

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 108**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/025** (2006.01)

**C12N 15/85** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2011 PCT/US2011/062720**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2013 WO13081612**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2011 E 11815647 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 2785731**

54 Título: **Vectores y células hospedadoras que comprenden un promotor de SV40 modificado para la expresión de proteínas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.07.2019**

73 Titular/es:

**ABBVIE BIOTECHNOLOGY LTD (100.0%)**  
**Clarendon House, 2, Church Street**  
**HM 11 Hamilton, BM**

72 Inventor/es:

**HARTMAN, TAYMAR;**  
**TSO, YUN J. y**  
**HE, YIMIN**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 719 108 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

Vectores y células hospedadoras que comprenden un promotor de SV40 modificado para la expresión de proteínas

5 **1. Antecedentes**

Las proteínas recombinantes se utilizan en una amplia variedad de contextos, desde aplicaciones bioindustriales, donde las proteínas se utilizan en la fabricación de un producto útil desde el punto de vista comercial, tal como un biocombustible, hasta aplicaciones terapéuticas donde las proteínas se utilizan para tratar una enfermedad o afección. La producción de proteínas recombinantes se lleva a cabo en células técnicamente diseñadas para expresar tales proteínas a altos niveles y que crecen en grandes cantidades, a menudo en cultivo líquido. El proceso de desarrollo de una línea celular que produzca una proteína recombinante en grandes cantidades y esté adaptada al crecimiento en condiciones adecuadas para la producción a escala comercial es largo. Con frecuencia, el desarrollo inicial y la exploración de líneas celulares se realizan en un cultivo adherente hasta que se identifican las líneas celulares recombinantes de alto rendimiento candidatas y, posteriormente, se realiza un desarrollo adicional para optimizar las líneas celulares candidatas para la producción a gran escala en cultivo en suspensión. Con frecuencia se precisa un tiempo y esfuerzo adicionales para las proteínas recombinantes que están destinadas a aplicaciones terapéuticas en seres humanos, donde las consideraciones de seguridad favorecen el desarrollo de líneas celulares adaptadas para crecer en medios definidos, sin componentes animales heterogéneos. Por lo tanto, incluso después de que se acaba el desarrollo inicial de la línea celular, con frecuencia se precisa un ciclo adicional de desarrollo y optimización para generar una línea celular recombinante adecuada que exprese altos niveles del polipéptido de interés, que se pueda usar para la producción comercial. Este proceso es lento e ineficaz, dado que precisa múltiples ciclos de desarrollo de líneas celulares. Existe la necesidad de herramientas y procesos simplificados que acorten el tiempo necesario para desarrollar una línea celular recombinante de alto rendimiento que sea adecuada para la producción comercial de proteínas, especialmente proteínas terapéuticas.

**2. Sumario**

Como se divulga en la presente solicitud, los solicitantes han desarrollado herramientas y un método para la generación simplificada de líneas celulares de mamífero recombinantes que están adaptadas a crecer en condiciones que se asemejan a las condiciones de producción comercial. En particular, la presente divulgación está basada, en parte, en el descubrimiento por parte de los solicitantes de que los vectores de expresión que codifican un polipéptido de interés, tal como una proteína terapéutica, y un marcador de selección donde el marcador de selección está unido operativamente a, o bajo el control de, un promotor de SV40 que se ha debilitado por la delección parcial de la región potenciadora ("promotor dESV40"), se pueden usar para generar líneas celulares recombinantes que tengan la capacidad de producir el polipéptido de interés en un cultivo con un alto rendimiento.

En conformidad con la presente invención, se proporciona una célula de ovario de hámster chino (CHO) transfectada de forma estable con un vector, en donde el vector comprende:

- (i) un casete de expresión, donde el casete de expresión comprende una primera secuencia polinucleotídica que codifica un primer polipéptido de interés unido operativamente a un primer promotor de expresión que tiene la capacidad de efectuar la expresión del primer polipéptido en una célula de mamífero; y
- (ii) una secuencia polinucleotídica que codifica un marcador de selección unido operativamente a un promotor dESV40, en la que el promotor dESV40 consiste en la SEQ ID NO:1.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula de ovario de hámster chino (CHO) transfectada de forma estable con un vector útil para efectuar la expresión de un anticuerpo de interés, en donde el vector comprende:

- (i) un casete de expresión, donde el casete de expresión comprende una primera secuencia polinucleotídica que codifica una cadena pesada de un anticuerpo de interés, unida operativamente a un primer promotor de expresión que tiene la capacidad de efectuar la expresión de la cadena pesada codificada en una célula de mamífero, y una segunda secuencia polinucleotídica que codifica una cadena ligera de un anticuerpo de interés, unida operativamente a un segundo promotor de expresión que tiene la capacidad de efectuar la expresión de la cadena ligera codificada en una célula de mamífero; y
- (ii) una secuencia polinucleotídica que codifica un marcador de selección unido operativamente a un promotor dESV40, en que el promotor dESV40 consiste en la SEQ ID NO:1.

Los inventores describen vectores útiles para desarrollar líneas celulares de mamífero recombinantes que expresan de forma estable altos niveles de un polipéptido de interés, tal como una proteína terapéutica (por ejemplo, un anticuerpo terapéutico). Generalmente, los vectores comprenden una secuencia polinucleotídica que codifica un marcador de selección (secuencia codificante de marcador de selección) y un casete de expresión que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido de interés (secuencia codificante de un polipéptido). El casete de expresión comprende una secuencia codificante de un polipéptido unida operativamente a, o bajo el control de, un promotor que tenga la capacidad de efectuar la expresión en una línea celular de mamífero de interés ("promotor de expresión"), por ejemplo una línea celular de mamífero que se usará a gran escala o en la producción comercial

del polipéptido codificado. La secuencia codificante del marcador de selección está unida operativamente a, o bajo el control de, un promotor de un marcador de selección. Como se proporciona en el presente documento, el promotor del marcador de selección útil para la expresión en células hospedadoras de mamífero es un promotor dESV40. En la **FIG. 1**, se ilustra una secuencia polinucleotídica que codifica un promotor dESV40. Los vectores también pueden incluir promotores y regiones codificantes para la expresión de polipéptidos adicionales de interés, marcadores de selección adicionales y/o elementos o características adicionales útiles para expresar el polipéptido (o los polipéptidos) de interés en células hospedadoras de mamífero, como es conocido en la materia. En la **FIG. 2C** y la **FIG. 2E** se ilustran realizaciones específicas de vectores como se divulgan en el presente documento que incluyen secuencias señal de poliadenilación opcionales.

Los inventores también describen, que cuando la célula hospedadora de mamífero es una célula CHO, el vector de expresión puede comprender una secuencia codificante de un marcador de selección unida operativamente a un promotor de un marcador de selección distinto. En tales realizaciones, el promotor de marcador de selección puede ser un promotor de SV40 debilitado por una mutación en la región rica en TA, como se describe en la **Sección 4.1.2** en el presente documento.

Los vectores descritos en el presente documento no están limitados con respecto a los tipos o el origen de los polipéptidos que pueden usarse para expresar y, de hecho, pueden usarse para expresar prácticamente cualquier polipéptido de interés. En particular, los vectores son útiles para expresar proteínas terapéuticas de origen mamífero y/o humano, tal como, por ejemplo, inmunomoduladores, hormonas, incluyendo hormonas de crecimiento, proteínas sanguíneas, enzimas, antígenos para vacunas e inmunoglobulinas, incluyendo anticuerpos terapéuticos. Otros polipéptidos de interés se describen a continuación en la **Sección 4.1.1**.

Los vectores tampoco están limitados con respecto a la elección del promotor de expresión. El único requisito es que el promotor de expresión tenga la capacidad de efectuar la expresión en la línea celular de mamífero que se usará para expresar el polipéptido codificado de interés. El promotor de expresión puede ser activo de forma constitutiva o inducible, como se conoce en la técnica. En algunas realizaciones, el promotor de expresión es más fuerte que el promotor del marcador de selección. Se conoce en la técnica una amplia diversidad de promotores que expresan polipéptidos adecuados, e incluyen a modo de ejemplo pero sin limitación, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV IE). A continuación, en la **Sección 4.1.1**, se describen promotores adicionales de interés. Cualquiera de estos promotores puede usarse en el vector descrito en el presente documento. El promotor específico usado será adecuado para la línea celular de mamífero usada para expresar el polipéptido codificado de interés.

El marcador de selección confiere a las células transfectadas con un vector como se describe en el presente documento un rasgo o característica que puede usarse para seleccionar o identificar células transfectadas de células no transfectadas, como es conocido en la técnica. Los rasgos comúnmente utilizados para selección incluyen, pero sin limitación, resistencia a una toxina, metal pesado, antibiótico, u otro agente, prototropía en un hospedador auxótrofo, la capacidad de crecer en un medio que carece de un nutriente esencial, la capacidad de sintetizar un metabolito esencial, etc. Se conoce en la técnica una diversidad de marcadores de selección en el contexto de vectores de expresión que confieren uno o más de estos rasgos. A continuación en la **Sección 4.1.2** se describen marcadores de selección adecuados. En una realización específica de los vectores descritos en el presente documento, el marcador de selección codifica dihidrofolato reductasa (DHFR), que permite que las células transfectadas crezcan en medios que carecen de hipoxantina y timidina, y confiere resistencia al metotrexato, o xantina-guanina fosforribosiltransferasa (XGPRT), una enzima de la ruta de rescate de las purinas que confiere resistencia al ácido micofenólico a las células transfectadas.

En una realización específica, los vectores descritos en el presente documento son útiles para expresar anticuerpos terapéuticos. Dichos vectores específicos generalmente comprenden (i) un casete de expresión que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica la cadena pesada del anticuerpo terapéutico de interés ("secuencia codificante de la cadena pesada"), y una secuencia polinucleotídica que codifica la cadena ligera del anticuerpo terapéutico de interés ("secuencia codificante de cadena ligera"), y (ii) una secuencia codificante de un marcador de selección. Las secuencias codificantes de la cadena pesada y la cadena ligera están cada una unidas operativamente a, o bajo el control de, promotores de expresión, que pueden ser iguales o distintos, pero, preferentemente, son iguales. Como alternativa, las secuencias codificantes de las cadenas pesada y ligera se pueden separar por un sitio interno de entrada al ribosoma ("IRES") y pueden estar unidas operativamente a, o bajo el control de, un promotor de expresión individual. La secuencia codificante del marcador de selección está unida operativamente a, o bajo el control de, un promotor dESV40 descrito en el presente documento. En las **FIG. 2C** y **2E** se ilustran realizaciones ejemplares de vectores útiles para producir polipéptidos terapéuticos de interés. En una realización específica de vectores útiles para expresar anticuerpos terapéuticos, el anticuerpo codificado para la expresión es distinto de elotuzumab.

Los vectores descritos en el presente documento pueden usarse para transfectar de forma estable células de mamíferos que se han adaptado a crecer en cultivo, preferentemente en cultivo en suspensión, produciendo cepas de células útiles para producir en cultivo celular el polipéptido (o polipéptidos) codificado con un alto rendimiento. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente divulgación proporciona células de mamífero recombinantes que tienen la capacidad de producir un polipéptido de interés en un cultivo con un alto rendimiento. En una realización específica, la célula de mamífero recombinante puede ser una célula de mamífero que se ha adaptado a crecer en cultivo en suspensión y

que se ha transfectado con un vector como se describe en el presente documento. Las células hospedadoras de mamífero que se han adaptado a crecer en cultivo en suspensión y que se pueden usar para crear las células de mamífero recombinantes son células de ovario de hámster chino (CHO) (por ejemplo, CHO-S, DG44 y DXB-11).

- 5 Los solicitantes han desarrollado un procedimiento rápido para desarrollar una línea celular de mamífero recombinante que tiene la capacidad de una alta producción volumétrica, o rendimiento, de un polipéptido de interés. Las células de mamífero recombinantes que tienen la capacidad de producir un polipéptido de interés con alto rendimiento en cultivo podrían obtenerse en ausencia de amplificación génica, acortando el tiempo desde la transfección hasta la identificación de células de mamífero recombinantes adecuadas. El procedimiento se puede llevar a cabo en un cultivo en suspensión, lo que permite el aislamiento de células de mamíferos adecuadas para el crecimiento en las condiciones oportunas para la producción comercial. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona adicionalmente un método para producir una célula de mamífero recombinante, preferentemente adaptada a cultivos en suspensión, que tiene la capacidad de producir una proteína recombinante en un cultivo con un alto rendimiento. El método generalmente comprende transfectar una célula de mamífero con un vector de la presente divulgación y seleccionar una célula que tenga la capacidad de producir altas cantidades de un polipéptido de interés. Cuando el polipéptido de interés es una inmunoglobulina, por ejemplo, un anticuerpo, el método comprende transfectar una célula de mamífero con un vector de la presente divulgación y seleccionar una célula que tenga la capacidad de producir al menos 0,5 g/l de un polipéptido de interés en un cultivo discontinuo alimentado de 10 días.
- 10
- 15
- 20 Además, en el presente documento se proporcionan métodos para utilizar las células de mamífero recombinantes descritas en el presente documento para producir un polipéptido de interés. En general, los métodos comprenden cultivar una célula de mamífero recombinante transfectada de forma estable en condiciones que dan como resultado la expresión del polipéptido de interés. Los métodos pueden incluir adicionalmente una etapa de recuperación del polipéptido de interés a partir de medio de cultivo o de lisados celulares. El método puede comprender etapas adicionales de aislamiento o purificación, como se describe a continuación en la **Sección 4.4**.
- 25

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un vector que comprende un promotor dESV40 unido operativamente a una secuencia codificante de polipéptido. El promotor dESV40 corresponde a la SEQ ID NO:1, mostrada en la **FIG. 1**.

