

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 529**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/63** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

**C12N 15/85** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**C12N 15/67** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.04.2016 PCT/EP2016/057228**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2016 WO16156574**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2016 E 16719778 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3277818**

54 Título: **Uso de vitaminas y de genes metabólicos de vitamina y de proteínas para la producción de proteínas recombinantes en células de mamíferos**

30 Prioridad:

**03.04.2015 US 201562142516 P**

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

**13.07.2020**

73 Titular/es:

**SELEXIS S.A. (100.0%)  
14 Chemin des Aulx  
1228 Plan-les-Quates, CH**

72 Inventor/es:

**MERMOD, NICOLAS;  
POURCEL, LUCILLE;  
GIROD, PIERRE-ALAIN y  
LE FOURN, VALÉRIE**

74 Agente/Representante:

**GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio**

ES 2 773 529 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

Uso de vitaminas y de genes metabólicos de vitamina y de proteínas para la producción de proteínas recombinantes en células de mamíferos

5

**Antecedentes de la invención**

Las vitaminas son micronutrientes esenciales necesarios para soportar el crecimiento y la propagación celular. Las células de los mamíferos no pueden sintetizarlos y, por lo tanto, los mamíferos deben obtenerlos de su dieta. En contraste, las bacterias, hongos y plantas sintetizan vitaminas. La función principal de las vitaminas es actuar como cofactores o coenzimas en diversas reacciones enzimáticas como el ciclo TCA, la glicólisis, la síntesis de aminoácidos y la biosíntesis de acetil-CoA.

10

La deficiencia de vitaminas está directamente relacionada con numerosas enfermedades. Por ejemplo, la deficiencia aguda de vitamina B1 en seres humanos conduce a una enfermedad llamada beriberi que, a su vez, puede provocar trastornos neurológicos y cardiovasculares fatales. Además, los ratones que carecen de genes implicados en la absorción de vitaminas muestran síntomas graves. Por ejemplo, la eliminación del transportador mitocondrial de vitamina B1 S1c25a19 causa letalidad embrionaria, malformaciones del SNC y anemia (Lindhurst et al., 2006). Los ratones que carecen del transportador de vitamina H y B5 (pantotenato) exhiben retraso del crecimiento, disminución de la densidad ósea, disminución de la longitud del hueso y letalidad después de 10 semanas (Ghosal et al., 2012). La deficiencia de actividades citoplasmáticas o mitocondriales que pueden estar relacionadas con el metabolismo de las vitaminas también puede alterar las funciones de las células u organismos. Por ejemplo, la eliminación de los genes de la pantotenato cinasa murina (PANK) conduce a defectos en las mitocondrias y la respiración celular, así como a la deficiencia de coenzima A (Brunetti et al. 2012; Garcia et al., 2012).

15

20

25

Las células de ovario de hámster chino (CHO) se usan ampliamente en procesos industriales para la producción de proteínas terapéuticas recombinantes. La viabilidad de las células CHO y otras células eucariotas utilizadas en procesos industriales (NS0, riñón de hámster bebé (BHK) y embrión humano riñón-293 (HEK-293)) dependen de la absorción de vitaminas. Del mismo modo, las células primarias, como las células humanas para terapias basadas en genes o células y para la medicina regenerativa, también dependen de la absorción de vitaminas.

30

La optimización de los medios de cultivo celular y las líneas celulares a menudo se realiza para obtener un mayor rendimiento de proteínas recombinantes. Estudios recientes que determinan los cambios en el metabolismo central que acompañan el crecimiento y la producción de anticuerpos monoclonales destacaron un vínculo regulador entre el metabolismo celular, los metabolitos de los medios y el crecimiento celular (Dean et al., 2013). Por ejemplo, el trabajo se ha centrado en controlar el ciclo de división celular al agotar nutrientes específicos o al controlar directamente los reguladores del ciclo celular, ya que el crecimiento y la división celular excesivos afectan negativamente los rendimientos de producción de proteínas (ver Du et al., 2014, y referencias asociadas). Sin embargo, estas intervenciones a menudo van acompañadas de efectos no deseados en la calidad y/o en el procesamiento postraduccional de la proteína recombinante (Nam et al., 2008; Sajan et al., 2010; Sampathkumar et al., 2006; Trummer et al., 2006).

35

40

Otros esfuerzos para mejorar la selección de líneas celulares transformadas se concentraron en el desarrollo de nuevos marcadores moleculares que no requieren ninguna resistencia al compuesto antibiótico tóxico. Por ejemplo, el aumento de la expresión de componentes de las vías biosintéticas de nucleótidos o aminoácidos, como la deshidrofolato reductasa o la glutamina sintasa, se han utilizado para la selección metabólica de las células que expresan proteínas recombinantes, mediante la inclusión de sus secuencias de codificación en vectores de expresión (Cacciatore et al. 2010, Birch y Racher 2006, WO2009/080759; Publicación de Patente de EE. UU. N.º 20100330572. Por ejemplo, la secuencia de codificación de un transportador de folato se utilizó para seleccionar una mayor expresión transgénica (Rothen et al., 2005). Aunque este enfoque tiene produjeron una mayor expresión de proteínas de interés farmacológico, varios estudios informaron niveles de expresión inestables, por ejemplo, cuando se usa para amplificar el número de copias del transgén (Schlatter et al., 2005; Chusainow et al., 2009).

45

50

55

El documento de patente WO 2010/097240 A1 se refiere a un sistema de selección para seleccionar células huésped que expresan un producto de interés. Su objetivo es proporcionar un sistema de selección con una alta rigurosidad para seleccionar células huésped que producen un producto de interés con alto rendimiento.

60

El metabolismo y el crecimiento de las células de mamífero también pueden depender directamente de la disponibilidad de vitaminas. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de modular el metabolismo y/o el crecimiento de las células cultivadas mediante el control de la absorción de vitaminas, la expresión de genes metabólicos de vitaminas y/o la concentración de vitaminas específicas en los medios de cultivo, generalmente con el objetivo de mejorar la expresión terapéutica de las proteínas. También existe la necesidad de procedimientos alternativos de selección de células. La presente invención está dirigida a abordar una o más de

65

estas necesidades, así como otras necesidades en la técnica.

### Breve descripción de las figuras

- 5 La **Figura 1** proporciona una descripción general del transporte de vitaminas en células y órganos de mamíferos.
- 10 Las **Figuras 2A-B** muestran el crecimiento de CHO-M en medios con agotamiento de vitaminas en relación con los medios sin agotamiento. Las células se sembraron a 50000 células/ml en 500 µl de medio de cultivo B-CDmin suplementado o no suplementado con vitamina B1, B5 o H (ver Tabla 2), o en un medio completo (SFM). Las células se cultivaron en placas de 24 pocillos durante el tiempo indicado sin agitación. La densidad celular (A) y la viabilidad (ensayo de exclusión de azul de tripano, panel (B)) se midieron después de 3, 6 y 10 días de cultivo.
- 15 La **Figura 3** muestra el crecimiento de CHO-M en medios sin vitaminas. Las células (5000 células/ml) se transfirieron a 150 µl de medio con diferentes concentraciones de vitamina B1, B5 o H (de 0 a 1X, ver Tabla 2). Se usaron 96 placas de pocillos y se midió el crecimiento después de 9 días de cultivo, midiendo el OD a 600 nm. Las barras sombreadas (inclinadas hacia adelante), oscuras punteadas y sombreadas (inclinadas hacia atrás) indican la modulación de las concentraciones de B1, B5 y H, respectivamente.
- 20 La **Figura 4** muestra el efecto del agotamiento de la vitamina B5 sobre el crecimiento celular y la viabilidad de un cultivo discontinuo alimentado con clones de células CHO-M que secretan anticuerpos. Se cultivó un clon de células CHO-M secretoras de trastuzumab en medio completo (cuadrados negros), o en un medio sin vitaminas (triángulos grises, mezcla 5000:1 V:V de B-CDmin y medio CD completo), ambos suplementados con 6 mM glutamina. Se añadieron alimentos del mismo medio de cultivo en los días 3, 6, 7, 8, 9, 10 y 13. Se analizaron los cultivos para determinar la densidad celular viable (VCD, líneas continuas) y la viabilidad celular (% de células viables, líneas punteadas).
- 25 La **Figura 5** muestra el efecto del agotamiento de la vitamina B5 sobre el título de inmunoglobulina de un clon de células CHO-M en cultivos alimentados por lotes. El clon de células CHO-M secretoras de trastuzumab crecido en forma completa (cuadrados negros) o en el medio agotado en vitamina B5 (triángulos grises) de la **Figura 4** se analizó para determinar el título de anticuerpo secretado en el medio de cultivo mediante un ensayo ELISA de doble sándwich.
- 30 La **Figura 6** muestra los niveles de ARNm de *SLC5A6* en líneas estables de CHO-M. Las poblaciones policlonales transfectadas con la cantidad indicada del vector de expresión *Slc5a6* se seleccionaron para resistencia a la puromicina, y los niveles de ARNm de *Slc5a6* se determinaron por RT-qPCR. La acumulación de transcripción de *SLC5A6* se normalizó a la del ARNm de *GAPDH*, y se representa en relación con el nivel endógeno de ARNm de *SLC5A6* de células no transformadas usadas como control que se estableció en 1,0 ng indica células transfectadas únicamente por GFP y vectores de expresión de resistencia a puromicina, mientras que C significa células de control no transformadas.
- 35 La **Figura 7** muestra el efecto de *SLC5A6* sobre el crecimiento de CHO-M en condiciones limitantes de vitaminas. Las células se sembraron a 20000 células/ml en 500 µl de medio B-CD min suplementado con las cantidades indicadas de vitamina B5 y H, y con B1 (1X). Se usó una placa de 24 pocillos y se midió el crecimiento después de 6 días de cultivo midiendo la densidad celular viable. Las estrellas representan una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre las células transfectadas y no transfectadas dentro de la misma condición de crecimiento y medios de cultivo.
- 40 La **Figura 8A-B** muestran la selección de células transfectadas con CHO-M usando medios deficientes en B5 y transportador *SLC5A6*. Se transfectaron cantidades crecientes de vector *Slc5a6* (0, 50, 250 y 1000 ng), junto con GFP y plásmidos de puromicina. Después de la selección de la población policlonal estable en medio deficiente B5 ( $10^{-3}$  X), todas las células que expresan GFP+ (barras grises: todas las células GFP+) y los expresores de alta GFP (barras negras, expresores de alta GFP) se cuantificaron por FACS
- 45 **(A)**. La media de fluorescencia para las mismas células también se cuantificó mediante FACS **(B)**. C indica células CHO-M no transformadas utilizadas como control. El número de células que sobrevivieron al procedimiento de selección fue demasiado bajo para la cuantificación tras la transfección del ADN transportador (0 ng) o 50 ng del vector de expresión *Slc5a6*.
- 50 Las **Figuras 9A-C** muestran gráficos de FACS que representan el enriquecimiento de todas las células GFP+ y de células con alta expresión de GFP de poblaciones de células policlonales estables cotransfectadas con los plásmidos de expresión *SLC5A6*, GFP y resistencia a la puromicina (puro). Las células transfectadas se sometieron a una primera selección con puromicina, seguido de una segunda selección por cultivo en medio que contenía un exceso (B5 10X/H  $10^{-4}$  X) o limitante (B5  $10^{-3}$  X/H  $10^{-4}$  X)
- 55 concentración de vitamina B5, o se cultivaron con el medio de cultivo no selectivo (B5 1X/H  $10^{-4}$  X) como
- 60
- 65

control. (A): perfiles FACS de la fluorescencia GFP de CHO-M transfectada después de cultivar las células durante 7 días en los medios que contienen diferentes concentraciones de B5 ( $10^3$  X, 1X o 10X), como se indica. La puerta 1 representa todas las células que expresan GFP, mientras que la puerta 2 está restringida a las células que expresan GFP más altas. El enriquecimiento de las células fluorescentes GFP+ (B) y la media geométrica de la fluorescencia GFP de las células (C) se representan para los grupos de células policlonales cotransfectadas con diversas cantidades de vectores de expresión *Slc5a6* (por ejemplo, 0ng, 100ng y 250ng, como se indica), y con la GFP y los vectores de resistencia a la puromicina.

La **Figura 10** muestra un flujo de trabajo experimental de selección de células. Las células CHO-M se cotransfectaron con el plásmido de cadena ligera *SLC5A6* e IgG y con una construcción de resistencia a la puromicina y cadena pesada de IgG, después de lo cual el cultivo se dividió y seleccionó en presencia de puromicina (**condición A**) o en el cultivo privado de vitaminas. medio (medio mínimo, **condición B**), o mediante una doble selección (**AD y BD**). Esto fue seguido por ensayos de secreción de inmunoglobulina de los conjuntos de células policlonales resultantes. Después de la selección, parte de las células se transfirieron a un medio de cultivo no selectivo, para su pase durante un estudio de 10 semanas de la estabilidad de la expresión (A+, B+), o en biorreactores por lotes alimentados (AD+ y BD+).

La **Figura 11** muestra la secreción de inmunoglobulina de las poblaciones celulares seleccionadas usando purificación de puromicina o vitamina, o usando ambas selecciones. Los grupos de células policlonales totales se seleccionaron por crecimiento en el medio completo que contenía 5 µg/ml de puromicina (A+), en el medio mínimo (B1+), o mediante la doble selección, en el medio mínimo y en presencia de 5 µg/ml de puromicina. (B1D+ y B2D+), como se muestra en la Figura 10. Se analizaron dos poblaciones de células independientes para el régimen de selección B, denominado B1 y B2, produciendo las poblaciones B1D+ y B2D+ doblemente seleccionadas, respectivamente. Se analizaron dos poblaciones independientes para el régimen de selección BD+. Los grupos seleccionados se cultivaron en medio completo, y se añadieron alimentos en el día 3, y en los días 6 a 10. Las muestras se analizaron para el título de anticuerpo secretado por ELISA de doble sándwich.

La **Figura 12** muestra la secreción de inmunoglobulina de las poblaciones celulares seleccionadas usando purificación de puromicina o vitamina. (A) Las células se analizaron en el día 39 de cultivo siguiendo el régimen de selección representado en la Figura 10. La secreción celular fue detectada por un complejo de anticuerpos fluorescentes que se une al anticuerpo terapéutico secretado que se muestra en la superficie celular y se secreta. Las barras negras y la escala de la izquierda indican el porcentaje de células que secretan el anticuerpo en las poblaciones policlonales. La intensidad media de fluorescencia de la superficie celular, indicativa del nivel de secreción de células individuales, se muestra como barras blancas en unidades arbitrarias (AU) en la escala del lado derecho. Se analizaron dos poblaciones independientes para el régimen de selección B+ (B1+, B2+). (B) Las poblaciones celulares del panel A se analizaron para determinar los niveles de ARNm de la cadena pesada (Hc) y la cadena ligera (Lc) de la IgG, o del transportador de vitamina B5 (*SLC5A6*).

La **Figura 13** muestra la estabilidad de la secreción de inmunoglobulina de poblaciones seleccionadas usando purificación de puromicina o vitamina. Los grupos de células policlonales de la **Figura 8**, seleccionados usando puromicina (A+) o por privación de vitamina B5 (B+), se mantuvieron en medio completo y se pasaron dos veces por semana para estudios de estabilidad de la expresión. La productividad específica de las poblaciones celulares, expresada en picogramos de anticuerpo secretado por célula y por día (pcd), se midió después de cada pasaje durante 10 semanas.

La **Figura 14** muestra los ensayos de producción de inmunoglobulina de cultivos alimentados por lotes de poblaciones de células seleccionadas usando puromicina o reducción de vitaminas. Los grupos seleccionados se cultivaron en medio completo en cultivos de lotes alimentados, y se agregaron alimentos en el día 3 y en los días 6 a 10. Las muestras se analizaron para determinar la densidad celular viable (VCD) y la viabilidad (% de células viables, líneas punteadas) (A), y para el título de anticuerpo secretado por ELISA de doble sándwich (B).

La **Figura 15** muestra las secuencias de codificación (CDS) de diferentes genes de vitamina CHO-M.

La **Figura 16** muestra las secuencias de aminoácidos de los genes de la vitamina CHO-M de la Figura 15.

La **Figura 17** muestra el transportador multivitaminico dependiente de sodio (SMVT) *SLC5A6* en predicción silico para regiones transmembrana (determinado a través del sitio web del Centro de Análisis de Secuencias Biológicas, Universidad Técnica de Dinamarca, marzo de 2015).

La **Figura 18** muestra un protocolo para seleccionar células de alta expresión co-transfectando un vector de expresión para el transportador de vitaminas *SLC5a6* (derecha) y cultivando las células en medio de cultivo selectivo privado de vitaminas. Las células CHO se cotransfectaron con los vectores de expresión de

cadena ligera y pesada GFP o IgG y el plásmido de resistencia a puomicina, sin (condición A) o con (condiciones B y C) el vector de expresión SLC5a6. Los cultivos se seleccionaron luego en presencia de puomicina (condiciones A y B) o mediante cultivo en el medio de cultivo privado de vitaminas que contenía concentraciones limitantes de vitaminas (B5  $10^{-3}$  X/H  $10^{-4}$  X) (condición C) Nótese que el círculo cruzado indica que las células que no habían sido transfectadas con el vector de expresión SLC5a6 no sobrevivieron a la selección en el medio de cultivo privado de vitaminas. Después de la selección, las células se cultivaron en un medio de cultivo no selectivo hasta el análisis por FACS o por ensayos de secreción de inmunoglobulina de los conjuntos de células policlonales resultantes (**Figura 19-20**), o durante la generación y análisis de poblaciones monoclonales (**Figura 20- 21**)

La **Figura 19** muestra el enriquecimiento de las células que expresan la proteína indicadora de GFP transfectada de acuerdo con el protocolo que se muestra en la **Figura 18**. El análisis por citofluorometría para fluorescencia GFP (A) mostró altos niveles de poblaciones policlonales después de la selección basada en la privación de vitaminas (en un círculo C). El enriquecimiento de las células fluorescentes positivas para GFP (B) y la media geométrica de la fluorescencia GFP de las células (C) se representan para los grupos de células policlonales.

La **Figura 20** muestra el enriquecimiento de las células que expresan una inmunoglobulina terapéutica (en lugar de GFP) a altos niveles en poblaciones policlonales después de una selección basada en la privación de vitaminas, de acuerdo con los protocolos mostrados en la Figura 18. Los niveles de producción de las células seleccionadas por privación de vitaminas (C marcado) son más altas en el nivel del conjunto de células policlonales (panel A), y para 10 clones de células seleccionados aleatoriamente obtenidos por diluciones limitantes (**panel B**) (véase también la leyenda de la Figura 18)

La **Figura 21** muestra el alto nivel de secreción de IgG por tinción de la superficie celular para uno de los clones productores de IgG (Clon C\_a) obtenidos por selección de vitaminas (**A**), la estabilidad de la producción para dos de estos clones (Clones C\_a y C\_b) (**B**), así como la alta densidad de células viables y los niveles de producción de los dos clones en condiciones de cultivo alimentado por lotes (**C y D**), en comparación con un clon de referencia de alto productor obtenido previamente en paralelo (BS03).

La **Figura 22** ilustra la selección (a través de un antibiótico o por cultivo en medio agotado en vitaminas ("metabólico")) de poblaciones policlonales que expresan diversas proteínas terapéuticas, un anticuerpo fácil de expresar (A y B) y uno difícil de expresar. proteína (interferón beta, panel C). Esto muestra la versatilidad del sistema de selección para la selección de células que producen proteínas terapéuticas de interés a niveles mejorados en relación con la selección de antibióticos convencionales.

### Sumario de la invención

La invención está dirigida a un sistema de expresión eucariota que comprende:

- al menos un primer polinucleótido que codifica al menos una proteína metabólica de vitamina bajo el control de al menos una primera secuencia reguladora, y
- bajo el control de al menos una segunda secuencia reguladora, al menos un sitio de escisión de enzimas de restricción y/o al menos un segundo polinucleótido que codifica al menos un producto de interés.

La al menos una proteína metabólica de vitamina puede ser una proteína de transporte de vitaminas. El al menos un segundo polinucleótido se puede insertar en dicho al menos un sitio de escisión de enzima de restricción. La proteína de transporte de vitaminas puede transportar una vitamina soluble como vitamina B1, B5 y/o H. La proteína de transporte de vitaminas puede ser THTR-1 (transportador de tiamina-1), THTR-2 (transportador de tiamina-1), TPC (portador de pirofosfato de tiamina), TPK (pirofosfoquinasa de tiamina) y/o, en particular, SMVT (transportador multivitamínico dependiente de sodio). Un vector de expresión puede comprender el sistema de expresión. En particular, un vector singular puede comprender dicho al menos un primero y dicho al menos un segundo polinucleótido.

La primera y/o segunda secuencia reguladora pueden ser promotores, potenciadores, regiones de control de locus (LCR), regiones de unión a matriz (MAR), regiones de unión a armazón (SAR), elementos aislantes y/o ADNs asociados a matriz nuclear.

La invención también se dirige a un kit que comprende en un recipiente, el sistema de expresión eucariota divulgado en la presente memoria (en particular en uno o más vectores) y, en un segundo recipiente, instrucciones de cómo usar dicho sistema. El kit puede comprender además un medio de cultivo celular, preferentemente que tiene una concentración limitante y/o saturante de al menos una vitamina, tal como de vitamina B1, B5 y/o H.

La invención también se dirige a una célula eucariota recombinante que comprende el sistema de expresión

descrito en la presente memoria descriptiva; y/o

que tiene una mutación aceleradora o lentificadora en una proteína metabólica de vitamina, y un polinucleótido (segundo polinucleótido) que codifica un producto de interés, o una secuencia regulatoria que regula la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína metabólica de vitamina, en la que la proteína metabólica de vitamina es opcionalmente intrínseca a la célula. La célula puede ser una célula de ovario de hámster chino (CHO). El al menos un primer polinucleótido puede estar mutado/contener una mutación aceleradora o lentificadora. La proteína metabólica de vitamina puede interferir con el metabolismo de la vitamina y/o unirse a la vitamina dentro de una célula. La proteína metabólica de vitamina puede ser pantotenato 1, 2 y/o 3 y/o una pirofosfato quinasa de tiamina, como la TPK1 (pirofosfato quinasa de tiamina 1).

La proteína metabólica de vitamina puede ser un marcador seleccionable para dicha célula eucariota recombinante y dicha célula eucariota recombinante puede producir y, preferentemente, secretar dicho producto de interés.

La invención también se dirige a un medio de cultivo de células eucariotas que comprende las células eucariotas recombinantes divulgadas en la presente memoria, preferentemente policlonales, que expresan preferentemente (i) una proteína de transporte de vitaminas como marcador seleccionable y (ii) una proteína de interés. El medio puede ser un medio limitante para B5, o un medio saturado para B5 pero un medio limitante para H.

La invención también se dirige a un procedimiento para cultivar y, opcionalmente, seleccionar células eucariotas recombinantes que comprende:

proporcionar el sistema de expresión como se divulga en la presente memoria, proporcionar células eucariotas, en las que la viabilidad, crecimiento y/o división de dichas células eucariotas depende de la absorción de vitaminas, introducir dicho sistema de expresión en dichas células eucariotas para producir dichas células eucariotas recombinantes que expresan dicha proteína metabólica de vitamina y dicha proteína de interés, cultivar dichas células eucariotas en un medio de cultivo celular, por ejemplo, un medio limitante para B5, o un medio saturado para B5, pero un medio limitante o no limitante para H, o un medio saturado para H pero un medio limitante o no limitante para B5 y opcionalmente, seleccionar a través de dicha proteína metabólica de vitamina, que preferentemente se expresa en la superficie de dichas células eucariotas recombinantes, dichas células eucariotas recombinantes que expresan establemente dicho producto de interés.

