Fig. 5 C**



**Fig. 5 D**



**Fig. 6**

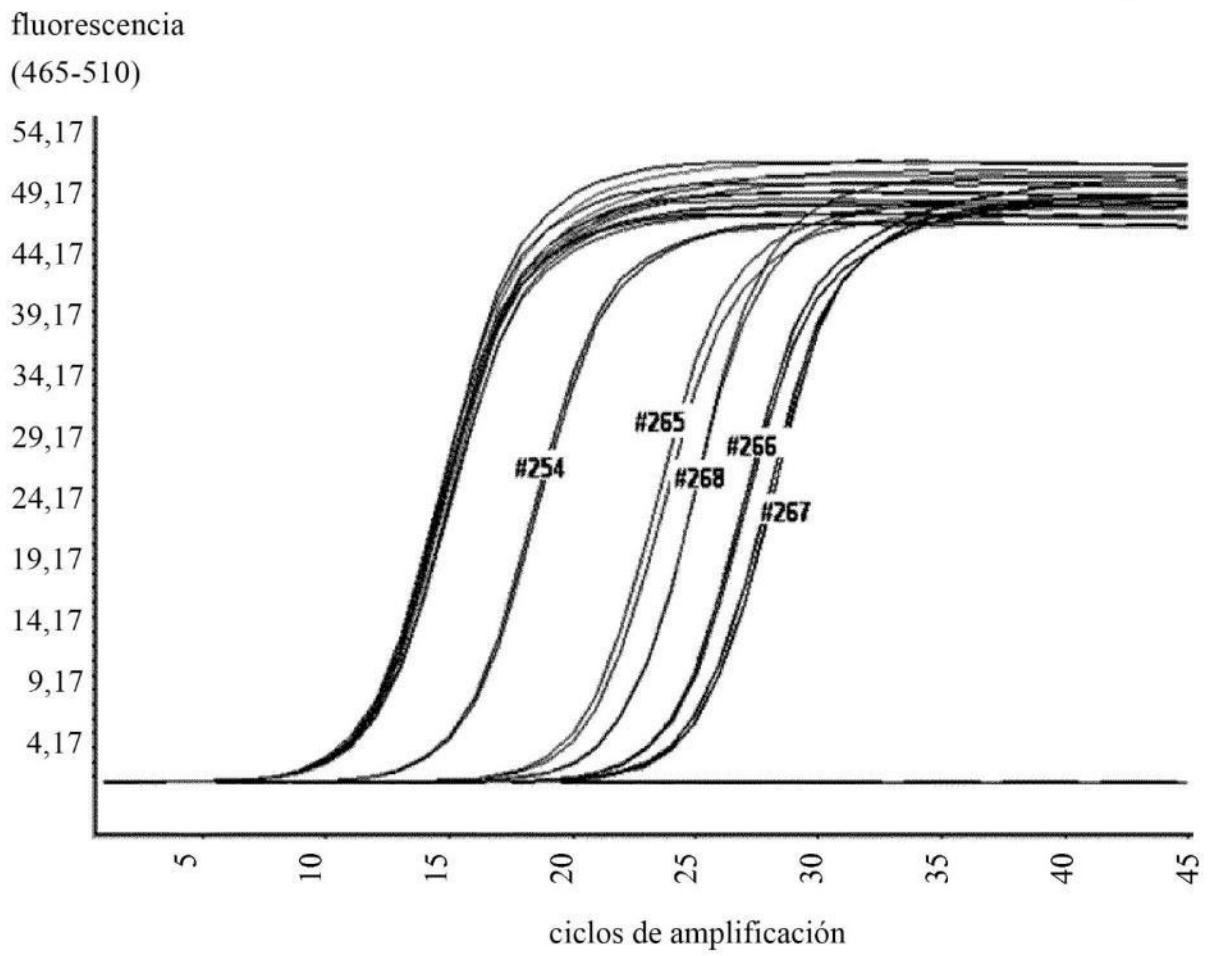
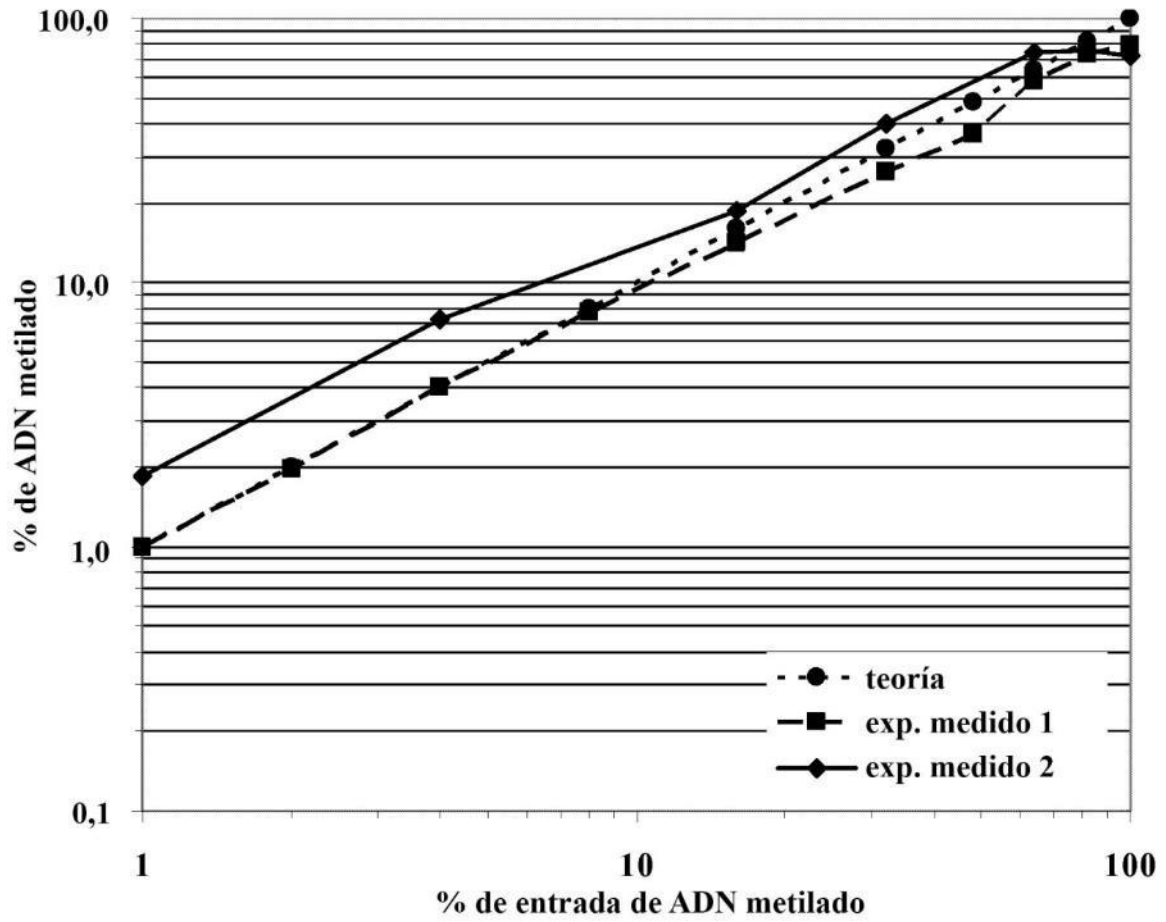
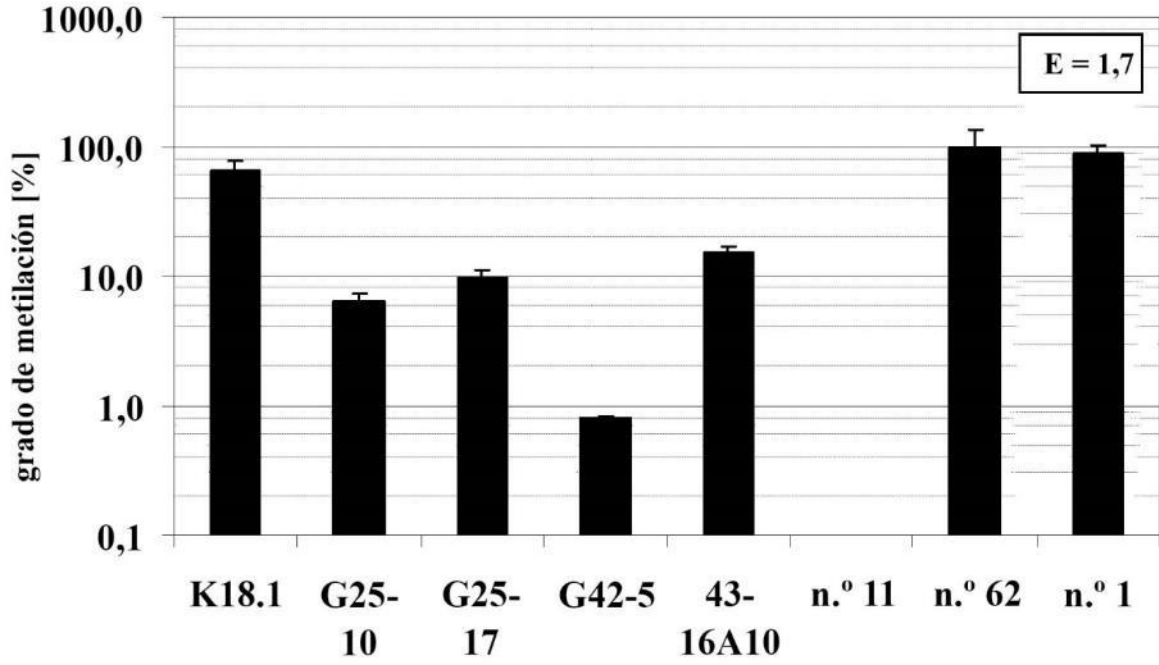