30 **3. Breve descripción de las figuras**

La **FIG. 1** proporciona la secuencia de nucleótidos de una realización de un promotor dESV40 como se describe en el presente documento;

35 Las **FIG. 2A-F** proporcionan ilustraciones esquemáticas de vectores de expresión que comprenden un casete de expresión para efectuar la expresión de uno o más polipéptidos de interés y un marcador de selección unido operativamente a un promotor dESV40 o uno de SV40 de tipo silvestre ("wtSV40");

40 La **FIG. 2A** es una ilustración esquemática de un vector de expresión ejemplar de la presente divulgación, que comprende un casete de expresión que comprende una primera secuencia codificante de polipéptido unida operativamente a un promotor de expresión, y una secuencia codificante de un marcador de selección unida operativamente a un promotor dESV40;

45 La **FIG. 2B** proporciona una ilustración esquemática de un vector de expresión ejemplar de la presente divulgación, que comprende un casete de expresión que comprende las secuencias codificantes de los primero y segundo polipéptidos unidas operativamente a un único promotor de expresión, un sitio interno de entrada al ribosoma entre la primera y segunda secuencias codificantes de polipéptido, y una secuencia codificante de marcador de selección unida operativamente a un promotor dESV40;

50 La **FIG. 2C** proporciona una ilustración esquemática de un vector de expresión ejemplar de la presente divulgación para expresar la proteína X, pVI.dESV40.X, que comprende un casete de expresión que comprende las primera y segunda secuencias codificantes de polipéptido, que son secuencias génicas genómicas o sintéticas, cada una unida operativamente a un promotor de expresión (promotor de expresión 1), una secuencia codificante de marcador de selección unida operativamente a un promotor dESV40, y una señal de poliadenilación (pA) en el extremo 3' de la secuencia codificante de marcador de selección y las primera y segunda secuencias codificantes de polipéptido;

60 La **FIG. 2D** proporciona una ilustración esquemática de un vector de control para expresar la proteína X, pVI.wtSV40.X, que comprende un casete de expresión que comprende las primera y segunda secuencias codificantes de polipéptido, que son secuencias génicas genómicas o sintéticas, cada una unida operativamente a un promotor de expresión (promotor de expresión 1), una secuencia codificante de marcador de selección unida operativamente a un promotor wtSV40, y una señal de poliadenilación (pA) en el extremo 3' de la secuencia codificante de marcador de selección y las primera y segunda secuencias codificantes de polipéptido;

65 La **FIG. 2E** proporciona una ilustración esquemática de un vector de expresión ejemplar de la presente divulgación

para expresar la proteína X, pV2.dESV40.X, que comprende un casete de expresión que comprende una primera y segunda secuencias codificantes de polipéptido, que son secuencias de ADNc, cada una unida operativamente a un promotor de expresión (promotor de expresión 2), una secuencia codificante de marcador de selección unida operativamente a un promotor dESV40, y una señal de poliadenilación (pA) en el extremo 3' de la secuencia codificante de marcador de selección y las primera y segunda secuencias codificantes de polipéptido;

La **FIG. 2F** proporciona una ilustración esquemática de un vector de control para expresar la proteína X, pV2.wtSV40.X, que comprende un casete de expresión que comprende las primera y segunda secuencias codificantes de polipéptido, que son secuencias de ADNc, cada una unida operativamente a un promotor de expresión (promotor de expresión 2), una secuencia codificante de marcador de selección unida operativamente a un promotor wtSV40, y una señal de poliadenilación (pA) en el extremo 3' de la secuencia codificante de marcador de selección y las primera y segunda secuencias codificantes de polipéptido;

La **FIG. 3** proporciona un diagrama de flujo de un procedimiento para identificar células de mamífero recombinantes de alto rendimiento;

Las **FIG. 4A-B** proporcionan un gráfico del rendimiento de proteína (µg/ml) de las células de mamífero recombinantes transfectadas con vectores que portan un promotor dESV40 o un promotor wtSV40. La **FIG. 4A** muestra el rendimiento de proteína para la proteína de prueba DVD1 expresada en los vectores pV1.dESV40.DVD1, pV2.dESV40.DVD1 o pV2.wtSV40.DVD1. La **FIG. 4B** muestra el rendimiento de proteína para la proteína de prueba Abl expresada en los vectores pV1.dESV40.Ab1 o pV1.wtSV40.Ab1;

Las **FIG. 5A-B** proporcionan gráficos del rendimiento de proteína (µg/ml) a partir de células de mamífero recombinantes generadas mediante la transfección de tres líneas celulares de mamífero distintas con el vector de expresión pV1.dESV40.Abl (**FIG. 5A**) o pV1.dESV40.Ab2 (**FIG. 5B**); y la **FIG. 6** proporciona un gráfico del rendimiento de proteína (µg/ml) de las células de mamífero recombinantes transfectadas con pV1.dESV40.Ab1 o pV1.dESV40.Ab2, seleccionadas en medio sin componentes animales con o sin suplementación con ZAP-CHO® ("sin ZAP" frente a "ZAP").

#### 4. Descripción detallada

Como se muestra en el Ejemplo a continuación, los solicitantes han descubierto que los vectores de expresión que portan un marcador de selección unido operativamente a, o bajo el control de, un promotor temprano del virus de simio (SV40), que se ha debilitado por la delección parcial de la región potenciadora, cuya secuencia de nucleótidos se muestra en la **FIG. 1**, además de un casete de expresión que incluye una secuencia codificante de polipéptido para un polipéptido de interés bajo el control de un promotor operativo en una célula de mamífero, se puede usar para generar líneas celulares recombinantes que tienen un alto rendimiento del polipéptido de interés. Sin quedar ligado a teoría alguna, se cree que los marcadores de selección bajo el control de los promotores SV40 en los que los elementos potenciadores se han deleccionado parcialmente ("dESV40") facilitan la identificación de células de mamífero transfectadas de forma estable en las que el vector de expresión está integrado en una región cromosómica que es transcripcionalmente activa, produciendo altos niveles de expresión del polipéptido de interés en ausencia de amplificación génica. Utilizando líneas celulares de mamífero que ya están adaptadas al crecimiento en cultivo en suspensión como células hospedadoras, los solicitantes han desarrollado adicionalmente un procedimiento acortado para la generación de células de mamífero recombinantes que tienen la capacidad de producir altos niveles de un polipéptido de interés. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona vectores de expresión, células recombinantes de mamífero que tienen la capacidad de producir altos niveles de un polipéptido de interés, y métodos para producir y usar tales células de mamífero recombinantes.

#### 4.1. Vectores de expresión

Los vectores de expresión de la presente divulgación comprenden un casete de expresión y una secuencia polinucleotídica que codifica un marcador de selección (secuencia codificante del marcador de selección), bajo el control de un promotor de SV40 que se ha debilitado por la delección parcial de la región potenciadora. Cada uno de estos componentes se describe con mayor detalle a continuación.

##### 4.1.1. Casetes de expresión

Los casetes de expresión comprenden una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido de interés (secuencia codificante del polipéptido) unida operativamente, o bajo el control de, un promotor que tenga la capacidad de efectuar la expresión en una línea celular de mamífero de interés ("promotor de expresión"). Los casetes de expresión pueden comprender una o más secuencias codificantes de polipéptidos. Por consiguiente, los casetes de expresión comprenden al menos una primera, y opcionalmente una segunda, tercera, cuarta, etc., secuencia codificante de un polipéptido. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los casetes de expresión comprenden una primera y segunda secuencias codificantes de polipéptido, que pueden estar bajo el control de un único promotor o promotores distintos.

5 Cuando la primera secuencia codificante de polipéptido está unida operativamente a, o bajo el control de, un primer promotor de expresión y la segunda secuencia polipeptídica está bajo el control de un segundo promotor de expresión, los primero y segundo promotores pueden ser iguales o distintos. Cuando dos o más secuencias codificantes de polipéptido están bajo el control de un único promotor de expresión, como se representa en la **FIG. 2B**, se incluye preferentemente un sitio interno de unión a ribosoma ("IRES") entre cada secuencia codificante de polipéptido.

10 La secuencia codificante de polipéptido puede ser de un eucariota o un procariota, y puede ser una secuencia genómica, un gen sintético o una secuencia de ADNc. Cuando la secuencia codificante de polipéptido es de un gen eucariota, puede, pero no necesariamente, incluir intrones que se pueden cortar y empalmar durante el procesamiento transcripcional en la célula de mamífero.

15 La secuencia codificante de polipéptido puede ser una fusión de dos o más secuencias codificantes y contener múltiples dominios funcionales en un único polipéptido, denominado proteína de fusión. Una proteína de fusión puede incorporar secuencias diseñadas para garantizar un procesamiento o direccionamiento adecuado del polipéptido dentro de la célula hospedadora, por ejemplo, una secuencia señal, como se analizará más adelante. Las proteínas de fusión también pueden contener secuencias que facilitan la detección o purificación del polipéptido de interés, tal como una secuencia que codifica una etiqueta epitópica que es reconocida por un anticuerpo anti-etiqueta. La secuencia codificante de la etiqueta epitópica se coloca generalmente en un extremo (carboxilo o amino) de la secuencia codificante del polipéptido de interés. Están disponibles diversos polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos. Los ejemplos se incluyen etiquetas de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); HIS6 y etiquetas de quelación de metales, el polipéptido etiqueta HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 (Field, *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:2159-2165); la etiqueta myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7, y 9E10 para la misma (Evan, *et al.* (1985) *Molecular and Cellular Biology* 5:3610-3616); y la etiqueta de glucoproteína D (gD) del virus del herpes simple y su anticuerpo Paborsky, *et al.* (1990) *Protein Engineering* 3(6):547-553). Otros polipéptidos etiqueta incluyen el péptido Flag (Hopp, *et al.*, (1988) *BioTechnology* 6:1204-1210); el péptido epitópico KT3 (Martin, *et al.* (1992) *Science* 255:192-194); un péptido epitópico de tubulina (Skinner, *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* 266:15163-15166); y el péptido epitópico de la proteína 10 del gen T7 (Lutz-Freyermuth, *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6393-6397).

30 Los vectores de expresión de la presente divulgación se pueden usar para expresar prácticamente cualquier polipéptido de interés. En particular, los vectores son útiles para expresar proteínas terapéuticas (es decir, un polipéptido que tiene una actividad biológica terapéutica) de mamífero, por ejemplo, de origen humano.

35 El polipéptido de interés puede ser un polipéptido usado para generar conjugados con nuevas propiedades mediante el acoplamiento con otras moléculas, tal como, sin limitación, un fármaco, una toxina (por ejemplo, una inmunotoxina), un radionúclido, o una molécula indicadora. En un ejemplo específico, el polipéptido de interés es una inmunoglobulina que se puede acoplar a un fármaco para generar un conjugado de anticuerpo-fármaco.

40 Los ejemplos de proteínas terapéuticas adecuadas incluyen: eritropoyetina, citocinas tales como interferón  $\alpha$ , interferón  $\beta$ , interferón  $\gamma$ , interferón  $\delta$  y CSF de granulocitos, GM-CSF, factores de la coagulación tal como factor VIII, factor IX y proteína C humana, antitrombina III, trombina, cadena  $\alpha$  del receptor de IgE soluble, IgG, fragmentos de IgG, fusiones de IgG, IgM, IgA, interleucinas, urocinasa, quimasa e inhibidor de tripsina de urea, proteínas de unión al IGF, factor de crecimiento epidérmico, factor de liberación de la hormona del crecimiento, proteína de fusión de anexina V, angiostatina, factor de crecimiento endotelial vascular 2, factor inhibidor del progenitor mielóide 1, osteoprotegerina,  $\alpha$ -1-antitripsina,  $\alpha$ -fetoproteínas, ADNasa II, *kringle* 3 del plasminógeno humano, glucocerebrosidasa, proteína de unión al TNF 1, hormona foliculoestimulante, Ig para el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos, activador transmembrana y modulador de calcio y ligando de ciclofilina, fusión del Fc con el receptor de TNF soluble, proteína de tipo glucagón 1 y agonista del receptor de IL-2.