Un medio de selección como se divulga en la presente memoria podría ser un medio limitante para B5, o un medio saturado para B5, pero un medio limitante o no limitante para H.

La presente invención también está dirigida al uso de una proteína metabólica de vitamina y su secuencia de codificación de ADN como un marcador de selección para la selección de células eucariotas recombinantes que expresan establemente un producto de interés, en el que la viabilidad, el crecimiento y/o la división de dicha célula puede depender de la absorción de una vitamina.

La presente invención también se dirige a un medio de cultivo que comprende al menos una vitamina:

- en una concentración de menos de 10 nM, y/o
- en una concentración de 20 µM o más, en el que dicha al menos una vitamina es una vitamina esencial.

La al menos una vitamina puede ser vitamina B1, B5 y/o H. El medio de cultivo puede comprender una o más células eucariotas recombinantes que expresan, preferentemente secretan, una proteína de interés. La proteína de interés puede ser una proteína terapéutica. Se puede detener el crecimiento y/o división de las células, y la proteína de interés se puede producir a un nivel máximo inhibido (MAL en [g/1]) que excede un nivel máximo (ML en [g/1]) de proteína expresado por las células cuando crecen en un medio, preferentemente un medio estándar, en el que el crecimiento no se detiene, en donde el MAL es más de 1,5 veces el ML, más de 2 veces el ML o incluso más de 2,5x o 3x el ML.

La invención también se dirige a un procedimiento para producir una proteína de interés, que comprende:

- (a) transformar células eucariotas con un sistema de expresión divulgado en la presente memoria para producir células eucariotas recombinantes;
- (b) cultivar dichas células eucariotas recombinantes en un medio de cultivo en el que la viabilidad y/o crecimiento o división de las células eucariotas recombinantes depende de la actividad de una o más proteínas metabólicas de vitamina;
- (c) seleccionar células eucariotas recombinantes que expresan dicha una o más proteínas metabólicas de vitaminas, en el que dicha proteína metabólica de vitamina es un marcador seleccionable para obtener células eucariotas recombinantes seleccionadas, preferentemente cuando dichas células eucariotas

recombinantes son parte de una población de células monoclonales (procedentes de una unicelular); y (d) purificar la proteína de interés de dichas células eucariotas recombinantes seleccionadas o de un medio de cultivo de las mismas que comprende dichas células eucariotas recombinantes seleccionadas.

5 La proteína metabólica de vitamina puede ser una proteína de transporte de vitamina que preferentemente transporta vitamina B5, B1 y/o H y dicho medio de cultivo puede ser limitante y/o saturante para una o más de dichas vitaminas. La proteína de transporte de vitaminas puede ser SMVT y el medio de cultivo puede ser un medio limitante para B5, o un medio saturado para B5 pero un medio limitante para H.

10 La invención también se dirige a células, procedimientos, sistemas y vectores de expresión divulgados en la presente memoria, en los que dicha proteína SMVT está codificada por un gen *Slc5a6* o un derivado del mismo, y/o en los que dichas células eucariotas son parte de una población de células monoclonales.

15 La presente invención también se dirige más generalmente a evaluar si los estrictos requerimientos de vitaminas de las células eucariotas podrían usarse como herramienta de selección para células transformadas, en particular células transformadas que expresan de manera estable altos niveles de un gen de interés, cuando se coexpresan con un gen de absorción de vitaminas. La presente invención también se dirige más generalmente a evaluar si se pueden usar medios de cultivo enriquecidos o sin vitaminas para mejorar aún más la producción de proteínas por parte de dichas células.

20 En una realización específica, la presente invención está dirigida a disminuir la disponibilidad de vitamina B5 en la fase tardía de la producción de proteína recombinante para ralentizar la división celular, y de ese modo aumentar el nivel de proteínas terapéuticas producidas en un biorreactor.

25 En otra realización específica, la invención también se dirige a la clonación y expresión del transportador multivitamínico *Slc5a6* (SMVT), implicado en la absorción de la vitamina B5 y H en la célula, en particular las células CHO-M. La invención también está dirigida a las células que sobreexpresan este transportador de vitaminas para dar como resultado un crecimiento más rápido y una mayor viabilidad en los medios limitantes de B5 en comparación con las células no transformadas. La invención también se dirige a coexpresar *SLC5A6* como un marcador de selección para obtener líneas celulares que tienen niveles más altos de producción de proteína recombinante. La invención está dirigida además a sobreexpresar *SLC5A6* en células para producir una mejor viabilidad celular incluso en un medio de cultivo no agotado, contribuyendo preferentemente a niveles de expresión aún más favorables de proteínas terapéuticas.

### 35 **Discusión de varias realizaciones preferentes**

#### Definiciones

40 Un sistema de expresión eucariota de acuerdo con la presente invención comprende elementos que permiten la expresión de un gen de interés en células eucariotas tales como una célula CHO, preferentemente una célula CHO K1, preferentemente una célula CHO-M. Generalmente, el sistema de expresión eucariota comprende al menos un vector de expresión. Sin embargo, el sistema de expresión eucariota también podría ser parte del genoma de una célula eucariota. El vector sistema/expresión comprende secuencias reguladoras tales como promotores, potenciadores, regiones de control de locus (LCR), regiones de unión a matriz (MAR), regiones de unión a armazones (SAR), elementos aislantes y/o ADNs asociados a matriz nuclear que conducen a una transcripción eficiente de un transgén integrado en el sistema de expresión. Estas secuencias reguladoras como cualquier otra secuencia a la que se hace referencia en la presente memoria descriptiva a menudo son heterólogas (es decir, extrañas a la célula huésped que se está utilizando, por ejemplo, derivadas de una especie diferente a la célula huésped que se está utilizando) o, aunque son homólogas (es decir, endógenas al huésped célula utilizada) están presentes en diferentes ubicaciones genómicas que cualquier contraparte intrínseca a las células (en lo sucesivo denominado "heterolocal"). Un vector de expresión también puede contener un origen de replicación.

55 El primer polinucleótido que codifica al menos una proteína metabólica de vitamina y el segundo polinucleótido que codifica al menos un producto de interés de acuerdo con la presente invención se añaden a una célula eucariota para crear una célula eucariota recombinante. Los genes o proteínas intrínsecos a la célula eucariota no se agregan a la célula, pero existen en la célula independientemente de cualquier transformación. Sin embargo, como se dará cuenta la persona experta en la técnica, el primer y segundo polinucleótido podrían ser copias de un gen intrínseco, como copias heterolocales del gen. En muchos casos, se prefiere que algunas o todas las secuencias de ADN codificantes (CDS) de un gen de tipo salvaje formen los polinucleótidos de la presente invención, incluido el primer polinucleótido que codifica al menos una proteína metabólica de vitamina.

60 Como se usa en la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se usan indistintamente, ya que un plásmido es la forma de vector usada más comúnmente. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión, que incluyen, pero no se limitan a, vectores virales (por ejemplo, retrovirus, adenovirus

y adenovirus defectuosos de replicación defectuosos) o vectores transponibles, que cumplen funciones equivalentes. En este caso, la transformación se refiere a la introducción del ADN del vector en cualquier célula, independientemente del medio o tipo de vector utilizado.

5 El "gen de interés" o "transgén", en la presente memoria descriptiva también denominado "polinucleótido que codifica un producto de interés" codifica, por ejemplo, una "proteína de interés" (proteína estructural o reguladora). La proteína de interés es a menudo una proteína terapéutica. Como se usa en la presente memoria descriptiva, "proteína" se refiere generalmente a péptidos y polipéptidos que tienen más de aproximadamente diez aminoácidos. Las proteínas pueden ser "homólogas" para el huésped (es decir, endógenas a la célula huésped que se está utilizando) o "heterólogas" (es decir, ajenas a la célula huésped que se está utilizando), como una proteína humana producida por la levadura. La proteína se puede producir como un agregado insoluble o como una proteína soluble en el espacio periplásmico o el citoplasma de la célula, o en el medio extracelular. Los ejemplos de proteínas terapéuticas incluyen hormonas como la hormona del crecimiento o la eritropoyetina (EPO), factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico, sustancias analgésicas como la encefalina, enzimas como la quimotripsina, receptores o anticuerpos (por ejemplo, inmunoglobulina monoclonal (IgG) Trastuzumab). Los genes generalmente se usan como un marcador de visualización, por ejemplo, la proteína verde fluorescente también son transgenes adecuados. El transgén también puede codificar, por ejemplo, un ARN regulador, como un ARNip. Una proteína homóloga o ARN puede ser producida por un polinucleótido heterólogo. En muchos casos, se prefiere que algunas o todas las secuencias de ADN codificantes (CDS) de un gen de tipo salvaje formen los polinucleótidos de la presente invención, incluido el segundo polinucleótido que codifica al menos un producto de interés.

Las células eucariotas utilizadas en el contexto de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, las células CHO-M mencionadas anteriormente (disponibles de SELEXIS SA) y otras células que son adecuadas para la producción de proteínas a escala de fabricación industrial. Esas células son bien conocidas por los expertos y se han originado, por ejemplo, de las especies *Cricetulus griseus*, *Cercopithecus aethiops*, *Homo sapiens*, *Mesocricetus auratus*, *Mus musculus* y *Chlorocebus*. Las líneas celulares respectivas se conocen como células CHO (ovario de hámster chino), células COS (una línea celular derivada de riñón de mono (mono verde africano), células vero (células epiteliales de riñón extraídas de mono verde africano), células Hela (la línea se derivó de células de cáncer cervical tomadas de Henrietta Lacks), células BHK (células de riñón de hámster bebé, células HEK (riñón embrionario humano), células NSO (línea celular de mieloma murino), células C127 (célula de ratón no tumorigénica línea), células PerC6.RTM. (línea celular humana, Crucell), células CAP (producción de amniocitos de CEVEC) y células Sp-2/0 (células de mieloma de ratón). Las células eucariotas utilizadas en el contexto de la presente invención pueden también, por ejemplo, ser células primarias humanas, incluidas células madre hematopoyéticas, como células de médula ósea o células madre, como células madre embrionarias(es), células madre pluripotentes inducidas (iPS) o células diferenciadas derivadas de células ES o iPS.

Una proteína metabólica de vitamina de acuerdo con la presente invención es una proteína que disminuye o aumenta la disponibilidad de vitaminas o el uso en una célula.

Una proteína metabólica de vitamina preferida es una proteína de transporte de vitaminas que generalmente es una proteína unida a la membrana y transporta las vitaminas disponibles en un medio de cultivo a una célula. La Tabla 1 proporciona ejemplos de esas proteínas bajo el encabezado de "Función". Como se puede apreciar en esta tabla, se han caracterizado dos transportadores citoplasmáticos y uno mitocondrial para la vitamina B1 (SLC19A2 [SEQ ID NO: 24], SLC19A3 [SEQ ID NO: 25] y SLC25A19 [SEQ ID NO: 27]), mientras que se ha caracterizado un único transportador citoplasmático para las vitaminas B5 y H, llamado transportador multivitamínico de sodio SLC5A6 [SEQ ID NO. 21].

Otros ejemplos de proteínas metabólicas de vitamina incluyen pantotenato quinasas 1, 2 o 3 codificadas por el *PANK1* [SEQ ID NO. 22], *PANK2* [SEQ ID NO. 23] y *PANK3* [SEQ ID NO. 35, 36] y el gen TPK1 (tiamina pirofosfato quinasa 1), codificado por el gen TPK1 [SEQ ID NO. 26] Las pantotenato quinasas son enzimas reguladoras clave en la biosíntesis de la coenzima A (CoA), la proteína TPK1 homodimérica cataliza la conversión de tiamina en pirofosfato de tiamina. Como el experto en la técnica se dará cuenta fácilmente, otras proteínas que están involucradas en el metabolismo de las vitaminas también son parte de la presente invención.

Una célula que crece en un medio de cultivo completo tendrá todas las vitaminas disponibles en concentraciones estándar. Las concentraciones estándar se denominan aquí como 1X. Las concentraciones estándar para B1, B5 y H (1X) se establecieron en 7,5 µM, 2,5 µM y 0,5 µM, respectivamente. Se determinó que B5 tenía para las células CHO un intervalo de concentración limitante del crecimiento de aproximadamente  $10^4$  X a  $10^{-3}$  X (0,25 a 2,5 nM), mientras que  $10^2$  X y concentraciones más altas permitieron el crecimiento normal del cultivo. Se determinó que las concentraciones limitantes de B1 eran para las células CHO entre  $10^{-5}$  X (15pM) y  $10^{-4}$  X (150pM), mientras que era inferior a  $10^{-5}$  X (5pM) para H. En un medio que tiene una concentración limitante (medio limitante o medio agotado) de dicha vitamina, la concentración es inferior a 1X, por ejemplo  $10^{-1}$  X,  $10^{-2}$  X,  $10^{-3}$  X,  $10^{-4}$  X,  $10^{-5}$  X, en relación con dicha concentración estándar de la vitamina respectiva presente en un

medio completo (1 X). La concentración de una vitamina se considera saturante si la concentración excede la de un medio de referencia estándar (también denominado en la presente memoria descriptiva "medio saturado") (por ejemplo, 2 X, 3 X, 4 X, 5 X o 10 X la cantidad encontrado en un medio completo).

5 Los medios de cultivo celular que tienen una concentración limitante y/o saturante de una vitamina son parte de la presente invención. Por ejemplo, el medio puede agotarse con respecto a una vitamina, pero saturarse con respecto a otra vitamina.

10 En un medio limitante, puede detenerse el crecimiento y/o división de dichas células, y puede producirse una proteína de interés a un nivel máximo inhibido ("MAL" en [g/l]). El MAL puede exceder un nivel máximo ("ML" en [g/l]) de proteína expresada por el mismo tipo de células cuando se cultiva en un medio tal como un medio estándar, en el que no se detiene su crecimiento. En ciertas realizaciones de la presente invención, el MAL es más de 1,5 veces el ML, más de 2 veces el ML o incluso más de 2,5x o 3x el ML. Por ejemplo, mientras que un  
 15 ML de proteína de interés, como un anticuerpo que se expresa por células recombinantes, como las células CHO recombinantes en medio estándar, es aproximadamente 1 g/l de IgG, el MAL de proteína de interés, como un anticuerpo que se expresa por células recombinantes, como las células CHO recombinantes en medio estándar es de aproximadamente 3 g/l de IgG o más.

20 La proteína metabólica de vitamina, incluida la proteína de transporte de la vitamina, puede ser una proteína de tipo salvaje de longitud completa o puede estar mutada, incluso mediante mutaciones puntuales, sustituciones, inserciones, adiciones y/o deleciones o inversiones terminales o internas. Mientras que una proteína metabólica de vitamina puede, en relación con una secuencia particular, contener una mutación que tiene (i) actividad correspondiente a la proteína de tipo salvaje (mutación neutral), una proteína metabólica/de transporte de  
 25 vitamina se denomina mutada en el contexto del presente invención cuando la mutación provoca una (ii) actividad/estabilidad alterada en comparación con la proteína de tipo salvaje que incluye una mayor actividad ("mutación aceleradora") (por ejemplo, en más del 10%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90% o más del 100%) o disminución de la actividad/estabilidad ("mutación lentificadora") (por ejemplo, menos del 10%, menos del 20%, menos del 30%,  
 30 menos del 40%, menos del 50%, menos del 60%, menos del 70%, menos del 80%, menos del 90%, menos del 100%). Se puede evaluar fácilmente si una mutación particular es una mutación aceleradora o lentificadora mediante ensayos estándar disponibles en la técnica. La proteína metabólica de vitamina mutada resulta de una mutación en el primer polinucleótido que codifica la proteína metabólica de vitamina. De manera similar, una mutación en la secuencia que regula la expresión de dicho primer polipéptido se denomina mutación aceleradora cuando el polipéptido codificado por el polinucleótido se expresa de manera más o más estable (por ejemplo,  
 35 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, o más) que cuando la secuencia que regula la expresión de dicho primer polipéptido no comprende la mutación. Una mutación en una secuencia que regula la expresión de dicho primer polipéptido se denomina mutación lentificadora cuando el polipéptido codificado por el polinucleótido se expresa de manera menos o menos estable que el primer polinucleótido, por ejemplo, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o menos) que cuando la secuencia que regula la expresión de dicho primer polipéptido no comprende la mutación. Las  
 40 mutaciones aceleradoras en las secuencias que regulan la expresión del primer polipéptido también pueden corresponder a la adición de un MAR, SAR, LCR y/o un elemento aislante además de las secuencias potenciadoras y promotoras para aumentar el nivel de expresión o la estabilidad de la proteína codificada por dicho polinucleótido.

45 Las modificaciones o mutaciones deseadas en el polipéptido se pueden lograr usando cualquier técnica conocida en la técnica. Las técnicas de ADN recombinante para introducir tales cambios en una secuencia de proteínas son bien conocidas en la técnica. En ciertas realizaciones, las modificaciones se realizan mediante mutagénesis dirigida al sitio del polinucleótido que codifica la proteína o la secuencia que regula (secuencias reguladoras como se definió anteriormente) su expresión. Otras técnicas para introducir mutaciones se discuten en Molecular  
 50 Cloning: A Laboratory Manual (Clonación molecular: un manual de laboratorio), 2nd Ed., Ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); el tratado, Methods in Enzymology (Procedimientos en enzimología) (Academic Press, Inc., N.Y.); Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology (Protocolos actuales en biología molecular) (John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1999).

55 Se conocen en particular mutaciones lentificadoras en promotores y otras secuencias reguladoras inherentes a una célula. La mutación disminuye la afinidad de los factores de transcripción para la región promotora, disminuyendo las tasas de transcripción. Sin embargo, las mutaciones en las regiones promotoras también pueden ser neutrales o causar mutaciones.

60 Los polinucleótidos y proteínas que tienen más del 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con los polinucleótidos y secuencias de proteínas divulgadas en la presente memoria, en particular las divulgadas en las Figuras 15 y 16 también son parte de la presente invención, ya sea solos o como parte de cualquier sistema (por ejemplo, vectores y células), procedimiento y kit divulgados en la presente memoria. La Figura 15 muestra en particular el CDS (secuencia de ADN codificante) del gen respectivo,  
 65 por ejemplo, esa porción del ADN o ARN del gen, compuesta de exones que codifica la secuencia de

proteína/aminoácido respectivo (ver Figura 16). Los polinucleótidos de la presente invención pueden diferir de cualquier secuencia de tipo salvaje en al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más nucleótidos. En muchos casos, se prefieren los polinucleótidos formados por CDS del gen o ADNc respectivos.

5 El término identidad de secuencia se refiere a una medida de la identidad de secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos. En general, las secuencias se alinean de modo que se obtenga la coincidencia de orden más alto. La "identidad", per se, ha reconocido el significado en la técnica y puede calcularse utilizando técnicas publicadas. (Ver, por ejemplo: Computational Molecular Biology (Biología molecular informática), Lesk, AM, ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Biocomputación: informática y proyectos genómicos), Smith, DW, ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data (Análisis informático de datos de secuencia), Parte I, Griffin, AM, y Griffin, HG, eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology (Análisis secuencial en biología molecular), von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer (Cebador para análisis de secuencias), Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991). Si bien existen varios procedimientos para medir la identidad entre dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos, los expertos en la técnica conocen bien el término "identidad" (Carillo, H. y Lipton, D., SIAM J Applied Math 48: 1073 (1988)).

20 Si una molécula particular de ácido nucleico es al menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico de SMVT [SEQ ID NO. 21], o una parte del mismo, se puede determinar convencionalmente utilizando programas informáticos conocidos como el software DNAsis (Hitachi Software, San Bruno, CA) para la alineación de la secuencia inicial, seguido del software de secuencia de ADN/proteína ESEE versión 3.0 (cabot@trog.mbb.sfu.ca) para alineamientos de secuencia múltiple.

25 Si la secuencia de aminoácidos es al menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a, por ejemplo, la SEQ ID NO. 28, o una parte del mismo, se puede determinar convencionalmente utilizando programas informáticos conocidos como el programa BESTFIT (Paquete de análisis de secuencia de Wisconsin, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, 53711). BESTFIT utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981), para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias.

30 Cuando se usa DNAsis, ESEE, BESTFIT o cualquier otro programa de alineación de secuencias para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, 95% idéntica a una secuencia de referencia de acuerdo con la presente invención, los parámetros se establecen de tal manera que el porcentaje de identidad se calcula sobre la longitud total de la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos de referencia y se permiten huecos en la homología de hasta el 5% del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia.

35 Una célula eucariota recombinante de acuerdo con la presente invención es una célula eucariota que contiene un transgén como se definió anteriormente.

40 Una vitamina esencial de acuerdo con la presente invención es una vitamina requerida para el crecimiento celular, división y/o viabilidad.

45 Los sistemas de expresión generalmente contienen un gen marcador seleccionable que facilita la selección de células eucariotas (células huésped) transformadas con vectores que contienen el polinucleótido que codifica la proteína de interés. El marcador seleccionable (o "proteína marcadora seleccionable") expresado por el gen a menudo se basa en la resistencia a los antibióticos. Por ejemplo, se puede usar un casete de expresión de selección de resistencia a puromicina para identificar, mediante la adición de puromicina, células que se han transformado con éxito con el casete. Sin embargo, la selección sin resistencia a los antibióticos también es posible. Ejemplos de marcadores seleccionables de este tipo son la dihidrofolato reductasa (DHFR) y la glutamina sintetasa (GS). La selección ocurre, por ejemplo, en ausencia de los metabolitos, por ejemplo, glicina, hipoxantina y timidina para DHFR y glutamina para GS. Las células que sobreviven a la selección comprenden una o más copias del plásmido transformado en el genoma de la célula. En el contexto de la presente invención, la proteína metabólica de vitamina/proteína de transporte de la vitamina puede servir como marcador seleccionable individualmente o en combinación con otros marcadores seleccionables. Por lo tanto, en su forma más simple, en un medio que es deficiente en una vitamina, las células eucariotas recombinantes que expresan la proteína de transporte de vitaminas respectiva, como un marcador seleccionable, pueden crecer mejor que las células que no expresan la proteína de transporte de vitaminas respectiva. Sin embargo, como se discute en la presente memoria descriptiva, incluso en un medio estándar, las proteínas de transporte de vitaminas proporcionan una ventaja de crecimiento y, por lo tanto, se pueden usar como marcador seleccionable. Los sistemas de expresión de la presente invención pueden contener, como marcadores seleccionables, proteína(s) metabólica de la vitamina/proteína(s) de transporte de la vitamina además de genes marcadores seleccionables basados, por ejemplo, en la resistencia a los antibióticos.

65 De manera similar, una mutación en la secuencia que regula la expresión de dicho primer polipéptido se

denomina mutación aceleradora cuando el polipéptido codificado por el polinucleótido se expresa más o es más estable (por ejemplo, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o más) que cuando la secuencia que regula la expresión de dicho primer polipéptido no comprende la mutación. Una mutación en una secuencia que regula la expresión de dicho primer polipéptido se denomina mutación lentificadora cuando el polipéptido codificado por el polinucleótido se expresa menos que el primer polinucleótido o es menos estable (por ejemplo, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o menos) que cuando la secuencia que regula la expresión de dicho primer polipéptido no comprende la mutación.