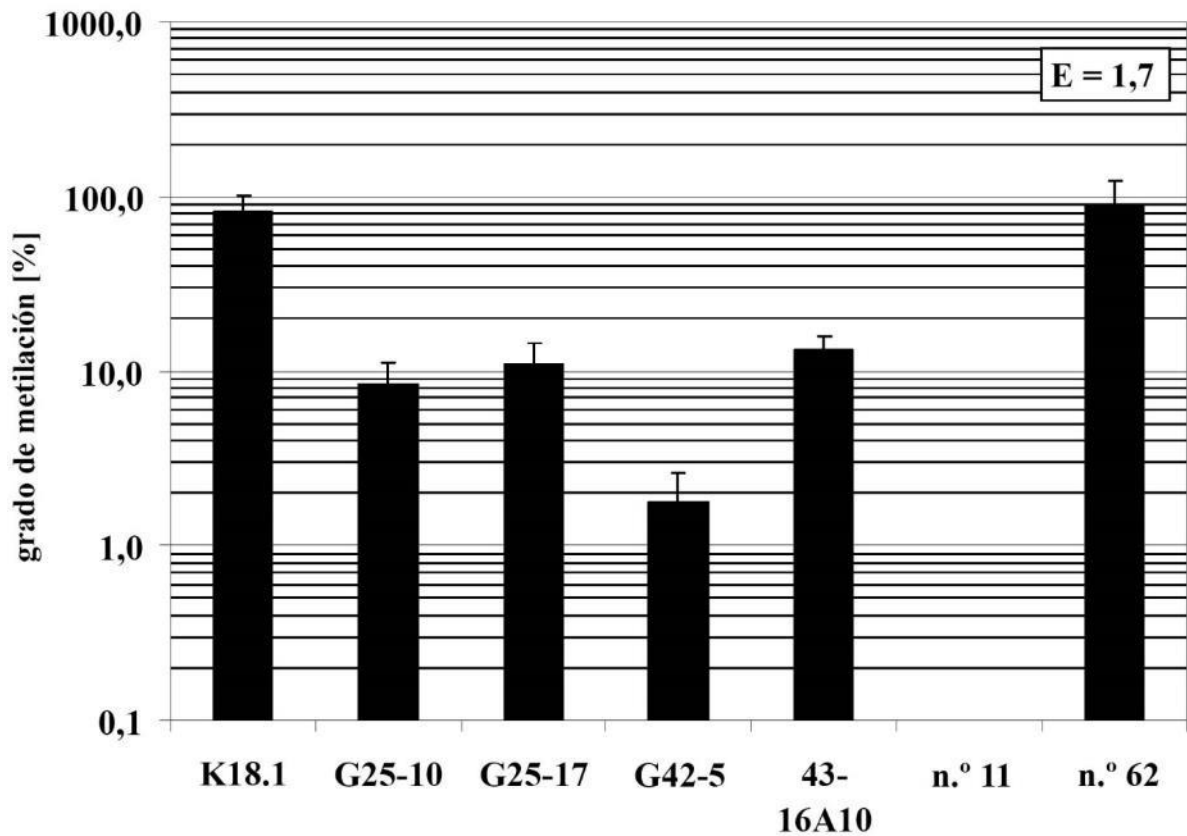
Fig. 7



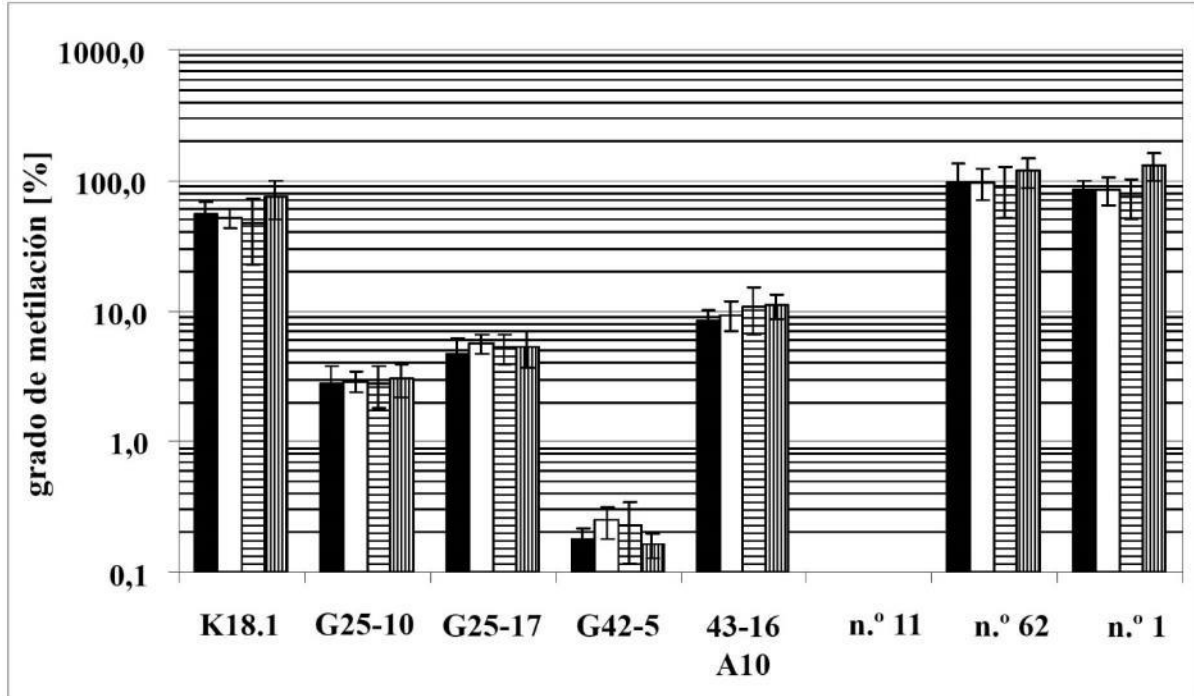
**Fig. 8 A**



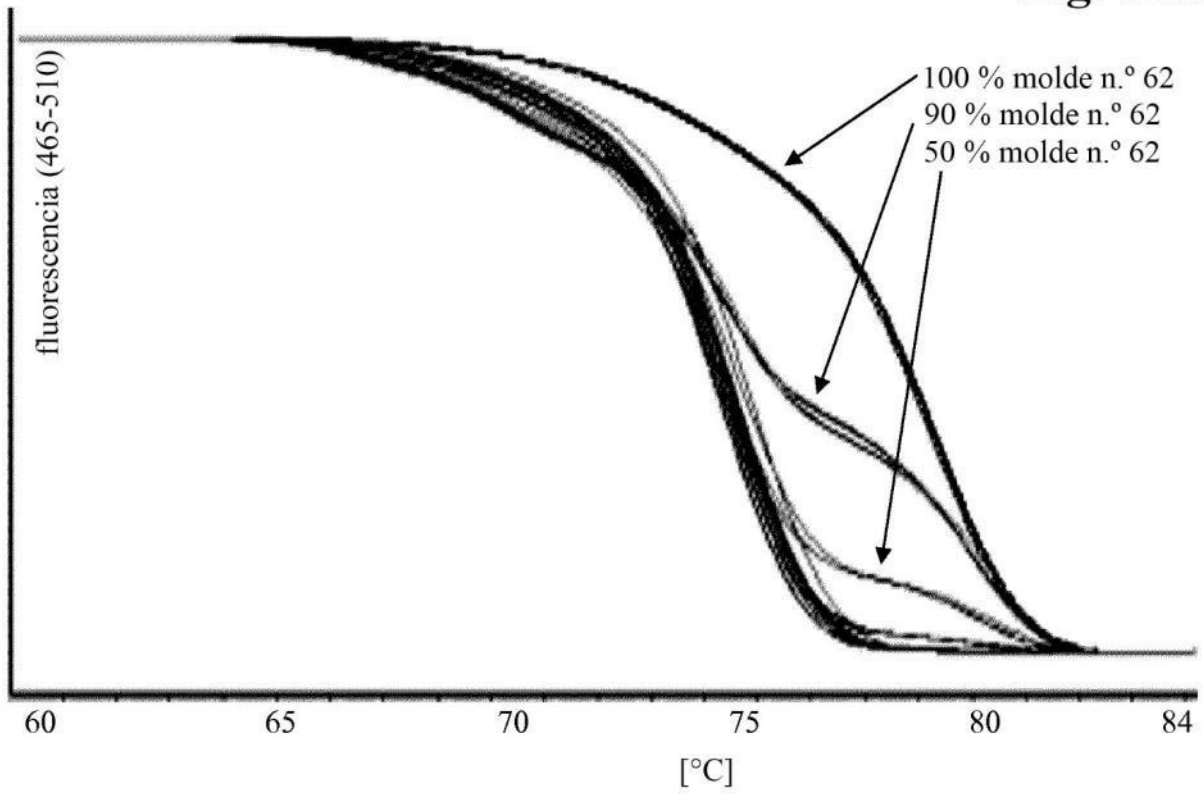
**Fig. 8 B**



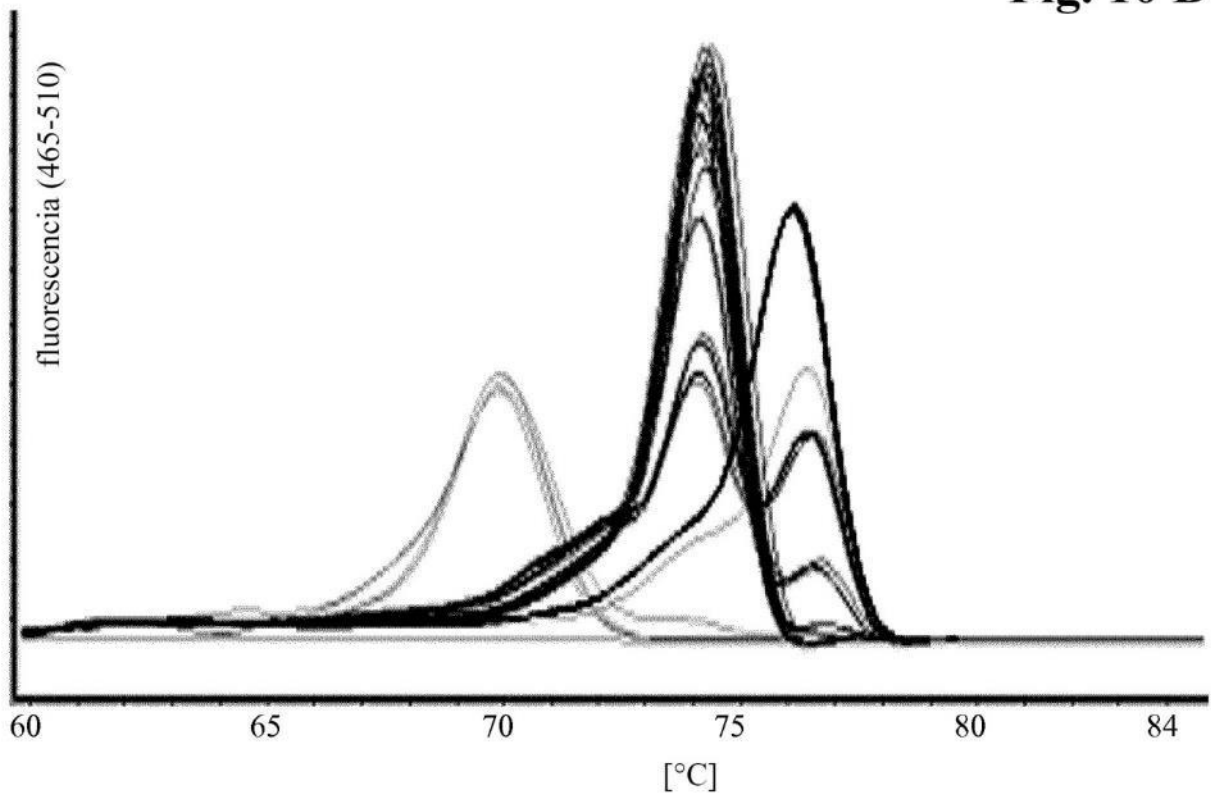
**Fig. 9**



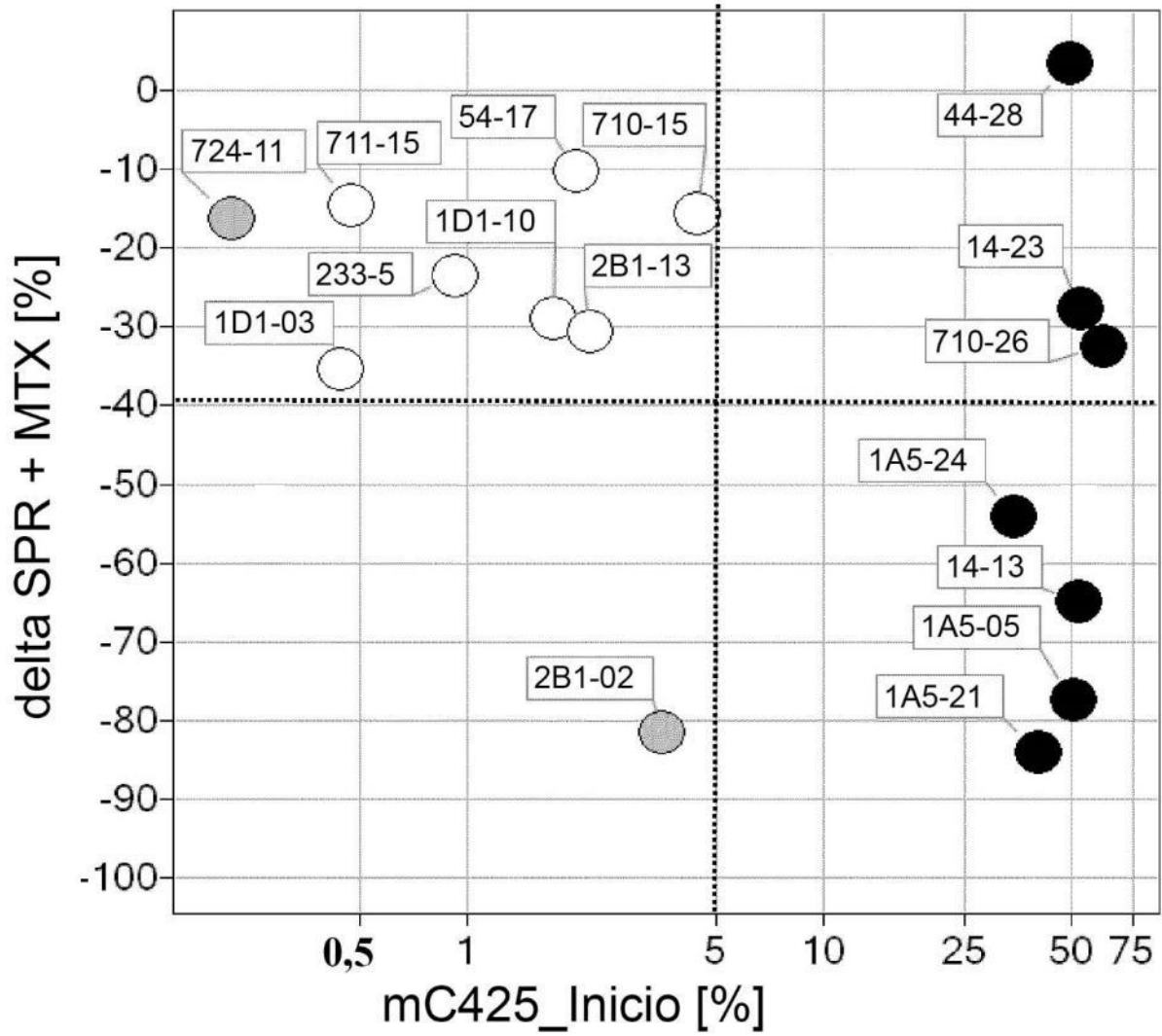
**Fig. 10 A**



**Fig. 10 B**



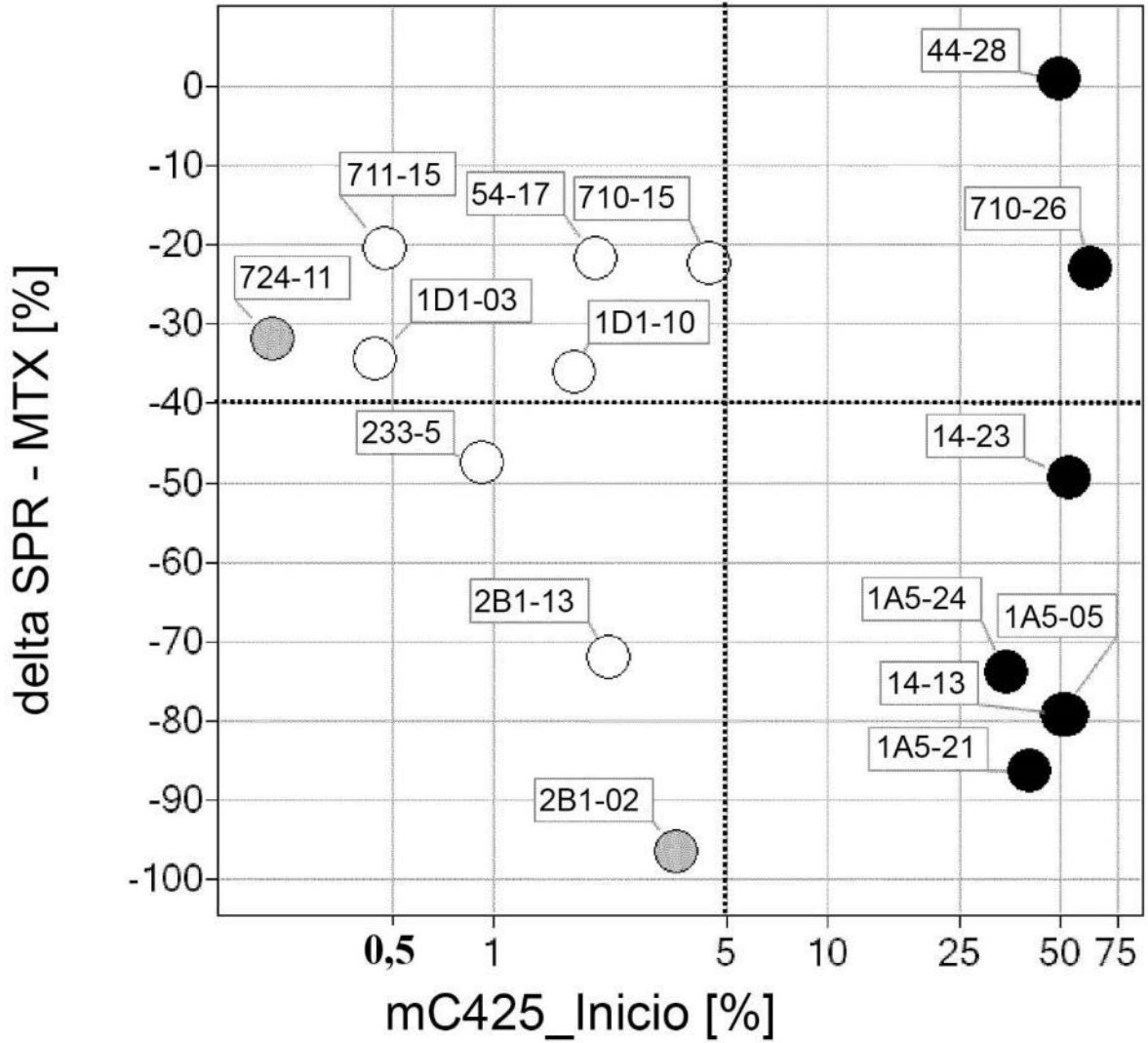
**Fig. 11 A**



- mC425\_Inicio < 5 %  