50 El polipéptido de interés puede ser una inmunoglobulina, incluyendo, pero sin limitación, un anticuerpo (por ejemplo, monoclonal, quimérico, humanizado o completamente humano), un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, Fv, Fv monocatenario, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>), proteína de fusión de inmunoglobulina (por ejemplo, proteína de fusión de Fc, proteína de fusión anticuerpo-enzima, proteína de fusión anticuerpo-inmunotoxina), un anticuerpo biespecífico, y una inmunoglobulina de dominio variable doble. Las inmunoglobulinas de dominio variable doble (las Ig DVD) son inmunoglobulinas sintéticas que comprenden dos o más dominios de unión a antígeno que pueden diseñarse para reconocer múltiples antígenos. Véase, por ejemplo, la solicitud de Estados Unidos n.º pub. 2011/0008766, que describe las Ig DVD, y Wu *et al.*, 2007, *Nature Biotechnology* 25:1290-1297. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1) o subclase.

60 La inmunoglobulina puede ser una proteína de fusión, que combine regiones constantes y regiones variables de distintos genes en una sola secuencia codificante de polipéptido o que fusione un anticuerpo con una molécula completamente distinta que confiere nuevas propiedades, por ejemplo, una enzima. En algunas realizaciones, la secuencia codificante de polipéptido incluye dos o más restos de aminoácido que se usan para unir secuencias que codifican distintas regiones de una cadena pesada o ligera de un anticuerpo. Dichas secuencias polipeptídicas enlazadoras son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Holliger *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

90:6444-6448; Poljak *et al.*, 1994, *Structure* 2:1121-1123).

Los anticuerpos terapéuticos son de especial interés. En una realización específica, el casete de expresión comprende una secuencia polinucleotídica que codifica la cadena pesada del anticuerpo terapéutico de interés ("secuencia codificante de la cadena pesada") y una secuencia polinucleotídica que codifica la cadena ligera del anticuerpo terapéutico de interés ("secuencia codificante de la cadena ligera"). Las secuencias codificantes de la cadena pesada y la cadena ligera están cada una unidas operativamente a, o bajo el control de, promotores de expresión, que pueden ser iguales o distintos, pero, preferentemente, son iguales. Como alternativa, las secuencias codificantes de las cadenas pesada y ligera se pueden separar por un IRES y pueden estar unidas operativamente a, o bajo el control de, un promotor de expresión individual. En una realización específica de vectores útiles para expresar anticuerpos terapéuticos, el vector comprende un casete de expresión que comprende secuencias polinucleotídicas que codifican un anticuerpo distinto de elotuzumab. En una realización específica adicional, el anticuerpo terapéutico es distinto de un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena pesada que corresponde a la SEQ ID NO:5 y una región variable de la cadena ligera que corresponde a la SEQ ID NO:6, de la Patente de Estados Unidos n.º 7.842.293.

Para algunas aplicaciones, puede ser conveniente que el polipéptido de interés sea secretado por la célula de mamífero. Para tal aplicación, la secuencia codificante del polipéptido puede incluir, o diseñarse técnicamente para incluir, una secuencia señal que codifica un péptido líder que dirige el polipéptido de interés a la ruta secretora de la célula de mamífero. La secuencia señal, cuando está presente, está en una fase de lectura de traducción apropiada con la secuencia codificante del polipéptido maduro. Por consiguiente, la secuencia codificante del polipéptido puede codificar adicionalmente una secuencia señal unida operativamente al extremo N del polipéptido de interés, en que la secuencia señal contiene una secuencia de aminoácidos que dirige al polipéptido de interés al sistema secretor de la célula recombinante de mamífero, dando como resultado la secreción del polipéptido maduro de interés de la célula de mamífero recombinante en el medio en el que crece la célula de mamífero recombinante. La secuencia señal se escinde total o parcialmente de la proteína de fusión antes de la secreción del polipéptido maduro de interés. La secuencia señal empleada puede ser endógena o no endógena para polipéptido de interés y/o la célula de mamífero recombinante. Preferentemente, la secuencia señal es una secuencia señal que facilita la secreción de proteínas de una célula de mamífero. En determinadas realizaciones, por lo tanto, la secuencia codificante del polipéptido incluye una secuencia que codifica una secuencia señal, produciendo un polipéptido de interés en forma de un polipéptido que comprende una secuencia señal N-terminal, para la secreción de la proteína de la célula de mamífero recombinante.

Los promotores de expresión de la presente divulgación pueden ser cualquier promotor que tenga la capacidad de efectuar la expresión en la línea celular de mamífero utilizada. En la técnica se conocen una diversidad de promotores, incluyendo promotores víricos de mamífero y promotores de genes de mamífero.

Los genes víricos de mamífero a menudo se expresan de forma alta y tienen una amplia gama de hospedadores, por lo tanto, las secuencias que codifican genes víricos de mamífero proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Los ejemplos específicos de promotores víricos de mamífero incluyen el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV) (véase, por ejemplo, Yamamoto *et al.*, 1980, *Cell* 22:787-797), el promotor del gen temprano inmediato de citomegalovirus (CMV IE) (Boshart *et al.*, 1985, *Cell* 41(2):521-30) y el promotor intermedio-temprano principal de citomegalovirus (CMV MIE) (Akrigg, *et al.*, 1985, *Virus Res.* 2:107-121), el promotor temprano de SV40 (SV40) (Benoist y Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310), el promotor tardío principal de Adenovirus (AML) (Tooze, 1980, *Molecular Biology of Tumor Viruses, Parte II: DNA Tumor Viruses*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York), el promotor de la LTR del virus de tumor mamario de ratón, y el promotor de la timidina quinasa de *Herpes* (véase, por ejemplo, Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1441-1445). Además, secuencias procedentes de genes no víricos, tales como el gen de  $\beta$  actina humana (ACTB), el gen del factor de elongación la (EF1 $\alpha$ ), el gen de la fosfoglicerato quinasa (PGK), el gen de la ubiquitina C (UbC) y el gen de metalotioneína murina, también proporcionan secuencias promotoras útiles.

En algunas realizaciones, los promotores de expresión de la presente divulgación son promotores que son más fuertes que el promotor del marcador de selección, es decir, promotores que proporcionan un nivel de expresión más alto que el promotor dESV40 descrito en el presente documento, por ejemplo, al menos 1,5 o más veces, al menos 2 o más veces, al menos 2,5 o más veces, al menos 3 o más veces la actividad del promotor dESV40. La actividad del promotor de expresión se puede medir comparando el rendimiento de una proteína indicadora, por ejemplo, la proteína verde fluorescente, en una célula hospedadora de mamífero transfectada con un vector que contiene el promotor de expresión de prueba unido operativamente a una secuencia codificante de la proteína indicadora con respecto a una célula hospedadora de mamífero transfectada con un vector de referencia en el que la secuencia del promotor de prueba está sustituida por el promotor dESV40 que se muestra en la **FIG. 1**, cultivada en un medio adecuado.

Los promotores de expresión también pueden estar unidos operativamente a uno o más elementos potenciadores (potenciador). La presencia de un potenciador habitualmente aumentará los niveles de expresión. Un potenciador es una secuencia reguladora de ADN que puede estimular la transcripción hasta 1000 veces cuando está unida a promotores homólogos o heterólogos, comenzando la síntesis en el sitio de inicio del ARN normal. Los potenciadores obtenidos de virus pueden ser particularmente útiles, dado que habitualmente tienen una gama de hospedadores más amplia. Los ejemplos incluyen el potenciador del gen temprano de SV40 (Dijkema *et al.*, 1985, *EMBO J.* 4:761) y los

potenciadores/promotores obtenidos de la repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma de Rous (Gorman *et al.*, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. 79:6777) y del citomegalovirus humano (Boshart *et al.*, 1985, Cell 41:521). Adicionalmente, algunos potenciadores son regulables y se activan solo en presencia de un inductor, tal como una hormona o un ion metálico (Sassone-Corsi y Borelli, 1986, Trends Genet. 2:215; Maniatis *et al.*, 1987, Science 236:1237).

#### 4.1.2. Marcadores de selección

Los vectores de expresión comprenden adicionalmente una secuencia polinucleotídica que codifica un marcador de selección unido operativamente a, o bajo el control de, un promotor de un marcador de selección. Como se proporciona en el presente documento, el promotor del marcador de selección útil para transfectar células hospedadoras de mamífero es un promotor de SV40 que se ha debilitado por la delección parcial de dos repeticiones de 72 nucleótidos (o repetición en tándem de 72 nucleótidos) que forman un elemento potenciador en el promotor de SV40 de tipo silvestre, denominado en el presente documento promotor dESV40. La delección de aproximadamente cuatro quintos de la repetición en tándem de 72 nucleótidos da como resultado un promotor que conserva la capacidad de dirigir la expresión pero a un nivel reducido en comparación con el promotor de SV40 de tipo silvestre. La secuencia de nucleótidos de un promotor dESV40 ejemplar se muestra en la FIG. 1. Se espera que las secuencias promotoras dESV40 que tengan al menos un fragmento de 25 nucleótidos de la repetición en tándem de 72 nucleótidos, pero menos de una repetición de 72 nucleótidos individual, sean útiles para efectuar la expresión del marcador de selección en los vectores de la presente divulgación. Los inventores también describen un promotor dESV40 que es un promotor que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID NO:1.

Los expertos en la materia apreciarán que el promotor dESV40 descrito en el presente documento se puede usar generalmente para dirigir la expresión de una secuencia codificante de polipéptido. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona adicionalmente un vector que comprende un promotor dESV40 unido operativamente a una secuencia codificante de polipéptido. En una realización ejemplar, el promotor dESV40 corresponde en secuencia a la SEQ ID NO:1.

El promotor de marcador de selección está unido operativamente a una secuencia codificante de marcador de selección, lo que confiere a las células transfectadas con un vector como se describe en el presente documento un rasgo o característica que se usa para identificar células transfectadas de células no transfectadas. Los marcadores de selección son bien conocidos en la técnica. Pueden conferir rasgos tales como, pero sin limitación, resistencia a una toxina, metal pesado, antibiótico, u otro agente, prototropía en un hospedador auxótrofo, la capacidad de crecer en un medio sin un nutriente esencial, la capacidad de sintetizar un metabolito esencial. Los marcadores de selección usados comúnmente en la transfección de células de mamíferos incluyen genes de mamífero tales como de la dihidrofolato reductasa (DHFR) y genes bacterianos, tales como de la xantina-guanina fosforribosiltransferasa (*gpt*) de *E. coli*. Los ejemplos de marcadores de selección que confieren resistencia a antibióticos incluyen neomicina, puromicina, higromicina y fleomicina. Otros marcadores de selección ejemplares incluyen, pero sin limitación, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina carbamoiltransferasa), *bar* (fosfinotricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa), *pyr4* (orotidina-5'-monofosfato descarboxilasa) y *trpC* (antranilato sintasa). Véase también, la Patente de Estados Unidos n.º 5.627.033.

#### 4.1.3. Vectores adecuados y métodos para fabricar vectores de expresión

El casete de expresión, el marcador de selección y el promotor del marcador de selección descritos anteriormente se proporcionan en vectores de expresión. La elección del vector dependerá de varios factores, incluyendo la compatibilidad del vector con la célula de mamífero en la que se va a introducir el vector (por ejemplo, una célula de mamífero, o una célula hospedadora tal como una célula bacteriana, útil para propagar o amplificar el vector), y de la capacidad del vector para integrarse en el genoma de la célula de mamífero. El vector puede ser un vector vírico, un fago, un fagémido, un cósmido, un fósido, un bacteriófago, un cromosoma artificial, un vector de clonación, un vector lanzadera, un plásmido (lineal o circular cerrado), o similar. Los vectores pueden incluir secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas. Los expertos en la materia conocen un gran número de vectores adecuados que están disponibles en el mercado. Se proporcionan ejemplos de vectores adecuados en Sambrook *et al.*, eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) y Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1997). Los vectores particularmente útiles incluyen vectores obtenidos de fuentes comerciales, tales como Invitrogen y Promega.

La orientación relativa de la secuencia (o secuencias) codificante del polipéptido y de la secuencia codificante del marcador de selección no es importante. La una o más secuencias codificantes de polipéptidos y la secuencia codificante del marcador de selección pueden estar en la misma orientación o en orientaciones distintas.

Los vectores de expresión pueden incluir características o elementos adicionales útiles para expresar el polipéptido (o polipéptidos) de interés en células hospedadoras de mamífero, como se conoce en la técnica. Dichas características incluyen elementos potenciadores, secuencias de iniciación de la transcripción y sitios de unión al ribosoma,

secuencias señal de poliadenilación, secuencias de terminación y otras características importantes para la exportación nuclear, la traducción y/o la estabilidad del ARNm.

5 Los vectores descritos en el presente documento también contienen, normalmente, características útiles para la clonación y propagación en una célula procariota, por ejemplo, bacteriana, tal como un origen de replicación, que permite la replicación autónoma, y un marcador de selección para la exploración de clones positivos.

10 Las técnicas para la manipulación de ácidos nucleicos, incluyendo las técnicas de síntesis, aislamiento, clonación, detección, e identificación, son bien conocidas en la técnica y están bien descritas en la bibliografía científica y de patentes. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989); Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1997); Tijssen, ed., *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes*, Parte I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Elsevier, N. Y. (1993). Los ácidos nucleicos que comprenden los vectores de expresión descritos en el presente documento o los componentes de los mismos incluyen  
15 ácidos nucleicos aislados, sintéticos y recombinantes.