Las modificaciones o mutaciones deseadas en el polipéptido se pueden lograr usando cualquier técnica conocida en la técnica. Las técnicas de ADN recombinante para introducir tales cambios en una secuencia de proteínas son bien conocidas en la técnica. En ciertas realizaciones, las modificaciones se realizan mediante mutagénesis dirigida al sitio del polinucleótido que codifica la proteína o la secuencia que regula (secuencias reguladoras como se definió anteriormente) su expresión. Otras técnicas para introducir mutaciones se discuten en Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Clonación molecular: un manual de laboratorio), 2nd Ed., Ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); el tratado, Methods in Enzymology (Procedimientos en enzimología) (Academic Press, Inc., N.Y.); Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology (Protocolos actuales en biología molecular) (John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1999).

Se conocen en particular mutaciones lentificadoras en promotores y otras secuencias reguladoras inherentes a una célula. La mutación disminuye la afinidad de los factores de transcripción para la región promotora, disminuyendo las tasas de transcripción. Las mutaciones en las regiones promotoras pueden ser neutrales, causar mutaciones lentificadoras o aceleradoras. De manera similar, las mutaciones en, por ejemplo, un gen para una proteína metabólica de vitamina tal como una proteína de transporte de vitaminas pueden ser mutaciones neutrales, lentificadoras o aceleradoras.

1- Efectos de limitar el transporte de vitaminas sobre el crecimiento de células CHO y la expresión de proteínas recombinantes

Una primera etapa para el uso de vitaminas por células de mamífero cultivadas es su absorción celular del medio de cultivo. Las vitaminas B1 (tiamina), B5 (pantotenato) y H (B8 o biotina) son vitaminas solubles que se transportan al citoplasma y luego a las mitocondrias, donde actúan como cofactores metabólicos (Figura 1). Se han caracterizado dos transportadores citoplasmáticos y uno mitocondrial para B1 (SLC19A2, SLC19A3 y SLC25A19), mientras que un transportador citoplasmático único se ha caracterizado tanto para las vitaminas B5 como H, llamado transportador multivitamínico de sodio SLC5A6 (Tabla 1).

**Tabla 1.** Genes de ratones implicados en la absorción de vitaminas en la célula. Última columna: acumulación de transcripción en células CHO-M.

Vitamina	Función	Localización	Acceso	Transcriptoma CHO-M (número de coincidencia en RPKM)
B1	(THTR)-1 (Transportador de Tiamina)	Membrana de plasma	S1c19a2	3270/12
	(THTR)-2 (Transportador de Tiamina)	Membrana de plasma	S1c19a3	0/0
	TPK (Tiamina Pirofosfato Quinasa)	Citosol	Tpk1	4899 / 12
H+ B5	TPC (Portador de Tiamina Pirofosfato)	Mitocondria	S1c25a19	6016/22
	SMVT (transportador multivitamínico dependiente de sodio)	Membrana de plasma	Slc5a6	5267 / 13
B5	PANK1 (Pantotenato Quinasa 1)	Mitocondria	Pank1	3
	PANK2 (Pantotenato Quinasa 2)	Mitocondria	Pank2	38

1.1- Determinación de las concentraciones de vitaminas limitantes del crecimiento

Para evaluar el efecto de limitar la concentración de vitaminas sobre el crecimiento celular, un medio de cultivo celular agotado específicamente de vitaminas B1, B5 y H, llamado B-CDmin, se obtuvo de un medio de crecimiento disponible comercialmente (medio de crecimiento BalanCD CHO, IRVINE SCIENTIFIC INC.). Las células CHO-M sembradas en el medio B-CDmin no pudieron mantener las divisiones celulares, como se

esperaba (Figura 2A). Con el tiempo, el tamaño celular se redujo y las células comenzaron a perder viabilidad después de 6 días de incubación en el medio que carece de vitaminas (Figura 2B). Luego, el medio B-CDmin se complementó con cantidades conocidas de vitaminas, estableciendo las concentraciones estándar de B1, B5 y H (1X) en 7,5  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M y 0,5  $\mu$ M, respectivamente, como se encuentra en los medios completos comúnmente utilizados (Tabla 2). En el medio de cultivo deficiente únicamente de B5, las células no se dividieron y la viabilidad disminuyó después de 6 días, como en el medio B-CDmin (Figura 2A y 2B). Cuando B1 o H se agotaron, las células pudieron dividirse durante 3 a 6 días respectivamente, aunque el crecimiento del cultivo se redujo en general en el medio agotado en H en comparación con los medios completos. Por lo tanto, concluimos que B5 puede ser lo más limitante para el crecimiento celular a corto plazo, ya que debe estar presente continuamente en el medio de cultivo para mantener la división celular.

**Tabla 2.** Composición de vitamina B1, B5 y H en medios SLX y CDM4CHO (realizada por espectrometría de masas, cf. *Selexis*), y concentración añadida en los medios BalanCD mínimos

Medio de cultivo	B1/Tiamina	B5/Pantotenato	H/Biotina
Medio SLX	8,84 $\mu$ M	14,26 $\mu$ M	90nM
Medio CDM4CHO	6,75 $\mu$ M	2,99 $\mu$ M	3,06 $\mu$ M
BalanCD mínimo+ vitamina B1, B5, H (1X)	7,5 $\mu$ M	2,51 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M

El medio B-CDmin agotado se complementó con una concentración más baja de cada vitamina por separado, para determinar el intervalo de concentraciones que limita el crecimiento de CHO-M. B5 fue esencial para el crecimiento de CHO-M, con un intervalo de concentración que limita el crecimiento alrededor de  $10^4$  X a  $10^{-3}$  X (0,25 a 2,5nM), mientras que  $10^{-2}$  X y concentraciones más altas permitieron un cultivo normal crecimiento (Figura 3 y datos no mostrados). Las concentraciones limitantes de B1 se observaron entre  $10^{-5}$  X (15pM) y  $10^{-4}$  X (150pM), mientras que fue inferior a  $10^{-5}$  X (5pM) para H. Curiosamente, en presencia de H a una concentración baja ( $10^{-5}$  X), la densidad celular fue ligeramente más alta que la observada en el medio completo. Como las vitaminas B5 y H usan el mismo transportador para ingresar a la célula, y debido a que B5 es el más limitante para el crecimiento celular, la disminución de la concentración de H por debajo del nivel de saturación podría haber aumentado la disponibilidad del transportador para B5, lo que puede permitir que B5 alcance niveles intracelulares más altos en comparación con las células cultivadas en un medio completo.

### 1.2- Efecto del crecimiento-concentración de vitamina B5 limitina en la expresión y modificaciones de proteínas

A continuación, se evaluó si la detención del crecimiento observada tras el agotamiento de B5 se puede usar para interrumpir o ralentizar la división celular en condiciones de producción de proteínas, a fin de posiblemente aumentar la producción de proteínas, usando cultivos alimentados por lotes mantenidos en biorreactores de tubo giratorio. Un clon celular derivado de CHO-M que expresaba una proteína terapéutica mostró un aumento del número de células hasta el día 8 cuando se cultivó en el medio completo, después de lo cual la viabilidad celular y el número de células viables disminuyeron, como se observa habitualmente en estas condiciones de cultivo (Figura 4) Sin embargo, en condiciones limitantes de vitaminas, el número de células se estabilizó desde el día 7, y se mantuvo una alta viabilidad celular hasta el día 14, lo que indica que las células utilizaron la disponibilidad limitante de vitaminas del medio y su grupo B5 celular endógeno para un número limitado de divisiones celulares antes de que se convirtiera en un factor limitante del crecimiento.

El título del anticuerpo secretado en el sobrenadante del cultivo celular aumentó hasta 3 g/l hasta el día 9 en el cultivo medio completo, después de lo cual disminuyó (Figura 5), como se esperaba de la disminución de la viabilidad celular observada anteriormente (Figura 4). Sin embargo, el anticuerpo siguió acumulándose hasta el día 15 del cultivo realizado con el medio agotado de vitaminas, donde alcanzó niveles superiores a 6 g/l (Figura 5). En general, concluimos que la privación de vitaminas se puede utilizar para detener el crecimiento de las células en el biorreactor, a fin de extender la longevidad de la viabilidad celular y la secreción de anticuerpos, proporcionando títulos muy altos del anticuerpo terapéutico. Este enfoque puede ser generalmente aplicable para mejorar la producción de proteínas recombinantes.

### 1.3- Efecto de aumentar el transporte de vitamina B5 en el crecimiento celular

En base a los hallazgos de que el crecimiento celular puede inhibirse ya sea por la falta de B5, por altas concentraciones de H, que pueden competir con B5 por su transportador común, o por altas concentraciones de B5, que pueden competir con H por su transportador común, se planteó la hipótesis de que la sobreexpresión del transportador Slc5a6 común podría proporcionar una ventaja de crecimiento a las células y/o podría conducir a densidades celulares viables más altas. De este modo, clonamos el ADNc de CHO-M que codifica el transportador multivitamínico Slc5a6 y otros transportadores de vitamina B1, como se indica en la Tabla 1, y los

insertamos bajo el control del fuerte promotor *GAPDH* y el elemento activador epigenético MAR 1-68, junto a una puromicina. casete de expresión de selección de resistencia. Las células CHO-M se transformaron conjuntamente con esta construcción *Slc5a6*, con un vector de expresión GFP y con un plásmido de selección de puromicina, después de lo cual se obtuvieron poblaciones policlonales estables a partir de la selección de células resistentes a puromicina. Se observó una acumulación de transcripción *Slc5a6* hasta 100 veces mayor en poblaciones de células CHO-M transformadas con cantidades crecientes del vector de expresión, en comparación con el nivel de expresión endógeno (Figura 6).

Las poblaciones de células que sobreexpresan *SLC5A6* se cultivaron luego sin selección de puromicina en el medio B-CDmin suplementado con diversas concentraciones de B5 y H. Como se indicó anteriormente, la división celular casi se detuvo en ausencia de B5 después de 6 días de cultivo, independientemente de la sobreexpresión del transportador o de la presencia de vitamina H (Figura 7). Sin embargo, las células transformadas con el plásmido de expresión del transportador alcanzaron densidades significativamente más altas en condiciones limitantes de B5 ( $10^{-3}$  X) y con bajo H ( $10^{-4}$  X). El mayor crecimiento se observó en las células co-transformadas con 100 ng del vector de expresión del transportador (Figura 7), lo que sugiere que se logró un nivel de expresión óptimo del transportador.

Resulta interesante señalar que, cuando se añadió B5 en un exceso de 10X en presencia de la baja cantidad de H (10X B5;  $10^4$  XH), el crecimiento celular no transformado se inhibió fuertemente en relación con el cultivo de estas células en el medio completo (1X B5;  $10^4$  X H). Sin embargo, las células que expresan el nivel de transportador más alto crecieron significativamente más que aquellas que expresan el transportador a niveles más bajos en presencia del exceso de B5 (10X B5;  $10^4$  X H). Esto indicó además la aparición de una competencia de las dos vitaminas por su transportador común, en la que las concentraciones saturantes de B5 pueden inhibir la absorción de pequeñas cantidades de H en el medio de cultivo, lo que limita el crecimiento, a menos que el transportador se sobreexpresen. En general, se concluyó que la sobreexpresión del transportador *SLC5A6* puede conferir una ventaja de crecimiento en presencia de concentraciones limitantes de B5 o, por el contrario, en presencia de concentraciones saturantes de B5 pero con cantidades limitantes de H. Se planteó la hipótesis de que esto podría usarse para discriminar las células que expresan cantidades elevadas del transportador contra las que lo expresan en niveles más bajos.

2- Uso de la expresión del transportador *SLC5A6* (SMVT) como marcador de selección para células transformadas

La expresión del vector GFP co-transformado se cuantificó para determinar si la co-transformación del transportador *Slc5a6* puede haber aumentado los niveles globales de expresión transgénica. Las células que integraron los plásmidos en su genoma y que expresaban de manera estable los transgenes se seleccionaron por cultivo en un medio limitante de B5 o en presencia de puromicina. El porcentaje de células fluorescentes que expresan GFP, así como las intensidades de fluorescencia celular, se evaluaron primero después de la selección por privación de B5. Tras la selección en presencia de cantidades limitantes de B5 ( $10^{-3}$  X), la mayor proporción de las células positivas para GFP y los niveles promedio de fluorescencia se obtuvieron al co-transformar las células con 250 ng del plásmido de expresión *SLC5A6* (Figura 8). La transformación de una mayor cantidad de plásmido (1000 ng) del vector *Slc5a6* dio un número similar de células positivas para GFP y una fluorescencia ligeramente menor, mientras que una menor cantidad de plásmido (50 ng) no produjo suficientes células para la cuantificación. Esto indicó que la co-transformación de este gen transportador de vitaminas se puede usar como un marcador seleccionable para una transformación estable, co-transformando una pequeña cantidad del plásmido *SLC5A6* con mayores cantidades de una construcción que expresa una proteína de interés (Tabla 3). Una pequeña cantidad del plásmido *SLC5A6* es usualmente 1000 ng, 250 ng, 100 ng o menos (véanse, por ejemplo, las Figuras 6, 8 y 9). Como se ilustra en la Tabla 3, las cantidades más altas de una construcción que expresa una proteína de interés pueden variar de más de dos veces a más de 15 veces la cantidad del vector de expresión de la proteína metabólica de vitamina, que incluye más de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 veces. Se obtuvieron resultados menos favorables cuando se realizaron experimentos similares con los ADNc de transporte de vitamina B1 (datos no mostrados), como podría esperarse del hecho de que B5 es más limitante que la vitamina B1.

**Tabla 3.** Mezclas de vectores utilizadas para transfecciones con *Slc5a6*+puro + GFP/IgG

Vectores	<i>pGAPDH-MAR1-68-Slc5a6</i> (10148bp)	<i>pGAPDH-MAR1-68-GFP</i> (8978bp)	<i>pSV-Puro</i> (4118bp)	<i>pGAPDH-1.68-IgG<sub>Lc</sub></i> (12551bp)	<i>pGAPDH-1.68-IgG<sub>Hc</sub></i> (13274bp)
Mix1: GFP/puro (ng)	0	1884	23	0	0
Mix2: <i>Slc5a6</i> (50ng)/GFP/puro (ng)	50	1834	23	0	0

	<b>Mix3: Slc5a6 (100ng)/GFP/puro (ng)</b>	100	1784	23	0	0
5	<b>Mix4: Slc5a6 (250ng)/GFP/puro (ng)</b>	250	1634	23	0	0
10	<b>Mix5: IgG<sub>Lc</sub>/IgG<sub>Hc</sub>/puro (ng)</b>	0	0	17,9	1000	769,2
15	<b>Mix6: Slc5a6 (250ng) /IgG<sub>Lc</sub>/IgG<sub>Hc</sub>/puro (ng)</b>	250	0	17,9	1000	769,2

15 Cuando las células se seleccionaron mediante puromicina en un medio que contenía una concentración de B5 no limitante, se obtuvieron células fluorescentes GFP independientemente de la expresión de Slc5a6, como se esperaba. Sin embargo, las células más altamente fluorescentes a menudo se obtuvieron tras la co-transformación de 250 ng del vector de expresión Slc5a6 (datos no mostrados). Esto indicó que el transportador de vitaminas puede conferir una ventaja selectiva a las células que lo expresan a niveles más altos incluso en medios de cultivo no limitantes. Cuando la selección de puromicina fue seguida por un cultivo adicional en el medio limitante de vitamina B5, se observaron niveles de expresión extremadamente altos en la mayoría de las células que sobreexpresan el transportador SLC5a6 (Figura 9A). La cuantificación del percentil total de células que expresan GFP (Puerta 1 de la Figura 9A), o de células altamente expresivas (Puerta 2 de la Figura 9A), reveló que más del 80% de las células expresaron GFP a niveles muy altos después de la transformación de 100 o 250 ng del plásmido de expresión Slc5a6, ya sea al seleccionar las células en medio agotado en B5 o en un exceso de B5 (Figura 9B). Los niveles de expresión de GFP también aumentaron más de dos veces cuando se realizó la selección de vitamina B5 después de la selección de puromicina, en comparación con la realización de una selección de puromicina solamente (compare 0ng Slc5a6 y 1XB5, 10<sup>-4</sup> XH con 100 o 250ng SLC5A6 y 10X B5; 10<sup>-4</sup> XH o 10<sup>-3</sup> X B5; 10<sup>-4</sup> XH, Figura 9C). En general, esto indicó que Slc5a6 y la selección mediada por vitaminas también se pueden usar junto con la selección de antibióticos para seleccionar preferentemente las células que median los niveles más altos de expresión transgénica.

35 Se aplicó este enfoque para la expresión de un transgén que codifica una proteína recombinante terapéutica, concretamente la inmunoglobulina monoclonal (IgG) de Trastuzumab. Las células se transformaron conjuntamente con un plásmido que codifica tanto Slc5a6 como la cadena ligera de inmunoglobulina, y con otro vector que expresa el marcador de resistencia a la puromicina y la cadena pesada de inmunoglobulina. Luego se seleccionaron las células bajo diversos regímenes de privación de B5 o tratamiento con puromicina (Figura 10), y se detectó la IgG de Trastuzumab secretada por tinción de la superficie celular usando un anticuerpo anti-IgG fluorescente.

45 Se evaluó primero cuál de las condiciones de selección producía poblaciones de células policlonales que mostraban los niveles de secreción de IgG más altos en los sobrenadantes de cultivos discontinuos alimentados. Las células seleccionadas con puromicina solo produjeron los niveles más bajos de IgG secretada (condición A+, Figura 11). Las células seleccionadas por privación de vitamina B5 (B1+), o por privación de vitaminas seguida de la adición de puromicina en el medio mínimo (B1D+ y B2D+), arrojaron niveles de IgG comparativamente altos. La célula seleccionada con puromicina seguida de privación de vitamina B5 produjo títulos de IgG intermedios. Dado que realizar la selección de puromicina además del agotamiento de la vitamina no produjo un aumento significativo en relación con la selección con solo privación de B5 (Figura 11, compare B1D+ con B1+), el siguiente enfoque fue en el análisis de las células seleccionadas solo por privación de vitamina, utilizando células seleccionadas de puromicina como controles.

55 La mayor proporción de células que expresan IgG, en el intervalo de 80 a 90%, y los niveles más elevados de fluorescencia de la superficie celular, se observaron para los grupos de células policlonales seleccionadas usando privación de vitaminas (Figura 12A, condición B+). Se obtuvieron niveles altos y aún equilibrados de los ARNm de cadena ligera y pesada de IgG tras la selección de vitamina B5, y se encontró que los niveles de ARNm del transportador Slc5a6 expresados para fines de selección eran bastante bajos en relación con los de la IgG (Figura 12B). Se encontró que las tasas de secreción de IgG eran aproximadamente 3 veces más altas para las poblaciones policlonales seleccionadas por privación de vitaminas en comparación con la selección de antibióticos, y se descubrió que la expresión de inmunoglobulina era estable al cultivo extendido en el medio completo no selectivo, incluso cuando era secretada en los niveles más altos (Figura 13). Cuando se evaluaron estas poblaciones de células policlonales en cultivos discontinuos alimentados utilizando el medio de cultivo completo, se obtuvieron títulos superiores a 8 g/l para las poblaciones seleccionadas por privación de vitaminas, mientras que el título obtenido de la selección de puromicina fue de 2 g/l (Figura 14). Por lo tanto, la privación de vitaminas y la selección basada en la sobreexpresión de SLC5a6 de poblaciones policlonales arrojaron títulos de

proteínas excepcionalmente altos, en un intervalo de acumulación de IgG que solo se obtiene ocasionalmente después de la clasificación y selección tediosa y lenta de las poblaciones monoclonales más productivas.

Un ejemplo de un procedimiento de selección de células se representa en la Figura 18. Las células CHO se cotransfectaron sin (condición A) o con (condiciones B y C) el vector de expresión SLC5a6, junto con los plásmidos de cadena ligera/pesada GFP o IgG y la resistencia a la puromicina, después de lo cual se seleccionó el cultivo en presencia de puromicina (condiciones A y B) o en el medio de cultivo privado de vitaminas que contiene concentraciones limitantes de vitaminas ( $B5\ 10^{-3}\ X/H\ 10^{-4}\ X$ ) (condición C). El círculo cruzado indica que las células que no habían sido transfectadas con el vector de expresión SLC5a6 no sobrevivieron a la selección en el medio de cultivo privado de vitaminas. Como se puede apreciar, el plásmido GFP usado en la presente memoria contenía también una secuencia MAR. Después de la selección, las células se cultivaron en un medio de cultivo no selectivo hasta el análisis mediante FACS o ensayos de secreción de inmunoglobulina de los grupos de células policlonales resultantes (Figura 19-20), o durante la generación y análisis de poblaciones monoclonales (Figura 20-21)

Las poblaciones de células policlonales que expresan GFP obtenidas en el proceso representado en la Figura 18 se cultivaron durante 9 días en medio no selectivo y se analizaron (Figura 19). El análisis por citofluorometría para fluorescencia GFP proporcionó perfiles de fluorescencia FACS que representan el enriquecimiento de todas las células GFP+ y de alta expresión de GFP de poblaciones de células policlonales estables cotransfectadas con los plásmidos de expresión SLC5a6, GFP y resistencia a la puromicina (puro), y seleccionados por cultivo con puromicina (condiciones A y B, ver Figura 18) o en el medio de cultivo privado de vitaminas (condición C). La proporción de células y la fluorescencia promedio de todas las células positivas para GFP, y de las células altamente fluorescentes, se determinaron a partir de células activadas como se ilustra en el panel A de la Figura 19. El enriquecimiento de las células fluorescentes positivas para GFP se muestra en B de la Figura 19 y la media geométrica de la fluorescencia de GFP de las células se representa para los grupos de células policlonales (Figura 19C). Como se puede apreciar, la selección B5 de células transfectadas con el vector de expresión SLC5a6, proporcionó un enriquecimiento significativo de células fluorescentes GFP entre las células con alta expresión de GFP (Figura 19B) y una media geométrica significativamente mayor de la fluorescencia GFP.

En la Figura 20, se muestra la productividad específica de inmunoglobulina de poblaciones celulares seleccionadas usando privación de puromicina o vitamina. En la Figura 20A, se obtuvieron los conjuntos policlonales totales de células que expresan una IgG terapéutica como se ilustra para las condiciones A, B y C de la Figura 18, y se ensayó la productividad específica de la IgG. La productividad específica se muestra en picogramos de anticuerpo secretado por célula y por día (PCD) (los datos son el resultado de tres experimentos biológicos independientes. Dos estrellas:  $P < 0,05$ , prueba T unilateral de igual varianza). La Figura 20B muestra los resultados obtenidos con diez clones que se aislaron aleatoriamente mediante diluciones limitantes de las poblaciones celulares obtenidas de las condiciones de selección B y C, y se determinó la productividad específica de IgG. Nuevamente, la productividad específica de los cultivos celulares en la condición C fue significativamente mayor que la productividad específica de los cultivos celulares en la condición B.