mC425\_Fin con MTX < 5 %
- mC425\_Inicio < 5 %  
mC425\_Fin con MTX > 5 %
- mC425\_Inicio > 5 %  
mC425\_Fin con MTX > 5 %

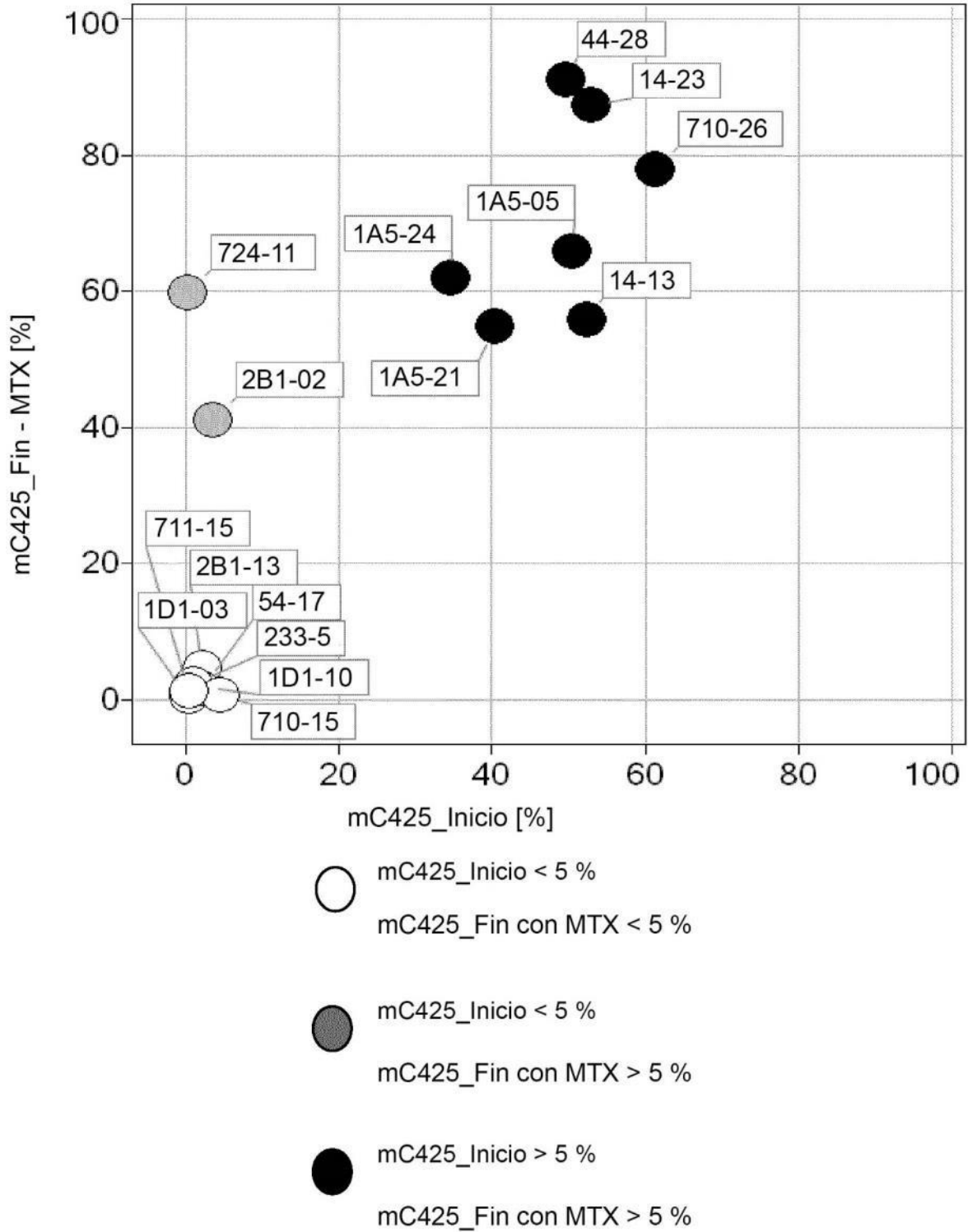


**Fig. 11 B**

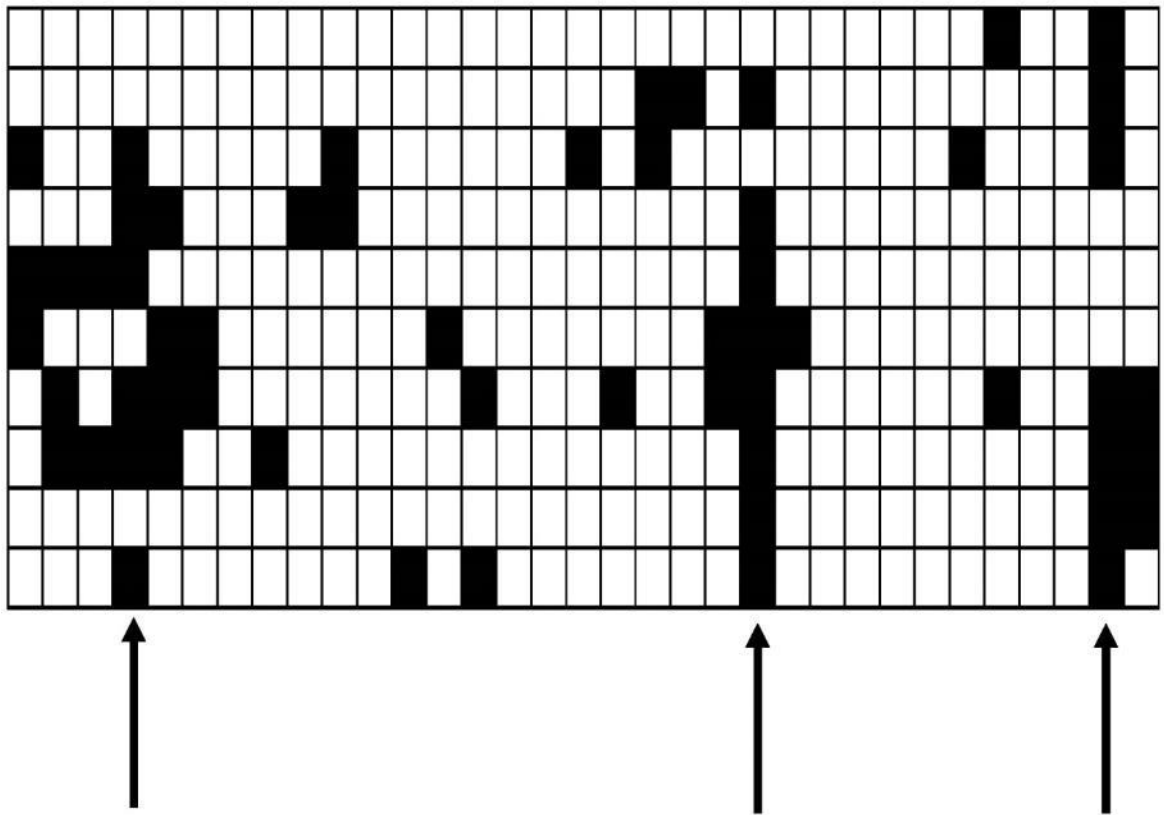


- mC425\_Inicio < 5 %  
mC425\_Fin sin MTX < 5 %
- mC425\_Inicio < 5 %  
mC425\_Fin sin MTX > 5 %
- mC425\_Inicio > 5 %  
mC425\_Fin sin MTX > 5 %