Los vectores de expresión y los componentes de los mismos se pueden fabricar y manipular fácilmente a partir de una diversidad de fuentes, por clonación a partir de ADN genómico o complementario, por ejemplo, utilizando la muy conocida reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Véase, por ejemplo, Innis *et al.*, 1990, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Application*, Academic Press, Nueva York. Los casetes de expresión y los componentes de los mismos también se pueden fabricar por síntesis química, como se describe en, por ejemplo, Adams, 1983, *J. Am. Chem. Soc.* 105:661; Belousov, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3440-3444; Frenkel, 1995, *Free Radic. Biol. Med.* 19:373-380; Blommers, 1994, *Biochemistry* 33:7886-7896; Narang, 1979, *Meth. Enzymol.* 68:90; Brown, 1979, *Meth. Enzymol.* 68:109; Beaucage, 1981, *Tetra. Lett.* 22:1859; patente de Estados Unidos n.º 4.458.066. Los procedimientos usados para enlazar los componentes descritos en el presente documento para construir los vectores de expresión recombinantes son bien conocidos para un experto en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989)).  
20  
25

#### 30 4.2. Células de mamífero recombinantes

Los vectores de expresión de la presente divulgación se transfectan en células de mamífero que están adaptadas a crecer en cultivo para producir células de mamífero recombinantes, que tienen la capacidad de producir un polipéptido de interés en un cultivo con un alto rendimiento.

35 El alto rendimiento, o la alta productividad volumétrica, como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de las células para producir altos niveles de un polipéptido de interés. El rendimiento particular dependerá del polipéptido de interés y puede ser de al menos 0,05 g/l, al menos 0,1 g/l, al menos 0,15 g/l, al menos 0,2 g/l, al menos 0,25 g/l, al menos 0,3 g/l, al menos 0,35 g/l, al menos 0,4 g/l, al menos 0,45 g/l, al menos 0,5 g/l, al menos 0,6 g/l, al menos 0,7 g/l, al menos 0,8 g/l, al menos 0,9 g/l, al menos 1 g/l, al menos 1,5 g/l, al menos 2 g/l, o más, en un cultivo de 10 días cultivado en condiciones discontinuas alimentadas, utilizando un medio de alimentación adecuado para la célula hospedadora de mamífero y que contenga aminoácidos, vitaminas u oligoelementos. En realizaciones específicas, las células recombinantes de mamífero de la presente divulgación expresan una inmunoglobulina y tienen la capacidad de producir al menos 0,5 g/l, al menos 0,6 g/l, al menos 0,7 g/l, al menos 0,8 g/l, al menos 0,9 g/l, al menos 1 g/l, al menos 1,5 g/l, al menos 2 g/l, o más, preferentemente hasta aproximadamente un 3 g/l, 4 g/l, 5 g/l o  
40  
45 10 g/l, cuando se cultivan en las condiciones de cultivo descritas anteriormente.

El rendimiento también se puede medir en términos de la productividad específica de una línea celular, determinada basándose en la cantidad de polipéptido producido por célula por día (expresado como pg/célula/día). Las células recombinantes de mamífero de la presente divulgación tienen la capacidad de producir al menos 1 pg/célula/día, al menos 2 pg/célula/día, al menos 3 pg/célula/día, al menos 4 pg/célula/día, al menos 5 pg/célula/día, al menos 6 pg/célula/día, al menos 7 pg/célula/día, al menos 8 pg/célula/día, al menos 9 pg/célula/día, al menos 10 pg/célula/día, al menos 11 pg/célula/día, al menos 12 pg/célula/día, al menos 13 pg/célula/día, al menos 14 pg/célula/día, al menos 15 pg/célula/día, al menos 20 pg/célula/día, al menos 25 pg/célula/día, o más, preferentemente hasta 50 pg/célula/día en un cultivo de 10 días cultivado en condiciones discontinuas alimentadas, utilizando un medio de alimentación adecuado para la célula hospedadora de mamífero y que contenga aminoácidos, vitaminas u oligoelementos. En realizaciones específicas, las células recombinantes de mamífero de la presente divulgación expresan una inmunoglobulina y tienen una productividad específica de al menos 10 pg/célula/día, al menos 11 pg/célula/día, al menos 12 pg/célula/día, al menos 13 pg/célula/día, al menos 14 pg/célula/día, al menos 15 pg/célula/día, al menos 20 pg/célula/día, al menos 25 pg/célula/día, o más, preferentemente hasta 50 pg/célula/día en las condiciones de cultivo descritas anteriormente.  
50  
55  
60

La producción a gran escala de proteínas para aplicaciones comerciales se lleva a cabo normalmente en un cultivo en suspensión. Por lo tanto, las células hospedadoras de mamífero utilizadas para generar las células de mamífero recombinantes descritas en el presente documento pueden, pero no necesariamente, estar adaptadas a crecer en cultivos en suspensión. Se conoce una diversidad de células hospedadoras adaptadas a crecer en cultivos en suspensión, incluyendo células CHO a partir las líneas celulares CHO-S, DG44 y DXB11.  
65

Las células de mamífero recombinantes se transfectan preferentemente de forma estable, donde el casete de expresión y el marcador de selección se integran en el genoma de la célula hospedadora de mamífero.

**4.3. Métodos para obtener células de mamífero recombinantes con un alto rendimiento**

Los solicitantes han desarrollado un procedimiento para obtener una célula de mamífero recombinante que tienen la capacidad de producir un polipéptido de interés en un cultivo con un alto rendimiento. En general, el método comprende transfectar una célula de mamífero con un vector de expresión de la presente divulgación y seleccionar una célula que tenga la capacidad de producir un polipéptido de interés en un cultivo con un alto rendimiento.

Un procedimiento ejemplar con el que se pueden obtener las células de mamífero recombinantes de la presente divulgación en seis a ocho semanas se describe en el siguiente Ejemplo y se representa esquemáticamente en la FIG. 3. El método no precisa la amplificación de genes para generar células de mamífero recombinantes con una alta productividad volumétrica de un polipéptido de interés.

Las técnicas para transfectar células de mamífero con vectores de expresión son conocidas en la técnica. Las células de mamífero recombinantes como se proporcionan en el presente documento se generan introduciendo un vector de expresión de la presente divulgación en una célula de mamífero adecuada. Se conocen numerosas técnicas para introducir ácidos nucleicos en células de mamífero. Los ácidos nucleicos pueden introducirse en las células utilizando cualquiera de una diversidad de técnicas, incluyendo transformación, transfección, transducción o infección vírica. Los métodos particulares incluyen transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección o electroporación (Davis, L., Dibner, M., Battey, I., *Basic Methods in Molecular Biology*, (1986)). Las técnicas generales de transformación son conocidas en la técnica (Véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1997); y Sambrook *et al.*, eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) y Campbell *et al.*, 1989, *Curr. Genet.* 16:53-56).

La selección de células recombinantes transfectadas de forma estable se lleva a cabo cultivando a las células en un medio de selección, por lo que solo las células transfectadas son capaces de crecer. Los medios y las condiciones de cultivo para seleccionar células recombinantes transfectadas son bien conocidos en la técnica. En general, la elección del medio está basada en el marcador de selección utilizado, cuando el medio carece de un componente necesario para el crecimiento celular, como en el caso de un marcador de selección que confiere prototrofia o la capacidad de producir un metabolito esencial o que contenga un componente que es tóxico para las células no transformadas, como en el caso de un marcador de selección que confiere resistencia a un biocida, a antibióticos o a metales pesados. En una realización ejemplar, el marcador de selección es DHFR y las células se cultivan en un medio que carece de hipoxantina y timidina, y que contiene metotrexato. En otra realización ejemplar, el marcador de selección es gpt de *E. coli* y las células se cultivan en un medio que contiene ácido micofenólico y xantina.

Como se muestra en el Ejemplo a continuación, los solicitantes han observado que es posible seleccionar células de mamífero recombinantes transfectadas de forma estable de alto rendimiento cultivando células en un medio que carezca de componentes procedentes de animales, tales como proteínas de suero, pero que se complementa con proteínas recombinantes. Por consiguiente, los métodos para obtener una célula de mamífero recombinante con una alta productividad volumétrica, o rendimiento, de un polipéptido de interés, pueden comprender seleccionar una célula que tenga una alta productividad volumétrica, o rendimiento, de un polipéptido de interés, cuando se cultiva en un medio químicamente definido, sin componentes procedentes de animales. Está disponible en el mercado una diversidad de medios sin componentes procedentes de animales, y pueden seleccionarse basándose en el tipo de célula de mamífero que se va a usar. Por ejemplo, las células CHO se pueden cultivar en medios tales como CD-DG44 y CD OptiCHO™ (Invitrogen) complementados con ZAP-CHO® (Invitria), y las células NS0 se pueden cultivar en medios tales como medio sin suero de NS0 EX-CELL® (Sigma -Aldrich).

**4.4. Uso de las células de mamífero recombinantes**

Las células de mamífero recombinantes descritas en el presente documento son útiles para producir polipéptidos de interés. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un método para producir un polipéptido de interés, que comprende cultivar una célula de mamífero recombinante en condiciones que dan como resultado la expresión del polipéptido de interés. Opcionalmente, el método comprende, adicionalmente, etapas adicionales, las cuales pueden incluir recuperar y purificar el polipéptido.

Las células de mamífero recombinantes se pueden cultivar en suspensión, ya sea por cultivo estático o por cultivo en agitación en matraces, o por fermentación a pequeña o gran escala (incluyendo el cultivo continuo, discontinuo, discontinuo alimentado o en fase sólida) en biorreactores de laboratorio o industriales, realizados en un medio adecuado y en condiciones que permitan la expresión y/o el aislamiento del polipéptido de interés.

Las técnicas para recuperar y purificar la proteína expresada son muy conocidas en la técnica y pueden adaptarse al polipéptido (o polipéptidos) particular expresado por la célula de mamífero recombinante. Los polipéptidos se pueden recuperar del medio de cultivo y/o de los lisados celulares. En realizaciones en que el método está dirigido a producir un polipéptido secretado, el polipéptido puede recuperarse a partir del medio de cultivo. Los polipéptidos pueden

recuperarse o purificarse a partir de los medios de cultivo mediante una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación. Después, el polipéptido recuperado se puede purificar adicionalmente mediante una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, hidrófoba, cromatoenfoco y de exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoco preparativo (IEF), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato amónico) o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989).

## 5. Ejemplo

**Ejemplo 1: Las células de mamífero transfectadas de forma estable con vectores de expresión que portan marcadores de selección bajo el control del promotor dESV40 muestran un rendimiento aumentado en comparación con los vectores con un promotor wtSV40**

Este ejemplo demuestra que los vectores de expresión que contienen un promotor dESV40, en lugar del promotor wtSV40, unidos operativamente a un marcador de selección, se puede usar para generar células de mamífero recombinantes transfectadas de forma estable con un alto rendimiento de un polipéptido de interés.

**Vectores.** Se fabricó una serie de vectores de expresión para probar el efecto del uso de un promotor dESV40 en comparación con un promotor wtSV40 sobre la capacidad de recuperar células de mamíferos transfectadas de alto rendimiento.

Los vectores pVI.dESV40.X y pVI.wtSV40.X, representados en las **FIG. 2C-D**, contienen un marcador de selección (DHFR o gpt de *E. coli*) bajo el control del promotor dESV40 mostrado en la **FIG. 1** o el promotor SV40 de tipo silvestre (Reddy *et al.*, 1978, Science 200:494-502), y un casete de expresión que comprende las primera y segunda secuencia codificante de polipéptido, cada una bajo el control de un promotor vírico de mamífero (promotor de expresión 1).

Los vectores se construyeron para expresar uno de los cinco anticuerpos de prueba, Ab1 a Ab5, o una inmunoglobulina de dominio variable doble, DVD1. Los vectores contienen secuencias de genes que codifican los polipéptidos de la cadena pesada y ligera para cada uno de Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5 y DVD1. Los vectores también incluyen una secuencia de poliadenilación (pA) cadena abajo de la secuencia codificante del marcador de selección y cada secuencia codificante de polipéptido. Se utilizaron un marcador de resistencia a la ampicilina (AMP) y un origen de replicación bacteriano para clonar y propagar el vector en bacterias. Los vectores se nombran para reflejar la identidad del promotor de SV40 analizado (dESV40 o wtSV40) y la proteína producida (X es Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5 o DVD1). Por ejemplo, un vector que contiene el promotor dESV40 y que expresa Ab1 se nombra pV1.dESV40.Ab1.

Los vectores pV2.dESV40.DVD1 y pV2.wtSV40.DVD1, representados en las **FIG. 2E-F**, contienen un marcador de selección (DHFR) bajo el control del promotor dESV40 mostrado en la **FIG. 1** o el promotor SV40 de tipo silvestre (Reddy *et al.*, 1978, Science 200:494-502), y secuencias de ADNc que codifican polipéptidos de cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina de dominio variable doble de prueba, DVD1, bajo el control de un promotor vírico de mamífero. Los vectores también incluyen una secuencia de poliadenilación (pA) cadena abajo de la secuencia codificante del marcador de selección y cada secuencia codificante de polipéptido. Se utilizaron un marcador de resistencia a la ampicilina (AMP) y un origen de replicación bacteriano para clonar y propagar el vector en bacterias. Los vectores se nombran para reflejar la identidad del promotor de SV40 analizado (dESV40 o wtSV40).