Los clones celulares seleccionados se analizaron adicionalmente. En particular, se analizaron dos clones (C\_a y C\_b) obtenidos mediante la dilución limitante de un conjunto de células policlonales que expresan SLC5A6 y una IgG terapéutica, y seleccionados usando la privación de vitaminas (condición C en las Figuras 18 y 20). La IgG secretada que se muestra en la superficie celular se marcó por incubación con un anticuerpo fluorescente dirigido por IgG, y las células se analizaron por citofluorometría como se muestra en la Figura 21A. Los perfiles de fluorescencia del grupo de células policlonales iniciales C y del clon derivado C\_a se muestran para comparación. En la Figura 21B, se representa la estabilidad de la expresión de inmunoglobulina de dos poblaciones monoclonales seleccionadas usando el agotamiento de vitaminas. Los clones C\_a y C\_b se mantuvieron en medio no selectivo completo y se pasaron dos veces por semana durante 30 días. La productividad específica de las poblaciones celulares, expresada en picogramos de anticuerpo secretado por célula y por día (PCD), se analizó en el momento indicado. Como se puede apreciar, los clones mostraron una alta estabilidad (los niveles de PCD disminuyen no más del 50%, no más del 40%, no más del 30%, no más del 20% o incluso no más del 10% o 5% del original nivel cuando se mantiene en medio no selectivo completo y se pasa dos veces por semana durante 30 días). Las Figuras 21C y D muestran ensayos de producción de inmunoglobulina de cultivos de lotes alimentados de clones C\_a y C\_b. Los clones se cultivaron en medio completo en cultivos de lotes alimentados, y se añadieron alimentos en los días 3, 6, 8 y 10. Las muestras se analizaron para determinar la densidad celular viable (Figura 21C) y para el título de anticuerpo secretado por ELISA de doble sándwich (Figura 21D). El clon BS03 de alta expresión de IgG y las células CHO-M parentales no transfectadas se usaron como referencia. Como se puede apreciar, ambos clones se desempeñaron bien en relación con el clon BS03 que expresa IgG alta.

La Figura 22 es una ilustración de la selección de poblaciones celulares que producen diversas proteínas recombinantes a altos niveles por co-transfección SLC5a6 y selección por privación de vitaminas. Se muestran los títulos obtenidos de cultivos alimentados por lotes de poblaciones policlonales de células que expresan una

IgG fácil de expresar, concretamente Herceptin, después de la selección de puromicina ("antibiótico") o selección por cultivo en medio agotado en vitaminas ("metabólico"). en la Figura 22A. En la Figura 22B, se muestra la determinación del porcentaje de células que expresan Herceptin, así como los niveles promedio de secreción por imágenes de colonias. Los títulos obtenidos a partir de poblaciones de células policlonales que producen una

5

proteína difícil de expresar, a saber, el interferón beta, seleccionado por adición de antibióticos o privación de vitaminas, se muestran en la Figura 22C. Como se puede apreciar, especialmente los títulos obtenidos de poblaciones de células policlonales que producen la proteína difícil de expresar; en este caso, el interferón beta, seleccionado por privación de vitaminas, excedió los seleccionados por adición de antibióticos en 3 a 5 veces.

10

15

De manera similar, las células huésped pueden diseñarse para expresar niveles más bajos del transportador y otros genes, para generar líneas celulares con propiedades de selección aún más fuertes. Finalmente, el uso de medios de cultivo celular privados de vitaminas B1, B5 o H, o combinaciones de los mismos, como se usa en este estudio, es un enfoque general que se puede usar para aumentar los niveles de producción de células, ya sea que estén diseñadas para sobreexpresar uno o más genes metabólicos de vitaminas, como en la Figura 14, pero también cuando se usan células que no están modificadas en los niveles de expresión de los genes de vitaminas, como se ejemplifica en la Figura 5. También será evidente para un experto en la técnica, y dentro del alcance de la presente invención, que este enfoque se puede usar para producir altos niveles de una proteína terapéutica *in vitro* usando líneas celulares cultivadas tales como células CHO-M, por ejemplo, en un biorreactor, pero también *in vivo* usando células primarias como células humanas para terapias basadas en genes o células, y también para medicina regenerativa.

20

25

La descripción anterior muestra que se pueden obtener poblaciones policlonales o monoclonales de células que producen proteínas recombinantes a niveles homogéneos y muy altos usando secuencias codificantes que expresan proteínas metabólicas de vitaminas como marcadores de selección. Se demostró que la privación de vitaminas durante las condiciones de producción de biorreactores alimentados por lotes se puede usar para mejorar la viabilidad de los clones celulares y su productividad en términos del título de proteínas terapéuticas recombinantes secretadas. Curiosamente, estos efectos se obtuvieron disminuyendo los niveles de, por ejemplo, las vitaminas B5 o H, pero también cuando los niveles de una de las vitaminas se elevaron por encima de los niveles de saturación. Este efecto posterior se observó cuando la elevación de la concentración de B5 por encima de los niveles habituales permitió la selección de células que expresan altos niveles del gen de selección SLC5a6, cuando crecieron en presencia de bajas cantidades de vitamina H. Por lo tanto, el régimen de selección óptimo también puede ser diseñado por el aumento de la concentración de vitaminas, o variando los niveles relativos de dos vitaminas que usan el mismo transportador de membrana. El enfoque aquí descrito es, por lo tanto, de gran valor para seleccionar e identificar clones celulares que producen una proteína de interés a niveles más elevados y estables, y por lo tanto, utilizan un tiempo y esfuerzos de detección reducidos, y también para aumentar los niveles de producción de proteínas y la viabilidad celular independientemente de la célula. origen o ingeniería genética de vitaminas.

30

35

40

45

#### Material y procedimientos

Secuencias génicas de vitaminas y constructos de vectores de ADN

Se determinaron las secuencias de ADN genómico y de ADN después de la alineación de los genes homólogos en ratones *SCL5A6*, *SLC19A2*, *SLC19A3*, *TPK1*, *SLC25A19* usando el software NCBI BLAST. La secuencia de transcripción y la acumulación de los genes correspondientes se determinaron utilizando la base de datos de expresión de genes SELEXIS CHO-M. Los CDS (secuencias de ADN codificantes) y las secuencias de proteínas se enumeran en la Figura 15 y la Figura 16, respectivamente.

50

55

Se amplificó la biblioteca de ADNc CHO-M (SURE CHO-M Cell Line™ (SELEXIS Inc., San Francisco, EE. UU.)) mediante transcripción inversa a partir de ARN total de 1 µg aislado de 10<sup>6</sup> células CHO-M (NucleoSpin™ Kit de ARN; Macherey-Nagel) utilizando Superscript Reverse Transcription Enzyme II y cebadores aleatorios (Goscript Reverse Transcription System; PROMEGA).

60

65

Las secuencias de codificación de vitaminas (CDS) se clonaron en el vector *pGAPDH-MAR 1-68-GFP*, cortando el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) y reemplazándolo con la vitamina CDS. Los vectores se construyeron de la siguiente manera: los CDS se amplificaron de la biblioteca de ADNc CHO-M por PCR (PHUSION High-Fidelity DNA Polymerase; Finnzymes, THERMO FISHER SCIENTIFIC) de ATG a Stop utilizando cebadores que llevan el sitio de restricción HinIII/XbaI para *SCL5A6*, HinIII/FseI para *SLC19A2*, NcoI/XbaI para *SLC19A3*, HinIII/XbaI para *TPK1*, HinIII/XbaI para *SLC25A19* (Tabla 4). Luego, los productos de

ADNc y los vectores *pGAPDH* fueron doblemente digeridos por las enzimas de restricción correspondientes. Finalmente, los ADNc se ligaron en el vector *pGAPDH*-MAR 1-68 donde la secuencia de GFP se cortó después de las digestiones con las mismas enzimas de restricción.

5

**Tabla 4. Secuencias de cebadores**

	NOMBRE DEL CEBADOR	SECUENCIA DEL CEBADOR 5'_3'	PROPÓSITO	SEQ. ID. NO.
10	Slc5a6-ATG-HindIII_F	AAAAAGCTTATGAGTGTGGAAGAGAGCA	Clonación de las CDS	SEQ ID 1
	Slc5a6-Stop-Xba1_R	AAATCTAGATCACAGGGAGGTCTCCT	Clonación de las CDS	SEQ ID 2
15	Pank2-ATG-HindIII_F	AAAAAGCTTATGTCTGGTGGCTTCCCTAAGG C	Clonación de las CDS	SEQ ID 3
	Pak2-Stop-Xba1_R	AAATCTAGATCACAACCGGTCAGC	Clonación de las CDS	SEQ ID 4
20	Slc19a2-ATG-HindIII_F	AAAAAGCTTATGCATGGATTATGCAGCC	Clonación de las CDS	SEQ ID 5
	Slc19a2-Stop-FseI_R	AAAGGCCGGCCTTAGGGAGTAGTTGCTTGA	Clonación de las CDS	SEQ ID 6
25	Slc19a3-ATG-Nco1_F	AAACCATGGAAACCATAATGAAGATA	Clonación de las CDS	SEQ ID 7
	Slc19a3-Stop-Xba1_R	AAATCTAGATCAGAACTTGGTTGACACAT	Clonación de las CDS	SEQ ID 8
30	Tpk1-ATG-HindIII_F	AAAAAGCTTATGGAGCATGCGTTTACC	Clonación de las CDS	SEQ ID 9
	Tpk1-Stop-Xba1_R	AAATCTAGATTAGCTTTTGACGGCCATG	Clonación de las CDS	SEQ ID 10
35	S1c25a19-ATG-HindIII F	AAAAAGCTTATGGTCGGCTATGACGC	Clonación de las CDS	SEQ ID 11
	Slc25a19-Stop-Xba1 R	AAATCTAGACTATCTGTCTTCACTCCTTA	Clonación de las CDS	SEQ ID 12
40	Slc5a6-qRT-F	GTGCCTATGAGTACCTGGAGCTT	PCR Cuantitativa	SEQ ID 13
	Slc5a6-qRT-R	AGCAACTCCCATGTAGATCACC	PCR Cuantitativa	SEQ ID 14
45	IgG1-Lc-qRT-F	AGGACAGCAAGGACTCCACCTA	PCR Cuantitativa	SEQ ID 15
	IgG1-Lc-qRT-R	CGTACACCTTGTGCTTCTCGTAG	PCR Cuantitativa	SEQ ID 16
50	IgG1-Hc-qRT-F	GGACCCTGAGGTGAAGTTCAAT	PCR Cuantitativa	SEQ ID 17
	IgG1-Hc-qRT-R	GGTAGGTGCTGTTGTTACTGTTCC	PCR Cuantitativa	SEQ ID 18
55	GFP-qRT-F	ACATTATGCCGGACAAAGCC	PCR Cuantitativa	SEQ ID 19
	GFP-qRT-R	TTGTTTGGTAATGATCAGCAAGTTG	PCR Cuantitativa	SEQ ID 20
60	GAPDH-qRT-F	PCR Cuantitativa		
	GAPDH-qRT-R	PCR Cuantitativa		

65

El vector *pGAPDH*-MAR 1-68-GFP se describió previamente (Girod et al., 2007; Hart y Laemmli, 1998; Grandjean et al., 2011). La proteína GFP se expresó usando un casete de expresión eucariota compuesto por un potenciador de citomegalovirus humano (CMV) y un promotor de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) humano aguas arriba de la secuencia de codificación seguido de una señal de poliadenilación del virus simio 40 (SV40), el terminador de gastrina humana y un potenciador SV40 (Le Fourn et al., 2013).

El vector *pSV*-puro contiene el gen de resistencia a la puromicina (puro) bajo el control del promotor SV40 originado a partir del plásmido pRc/RSV (INVITROGEN/LIFE TECHNOLOGIES).

Los vectores de expresión de inmunoglobulina 1-68 *IgG1-Lc lleno* y 1-68 *IgG1-Hc lleno* fueron tal como se describió anteriormente.

Cultivo celular, transformación estable y análisis de línea policlonal estable

Las células de ovario de hámster chino en suspensión (CHO-M) se mantuvieron en cultivo en suspensión en medio sin suero SFM4CHO-M Hyclone (SFM, ThermoScientific™) suplementado con L-glutamina (PAA, Austria) y suplemento HT (GIBCO, INVITROGEN LIFE SCIENCES) a 37 µC, 5% de CO<sub>2</sub> en aire humidificado. Otros medios celulares utilizados para estos experimentos son el crecimiento A de BalanCD CHO-M (B-CDfull; Irvine Scientific) y el crecimiento deficiente A de BalanCD CHO-M (B-CDmin; Irvine Scientific), suplementado con vitamina B1 (clorhidrato de tiamina; SIGMA ALDRICH), vitamina B5 (Calcio DL-Pantotenato; TCI) y vitamina H (Biotina, SIGMA ALDRICH)

Las células CHO-M se transformaron con vectores de expresión *SLC5A6*, GFP, puromicina, *IgG1-Hc* o *IgG1-Lc* digeridos con PvuI (ver mezclas de vectores en la Tabla 3) por electroporación de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (NEONDEVICES, INVITROGEN).

Las líneas policlonales de células productoras de GFP e *IgG1* que expresan *Slc5a6* y GFP o *IgG* se seleccionaron para experimentos adicionales de la siguiente manera: Un día antes de la transformación, se cultivaron células a 300 000 células/ml en medio selectivo B5 que consistía en B-CDmin medio suplementado con 7,5 µM B1 (1X), 250nM B5 (10<sup>-3</sup> X) y 5 µM de H (10<sup>4</sup> X). Después de la transformación, las células se incubaron directamente en una placa de 24 pocillos con medio selectivo B5 durante 24 h, luego se transfirieron a varios pocillos dependiendo de los experimentos. Para la selección de puromicina, las células se sembraron en medio SFM suplementado con 10 mg/ml de puromicina durante 2 semanas, luego se transfirieron al pocillo con medio SFM durante 5 días y luego a tubos de centrifugado de 50 ml con medio SFM.

Para la selección B5, las células se sembraron en medios selectivos B5 durante 7-9 días, luego se transfirieron a medios SFM no selectivos como para la selección de puromicina.

Para la doble selección de las células con puromicina y luego con B5, primero se seleccionaron líneas celulares estables policlonales con puromicina, luego se sembraron las células a 20000 células/ml en una placa de 24 pocillos en medio selectivo B5 durante 7 días (B-CDfull se usó como control negativo), luego se transfirió a pocillos de medio SFM completo durante 7 días, luego se sembró en un tubo con medio SFM.

El porcentaje de células fluorescentes y la intensidad de fluorescencia de las células positivas para GFP se determinaron mediante análisis FACS usando un citómetro de flujo CyAn ADP (BECKMAN COULTER). Las concentraciones de inmunoglobulina en los sobrenadantes del cultivo celular se midieron mediante ELISA de sándwich. La acumulación de transcripción de *Slc5a6*, GFP, *IgG1Lc* e *IgG1Hc* se confirmó mediante ensayos de PCR cuantitativa RT antes de los análisis. La tinción de superficie, el título de *IgG* y la dilución limitante se realizaron de acuerdo con Le Fourn et al. (2014)

#### Análisis PCR cuantitativo

Para el análisis PCR cuantitativo (qPCR), se extrajo el ARN total de 10<sup>6</sup> células y se transcribió inversamente en ADNc. La acumulación de transcripciones se cuantificó mediante qPCR utilizando el kit de polimerasa SYBR Green-Taq de la máquina de PCR Eurogentec Inc y ABI Prism 7700 (Applied Biosystems) y utilizando los cebadores *Slc5a6-qRT-F* y *Slc5a6-qRT-R* enumerados en la Tabla 4. Los niveles de transcripción se normalizaron a la del gen de limpieza *GAPDH*.

#### Análisis estadístico

Los resultados se expresan como medias ± error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student de dos colas. Los asteriscos en los paneles de Figuras se refieren a probabilidades estadísticas. Los valores de probabilidad estadística de menos de 0,05 se consideraron significativos.

**Referencias**

5  
 Birch, J. R. & Racher, A. J. (2006) Antibody production (Producción de anticuerpos). *Adv Drug Deliv Rev*, 58, 671-85.

10  
 Cacciatore, J. J., Chasin, L. A. & Leonard, E. F. (2010) Gene amplification and vector engineering to achieve rapid and high-level therapeutic protein production using the Dhfr-based CHO cell selection system (Amplificación de genes e ingeniería de vectores para lograr una producción de proteínas terapéutica rápida y de alto nivel utilizando el sistema de selección de células CHO basado en Dhfr). *Biotechnol Adv*, 28, 673-81.

15  
 Brunetti D, Dusi S, Morbin M, Uggetti A, Moda F, D'Amato I, Giordano C, d'Amati G, Cozzi A, Levi S, Hayflick S, Tiranti V. (2012). Pantothenate kinase-associated neurodegeneration: altered mitochondria membrane potential and defective respiration in Pank2 knock-out mouse model (Neurodegeneración asociada a pantotenato quinasa: potencial alterado de membrana mitocondrial y respiración defectuosa en el modelo de ratón knock-out Pank2). *Hum Mol Genet*. 21:5294-305

20  
 Chusainow, J., Yang, Y. S., Yeo, J. H., Toh, P. C., et al., (2009) A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: what makes a stable high producer? (Un estudio de líneas celulares CHO productoras de anticuerpos monoclonales: ¿qué hace que un productor estable sea alto?). *Biotechnol. Bioeng*. 102, 1182-1196.

25  
 Dean, J. and P. Reddy (2013). "Metabolic analysis of antibody producing CHO cells in fed-batch production (Análisis metabólico de células CHO productoras de anticuerpos durante la producción continua)". *Biotechnology and bioengineering* 110(6): 1735-1747.

30  
 Du Z, Treiber D, McCarter JD, Fomina-Yadlin D, Saleem RA, McCoy RE, Zhang Y, Tharmalingam T, Leith M, Follstad BD, Dell B, Grisim B, Zupke C, Heath C, Morris AE, Reddy P. (2015). Use of a small molecule cell cycle inhibitor to control cell growth and improve specific productivity and product quality of recombinant proteins in CHO cell cultures (Uso de un inhibidor del ciclo celular de molécula pequeña para controlar el crecimiento celular y mejorar la productividad específica y la calidad del producto de proteínas recombinantes en cultivos de células CHO). *Biotechnol. Bioeng*. 112: 141-155.

35  
 Garcia M., Leonardi R, Zhang YM, Rehg JE, Jackowski S. (2012). Germline deletion of pantothenate kinases 1 and 2 reveals the key roles for CoA in postnatal metabolism (La delección de la línea germinal de pantotenato quinasa 1 y 2 revela los papeles clave para CoA en el metabolismo postnatal). *PLoS One*. 7:e40871.

40  
 P.A. Girod, D.Q. Nguyen, D. Calabrese, S. Puttini, M. Grandjean, D. Martinet, A. Regamey, D. Saugy, J.S. Beckmann, P. Bucher, N. Mermod (2007). Genome-wide prediction of matrix attachment regions that increase gene expression in mammalian cells (Predicción amplia del genoma en regiones de unión a matriz que aumentan la expresión génica en células de mamíferos). *Nat. Methods*, 4 (2007), pp. 747-753

45  
 Ghosal, A., N. Lambrecht, et al. (2013). "Conditional knockout of the Slc5a6 gene in mouse intestine impairs biotin absorption (La desactivación condicional del gen Slc5a6 en el intestino del ratón perjudica la absorción de biotina)". *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 304(1): G64-71.

50  
 M. Grandjean, P.A. Girod, D. Calabrese, K. Kostyrko, M. Wicht, F. Yerly, C. Mazza, J.S. Beckmann, D. Martinet, N. Mermod (2011). High-level transgene expression by homologous recombination-mediated gene transfer (Expresión transgénica de alto nivel mediante transferencia génica mediada por recombinación homóloga). *Nucleic Acids Res.*, 39, p. e104.

55  
 C.M. Hart, U.K. Laemmli (1998). Facilitation of chromatin dynamics by SARs (Facilitación de la dinámica de la cromatina por medio de SAR). *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 8, pp. 519-525.

60  
 Jostock, T. (2011) Expression of Antibody in Mammalian Cells (Expresión de anticuerpos en células de mamíferos). *Cell Engineering*, 7, 1-24.

65  
 V. Le Fourn, P.A. Girod, M. Buceta, A. Regamey, N. Mermod (2014). CHO cell engineering to prevent polypeptide aggregation and improve therapeutic protein secretion (Diseño de células CHO para prevenir la agregación de polipéptidos y mejorar la secreción terapéutica de proteínas). *Metab. Eng.*, 21, pp. 91-102.

Nam JH, Zhang F, Ermonval M, Linhardt RJ, Sharfstein ST. (2008). The effects of culture conditions on the glycosylation of secreted human placental alkaline phosphatase produced in Chinese hamster ovary cells (Los efectos de las condiciones de cultivo en la glicosilación de la fosfatasa alcalina placentaria humana)

secretada producida en células de ovario de hámster chino). *Biotechnol Bioeng* 100:1178-1192.

5 Rothem, L., B. Berman, et al. (2005). "The reduced folate carrier gene is a novel selectable marker for recombinant protein overexpression (El gen transportador de folato reducido es un nuevo marcador seleccionable para la sobreexpresión de proteínas recombinantes)". *Molecular pharmacology* 68(3): 616-624.

10 Sajjan E, Matanguihan R, Heidemann R, Abu-Absi S, Asuncion W, Yamasaki G, Wu X, Chen J, Murphy JE, Zhang C. (2010). The effect of bioreactor pH and temperature on protein glycosylation in perfusion cultures of mammalian cells (El efecto del pH y la temperatura del biorreactor sobre la glicosilación de proteínas en cultivos de perfusión de células de mamíferos). *ESACT Proc* 4:785-788.

15 Sampathkumar SG, Jones MB, Meledeo MA, Campbell CT, Choi SS, Hida K, Gomutputra P, Sheh A, Gilmartin T, Head SR., et al. (2006). Targeting glycosylation pathways and the cell cycle: Sugar-dependent activity of butyratecarbohydrate cancer prodrugs (Orientación de las vías de glicosilación y el ciclo celular: actividad dependiente del azúcar de los profármacos de cáncer de butirato-carbohidrato). *Chem Biol* 13:1265-1275.

20 Schlatter, S., Stansfield, S. H., Dinnis, D. M., Racher, A. J., et al., (2005) On the optimal ratio of heavy to light chain genes for efficient recombinant antibody production by CHO cells (Sobre la proporción óptima de genes de cadena pesada a ligera para la producción eficiente de anticuerpos recombinantes por células CHO). *Biotechnol. Prog.* 21, 122-133.

25 Trummer E, Fauland K, Seidinger S, Schriebl K, Lattenmayer C, Kunert R, Vorauer-Uhl K, Weik R, Borth N, Katinger H, et al. (2006). Process parameter shifting: Part II. Biphasic cultivation-A tool for enhancing the volumetric productivity of batch processes using Epo-Fc expressing CHO cells (Desplazamiento de parámetros de proceso: Parte II. Cultivo bifásico: una herramienta para mejorar la productividad volumétrica de los procesos continuos utilizando células CHO que expresan Epo-Fc). *Biotechnol Bioeng* 94:1045-1052.