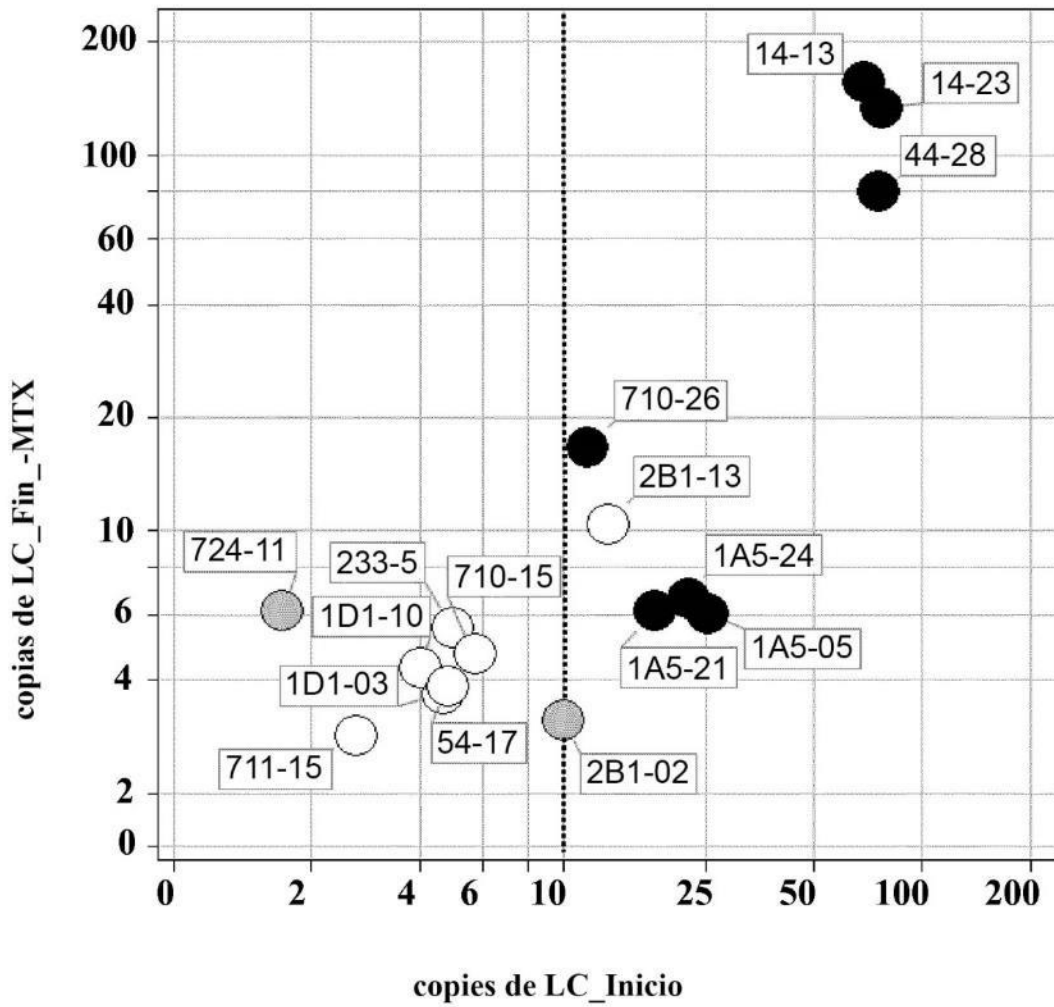
**Fig. 12**



**Fig. 13**



**Fig. 14**



- mC425\_Inicio < 5 %  
mC425\_Fin sin MTX < 5 %
- mC425\_Inicio < 5 %  
mC425\_Fin sin MTX > 5 %
- mC425\_Inicio > 5 %  
mC425\_Fin sin MTX > 5 %

Fig. 15

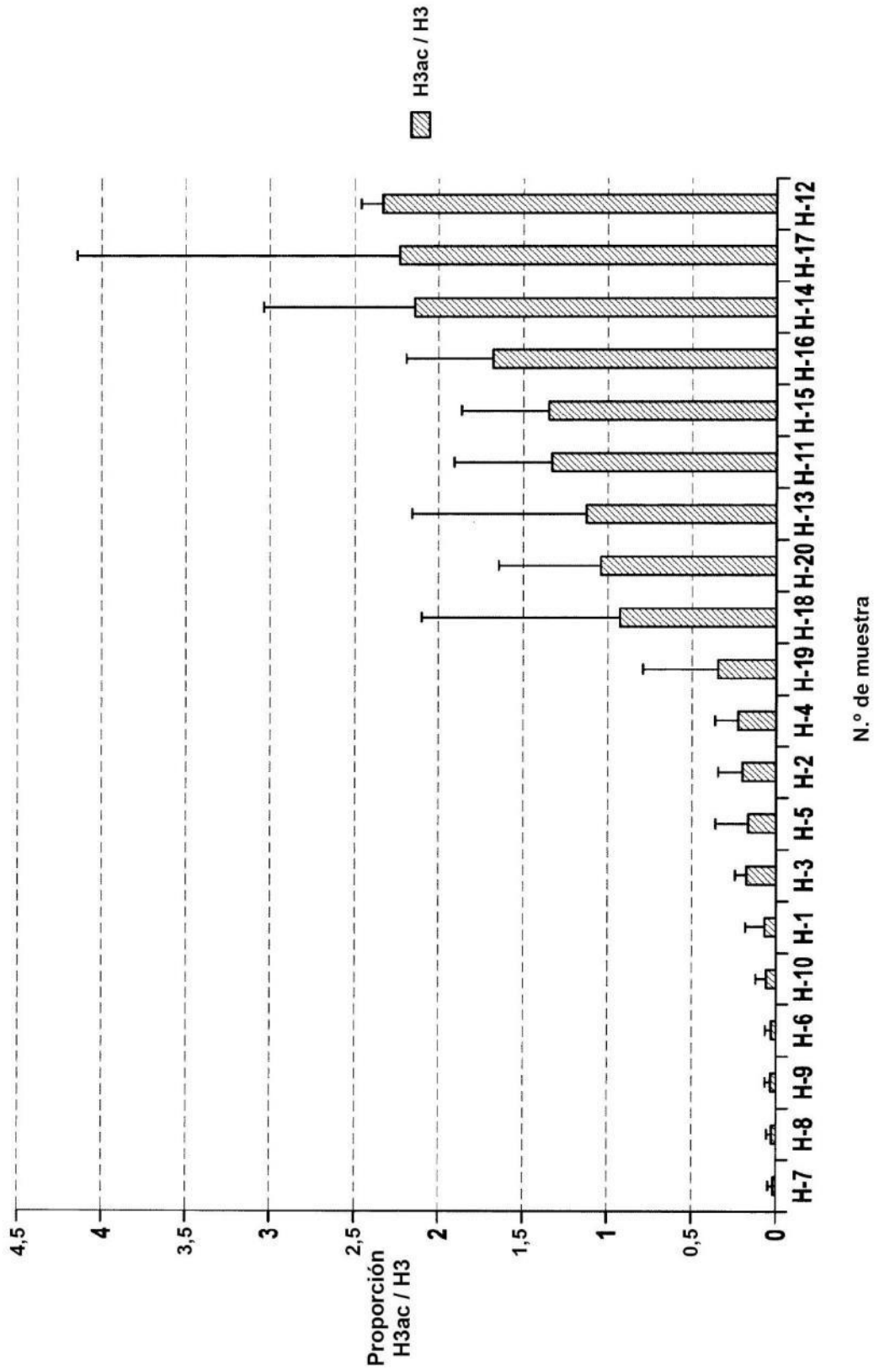
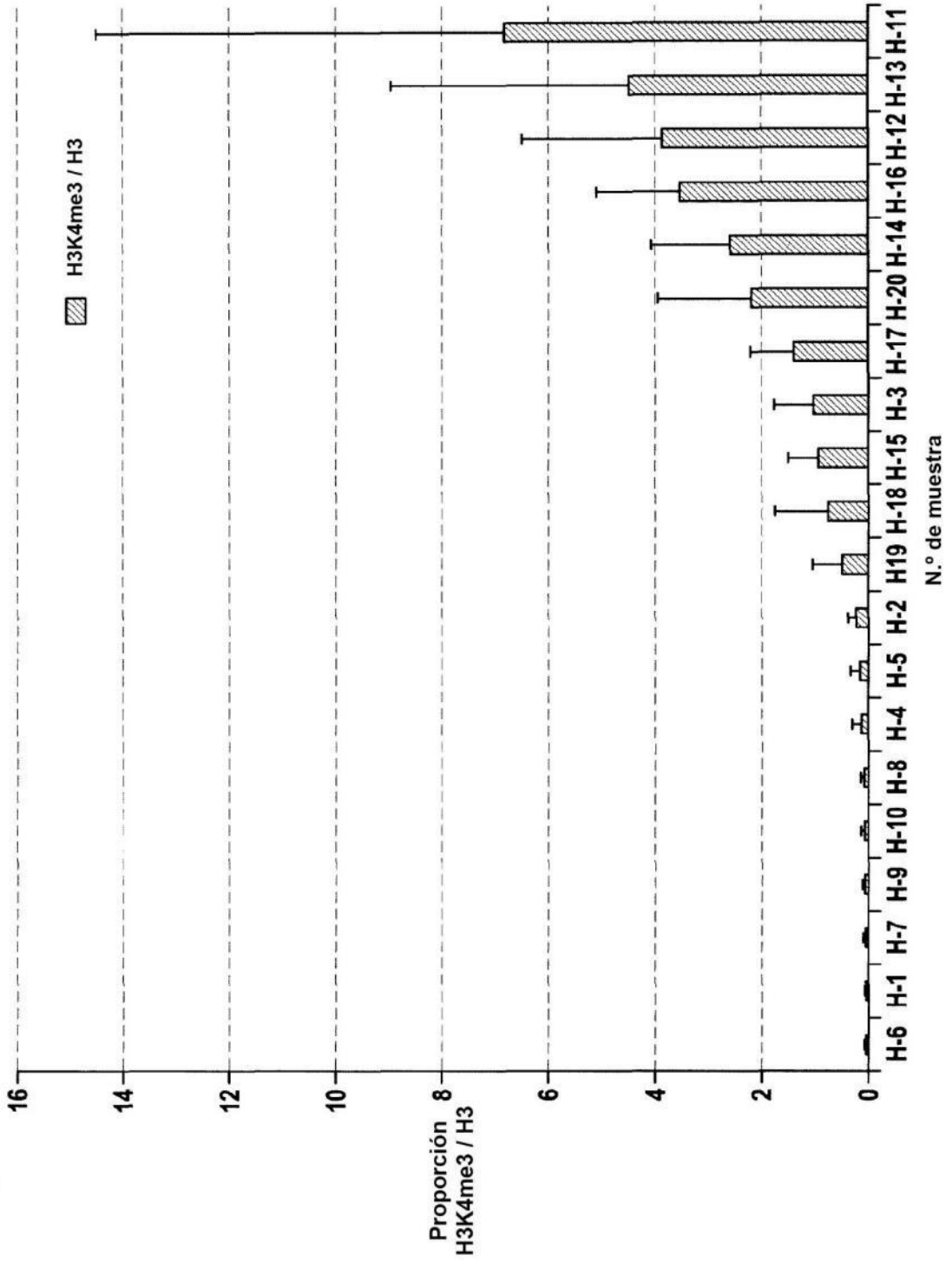