**Medios de crecimiento.** Los medios de cultivo utilizados para los ensayos de transfección, selección y rendimiento fueron adecuados para el tipo de célula de mamífero y el marcador de selección. Los medios adecuados para células NS0 transfectadas con vectores de expresión que contienen gpt están disponibles en el mercado, por ejemplo, medio sin suero de NS0 EX-CELL® (Sigma-Aldrich) y descrito en Hartman *et al.*, 2007, Biotech Bioeng. 96:294-306. Los medios adecuados para células CHO transfectadas con vectores de expresión que contienen DHFR están disponibles en el mercado, por ejemplo, los medios para CHO químicamente definidos CD-DG44 y CD OptiCHO™ (Invitrogen), y se describen en la técnica, por ejemplo, Zhang *et al.*, 1995, Bio/Technology 13:389-392. En algunos experimentos, los medios utilizados para seleccionar los transfectantes se complementaron con ZAP-CHO® (Invitria).

**Transfección, selección y exploración.** Como se muestra en la **FIG. 3**, las células hospedadoras de mamíferos se transfectaron y se sembraron en placas de 96 pocillos, en cultivos en suspensión, a una densidad de 20.000 a 30.000/pocillo, seguido por la selección en medio químicamente definido, con el reactivo de selección apropiado (por ejemplo, medio sin hipoxantina y timidina, con o sin metotrexato para DHFR, y medio con ácido micofenólico para la xantina guanina fosforribosiltransferasa). La selección se realizó en placas de 96 pocillos utilizando condiciones que produjeron colonias individuales que mantienen la diversidad y reducen el aislamiento de múltiples clones hermanos.

Para la transfección con vectores que contienen DHFR, se tituló la cantidad de metotrexato utilizada para conseguir colonias individuales en las placas de 96 pocillos. Los transfectantes de pV1.dESV40.DVD1 se seleccionaron en medio que carecía de hipoxantina y timidina (HT<sup>-</sup>) sin metotrexato. Los transfectantes de pV2.dESV40.DVD1 se seleccionaron en medio HT<sup>-</sup> con metotrexato 25 nM. Los transfectantes de pV2.wtSV40.DVD1 se seleccionaron en

medio HT<sup>-</sup> con metotrexato 200 nM. Los transfectantes de pV1.dESV40.Ab1 y pV1.dESV40.Ab2 se seleccionaron en medio HT<sup>-</sup> sin metotrexato y los transfectantes de pV1.wtSV40.Abl se seleccionaron en medio HT<sup>-</sup> con metotrexato 50 nM.

5 Se exploraron colonias resistentes de una o más transfecciones dentro de los diez a veinte días desde la transfección, utilizando ELISA para medir los niveles de expresión del polipéptido en las placas de 96 pocillos y los clones positivos se expandieron en un medio químicamente definido con o sin reactivo de selección, seguido de un ensayo de 24 horas para evaluar el rendimiento de proteína, usando los métodos descritos en Hartman *et al.*, 2007, Biotech Bioeng. 96:294-306. En resumen, se realizó ELISA tipo sándwich para detectar la expresión de inmunoglobulina a partir de  
10 colonias transfectantes, utilizando anticuerpos contra Fc de IgG humana y la cadena ligera kappa humana (Biosource, Camarillo, CA). El ensayo de rendimiento de proteína de 24 h se realizó en una placa de 12 pocillos, 1x 10<sup>6</sup> células viables/ml en 1 ml de medio químicamente definido e incubando a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 7,5 %, durante 24 h. La concentración de anticuerpos en el sobrenadante del ensayo se determinó mediante HPLC utilizando una columna de proteína A. Después de esta exploración inicial no se realizó amplificación o ciclos adicionales de selección. Los transfectantes  
15 positivos que mostraron alto rendimiento se agruparon. Las líneas celulares que presentan los rendimientos más altos pueden volver a explorarse en un procedimiento discontinuo alimentado en matraces de agitación.

El procedimiento completo para generar líneas celulares de mamífero que tengan la capacidad de expresar altos niveles de un polipéptido de interés se puede completar en 6 a 8 semanas y no precisa una etapa de amplificación o  
20 subclonación de genes.

Los vectores de expresión se analizaron en tres tipos distintos de células de mamífero: la línea celular NS0 de mieloma murino y dos líneas celulares CHO DHFR<sup>-</sup> adaptadas al crecimiento en cultivo de suspensión, CHO DG44 y CHO  
25 DXB11.

**Resultados.** La eficacia del promotor dESV40, en comparación con el promotor wtSV40, se demostró con dos polipéptidos de interés distintos, en dos vectores de expresión distintos. En primer lugar, los vectores pV1.dESV40.DVD1 y pV2.dESV40.DVD1 se compararon con pV2.wtSV40.DVD1. Cada vector se transfectó en la línea celular CHO DXB11, se seleccionó para la expresión de DHFR y se exploró en el ensayo de 24 horas para evaluar la  
30 producción de DVD1. Como se muestra en la **FIG. 4A**, las células de mamífero transfectadas con dos vectores de expresión distintos, pV1.dESV40.DVD1 o pV2.dESV40.DVD1, que contenían el promotor dESV40, tenían la capacidad de producir hasta 35 a 38 µg/ml de la inmunoglobulina de dominio variable doble de prueba (DVD1). Por el contrario, el vector de control que contenía el promotor SV40 de tipo silvestre, pV2.wtSV40.DVD1, solo produjo transfectantes que produjeron menos de 10 µg/ml de DVD1, lo que demuestra la eficacia de las construcciones de expresión que  
35 contenían el promotor dESV40. En segundo lugar, se compararon los vectores pV1.dESV40.Abl y pV1.wtSV40.Ab1. Cada vector se transfectó en las células CHO DG44, se seleccionó por la expresión de DHFR y se exploró en cuanto a la expresión del anticuerpo de prueba Abl en placas de 96 pocillos. Como se muestra en la **FIG. 4B**, el título de anticuerpos promedio en las colonias exploradas en placas de 96 pocillos fue casi de 14 µg/ml para los transfectantes que portaban la construcción que contenía dESV40, en comparación con menos de 4 µg/ml para los transfectantes  
40 que portaban la construcción de control que contenía wtSV40. Adicionalmente, 19 (o el 19 %) de los transfectantes para pV1.dESV40.Ab1 tuvieron un título de anticuerpos de más de 20 µg/ml, mientras que solo hubo 6 (o el 3 %) transfectantes para pV1.wtSV40.Abl con un título de anticuerpos de más de 20 µg/ml.

La utilidad de los vectores de expresión que contienen dESV40 que expresan polipéptidos de prueba en células  
45 hospedadoras de mamífero se confirmó transfectando células CHO DG44 y DXB11, y células NS0 de mieloma murino, con vectores que expresaban dos polipéptidos de prueba distintos, Abl y Ab2. Como se muestra en la **FIG. 5A-B**, pV1.dESV40.Abl y pV1.dESV40.Ab2 generaron células de mamífero recombinantes que tiene la capacidad de producir hasta 40 µg/ml de un anticuerpo de prueba y promediaron más de 10 µg/ml para Abl (**FIG. 5A**), y de aproximadamente 4 a 5 µg/ml para Ab2 (**FIG. 5B**), en células NS0, DG44 y DXB11, medido utilizando el ensayo de rendimiento de  
50 proteína de 24 horas.

Las líneas celulares DXB11 con el mayor rendimiento en el ensayo de proteína de 24 horas se analizaron  
55 adicionalmente en matraces de agitación en condiciones de procedimiento discontinuo alimentado, y los resultados se muestran en la Tabla a continuación.

TABLA 1					
Hospedador	ID del clon	24 horas (µg/ml)	Desempeño del cultivo discontinuo alimentado		
			Cantidad de Ac. (pg/célula/día)	CCIV (10 <sup>9</sup> c*d/l)	Título final (g/l)
DXB11	Ab2-E10	12,8	13,6	61,7	0,84
	Ab2-E12	13,4	14,8	59,6	0,89
	Ab1-F13	18,8	19,6	89,3	1,75
	Ab1-F3	21,6	16,4	75,3	1,24
	Ab1-F19	22,0	22,4	54,1	1,21

TABLA 1					
Hospedador	ID del clon	24 horas (µg/ml)	Desempeño del cultivo discontinuo alimentado		
			Cantidad de Ac. (pg/célula/día)	CCIV (10 <sup>9</sup> c*/d/l)	Título final (g/l)
	Ab1-F16	27,0	19,5	96,9	1,89
	Ab1-F11	39,6	29,7	42,5	1,26

5 Como se muestra en la tabla, se identificaron células DXB11 transfectadas que tenían la capacidad de producir de aproximadamente 0,9 a aproximadamente 1,9 g/l, o de aproximadamente 13 a aproximadamente 30 pg/célula/día, del anticuerpo de prueba, demostrando la capacidad de usar los vectores de expresión para generar transfectantes de alto rendimiento.

10 En un experimento adicional, se analizó la producción de tres anticuerpos adicionales en células NS0 transfectadas con pVI.dESV40.Ab3, pVI.dESV40.Ab4 o pVI.dESV40.Ab5, en que el marcador de selección era gpt. Al menos una línea celular NS0 transfectada con un vector pV1.dESV40.Ab4 tuvo rendimientos de anticuerpos que variaron entre 31 y 40 mg/l en el ensayo de 24 horas, y 8 líneas celulares tuvieron rendimientos de anticuerpos tan altos como 21 a 30 mg/l (2 con pVI.dESV40.Ab3, y 3 cada una con pVI.dESV40.Ab4 y pVI.dESV40.Ab5). 35 líneas celulares NS0 mostraron rendimientos de anticuerpos que variaron entre 11 y 20 mg/l.

15 Los solicitantes también han identificado las condiciones de selección optimizadas que generaron los transfectantes de CHO que expresan Ab1 o Ab2 de mayor rendimiento, utilizando medios de selección que contienen suplementos. La FIG. 6 muestra que las células CHO transfectadas con pV1.dESV40.Ab1 o pV1.dESV40.Ab2, sometidas a selección en presencia de suplemento de ZAP-CHO®, produjeron niveles más altos del anticuerpo de prueba que las células de mamífero recombinantes seleccionadas en ausencia de suplemento ZAP-CHO.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ABBOTT BIOTHERAPEUTICS CORP.

25 <120> VECTORES Y CELULAS HOSPEDADORAS PARA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

<130> 381493-243WO (118412)

<160> 1

30 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 206

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> "Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

40 <400> 1

```

>=VVV<
gcatgcatct caattagtca gcaaccatag tcccgccct aactccgcc atccccccc      60
taactccgcc cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaattttt tttatttatg      120
cagaggccga ggccgcctcg gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg      180
gaggcctagg cttttgcaaa aagctt                                           206
    
```

## REIVINDICACIONES

1. Una célula de ovario de hámster chino (CHO) transfectada de forma estable con un vector, en donde el vector comprende:
- 5
- (i) un casete de expresión, donde el casete de expresión comprende una primera secuencia polinucleotídica que codifica un primer polipéptido de interés unido operativamente a un primer promotor de expresión que tiene la capacidad de efectuar la expresión del primer polipéptido en una célula de mamífero; y
  - (ii) una secuencia polinucleotídica que codifica un marcador de selección unido operativamente a un promotor dESV40, en la que el promotor dESV40 consiste en la SEQ ID NO:1.
- 10
2. La célula de la reivindicación 1, en la que el casete de expresión comprende adicionalmente una segunda secuencia polinucleotídica que codifica un segundo polipéptido de interés unido operativamente a un segundo promotor de expresión que tiene la capacidad de efectuar la expresión del segundo polipéptido en una célula de mamífero.
- 15
3. La célula de la reivindicación 2, en la que los primero y segundo promotores de expresión son los mismos.
4. La célula de la reivindicación 1, en la que el casete de expresión comprende adicionalmente una segunda secuencia polinucleotídica que codifica un segundo polipéptido, 3' con respecto a la primera secuencia polinucleotídica.
- 20
5. La célula de la reivindicación 4, que comprende un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) entre las primera y segunda secuencias polinucleotídicas.
6. Una célula de ovario de hámster chino (CHO) transfectada de forma estable con un vector útil para efectuar la expresión de un anticuerpo de interés, en donde el vector comprende:
- 25
- (i) un casete de expresión, donde el casete de expresión comprende una primera secuencia polinucleotídica que codifica una cadena pesada de un anticuerpo de interés, unida operativamente a un primer promotor de expresión que tiene la capacidad de efectuar la expresión de la cadena pesada codificada en una célula de mamífero, y una segunda secuencia polinucleotídica que codifica una cadena ligera de un anticuerpo de interés, unida operativamente a un segundo promotor de expresión que tiene la capacidad de efectuar la expresión de la cadena ligera codificada en una célula de mamífero; y
  - (ii) una secuencia polinucleotídica que codifica un marcador de selección unido operativamente a un promotor dESV40, en la que el promotor dESV40 consiste en la SEQ ID NO:1.
- 30
7. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el primer y el segundo promotores de expresión se seleccionan de: el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV IE), el promotor intermedio-temprano principal de citomegalovirus (MIE), el promotor temprano del virus de simio 40 (SV40), el promotor tardío principal de Adenovirus (AML), el promotor de la LTR del virus de tumor mamario de ratón, el promotor de la timidina quinasa de Herpes, el promotor de la  $\beta$  actina humana (ACTB), el promotor del factor de elongación 1 $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ), el promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK), el promotor de la ubiquitina C (UbC) y el promotor de metalotioneína murina.
- 40
8. La célula de la reivindicación 1, en donde el marcador de selección es la dihidrofolato reductasa (DHFR).
- 45
9. Un método para obtener una célula de ovario de hámster chino (CHO) que tiene la capacidad de producir un polipéptido de interés en un cultivo con un alto rendimiento, que comprende transfectar una célula CHO con el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y seleccionar una célula CHO que tenga la capacidad de producir al menos 10 pg/célula/día del polipéptido de interés en un cultivo discontinuo alimentado de 10 días.
- 50
10. Un método para producir un polipéptido de interés, que comprende cultivar la célula de ovario de hámster chino (CHO) de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
11. El método de la reivindicación 10, en donde la célula de ovario de hámster chino (CHO) se cultiva en condiciones que dan como resultado la producción de al menos 10 pg/célula/día del polipéptido de interés en un cultivo discontinuo alimentado de 10 días.
- 55
12. El método de la reivindicación 11, en donde la célula de ovario de hámster chino (CHO) se cultiva en condiciones que dan como resultado la producción de al menos 0,5 g/l del polipéptido de interés en un cultivo discontinuo alimentado de 10 días.
- 60
13. La célula de la reivindicación 6, en donde el marcador de selección es la dihidrofolato reductasa (DHFR).
14. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende adicionalmente un elemento potenciador unido operativamente 5' con respecto al primero o el segundo promotor de expresión.
- 65