30

## REIVINDICACIONES

1. Un sistema de expresión eucariota que comprende:
  - 5 - al menos un primer polinucleótido que codifica al menos una proteína metabólica de vitamina bajo el control de al menos una primera secuencia reguladora, y
  - bajo el control de al menos una segunda secuencia reguladora, al menos un sitio de escisión de enzimas de restricción y/o al menos un segundo polinucleótido que codifica al menos un producto de interés,
  - 10 - en el que la al menos una proteína metabólica de vitamina es una proteína de transporte de vitaminas, y en el que dicha proteína de transporte de vitamina es THTR-1, THTR-2, TPK, TPC y/o SMVT (transportador multivitamínico dependiente de sodio).
2. El sistema de expresión eucariota de la reivindicación 1, en el que el al menos un segundo polinucleótido se inserta en dicho al menos un sitio de escisión de la enzima de restricción.
3. El sistema de expresión eucariota de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha proteína de transporte de vitaminas transporta una vitamina soluble tal como vitamina B1, B5 y/o H.
- 20 4. El sistema de expresión eucariota de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha proteína de transporte de vitaminas es SMVT.
5. El sistema de expresión eucariota de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sistema de expresión es al menos un vector de expresión.
- 25 6. El sistema de expresión eucariota de la reivindicación 5, en el que un vector singular comprende dicho al menos un primero y dicho al menos un segundo polinucleótido.
7. El sistema de expresión eucariota de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha primera y/o segunda secuencia reguladora son promotores, potenciadores, regiones de control de locus (LCR), regiones de unión a matriz (MAR), regiones de unión a andamio (SAR), elementos aislantes y/o ADN de asociación a matriz nuclear.
- 30 8. Un kit que comprende, en un recipiente, dicho sistema de expresión eucariota de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y, en un segundo recipiente, instrucciones de cómo usar dicho sistema.
- 35 9. El kit de la reivindicación 8, que además comprende un medio de cultivo celular, preferentemente que tiene una concentración limitante y/o saturante de al menos una vitamina.
- 40 10. El kit de la reivindicación 9, en el que el medio de cultivo celular tiene una concentración limitante y/o saturante de vitamina B1, B5 y/o H.
- 45 11. Una célula eucariota recombinante que comprende el sistema de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y/o que tiene una mutación aceleradora o lentificadora de una proteína metabólica de vitamina, y que comprende un segundo polinucleótido que codifica un producto de interés, en la que la proteína metabólica de vitamina es opcionalmente intrínseca a la célula, en la que la al menos una proteína metabólica de vitamina es una proteína de transporte de vitaminas, y en la que dicha proteína de transporte de vitaminas es THTR-1, THTR-2, TPK, TPC y/o SMVT (transportador multivitamínico dependiente de sodio).
- 50 12. La célula eucariota recombinante de la reivindicación 11, en la que la célula es una célula de ovario de hámster chino (CHO).
- 55 13. La célula eucariota recombinante de la reivindicación 11 o 12, en la que el al menos un primer polinucleótido o una secuencia que regula la expresión del al menos un primer polinucleótido tiene una mutación aceleradora o lentificadora.
- 60 14. La célula eucariota recombinante de la reivindicación 11 o 12, en la que la proteína metabólica de vitamina interfiere con el metabolismo de la vitamina y/o se une a una vitamina dentro de una célula.
- 65 15. La célula eucariota recombinante de la reivindicación 14, en la que la proteína metabólica de vitamina es pantotenato 1, 2 y/o 3 y/o es una pirofosfato quinasa de tiamina, tal como TPK1 (pirofosfato quinasa de tiamina 1).
16. La célula eucariota recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 que comprende dicho

sistema de expresión, en la que la proteína metabólica de vitamina es un marcador seleccionable para dicha célula eucariota recombinante y dicha célula eucariota recombinante produce y, preferentemente, secreta dicho producto de interés.

- 5     **17.** Un medio de cultivo de células eucariotas que comprende las células eucariotas recombinantes de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16 que expresan (i) una proteína de transporte de vitaminas como un marcador seleccionable y (ii) dicha proteína de interés, en la que al menos una proteína metabólica de vitamina es una proteína de transporte de vitaminas, y en la que dicha proteína de transporte de vitaminas es THTR-1, THTR-2, TPK, TPC y/o SMVT (transportador multivitamínico dependiente de sodio), y en la que dicho medio es un medio limitante para B5, o un medio saturado para B5 pero un medio limitante o no limitante para H o un medio saturado para H pero un medio limitante o no limitante para B5, preferentemente un medio limitante para B5, o un medio saturado para B5 pero un medio limitante para H.
- 10
- 15     **18.** Un procedimiento de cultivo y, opcionalmente, selección de células eucariotas recombinantes que comprende:
- proporcionar el sistema de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, preferentemente las reivindicaciones 5 y 6,
- proporcionar células eucariotas, en el que la viabilidad, crecimiento y/o división de dichas células eucariotas depende de la absorción de vitaminas,
- 20     introducir dicho sistema de expresión en dichas células eucariotas para producir dichas células eucariotas recombinantes que expresan dicha proteína metabólica de vitamina y dicha proteína de interés, cultivando dichas células eucariotas en un medio de cultivo celular, y
- opcionalmente, seleccionar a través de dicha proteína metabólica de vitamina, que se expresa preferentemente en la superficie de dichas células eucariotas recombinantes, dichas células eucariotas recombinantes que expresan establemente dicho producto de interés, en el que la al menos una proteína metabólica de vitamina es una proteína de transporte de vitaminas, y en el que dicha proteína de transporte de vitaminas es THTR-1, THTR-2, TPK, TPC y/o SMVT (transportador multivitamínico dependiente de sodio).
- 25
- 30     **19.** El procedimiento de la reivindicación 18, en el que dicho medio es un medio limitante para B5, o un medio saturado para B5, pero un medio limitante para H.
- 35     **20.** Un procedimiento de producción de una proteína de interés, que comprende:
- a) transformar células eucariotas con un sistema de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para producir células eucariotas recombinantes;
- b) cultivar dichas células eucariotas recombinantes en un medio de cultivo en el que la viabilidad, crecimiento y/o división de las células eucariotas recombinantes depende de la actividad de una o más proteínas metabólicas de vitamina,
- 40     c) seleccionar células eucariotas recombinantes que expresan dicha una o más proteínas metabólicas de vitaminas, en el que dicha proteína metabólica de vitamina es un marcador seleccionable para obtener células eucariotas recombinantes seleccionadas; y
- d) purificar la proteína de interés de dichas células eucariotas recombinantes seleccionadas o de un medio de cultivo de las mismas que comprende dichas células eucariotas recombinantes seleccionadas.
- 45
- 50     **21.** El procedimiento de la reivindicación 20, en el que la proteína metabólica de vitamina es una proteína de transporte de vitaminas que preferentemente transporta vitaminas B5, B1 y/o H y dicho medio de cultivo es limitante y/o saturante para una o más de dichas vitaminas.
- 55     **22.** El procedimiento de la reivindicación 21, en el que la proteína de transporte de vitaminas es SMVT y dicho medio de cultivo es un medio limitante para B5, o un medio saturado para B5 pero un medio limitante para H.

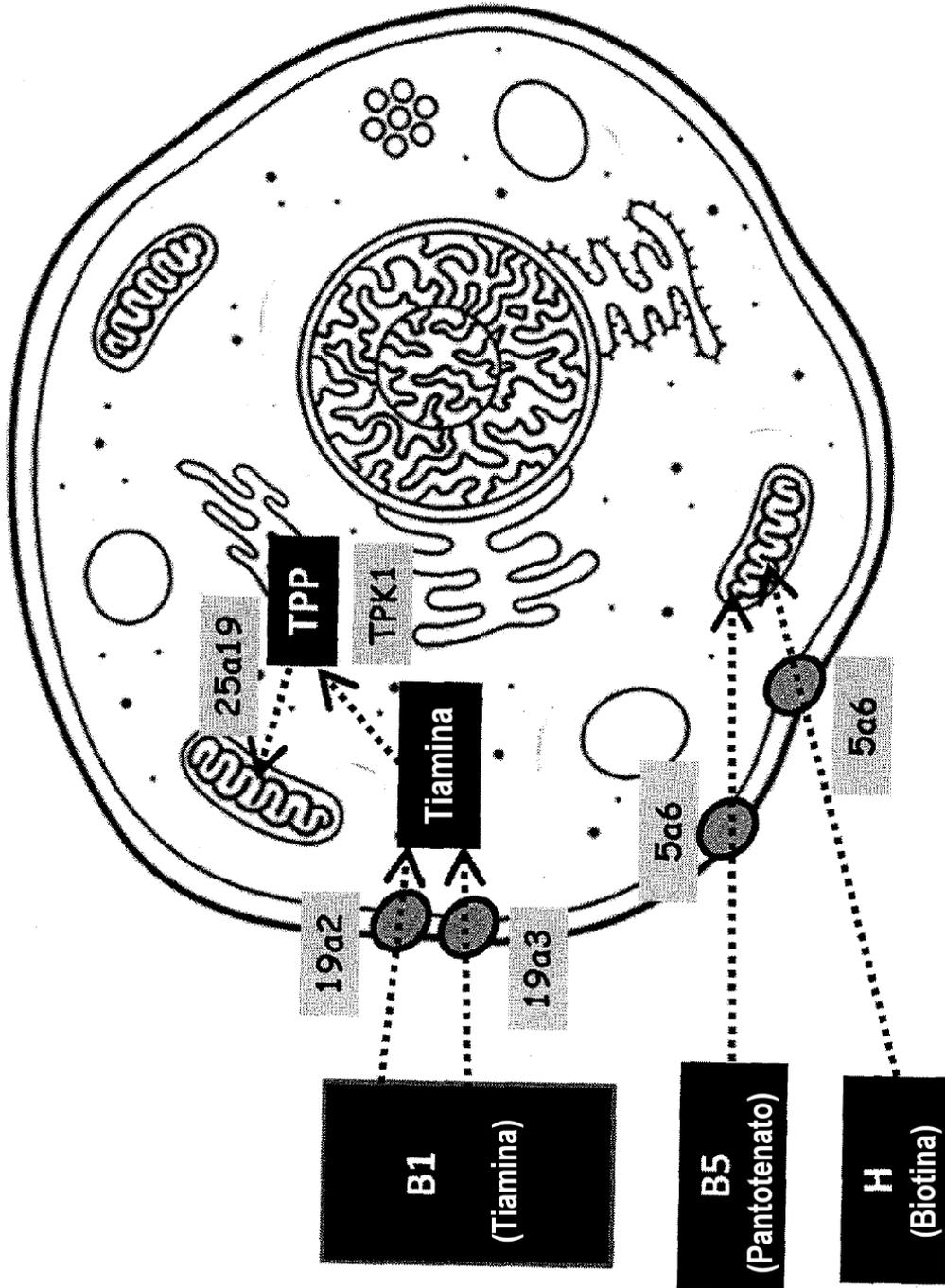


FIG. 1

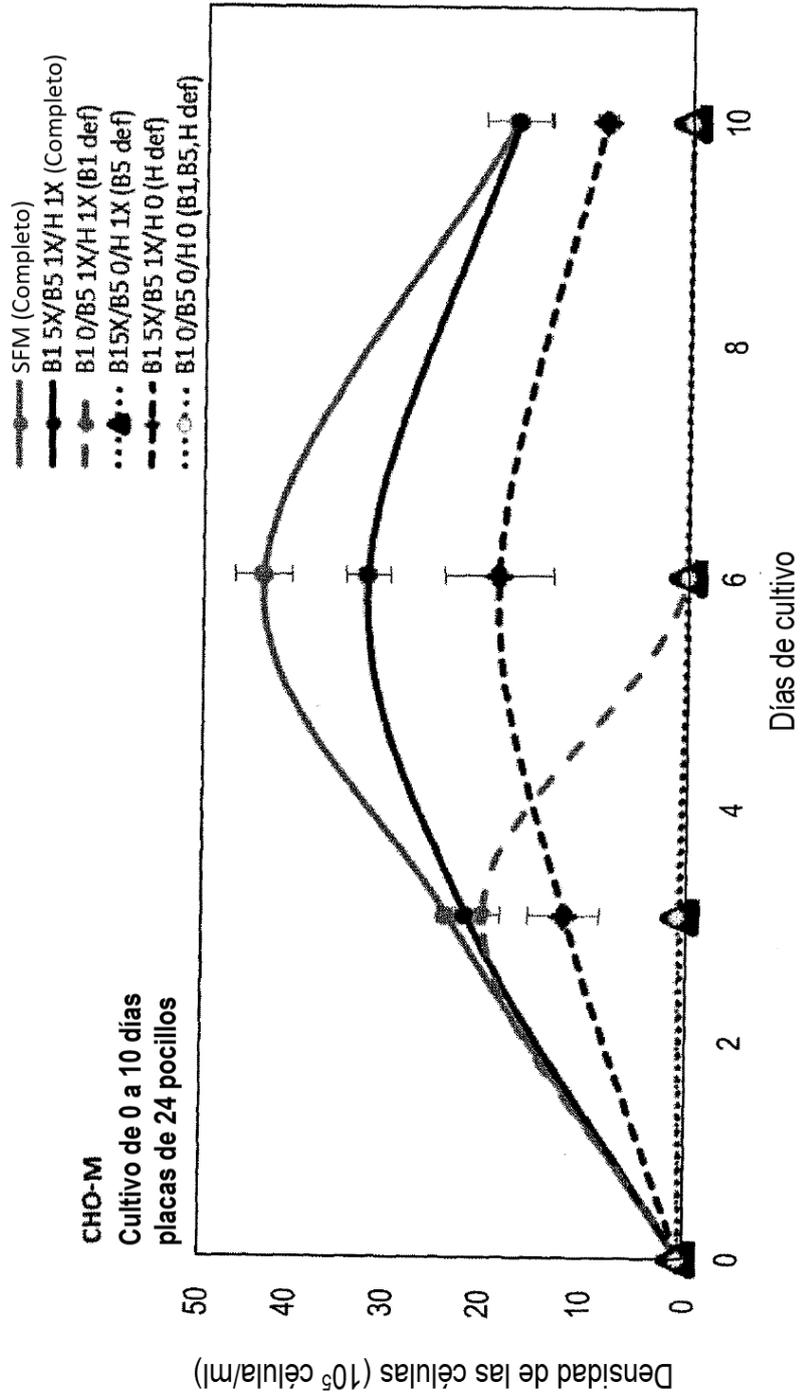
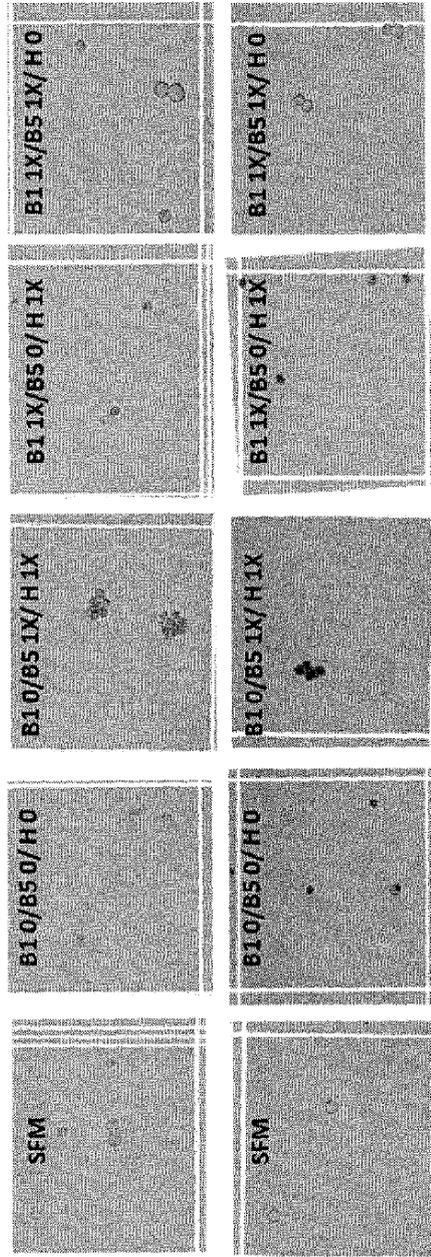