Fig. 16



**Fig. 17**

Gráfico de lo real frente a lo previsto

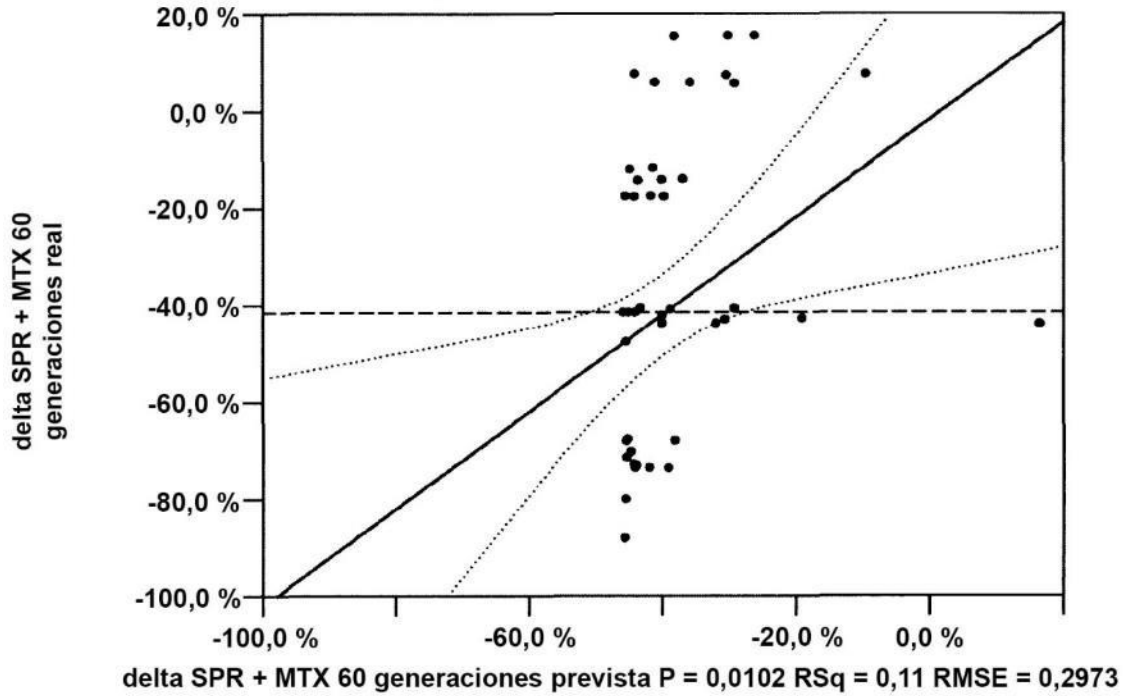
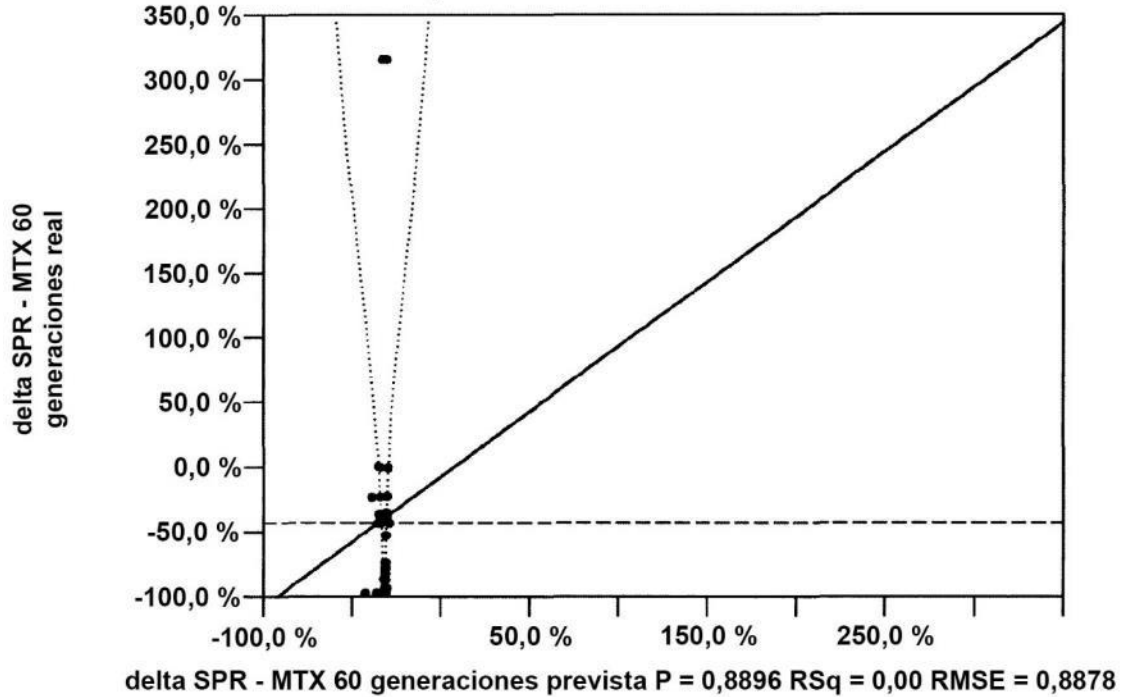
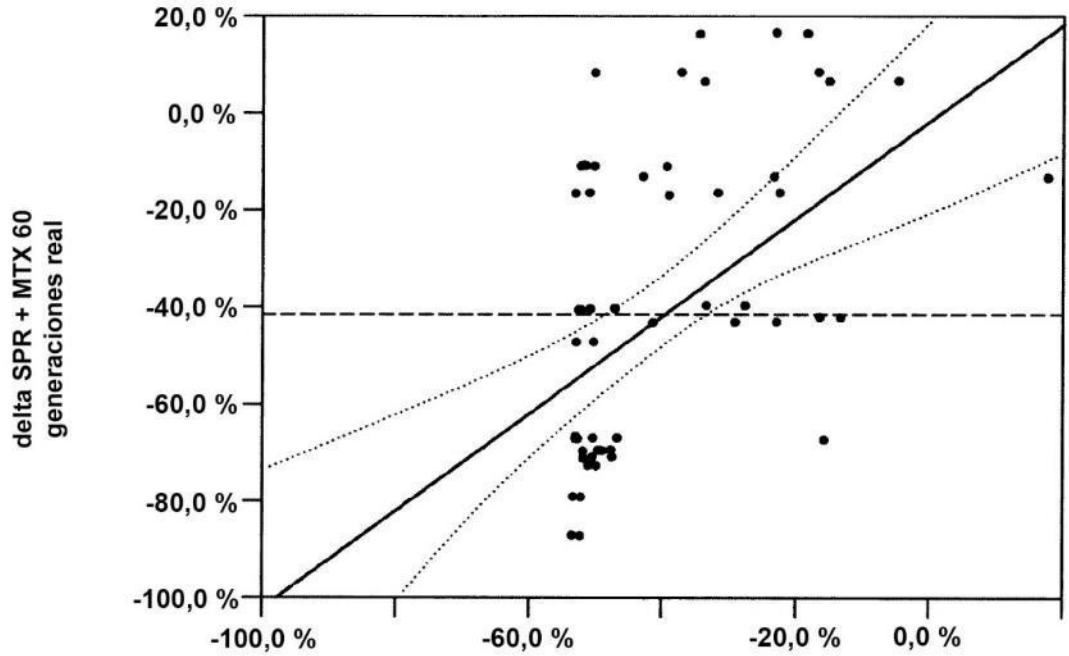


Gráfico de lo real frente a lo previsto



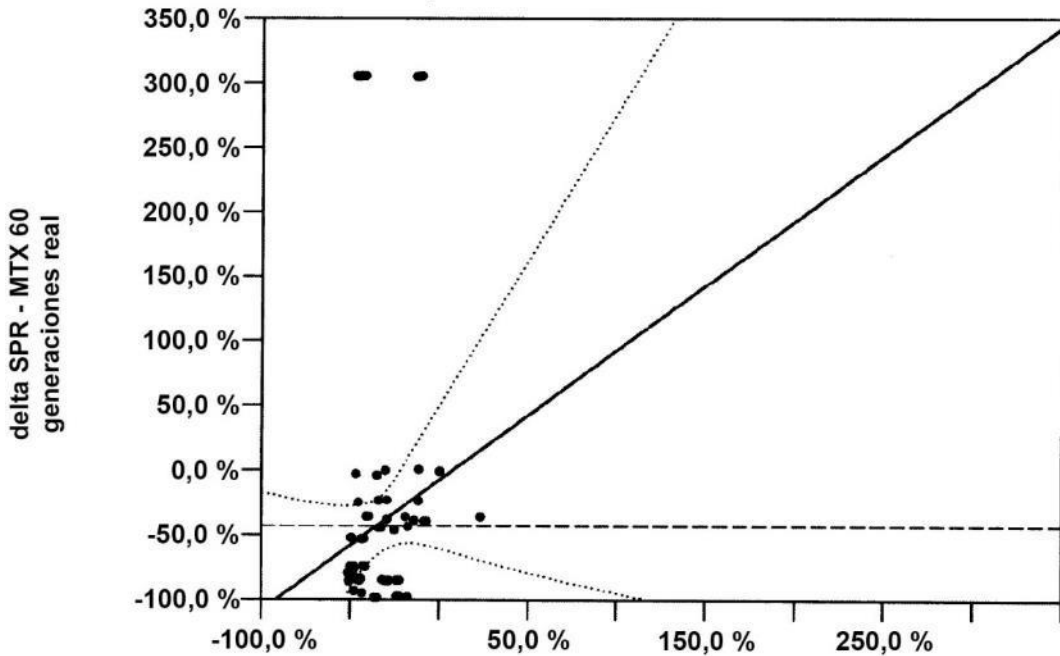
**Fig. 18**

Gráfico de lo real frente a lo previsto



delta SPR + MTX 60 generaciones prevista  $P < 0,0001$   $RSq = 0,27$   $RMSE = 0,2698$

Gráfico de lo real frente a lo previsto

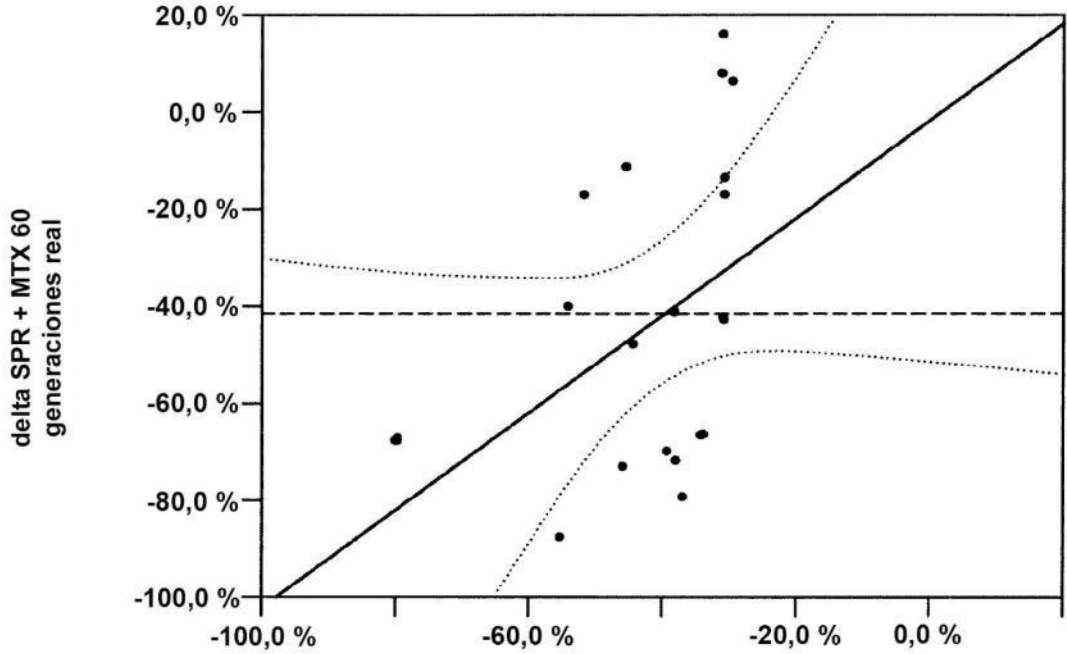


delta SPR - MTX 60 generaciones prevista  $P = 0,1449$   $RSq = 0,04$   $RMSE = 0,8714$