15. La célula de la reivindicación 13, en la que los primero y segundo promotores de expresión son promotores tempranos inmediatos de citomegalovirus (CMV IE).

SEQ ID NO:1

GCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAAC  
TCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCT  
CCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCG  
AGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGG  
CTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTT

FIG. 1

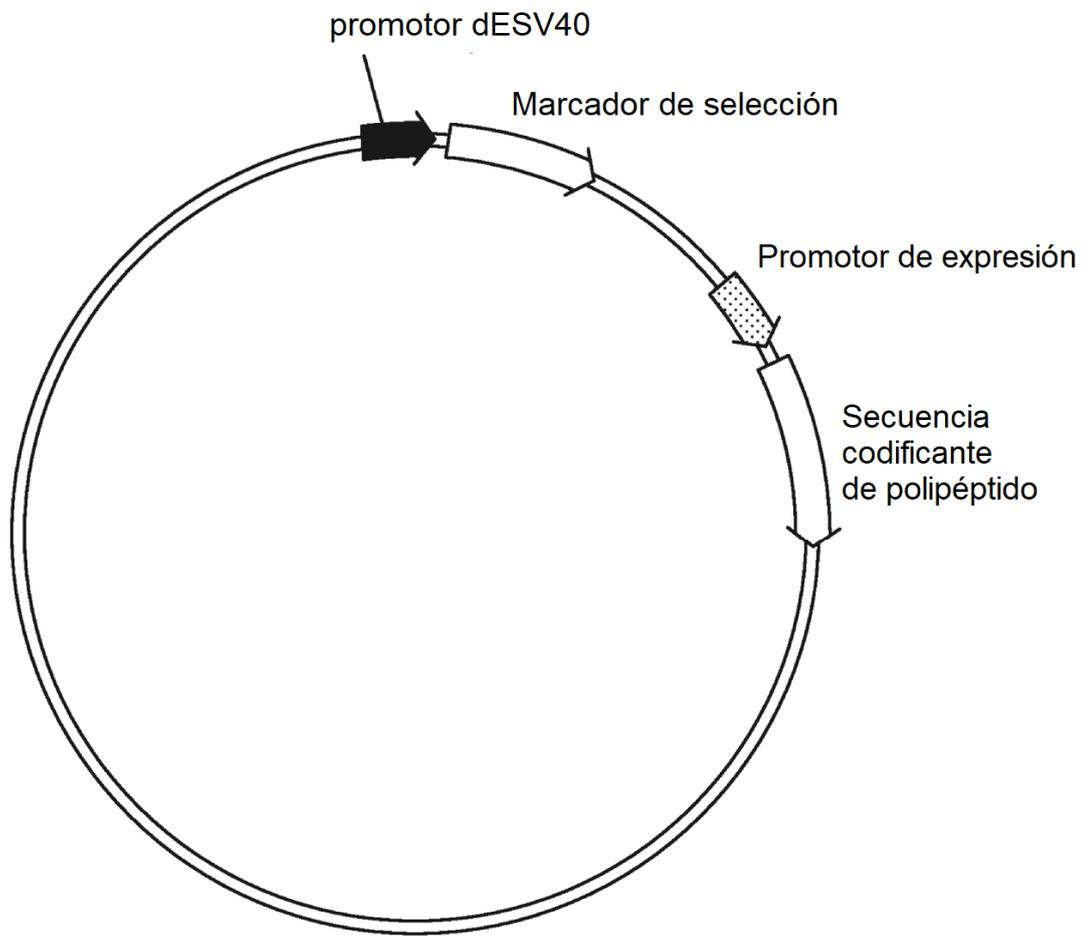


FIG. 1

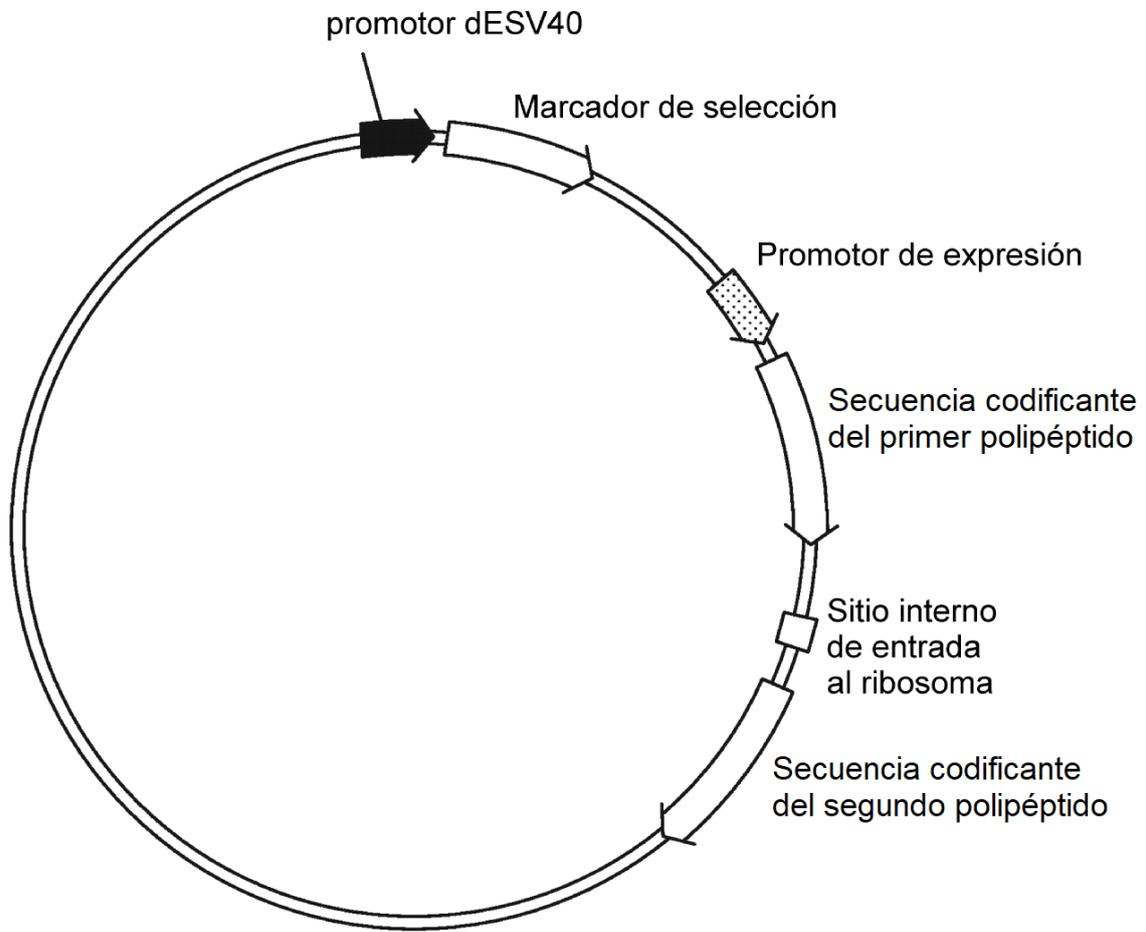


FIG. 2B

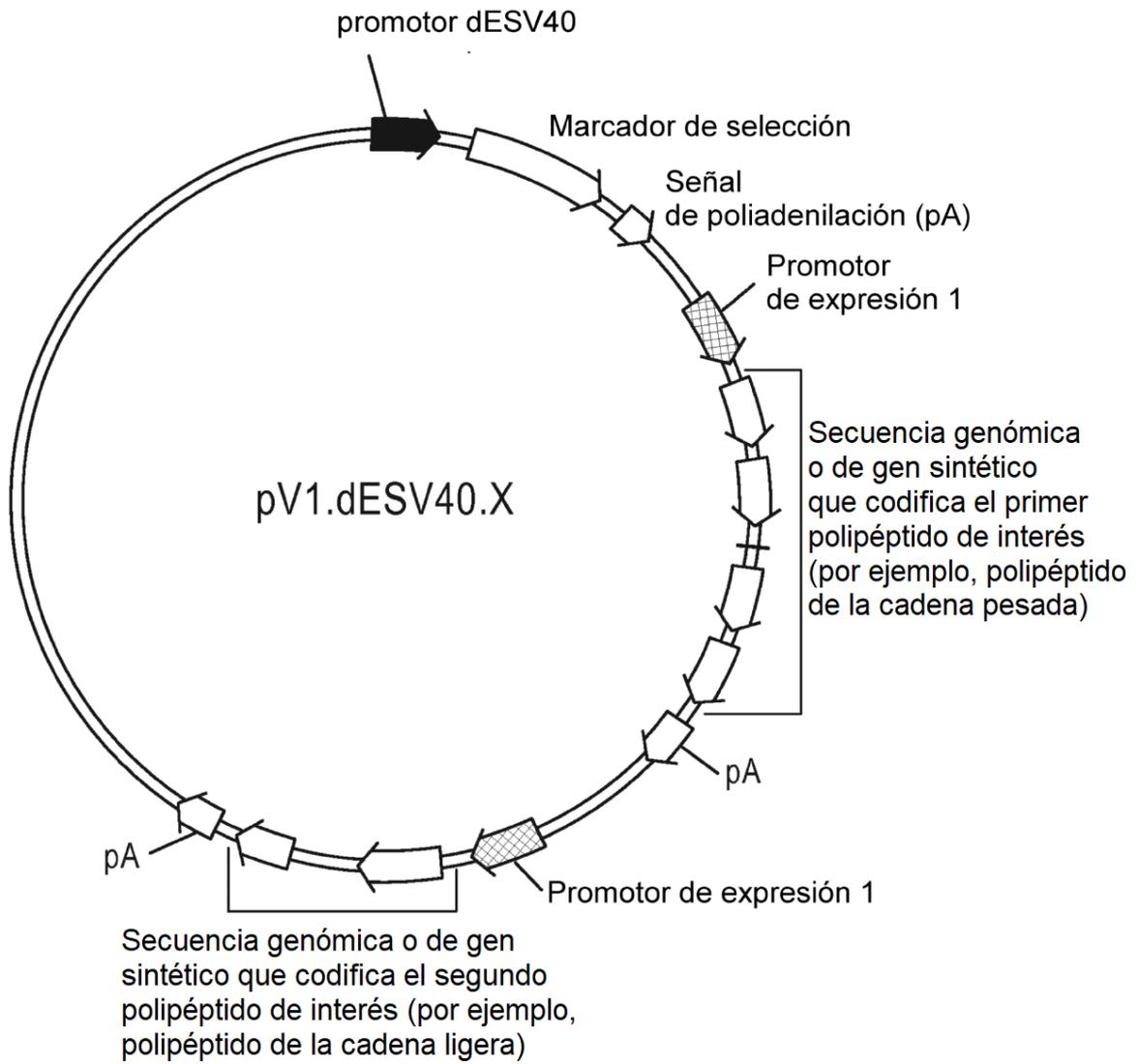


FIG. 2C

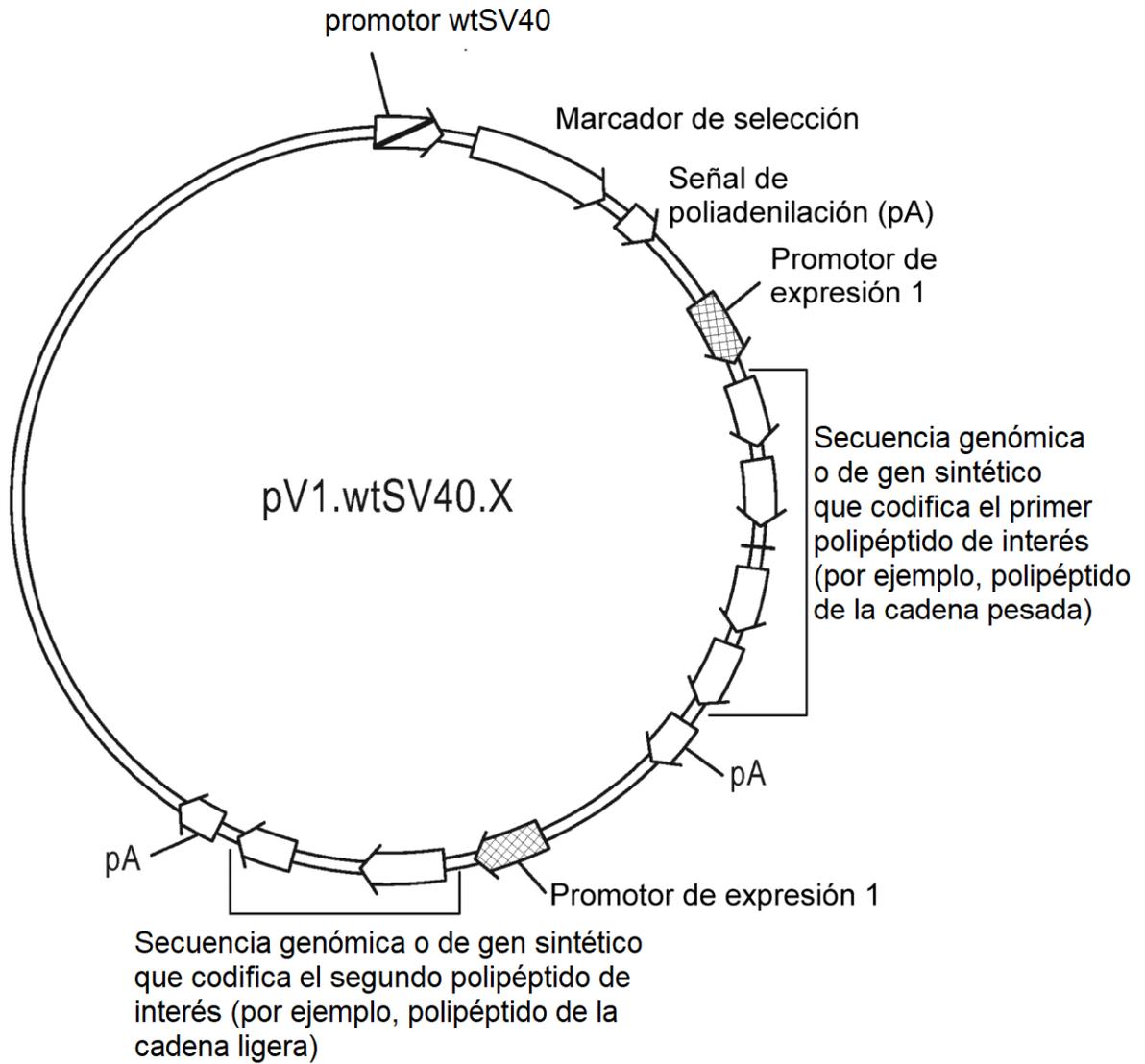


FIG. 2D

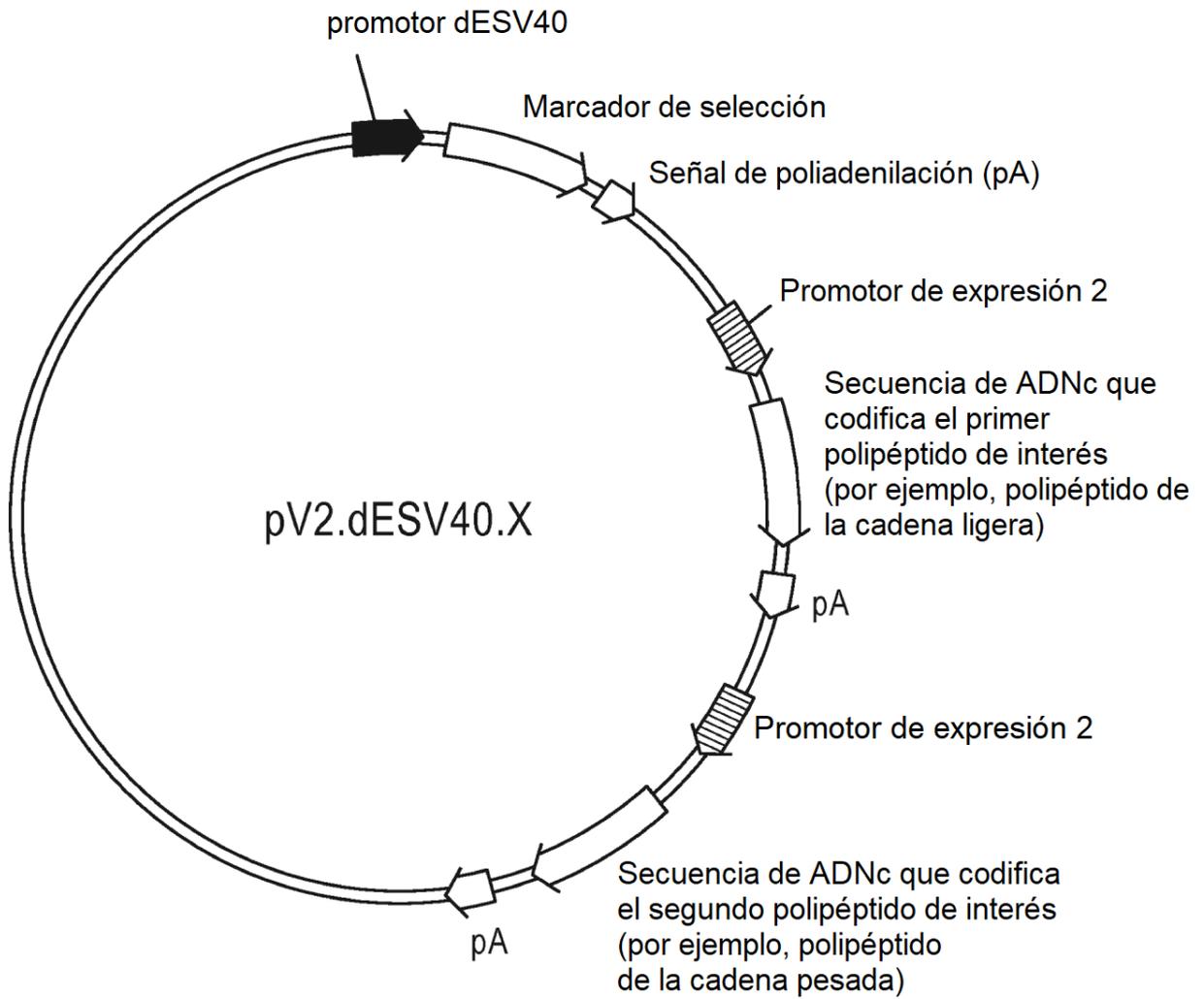