FIG. 2A



Células CHO  
6 días de cultivo

Tinción con azul de triptano

FIG. 2B

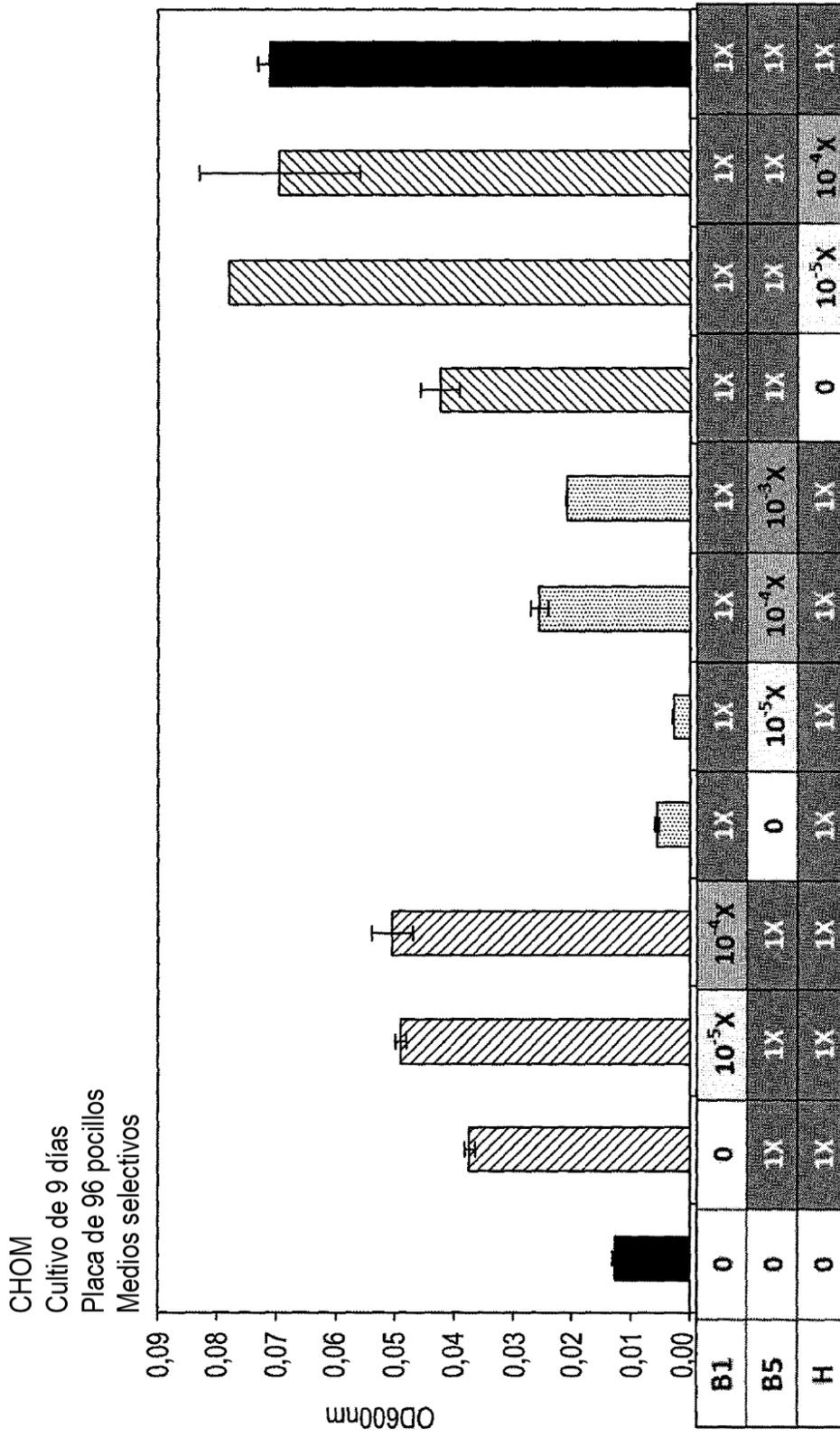


FIG. 3

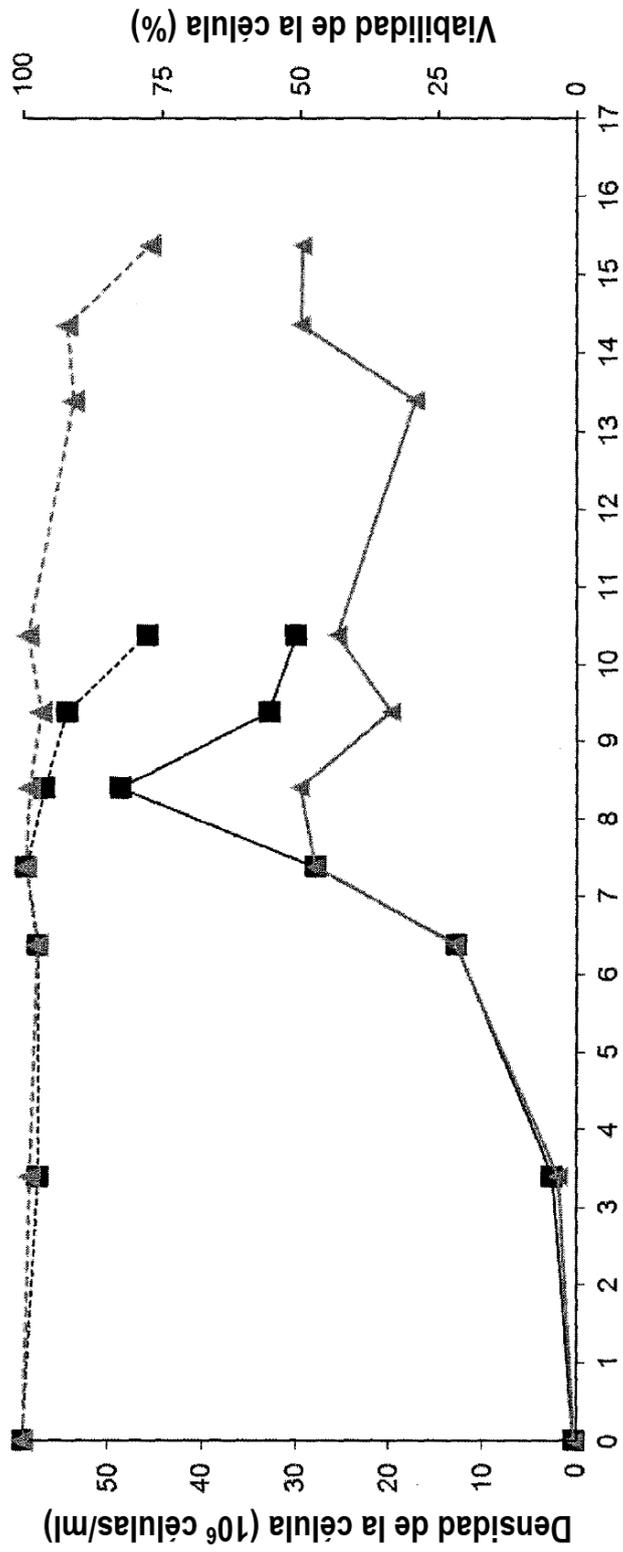


FIG. 4

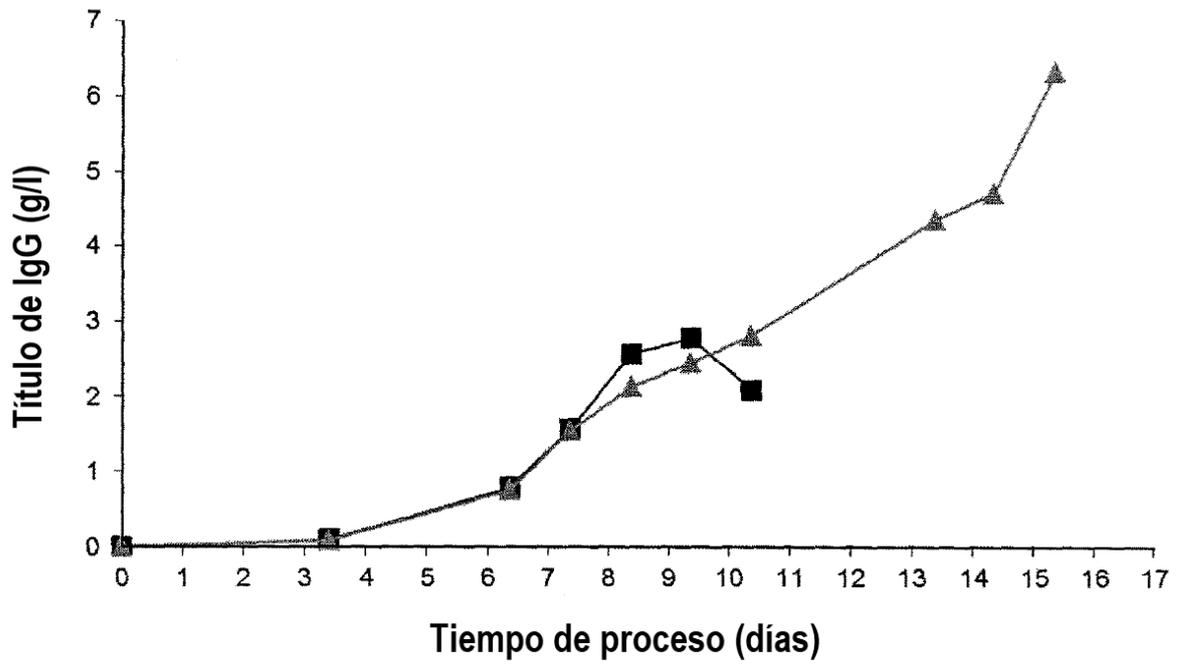


FIG. 5

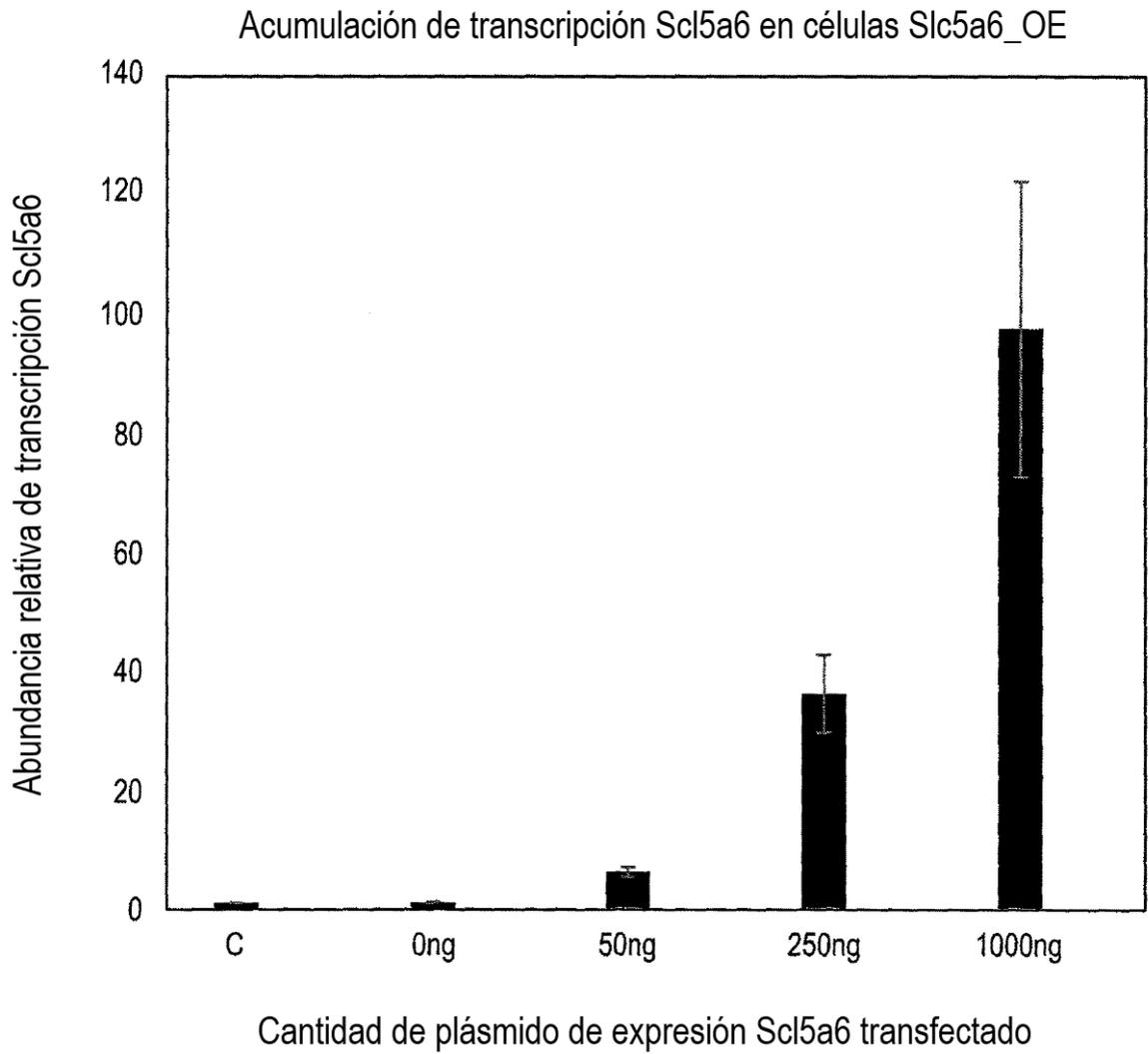


FIG. 6

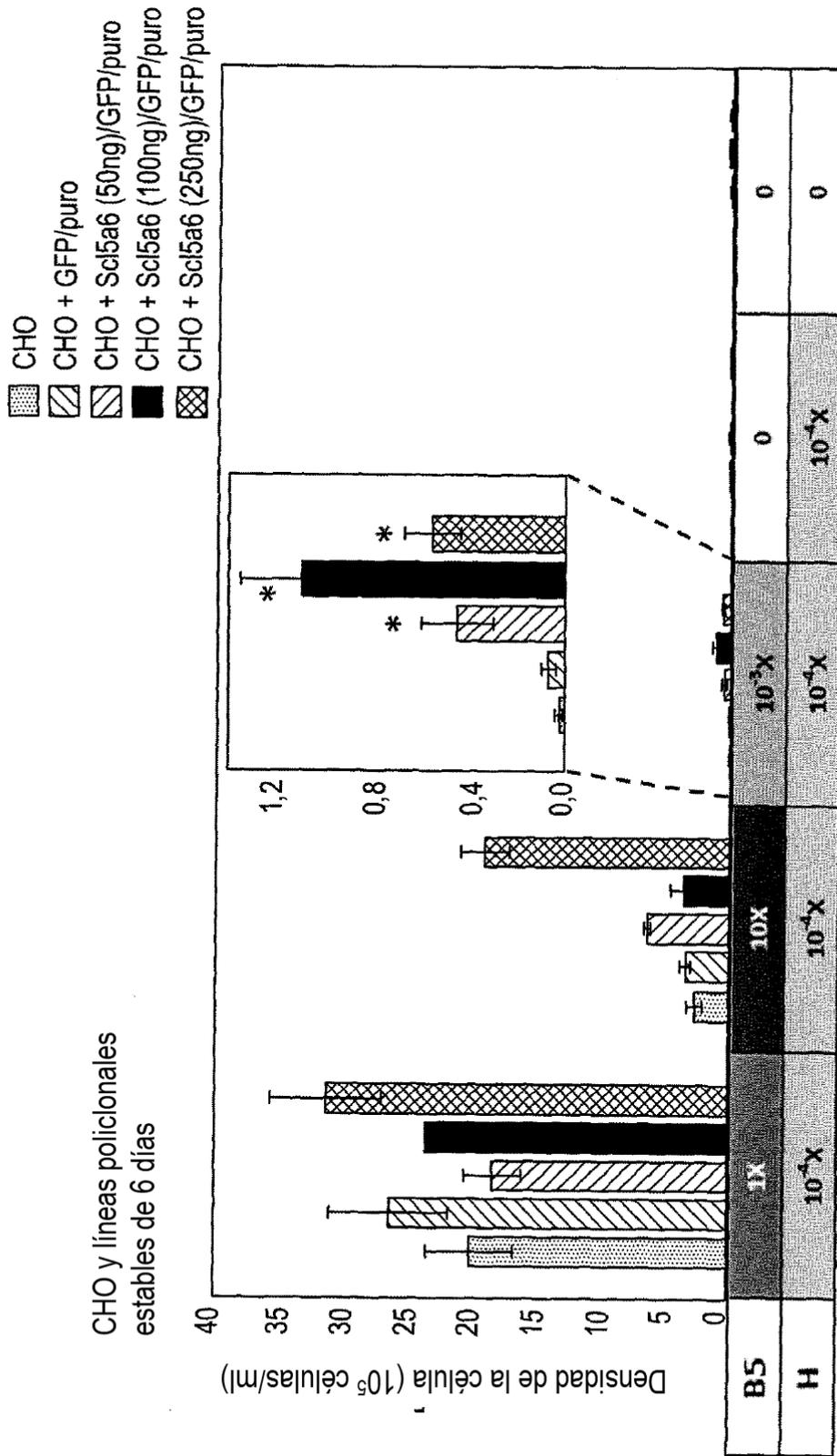
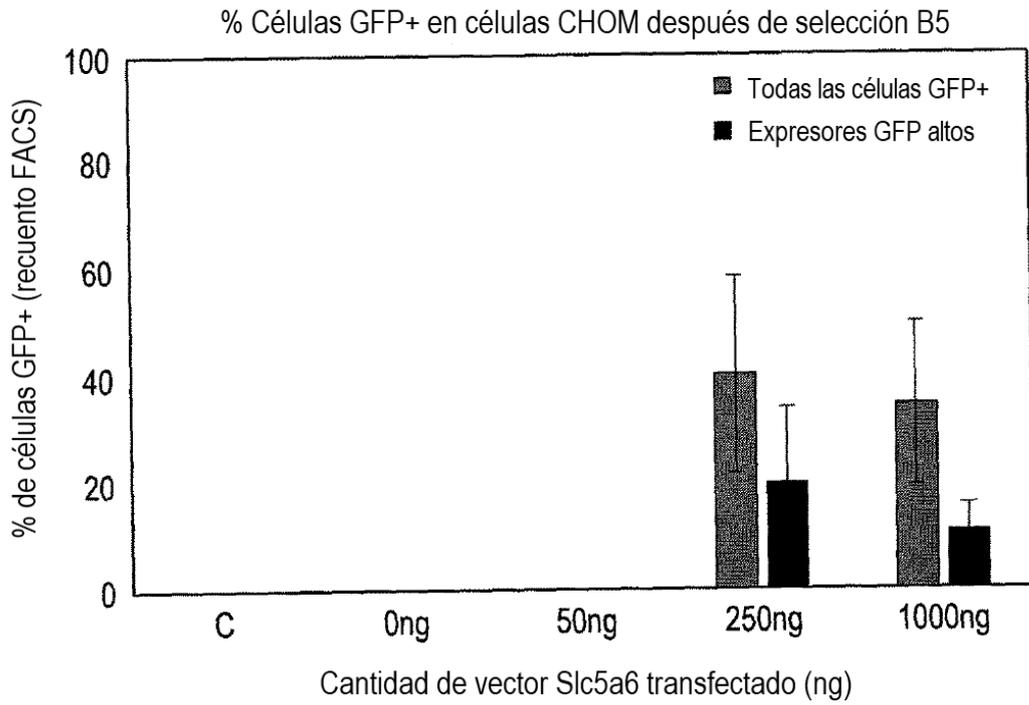
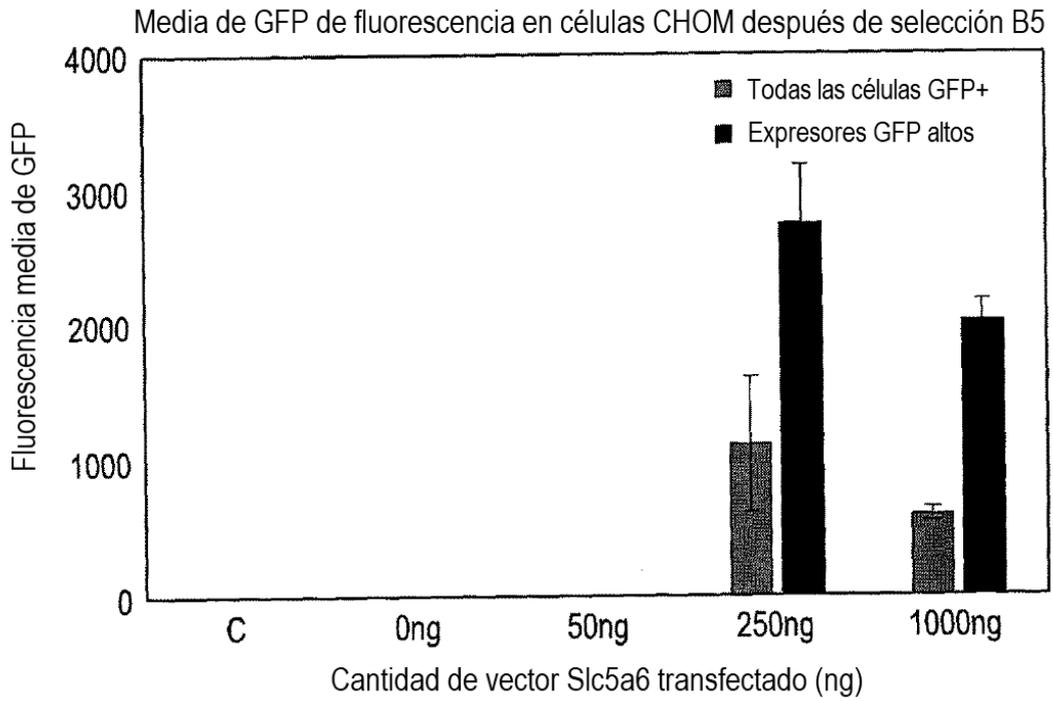