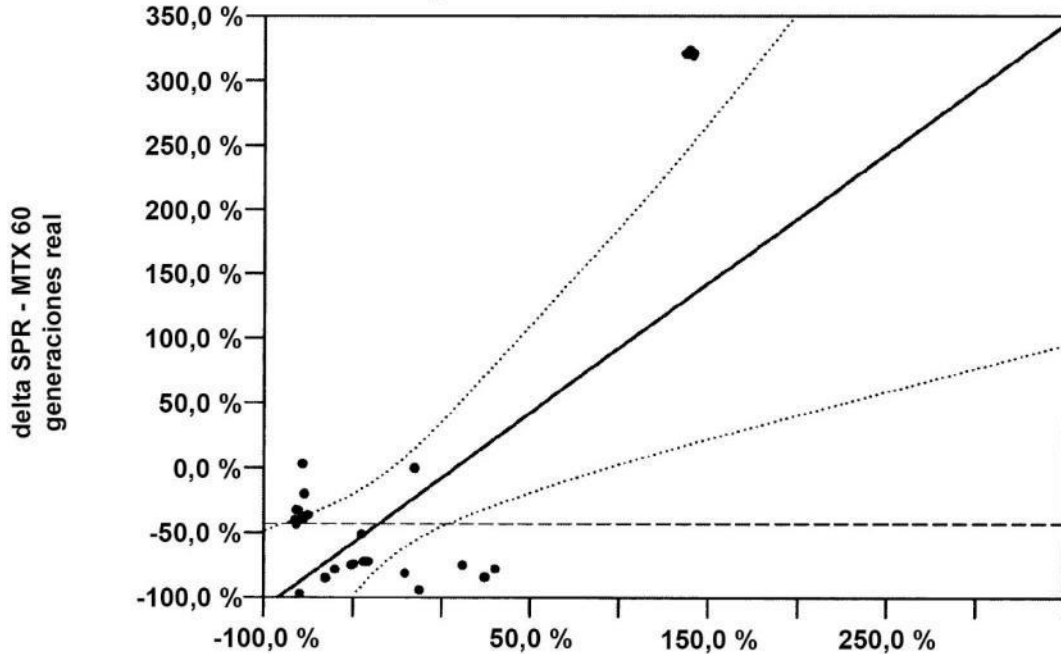
**Fig. 19**

Gráfico de lo real frente a lo previsto



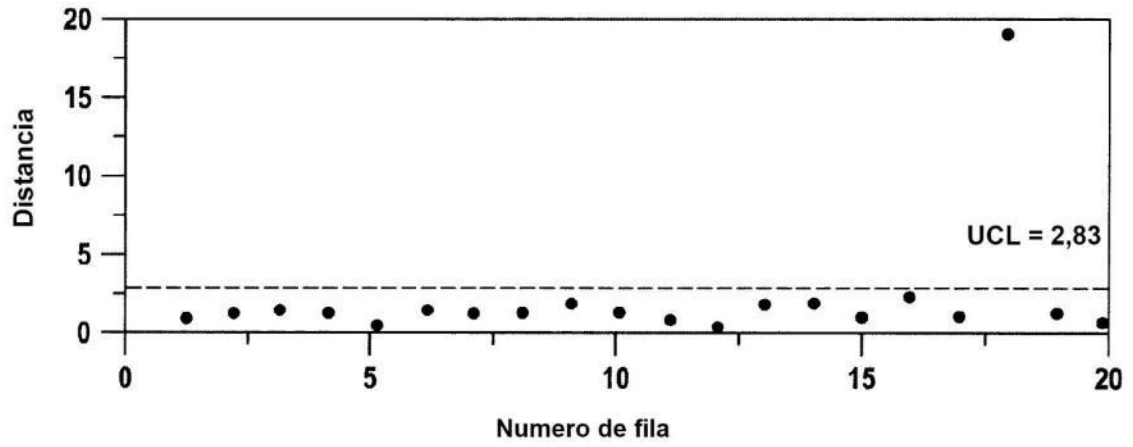
delta SPR + MTX 60 generaciones prevista P = 0,0898 RSq = 0,15 RMSE = 0,3011

Gráfico de lo real frente a lo previsto



delta SPR - MTX 60 generaciones prevista P = 0,0041 RSq = 0,38 RMSE = 0,7233

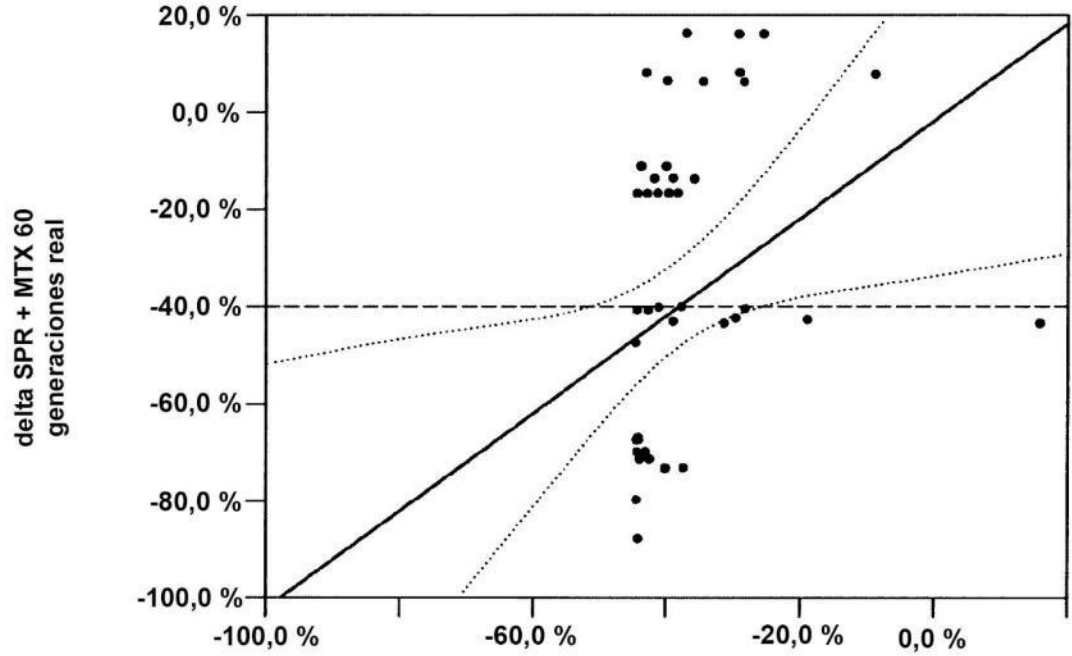
**Fig. 20**



$\alpha = 0,05$

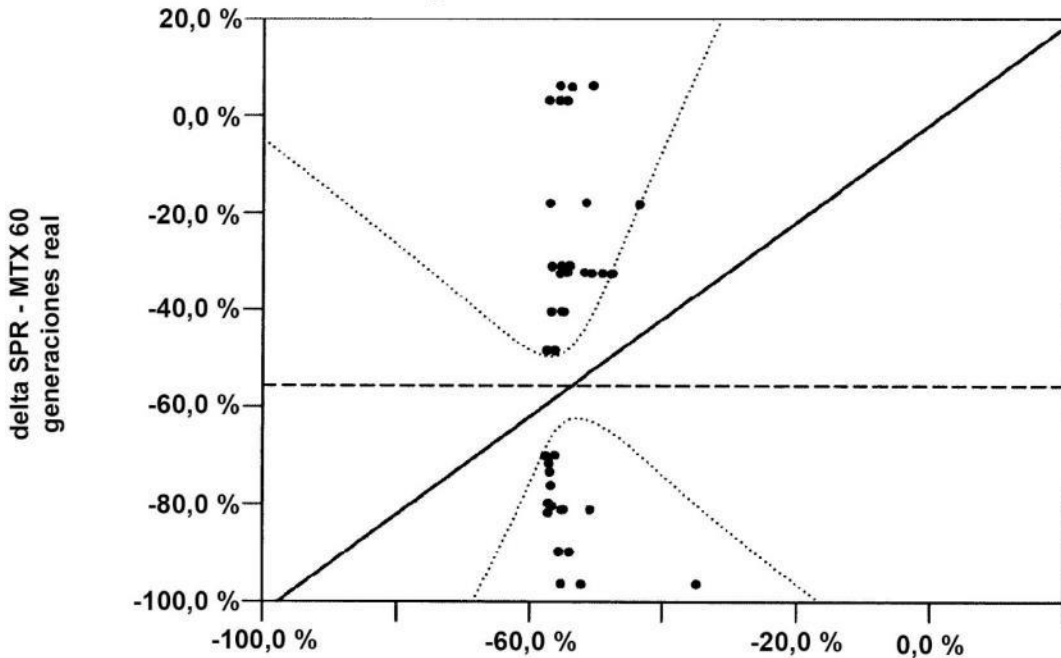
**Fig. 21**

Gráfico de lo real frente a lo previsto



delta SPR + MTX 60 generaciones prevista  $P = 0,0138$   $RSq = 0,11$   $RMSE = 0,2997$

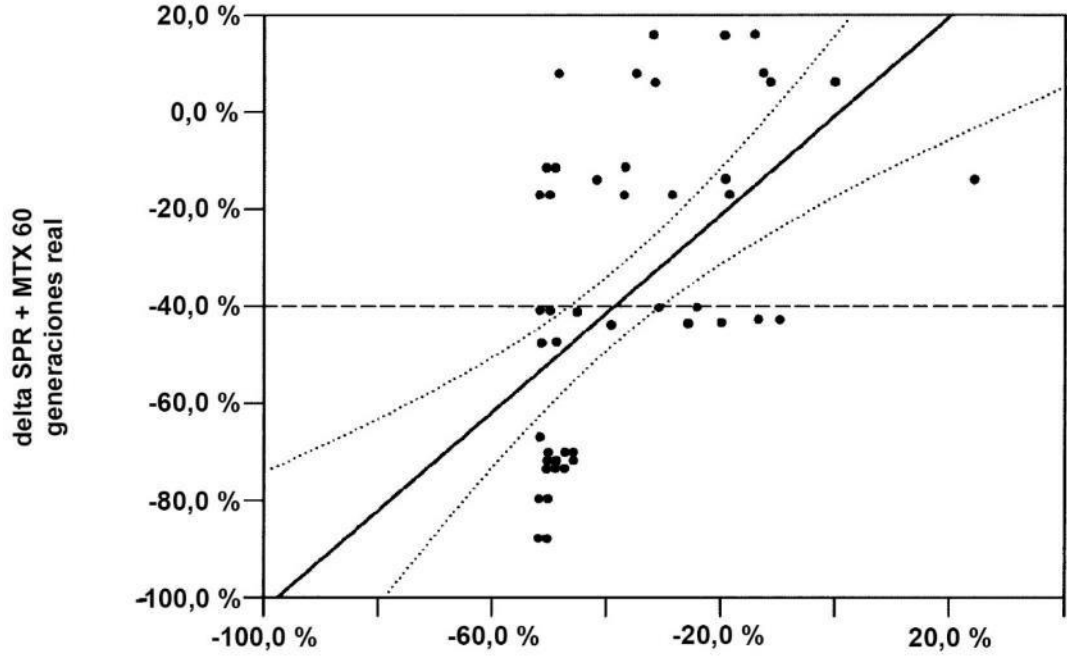
Gráfico de lo real frente a lo previsto



delta SPR - MTX 60 generaciones prevista  $P = 0,3464$   $RSq = 0,02$   $RMSE = 0,3007$