FIG. 2E

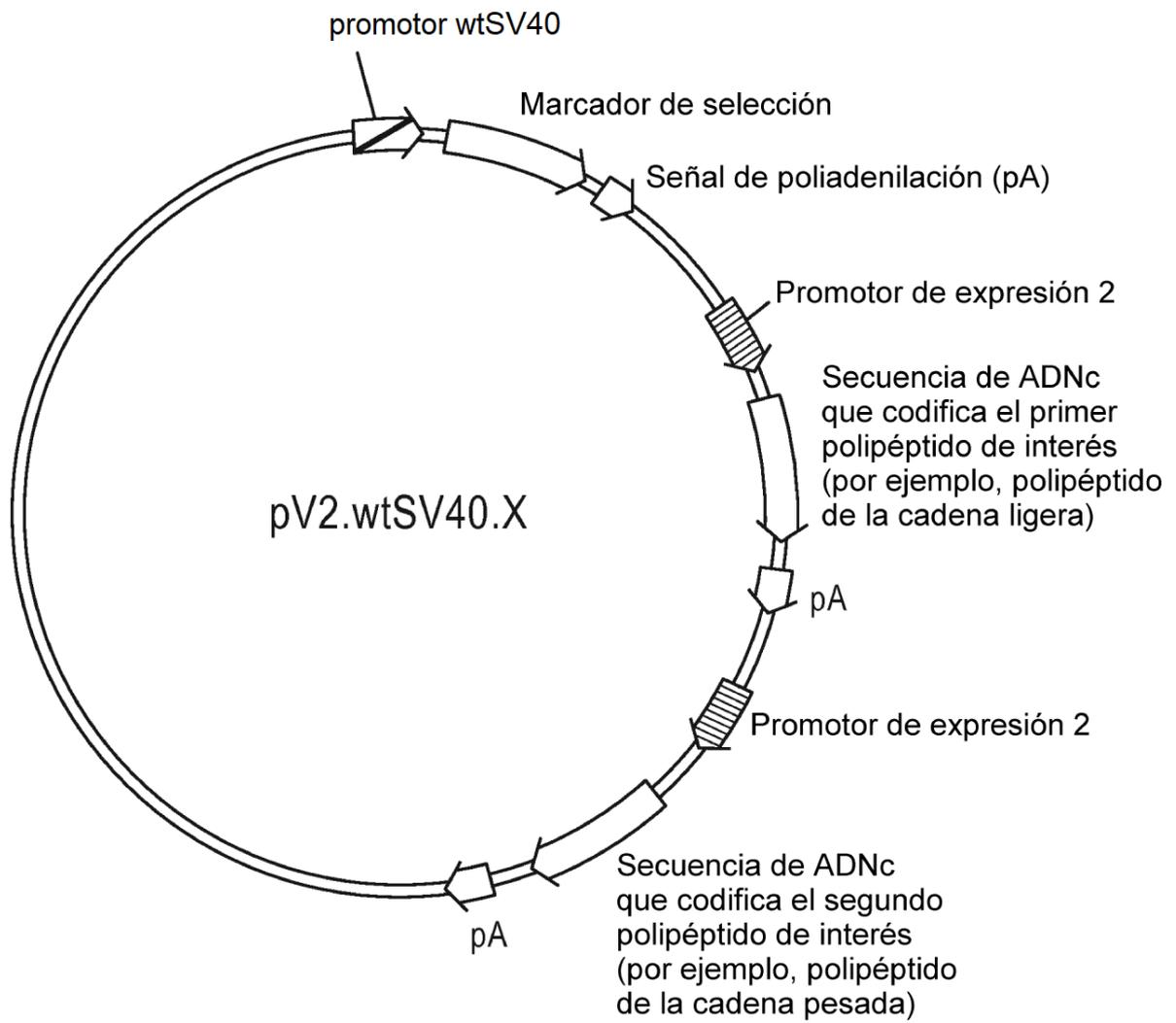


FIG. 2F

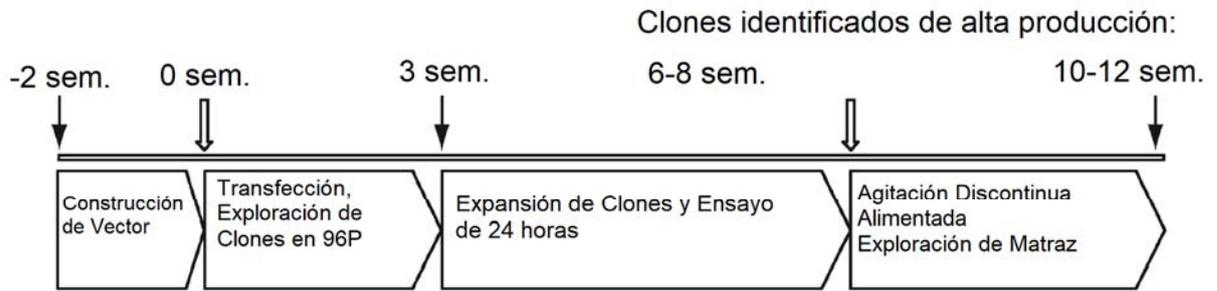


FIG. 3

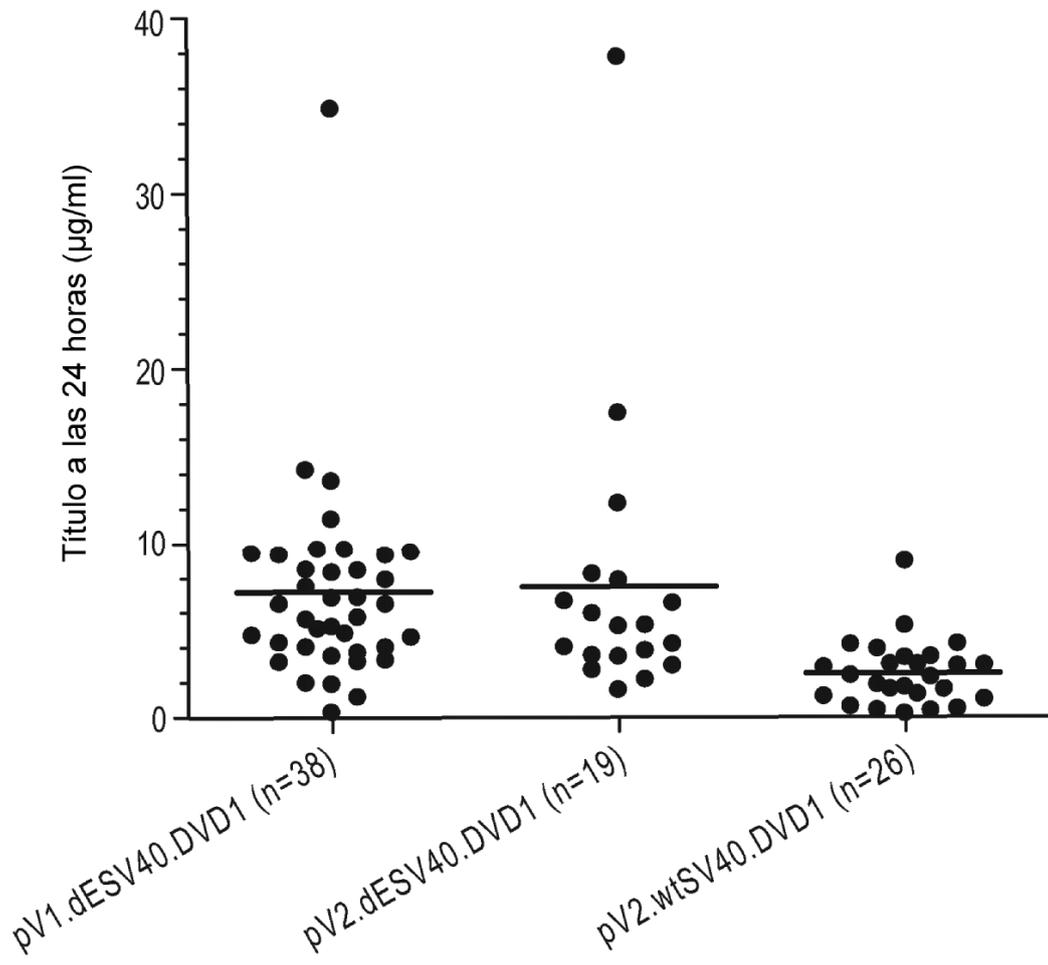


FIG. 4A

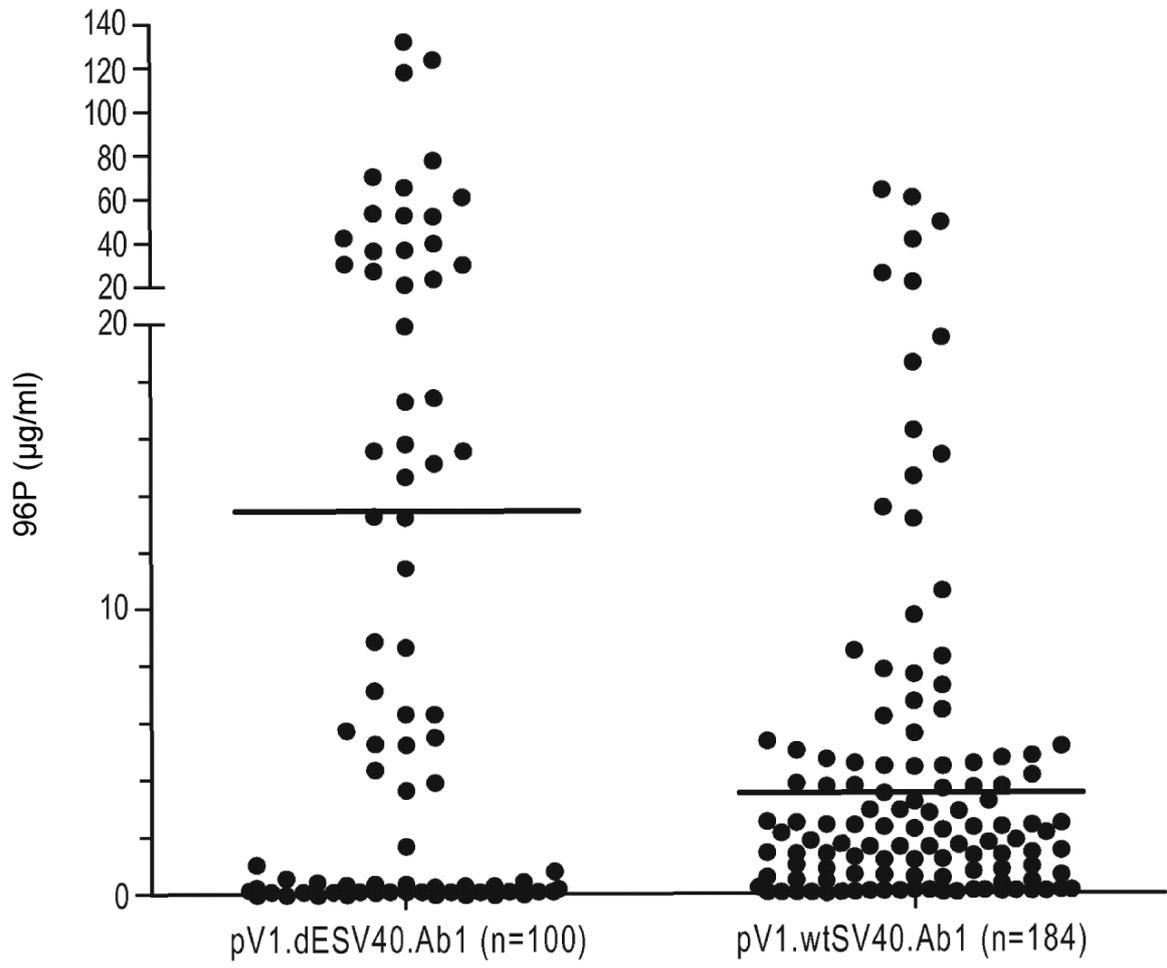


FIG. 4B

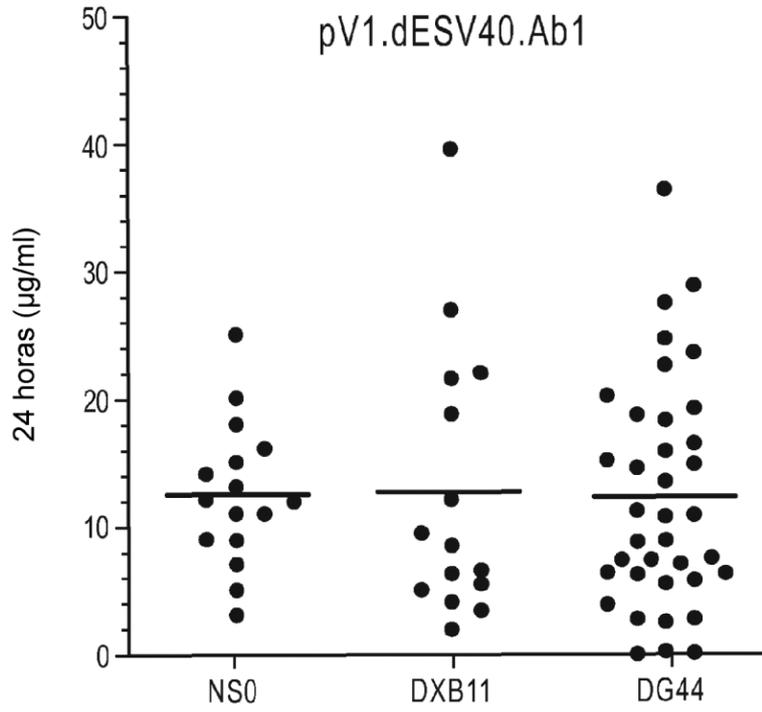
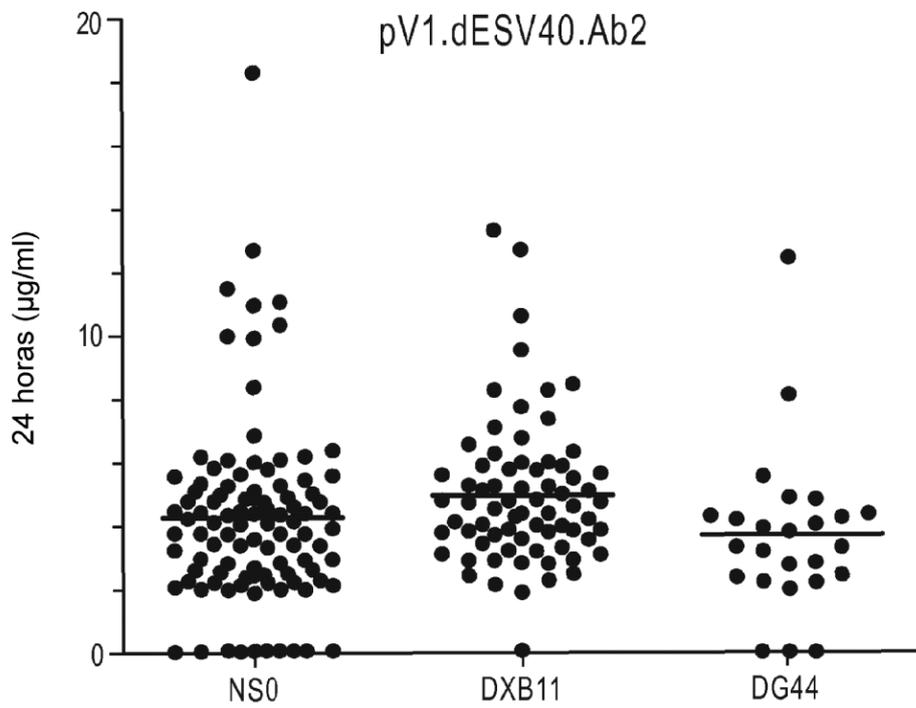


FIG. 5A



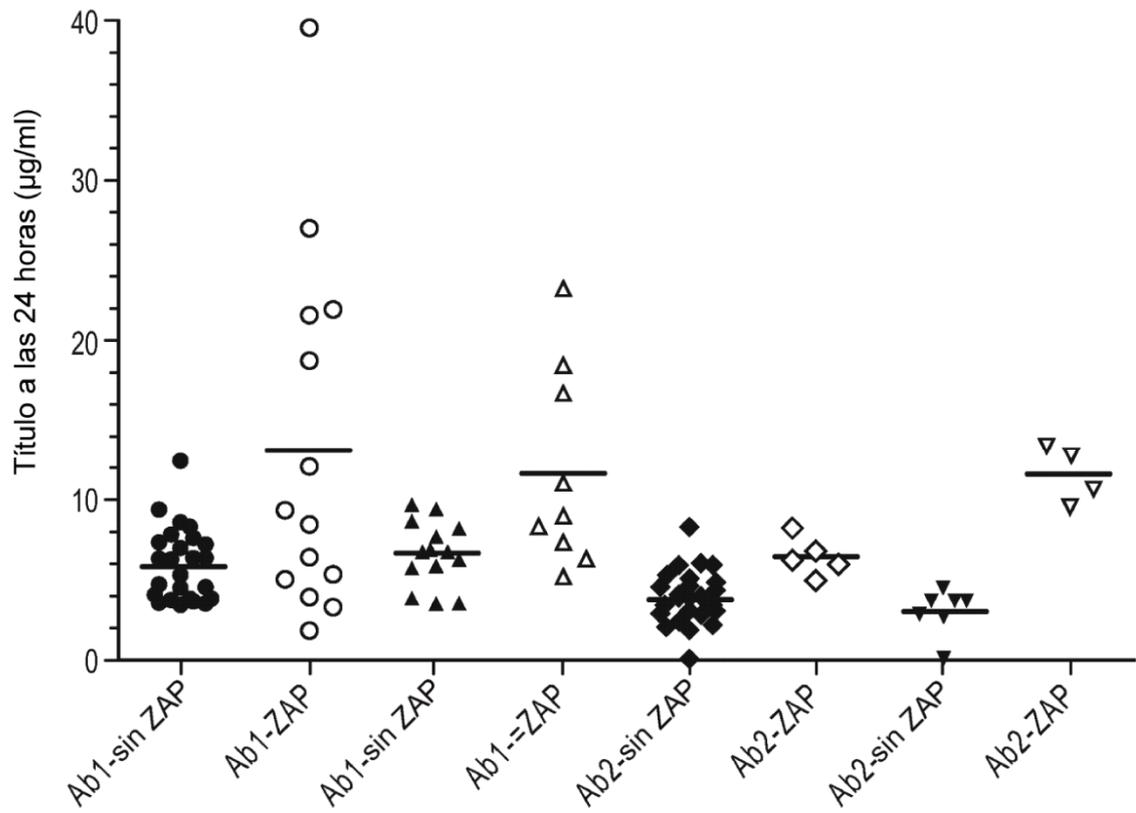


FIG. 6