FIG. 7



**FIG. 8A**



**FIG. 8B**

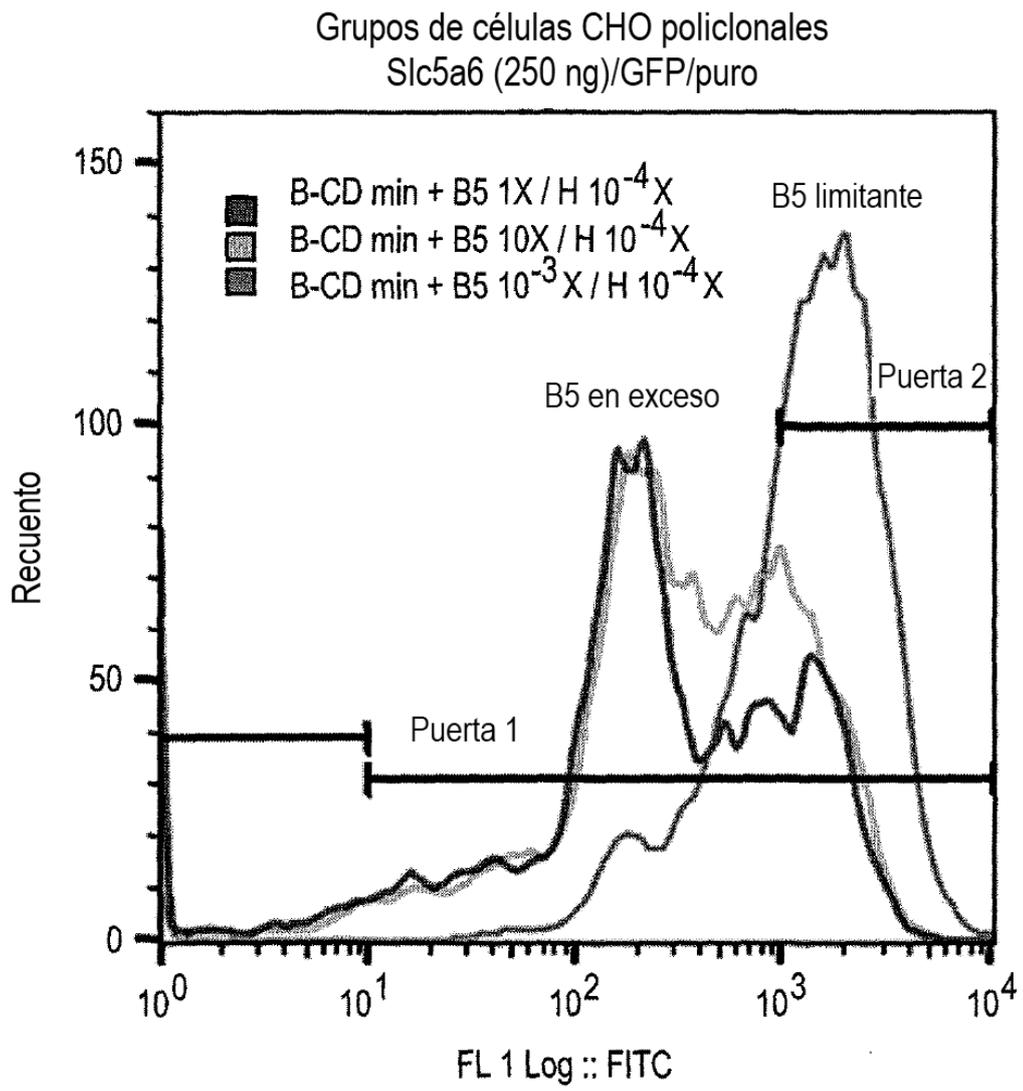


FIG. 9A

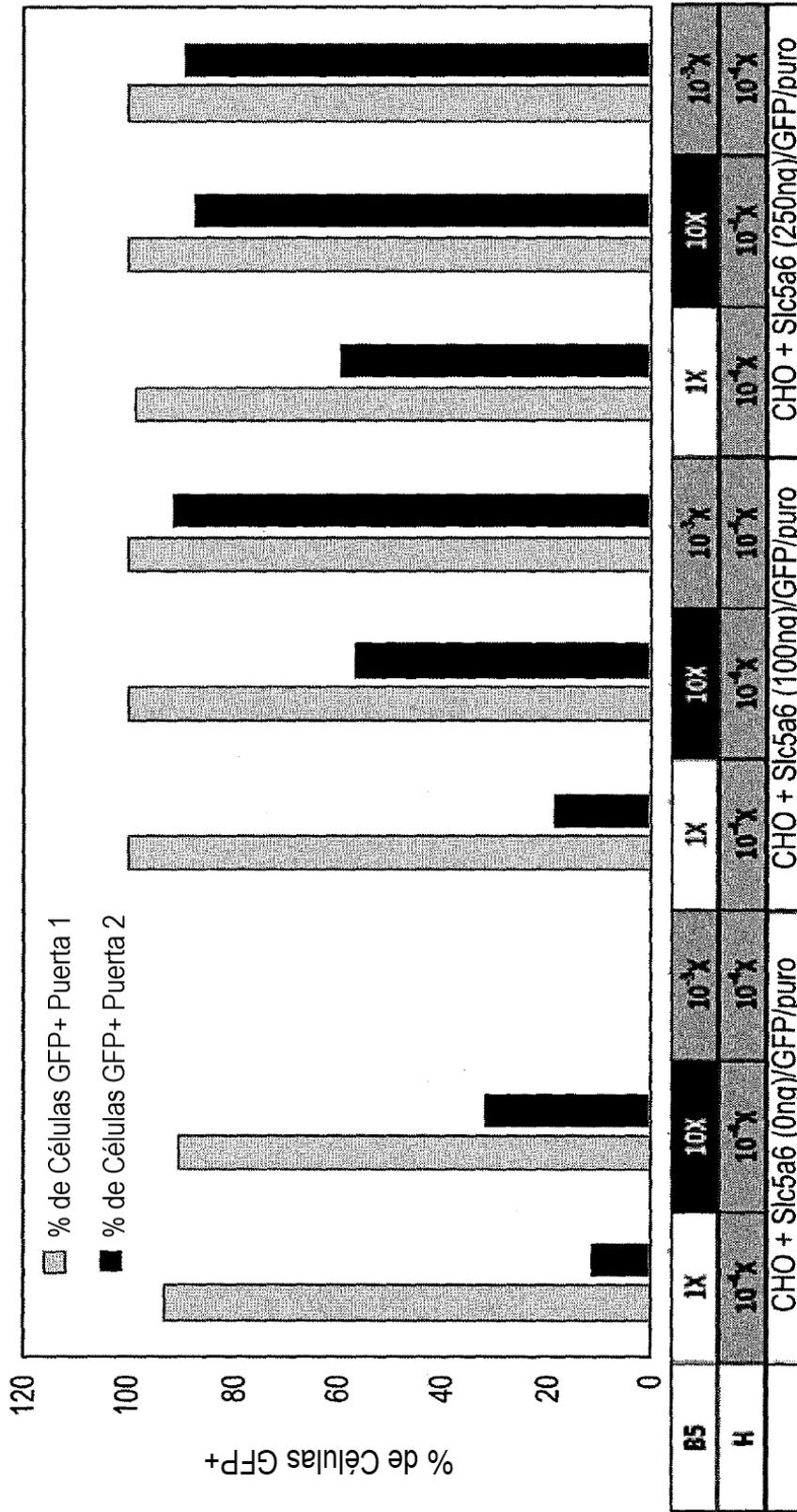


FIG. 9B

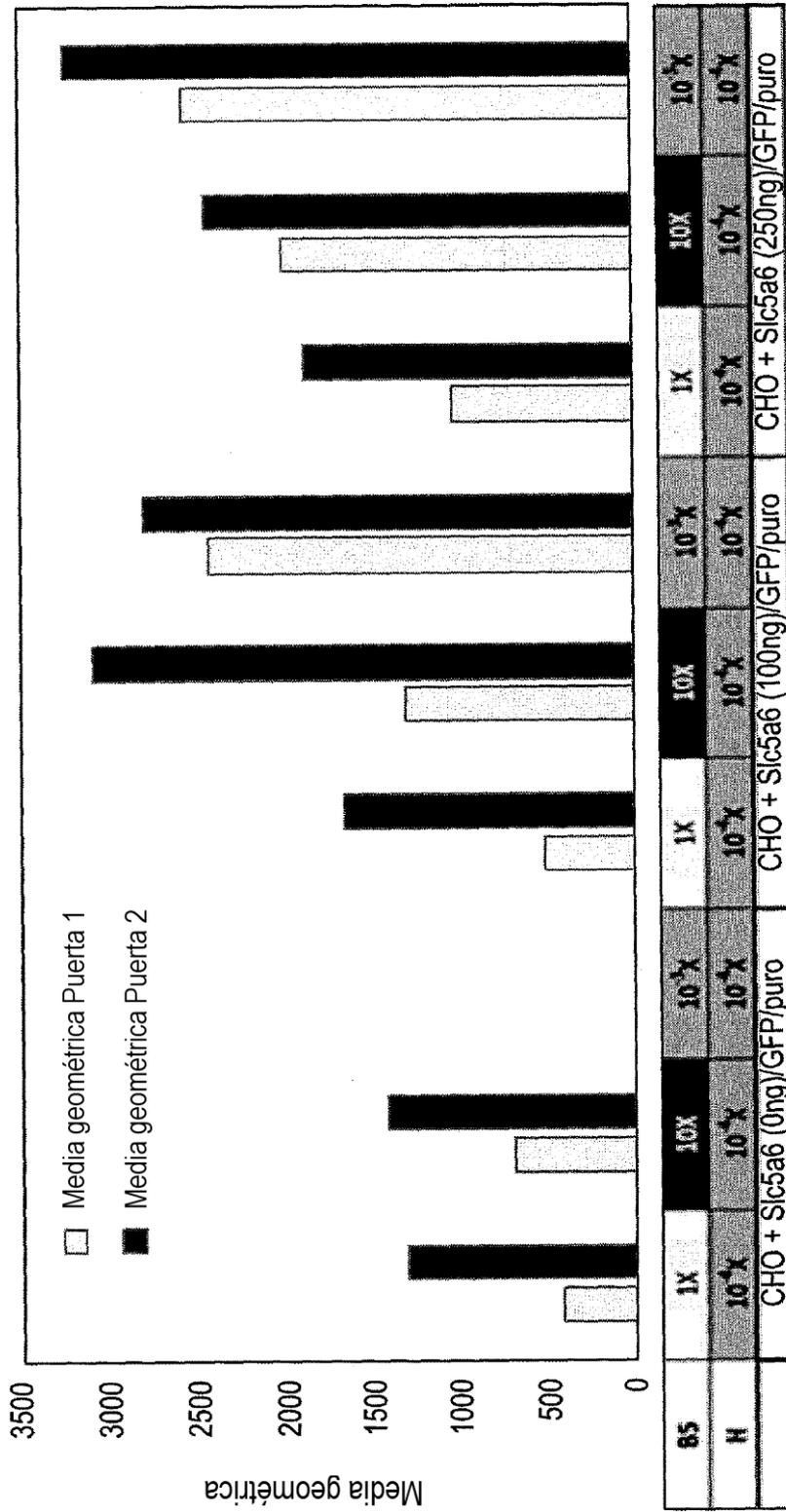


FIG. 9C

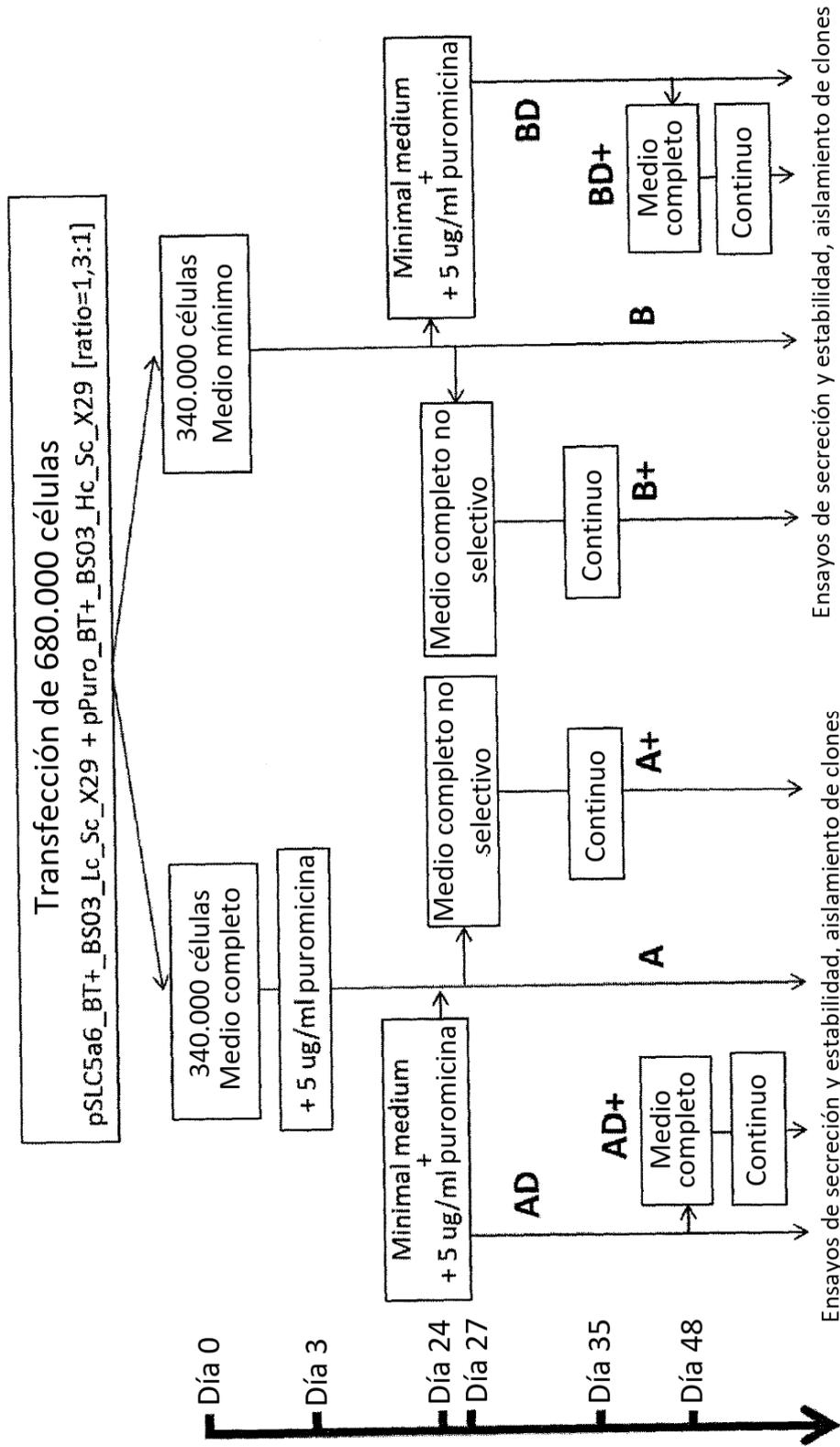


FIG. 10

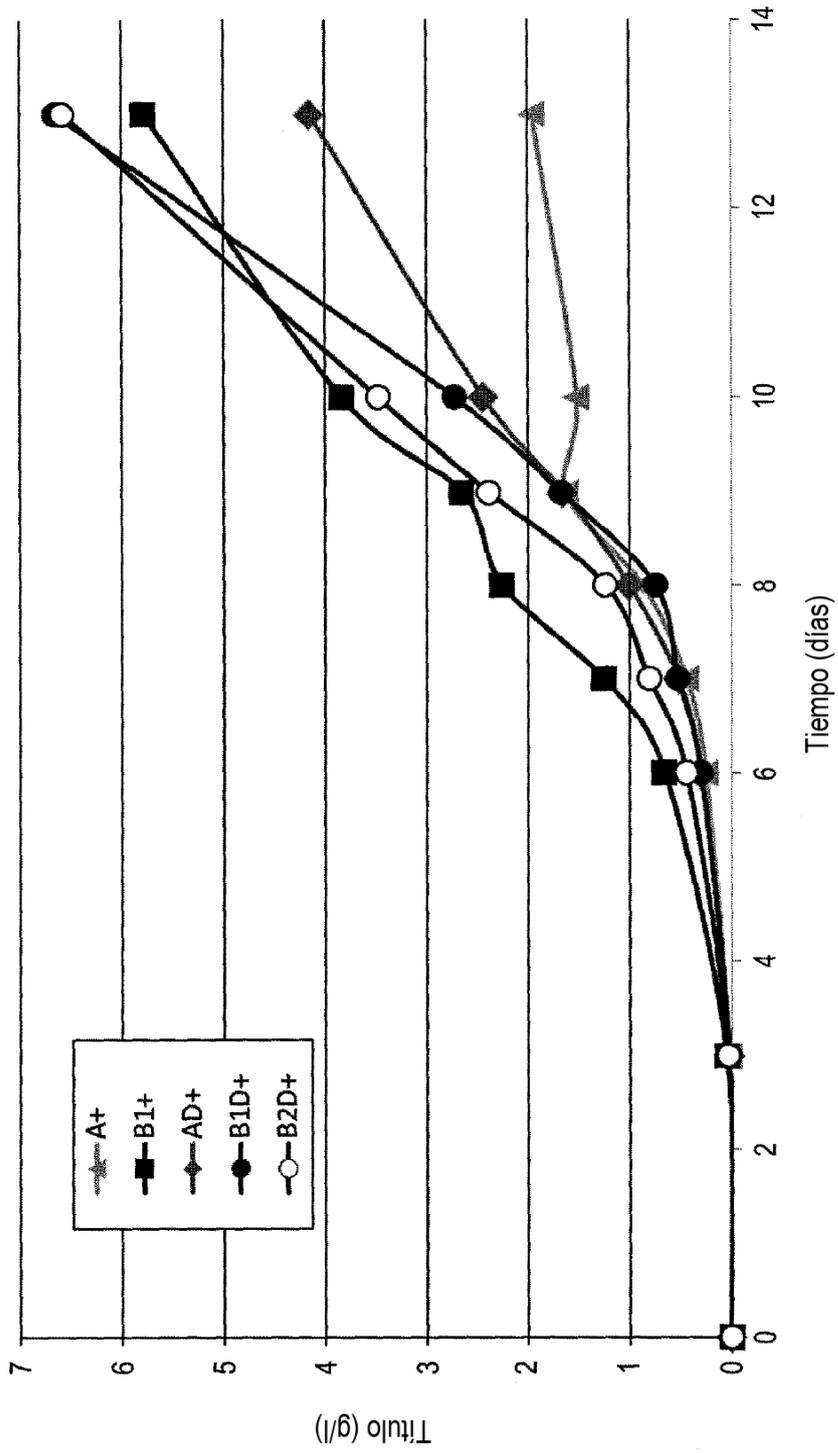


FIG. 11

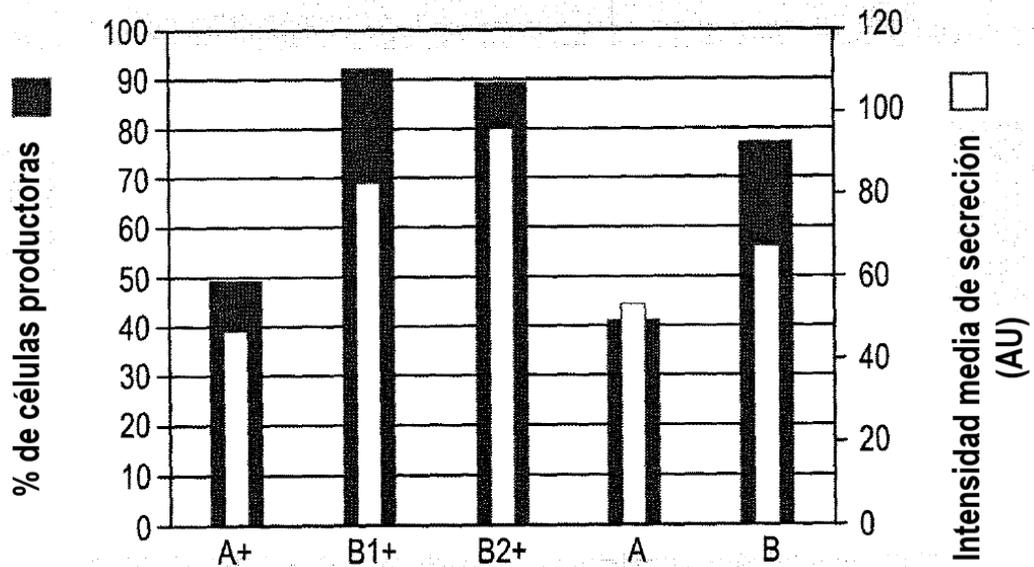


FIG. 12A

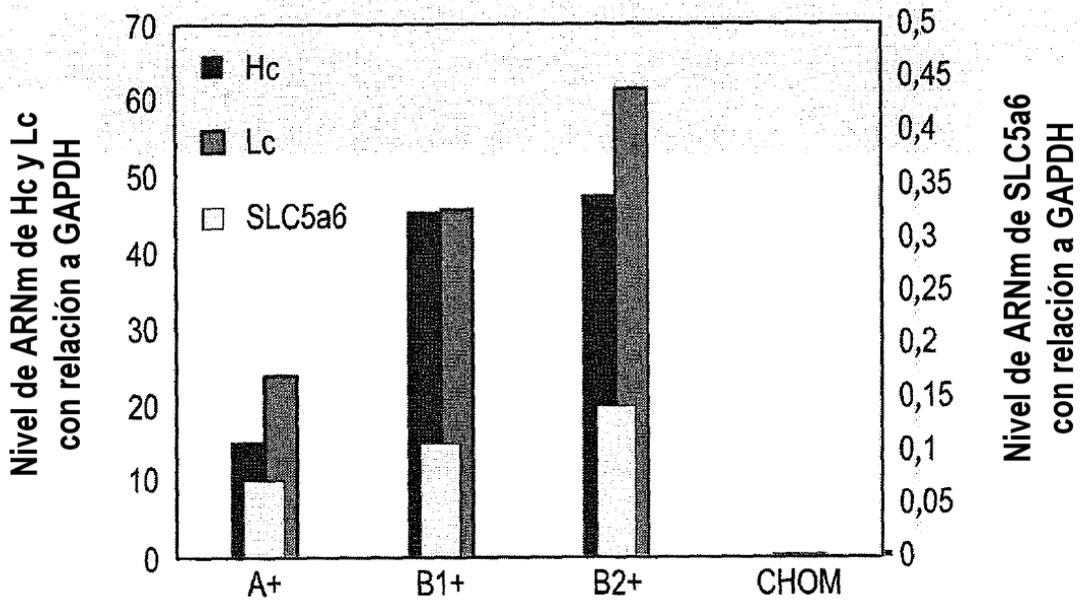


FIG. 12B

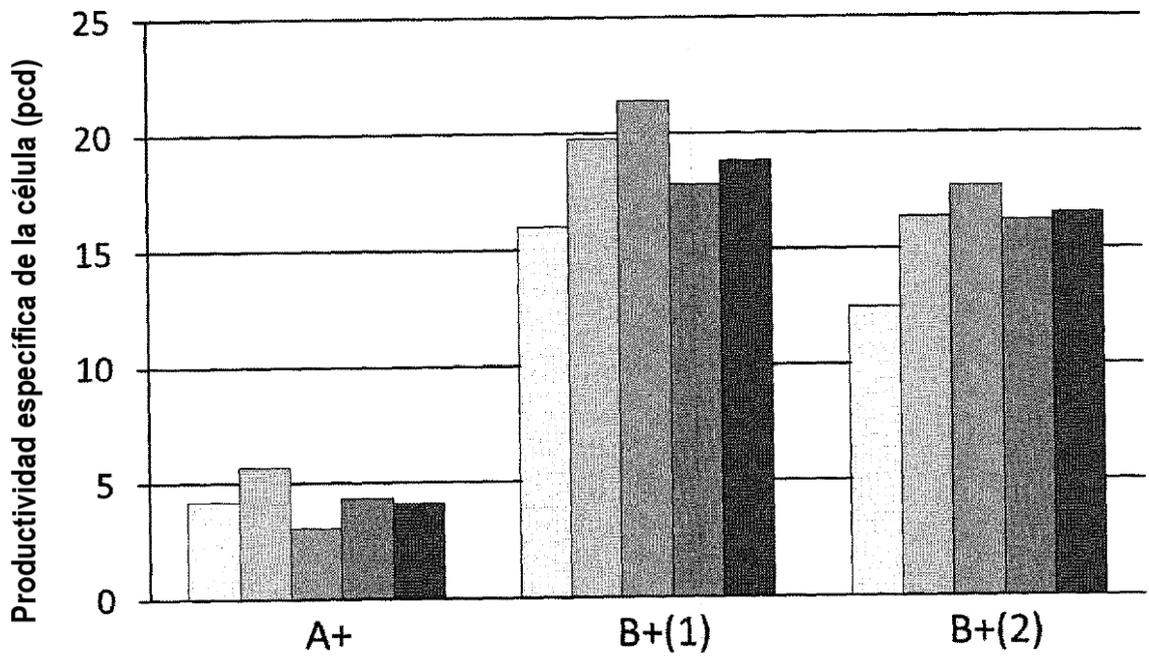


FIG. 13

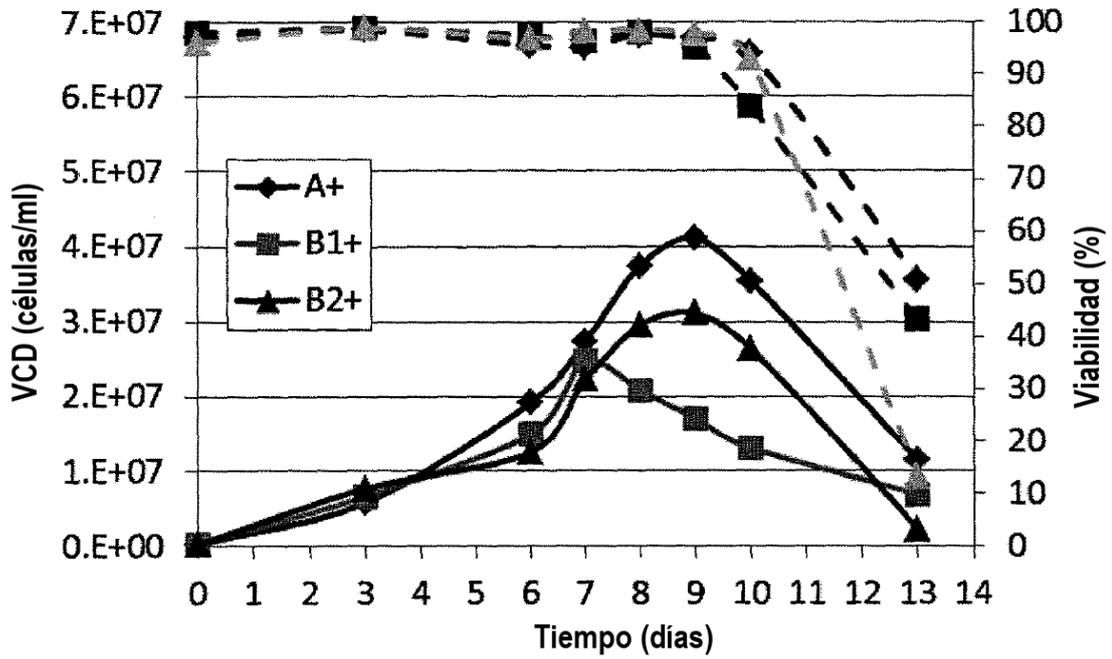


FIG. 14A

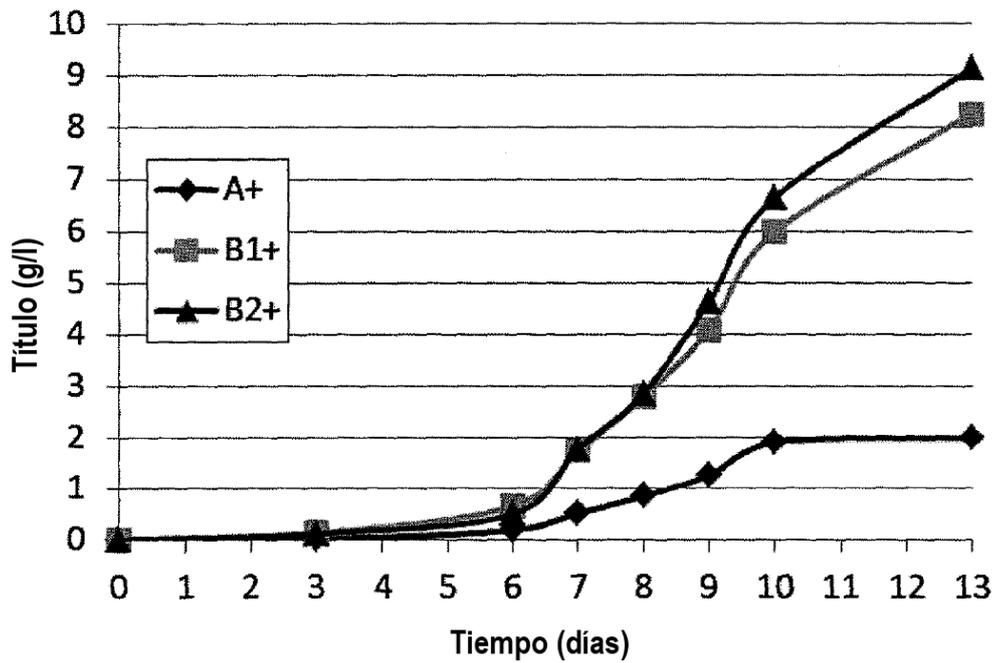


FIG. 14B

# FIG. 15

Secuencias de codificación de los genes de vitamina CHO-M

(SEQ ID NO. 21) >SLC5A6\_CHO\_CDS

ATGAGTGTGGAAGAGAGCACCTCAGCTCCCTTCTACACAACCTCAGATACCAACAAGGTTATTGCCA  
 CCTTTTCTGTTGTGGACTATGTGGTATTTGGCCTGTTGCTGGTTCTCTCCCTTGCCATTGGGCTCTAT  
 CATGCTTGCCGTGGATGGGGCCGGCATACTGTTGGTGAGCTGCTGCTGGCAGACCGAAAAATGGG  
 CTGCCTTCTGTATCACTGTCCCTGCTGGCCACCTTCCAGTCAGCGGTAGCCATCCTGGGGGCACC  
 AGCTGAGATCTACCGATTTGGAACCCAGTATTGGTTCTGGGATGCTCCTACTTTCTGGGGCTCCTG  
 ATCCCTGCTCACGTCTTCATCCCAGTCTTCTACCGCCTGCATCTTACCAGTGCCTATGAGTACCTGG  
 AGCTTCGCTTCAATAAAGCAGTGC GGATCCTGGGGACTGTGACCTTCATCTTTCAGATGGTGATCTA  
 CATGGGAGTTGCTCTCTATGCACCATCCTTGGCCCTCAATGCAGTGACTGGATTTGATCTGTGGCTG  
 TCAGTTCTGGCCCTGGGGATCGTCTGCAACATCTACACAGCACTGGGTGGGCTGAAGGCTGCATC  
 TGGACAGATGTGTTCCAAACACTGGTCATGTTCTAGGGCAGCTGGTGGTTATCATTGTAGGCTCTG  
 CCAGAGTAGGCGGCTTGGGGCATGTATGGGATGTGGCCTCCAGCATAAACTCATCTCTGGGATTG  
 AGCTGGATCCTGACCCATTTGTGCGTCATACTTTCTGGACTTTGGCCTTTGGGGGTGTCTTCATGAT  
 GCTGTCTTTGATGGTGTGAACCAGGCTCAGGTGCAGCGCTATCTCAGCTCCCGCTCAGAGAAGGC  
 TGCTGTGCTCTCCTGCTATGCCGTGTTCCCCTGCCAGCAAGTGGCCCTCTGCATGAGCTCCCTCATT  
 GGTTTGGTCATGTTTGCCTATTATAAGAAATACACTATGAGCCCCAGCAAGAGCAAGCAGCACCTG  
 ACCAGTTAGTCTCTATTTTGTATGGACCTTCTGAAGGACATGCCAGGGCTGCCTGGGCTCTTTGT  
 TGCCTGCCTCTTCAGTGGATCCCTCAGCACCATATCATCTGCATTCAATTCACTGGCAACCGTCACC  
 ATGGAAGACCTCATTCAACCCTGGTCCCTGAGCTGACCGAAACCCGGGCCATCATGCTTTCCCGAA  
 GCCTTGCTTTGCCTATGGGCTGATTTGCCTGGGAATGGCCTATATTTCTCTCATCTGGGATCAGT  
 GCTCCAGGCAGCACTCAGCATCTTTGGCATGGTTGGAGGGCCACTGCTGGGACTCTTCTGCTTGGG  
 GATGTTCTTTCTTGTGCCAACCCCTCTTGGCGCCATCGTGGCCTGTTGACTGGACTCACCATGGCT  
 TTCTGGATCGGCATTGGGAGCATAGTGAGCAGGATGAGTTCTGCCGTGGTGTCCCCTCCATTAAC  
 GGGTCCAGCTCCTTCTGTCCAGCAACCTGACCATGGCCACTGTGACCACCCTGATGCCTTCCACC  
 ACCCAGTCCAAGCCCACAGGACTGCAGCGGTTCTACTCCCTGTCTATTTATGGTACAGTGCACACA  
 ATTCCACCACAGTCATCGTTGTGGGCCTGATTGTCAGTCTGCTTACC GG GGAATGCGGGGGCCGGA  
 CCCTGAACCCCGGCACCATTTATCCTGTGTTGCCAAAGCTCCTCTCACTCCTGCCCTTATCCTGCCA  
 GAAGCGGCTTTGCTGGAAAAGCCACAGCCAGAATGCTCCAATGGTCCCCAAACTGTGTCCAGAGAA  
 GATGAGGAATGGAGTGCTGCAGGACAGCAGGGACAAAGAGAGGATGGCTGAGGATGGCCTAGCCC  
 ACCAGCCATGCAGTCTACCTATGTTGTCCAGGAGACCTCCCTGTGA

(SEQ ID NO. 22) >PANK1\_CHO\_CDS

ATGCAAATACCAGTGCGAAGTGAAGTTATCCAGTTACCGTTAGGAGCTCAAGGCAGTGCAGGCAGT  
 GGCTGTTACACGGGCACTGGAAGTCATGGCATCAGGTCTGCAGGCTTCTGGCTGTCTCGTGCCTAC  
 CTCACCCAGTACCCTTTAGGCTCACTCTGCCACACAAAGCACGATCCGCCTATCTCCTCTTCGAAA  
 CCCTGAGAACTTCATTCTGCACGTTAAACTCGTCGGTGGCGGTGGCGGGCAGGACTGGGCATGCT  
 CAGTGGCGGGGACAGGTCTGGGAGGGCAGGAAGCCGCATTTGAACCTCTAGAGGGCGCCGGGCGC  
 TGAAGGTGTTGGCCCGCGGTGGTTCTGGCTAGTCCTATCCGCCTGACACTAGCTGTGGCTGCACC

FIG. 15 (cont.)