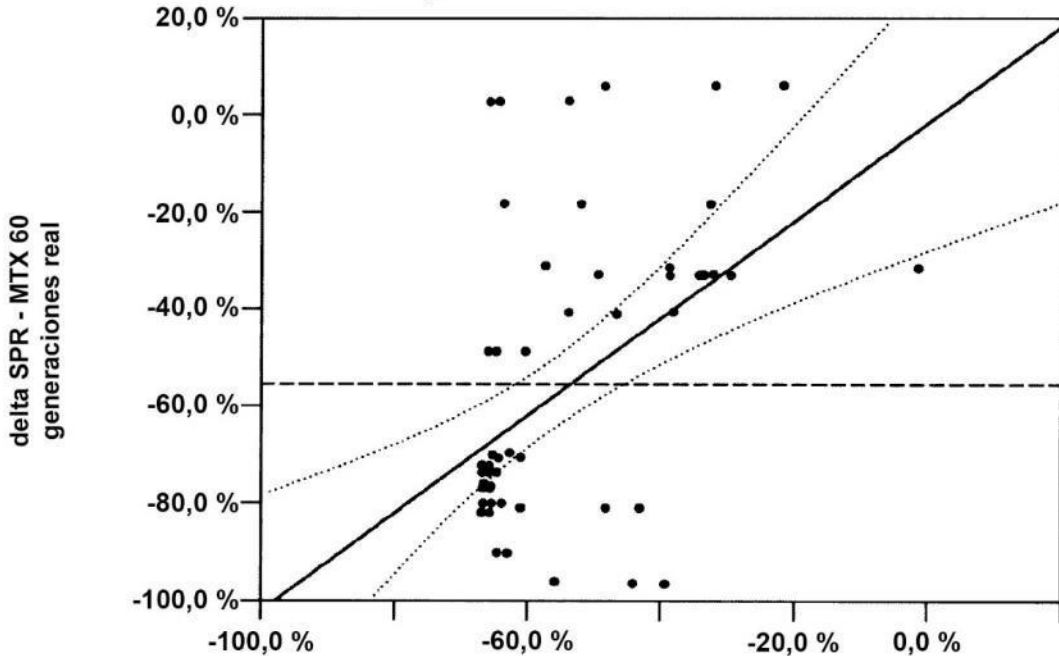
**Fig. 22**

Gráfico de lo real frente a lo previsto



delta SPR + MTX 60 generaciones prevista  $P < 0,0001$   $RSq = 0,30$   $RMSE = 0,265$

Gráfico de lo real frente a lo previsto



delta SPR - MTX 60 generaciones prevista  $P = 0,0001$   $RSq = 0,24$   $RMSE = 0,2645$

**Fig. 23**

Gráfico de lo real frente a lo previsto

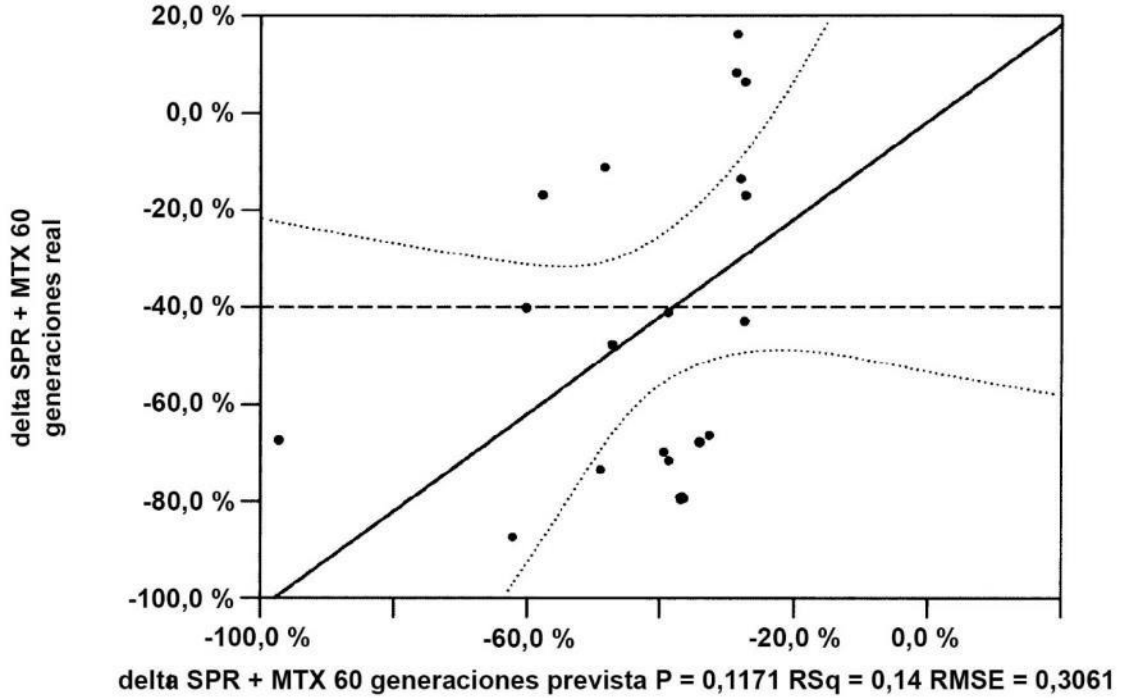


Gráfico de lo real frente a lo previsto

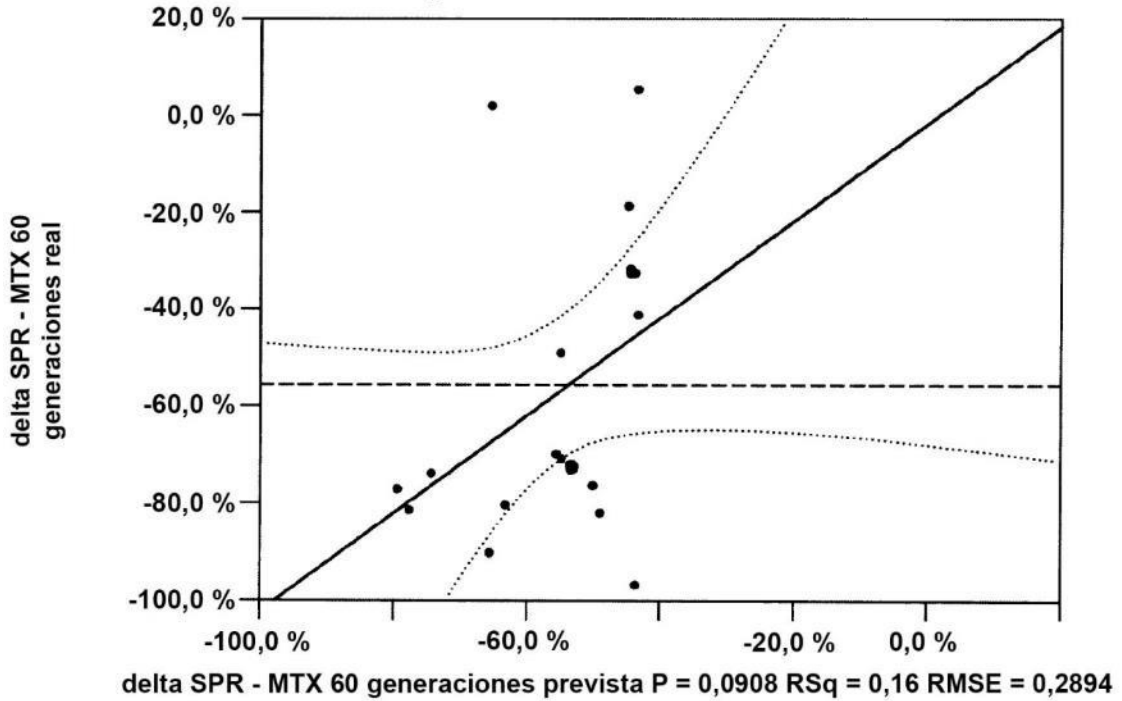


Fig. 24

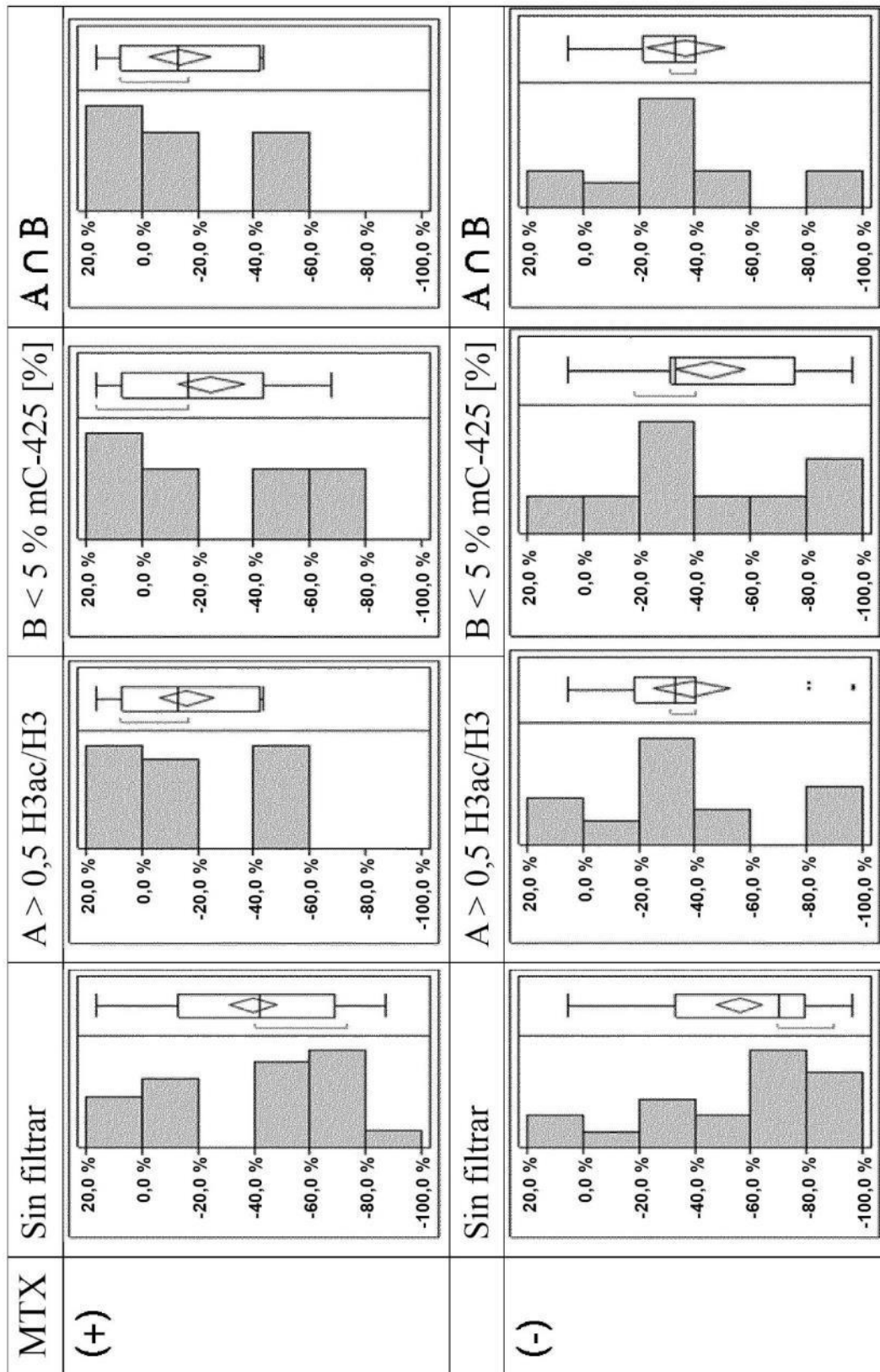
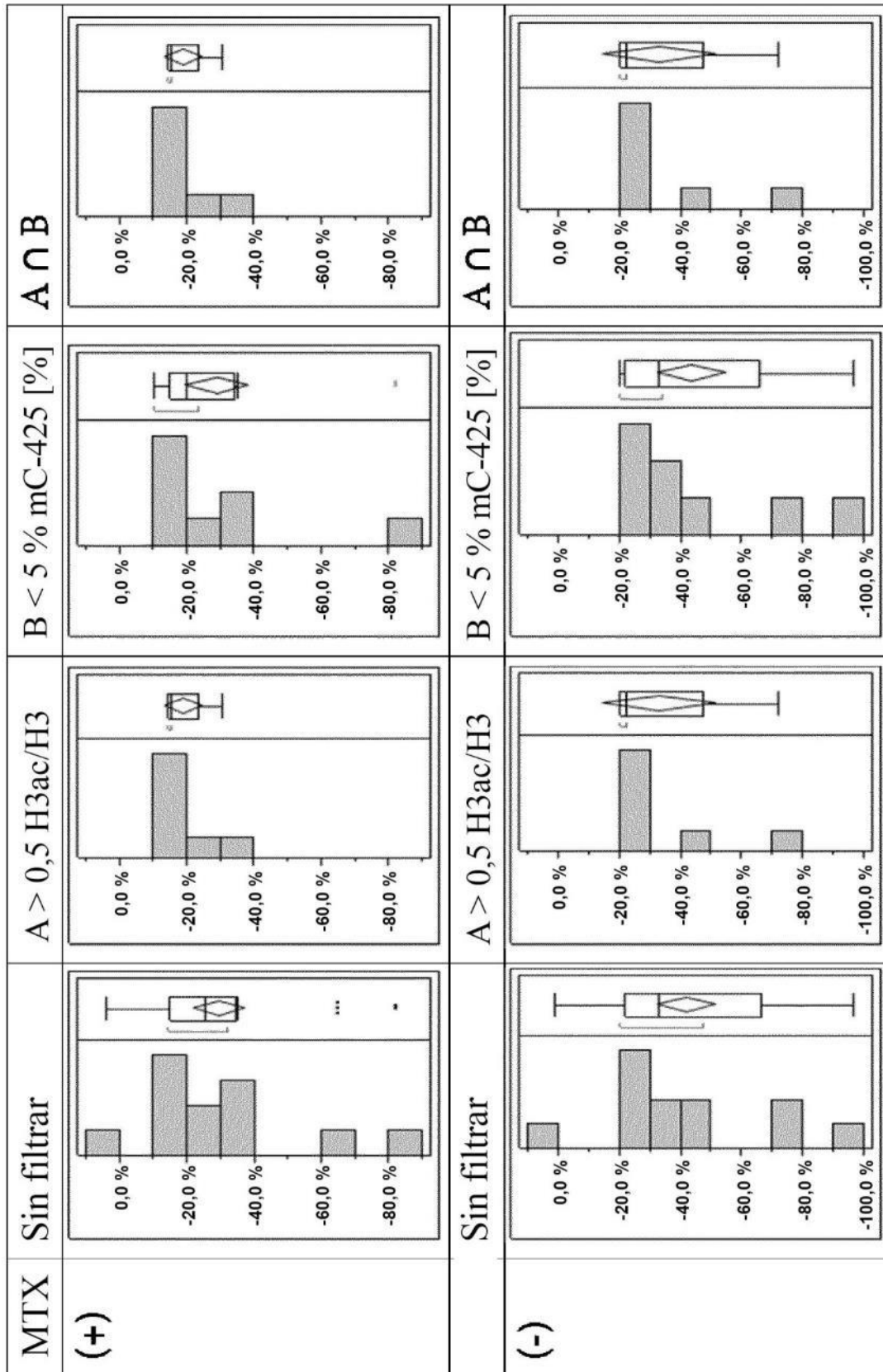
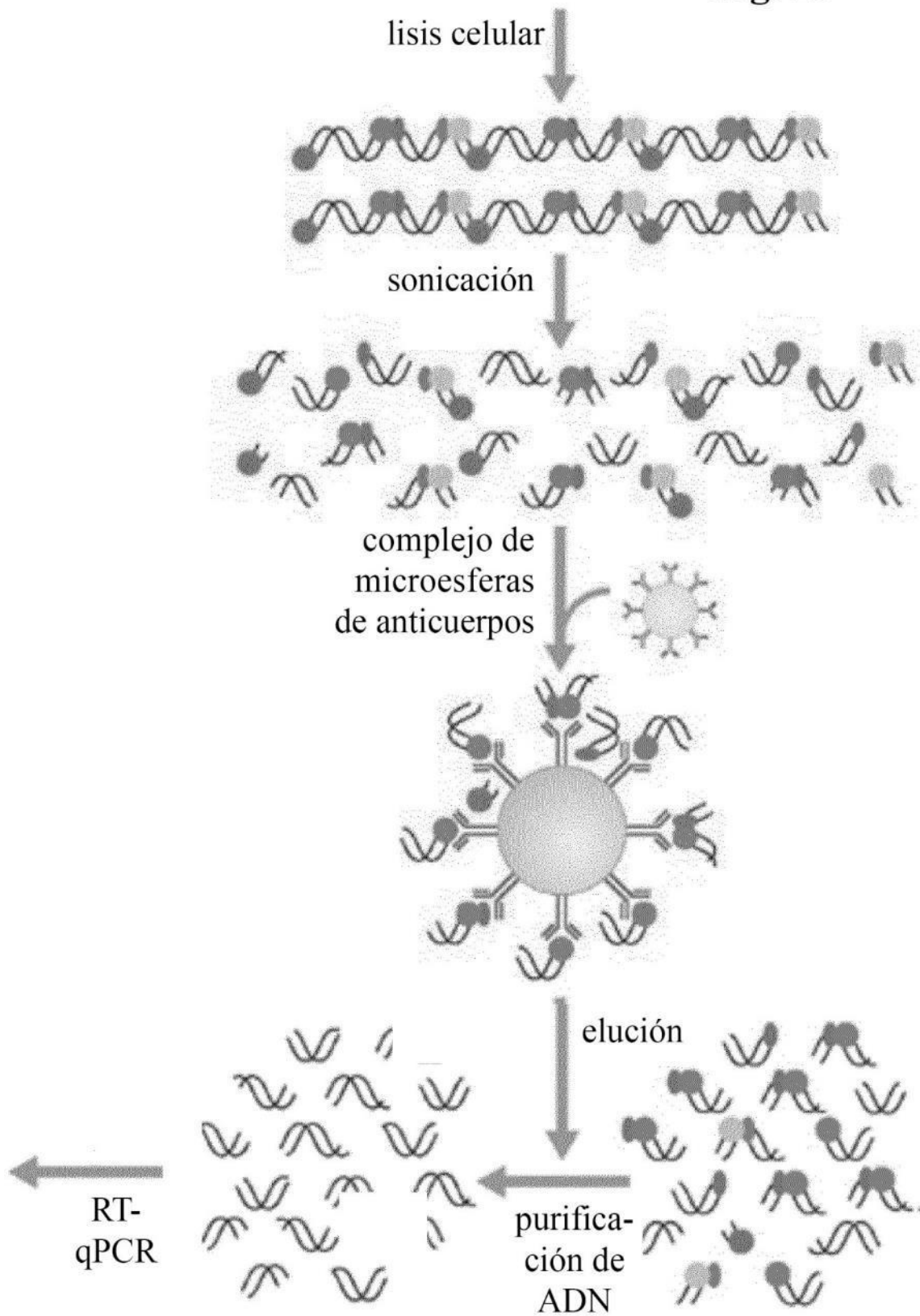


Fig. 25



**Fig. 26**





**Fig. 27**

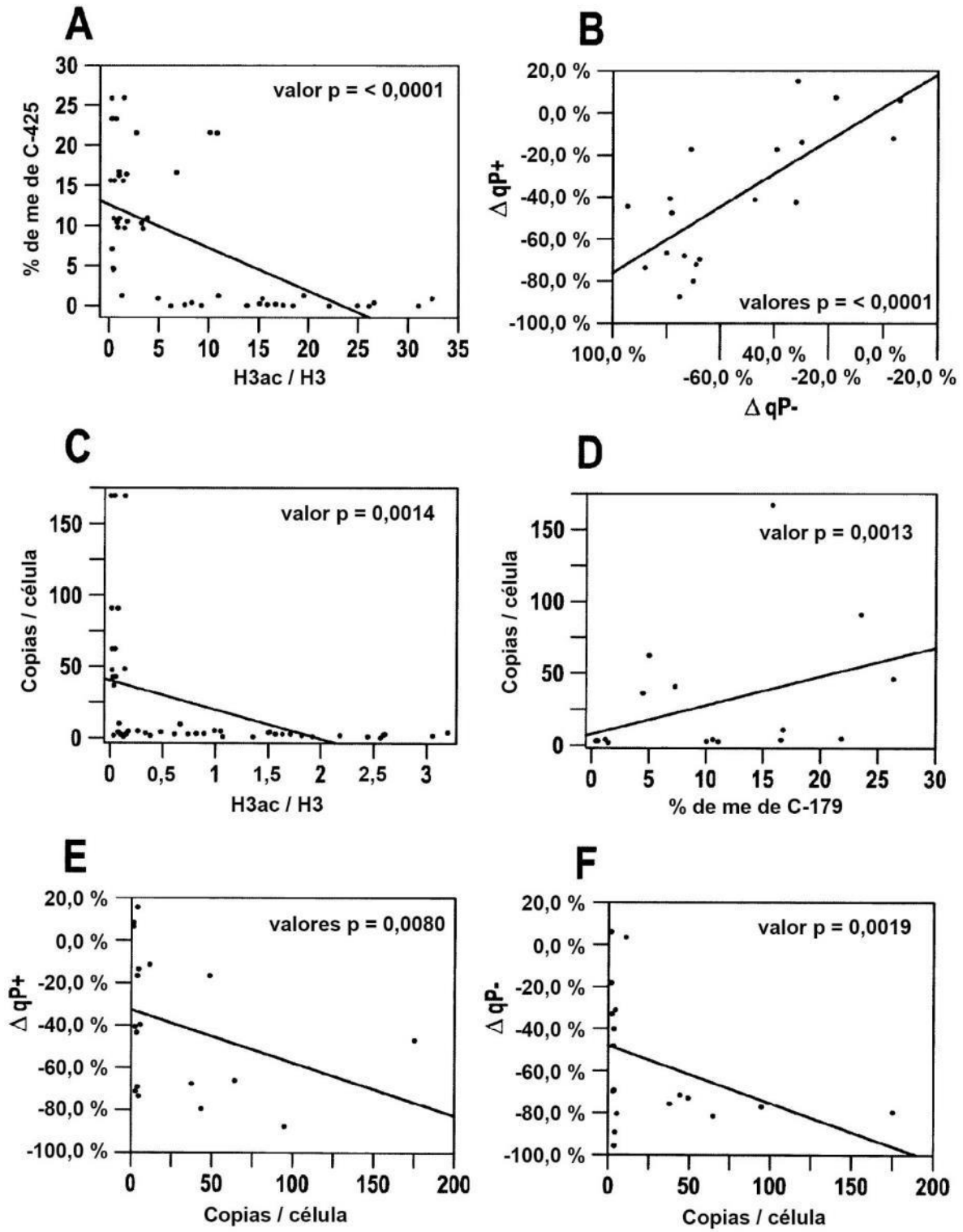


Fig. 28