CACCTGTGCCATGCACATGTTTCATCCAGATGGGCAGCGAGAAGAACTTCTCCAGCCTCCACACCAC  
 CCTCTGTGCCACGGGAGGTGGGGCTTTCAAGTTTGAGGAGGACTTCAGAATGATAGCAGACCTACA  
 GCTGCATAAACTGGACGAAGTGGACTGCTTGATACAGGGCCTGCTTTACGTTGACTCAGTTGGCTTC  
 AACGGCAAGCCAGAATGTTACTATTTTGAACACCCCAAAATCCTGAATTGTGTCAAAGAAGCCATA  
 CTGCCTTGATAACCCATACCCTATGCTGCTGGTTAACATGGGCTCAGGTGTCAGCATTCTAGCAGTG  
 TACTCCAAGGACAACACTACAAAAGAGTTACTGGGACCAGTCTTGAGGGCGGGACATTCTAGGCCTGT  
 GTTGCTTGCTGACTGGTTGTGAGACCTTTGAAGAAGCTCTGGAGATGGCAGCTAAAGGCGACAGCA  
 CCAATGTTGATAAGCTGGTGAAGGACATTTACGGAGGAGACTATGAACGATTTGGCCTTCAAGGATC  
 TGCTGTAGCATCAAGCTTTGGCAACATGATGAGTAAAGAAAAGAGAGAGGCCATCAGCAAAGAAGAC  
 CTCGCCCCTGCCACATTGGTCACCATCACCAACAACATTGGCTCCATTGCTCGGATGTGTGCTCTAG  
 AGGAGAATATTGACCGAGTTGTATTGCTGGAACTTTCTCAGAATCAACATGGTCTCAATGAAGTTG  
 CTCGCATATGCCATGGACTTTTGGTCTAAAGGACAGCTGAAAGCACTGTTTTTGAACATGAGGGTT  
 ATTTTGGAGCTGTTGGGGCCCTGTTGGAAGTGTCAAATGACTGATGCGCAGTAG

(SEQ ID NO. 23) >PANK2\_CHO\_CDS

ATGCTGGTGGCTTCCCTAAGGCTAGCCCCTCCTTGAGAAGCCATGTGCAGTTAGGGCAGCATTGC  
 ATACAGGTGACTGGAGGAGTGGTTGGATACTCAGTTTTTCCATGGTTTGGCTTGGATATTGGTGGAA  
 CCCTAGTTAAGCTGGTTTATTTTGAACCTAAAGACATCACTGCTGAAGAAGAAAAGGAGGAAGTGA  
 GAGTCTGAAAAGTATTCGCAAGTACCTGACCTCCAATGTGGCTTATGGATCCACAGGAATTCGGGAC  
 GTGCACCTTGAGCTGAAGGACCTGACTCTGTGTGGACGCAAAGGCAATCTGCACCTTATACGCTTTC  
 CCACTCATGACATGCCTGCTTTTATTCAAATGGGCAAAGATAAAAATTTCTCGAGTCTCCACACTGTC  
 TTTTGTGCCACTGGAGGTGGATCATAAAAATTTGAGCAGGATTTTCTCACAATAGGTGACCTTCAGCT  
 TCACAAAATGGATGAACTGGATTGCTTAATAAAAAGGAATTTGTACATTGATTGAGTTGGATTTAATGG  
 ACGGTCACAGTGTATTATTTTGAATACTCTGCTGATTCTGAAAAATGTCAGAAGTTACCATTTGATT  
 GAAAAATCCATACCCTCTGCTTCTGGTGAACATCGGCTCAGGGGTTAGCATCTTAGCAGTGTATTCC  
 AAAGATAATTATAAGAGGGTCACAGGCACCAGTCTTGAGGAGGAACCTTTCTTGGTCTCTGCTGTC  
 TTCTTACTGGCTGTAGCACTTTTGAAGAAGCTTTGAAATGGCATCTCGTGGGATGACCAAGT  
 GGACAAAATFAGTTTCGAGACATTTATGGAGGAGACTATGAACGGTTTTGGATTGCCAGGCTGGGCTGTG  
 GCTTCAAGTTTTTGGAAACATGATGAGCAAGGAGAAGAGAGAGGCTGCCAGTAAGGAGGACCTTGCC  
 AGAGCAACTTTGATCACCATCACCAACAACATTGGCTCCATAGCAAGAATGTGTGCCCTTAATGAAA  
 CATTAAACCAGGTTGTATTGTGCGGCAATTTCTGAGAGTCAACACAATCGCCATGCGACTTCTGGCAT  
 ATGCTCTGGATTACTGGTCCAAGGGGACAGCTAAAAGCACTGTTTTTCAAGCAGCAGTACCAGGAAAT  
 TTTTCCATTTGGGGCAGGGTTCTACTTACCCTACCCTTGTGTGACTCCTGTGAACTTAACACTGCCT  
 TGGGGCTGGCTGACCGGTTGTGA

(SEQ ID NO. 24) >SLC19A2\_CHO\_CDS

ATGCATGGATTATGCAGCCATGCTGCGCAAGCTCGCAAGCTCGTAAGGCTCTGGGATGACTATGCAT  
 TTTGCCTGAATGCAGATGGCCATGTGGGTGGCTATGGAACCCCGGAAATGACAACACAGAATATGC  
 CTTTCCAACCTGCTCTAGACCAAGTGTAAAAATGTTTGACATGTCCACGCTTTTTAGGTCACTGCTT  
 GCTCATTTAGCTGCCTTTAAGGTCTTCAATGAAATTTACCCCGTCTGGACGTACTCTTACTTGGTGTCT  
 CCTCTTTCTGTGTTCTTGGCCACAGACTACCTCCGTTACAAGCCTGTCATTCTGCTTCAGGGACTCA  
 GCCTTATTGTTACATGGTTTCATGCTGCTCTATGCCCAAGGATTGCTGGCTATTGAGTTCTTGGAAATC  
 TTCTATGGCATTGCCACAGCCACTGAAATTTGCCTATTACTCCTATATCTACAGTGTGGTTCGACCTGGG  
 CATGTACCAGAAAAGTCAACAAGTTACTGTAGAAGTGGCACCCTTGGTAGGCTTCACAGTGGGCTCTGTC  
 TTAGGGCAAATCCTTGTGTGTCAGTGGCTCACTGGCCACTGTTGAGCTTGAACGTCATCTCCCTCACCT  
 GTGTTTCTGTTGCTTTTCTGCTGTTGGCTGTTTCTGCCCATGCCACAGAAGAGTCTCTTCTTCCACCAC  
 ATTCCTGCCTCCTGTCATGGAGTGAATGGCATCAAGGTACAAAATGGTGGCATCGTTACTGAAAACC

FIG. 15 (cont.)

CAGCATCTAACCACCTTCCTGGATGGGAGGACATTGAGTCAAAAATTCCTCTAAATTTAGATGAACCT  
 CCTGTGGAGGAACCGGAGCCCAAGCCAGACCGGCTGCGTGTGCTGAAAGTCCTGTGGAATGACTTC  
 TTGATCTGTTACTCTTCCCGCCCTCTGCTCTGCTGGTCCGTGTGGTGGGCCCTCTCCACCTGCGGCT  
 ATTTTCAAGTGGTGAACACACCCAGGGATTGTGGGAGAAGGTGATGCCTTCTCAAAGTGCCGTTAT  
 CTACAATGGTGGTGTGGAGGCTGTGTCAACCTTGTGGGTGCAAGCGCTGTATTTGCAGTTGGTTAT  
 ATAAAAATACCTGGTCAACTTGGGGAGAAATGACGCTATTCTCTGTTCTCTCCTGATTGCTGCTGC  
 AGTGTATACCATGGACACTGTGAATAACATTTGGGTGTGCTATACATCCTATGTTGTCTTCAGAATCA  
 TCTACATGGTACTCATCACCATAGCAACTTTTTCAGATTGCTGCAAACCTCAGCATGGAACGTTACGCC  
 CTTGTGTTTGGTGTAAACACTTTTTCATTGCCCTGGCATTGCAGACCCTGCTCACTTAATTTGGTTGA  
 TAACAAGGGCCTTGGCTTAGAGATTACCACACAGTTCTGATTTATGCCAGTTACTTTGCGGTCATCT  
 CTGTAGTTTTCTGGCTAACGGTGCATTCAGTGTCTAAAGAAATGCAGAAAGCAGGAGGATCCAG  
 CTCAGCCCTCAAGCAACTACTCCCTAA

(SEQ ID NO. 25) >SLC19A3\_CHO\_CDS

ATGGAAACCATAATGAAGATACAGGGAAAGTCAGCCAAAACATCTTTCACCTTGATGGAGACAGAAA  
 ATGCCTTTGTTTCATAGTCGCTCATGTCTCGGGAAGAGACAAGAGCTCTGGTCTCGGGAGGAGACAG  
 AGTGTGCTTGGGAGATCACCAACTGCCACCTGGAAGACGTTCCAGGAAGTCTGTGGGAACCTCAGG  
 GACGCTTGGGAGATCCCGTGGGGAGCCGGTACACCATAGCCGGCTGCATTTGCCAGACTTTGC  
 ACTGCTGTGACAAAATATCTGATCCGAAGAATCACAGATTTCCAGACACAGTATCAGACAGCAGG  
 ACTCACCAACAAACCGGTCTGGCAGCACCTGCCAGAGGCCAGCAGTCACTAGCAGCAGCATT  
 GCTTCTGGCAGCAGCACTTCTGCTGACAACAGCCCTTCCACAGCCACATCCACAGCCACAGCCAC  
 AGGAGCCACAGCCGAGGAGCGGCAGGGGAGAGGGGGGGGGGGGGACGGCCACCGCCACAGCC  
 GCCACAGCCGCCACAGCCGCCACAGCCGCCACAGCCGCCACAGCCGCCACAGCCGCCACAGCCGCC  
 CCACAGCCGCCACAGCCGCCACAGCCGCCACAGCCGCCACAGCCGCCACAGCCGCCACAGCCGCC  
 ACAGCCGCCACAGCCGCCACAGCCGCCACAGCCGCCACAGCCGCCACAGCCGCCACAGCCGCC  
 ACAGCCGCCACAGCCGCCACAGCCGCCACAGCCGCCACAGCCGCCACAGCCGCCACAGCCGCC  
 TGTCAGTAGAGAGGACTCAGGGTACTGTGTTGCTGAGGCTAATCTTGAACCTCTGGGCTCCTGTGA  
 TCTCCCCACGCAGGGTACTGTGTTGCTGAGGCTAATCTTGAACCTCTGGGCTCCTGTGATCTCCCC  
 ACGCAGCCACCACAGCCGCCACAGCCGCCACAGCCGCCACAGCCGCCACAGCTGCCACAGCCTCC  
 ACAGCCACCGCAGCCACCACAACCACAGCAACCCATGATGTCAGTAAAGAGGACTCGGGTGAAGAC  
 TTTGTGCTCCATTGCTGTGGGAAGGGCTGTGGCTGTGGCTGTGGCTGTGGGAAGGGCTGTTGCCAG  
 CAGAAGTGTGCTGCCAGCAGAAGTGTGGCTGCAAGAAGTGTGCTGCTAGGATGGCTGTTGTCTC  
 TGCTTCTAAACTAAGTACAGCTTGGAGCCTTGTGGCTGCATTTGGGACCGTACGACTGAAACTG  
 AACACATCTGGAGTATTGGACAGCCACACCCTACTGCCACCAACGCCAGCAAAGTGGTGTGATGAGT  
 GCCATATTAGCCCAGGAACCTGAAGTCACTGCTTCTCTGAGGGCTATCTTGGAGGACGGGTCG  
 GGGTGGGAGACTGCAGAGGAGTGTGCCTTAGGCATGCACCACGCCAGCGAACAGAGCAGCTGGCT  
 TCCGCGCCTGGGGCCTTCTGTGATCTGCTGTGTTCTTGTGCTGGAACCCACCCAAGTTGGTCTA  
 GCCAGGATTCCTGTACCGCCCTCCGCAAGAGTAAAGGCCATTACGCTGGGCCAATTACACCTTTT  
 TACGCTGTGCGAATGCTTCTCAAACCGCTGCGGTTGGGGAGTTGGCATGAAGCTTTACCAGCGAG  
 TTTGGATAAACCCAAACTCAAAGACAGTGTTCAGTTTCCCTCGTGCGAATTGGAATTACCGCAGTCA  
 CTGTACCTATACGCTGTGCTTCTGGTCACCCCTACATATCTACTCCACAGATGACAAATGAGGTCTC  
 TCTGTTTGGACATACTCTACCTGGCGATGCTGCCCCCTGTGTTGCTCCTCACTGATTACCTGCGC  
 TACAAACCAGTCATCATATTACACATCATGGCCTTCATCGTTTGTACCTGATTCTTTTGTGGCCAG  
 GGTGTGATGCTCATGCAGGTGGCTGAGTCTTTTTTGGGTTGTCTCAGCTACGGAGATAGGCTACT  
 ATTCCTACATATACAGCATGGTACGCCAGAACTACCAGAAAGTGAAGCAGCTACTGTGGAGTGT  
 CACTCTTGTGGCCTACACAGTAGGCTCGGTGCTGGCCAGCTCCTGGTATCCCTGGCAGCTCTGCC  
 ATACTCTTCCCTTTTTACACAACCTTGGCCTGTGTCTCTGTGGCTTTCTTTTCTCGCTTTTTTACCA  
 ATGCCTAAGAAGAGCATGTTTTTTCATACAATGTATGACAGAGAAGCCCATCAAAGCCACTGGGAC  
 AAGATACTGTCTTGGGAAGCTCAGAAGAACAACAAGACAGCTCACCCAGAAATGCTGCCACTTC  
 AGGGACTCCAGGGAACATCAAGCCAAGGGGCCAGAGCCAGAAAACGTGGCTTTGAGAGTCTTTGT  
 GCATTTGGTTCCAAGACCTGAAGGAGTGTACTCTCCAAGCACCTTTTGTACTGGTCCCTGTGGTGG

FIG. 15 (cont.)

GCTTTCGCTACGTCGGGTTATAACCAAGTCTTGAAGTATGTTCAAGTCTTATGGGAACACAAGGCAC  
 CCTCCCAAGACTCTTCTATTTATAATGGAGCAGTAGAGGCTGCTGCCACATTTGGAGGAGCTTTGGC  
 TGCTTCTCTGTGGGCTACGTGAAGGTCAACTGGGACCTCCTAGGAGAAGTGGGCTGGCCATCTTC  
 TCAGCTGTCATTGCCGGCGCTCTGTTTCTCATGAATTACACGCTCAGCATCTGGGTGTGCTATGCCG  
 GCTATTTGCTGGTCAAGTCTAGCTATATGTTTCTTATAACCATAGCAGTGTTCAGATTGCTGTTAACC  
 TGAGCGTAGAACGTTATGCCCTGGTGTGGCATAGACACTTTCATTGCCTTGGTGATTGAGGCCAT  
 CATGACTGTGATTGTGGCTGATCAAAGAGGACTCCACTTGCCAGTCACCACTCAGTTTTTGGTTTATG  
 GAAGTTACTTTGCTGTCATTGCTGTGGTCTTCCCTAATGAGAAGCACATATATTATCTACTCAGCCAAG  
 TGCCAAAAGGAAGTAGAGAGCCTTGCTGTCTGTGAGAGTCCCAATGAGCCACACCCACAACAGCCG  
 AGAGATGTGTCAACCAAGTTCTGA

(SEQ ID NO. 26) >TPK1\_CHO\_CDS

ATGGAGCATGCGTTTACCCCGCTGGAGCCCCTGCTACCCACGGGAAATTTGAAATATTGCCTCATGG  
 TTCTTAATCAGCCTTTGGACACACGCTTTCGTCACTTTGGAAAAAGCTCTTTCAGAGCCTGTGCG  
 GACGGTGGTGCCAACTGCTTGTATGACCTCACCGAAGGAGAGAGAGAAAGATTCTTGCCTGAATTCA  
 TCAGTGGGGACTTTGATTCTATTAGGCCTGAAGTCAGAGAGTACTACACTGAAAAGGGCTGTGATCT  
 TATTTCAACTCCTGACCAAGACCACACTGATTTTACCAAGTGCCTTAAAGTGCTCCAAAGGAAGATAG  
 AAGAGAAAGAGCTGCAGGTGGACGTGATTGTGACCCTGGGAGGACTTGGTGGGCGTTTTGACCAGA  
 TCATGGCATCGGTGAACACCCCTTTCCAAGCCCCTCACATCACTCCTGTGCCAATTATAATAATCCAA  
 GGGGAATCTCTCATCTACCTCCTCCAACCCGGGAAAGCACAGGCTCCATGTGGACACTGGAATGGAA  
 GGCAGCTGGTGTGGTCTTATCCCTGTTGGACAGCGTTGCAGCCAGGTGACAACAACGGGCCTGAAA  
 TGGAACCTGACAAATGATGTGCTTGCCTTTGGAACACTGGTCAGTACTTCTAACACCTACGATGGGT  
 CTGGGGTGGTACTGTGGAGACTGACCACCCGCTTCTCTGGACCATGGCCGTCAAAAAGCTAA

(SEQ ID NO. 27) >SLC25A19\_CHO\_CDS

ATGGTCGGCTATGACGCCAAAGCAGATATCAGGAGTAACTCCAAGTTGGAGGTGGCGGTGGCAGGA  
 TCAGTGTCTGGATTTGTCACTCGTGCCCTGATCAGCCCTTTGGACGTCATCAAGATCCGTTTCCAGC  
 TTCAGATTGAACGGCTGTGCCAAGTGACCCCAAAGCCAAATACCACGGGATCTTGCAGGCAATCAA  
 GCAGATTCTGCAGGAGGAGGGACCAGCGCTTTCTGGAAAGGGCACGTTCCAGCCAGATCCTGTG  
 CGTAGGCTATGGAGCTGTCCAATTTCTGACGTTTGAAGAGCTGACTGAACTGCTCCATAGAATCAAC  
 TTGTATGAAACCCGCCAGTTCTCAGCACACTTCGTATGTGGCGGCCTGTCTGCTGGTGCAGCCACC  
 CTTGCTGTGCACCCTGTGGATGTCTGCGCACCCGCTCGCGGCTCAGGGGGAGCCCAAGATCTAT  
 AGCAACCTCCGAGACGCCGTGTGACCATGTACAGGACCGAGGGCCCTTTGGTCTTCTACAAAGGC  
 TTGACTCCCACCGTGATAGCCATCTTCCCCTACGCGGGCCTGCAGTTCTCCTGCTACCGGTCTTGA  
 AGCAAGTCTACGACTGGGTACATACCTCCAGATGGAAAGCAAACAGGGAACCTGAAAAACCTGCTCTG  
 TGGATGTGGGTCTGGAGTCATCAGCAAGACCCTCACATATCCCCTGGACCTCTTCAAGAAGCGTCTG  
 CAGGTGGGAGGGTTTGAGCGTGCCCGATCCGCTTTGGCGAGGTGCGTAGCTACAGGGGCCTCCT  
 GGACCTACCAAGCAGGTGCTACAAGATGAAGGCACCCAGGGCCTTCAAGGGCCTGTCCCCAG  
 CCTGCTGAAGGCGGCCCTCTCCACCGGCTTCATGTTCTTCTGGTACGAGCTCTTCTGTAACCTCTTC  
 CACTGCATAAGGAGTGAAGACAGATAG

(SEQ ID NO. 35) >PANK3-isoforma X1\_CHO\_CDS

ATGCCAAAAAACCTCTTCCCATGGTTTGAATGGACATTGGGGAACTCTAGTAAAGCTCTCATATTTTGAAC  
 CTATCGATATCACAGCAGAGGAAGAACAAGAGGAAGTTGAGAGCTTAAAAAGCATTTCGGAAATATTTGACTTCTA  
 ATGTAGCATATGGATCTACTGGCATTCCGGATGTACACCTTGAAGTGAAGGACTTAACCTTTTTGGACGAAGAGG  
 GAACTTGCACCTTATCAGATTTCCAACCCAGGACCTGCCTACTTTTATCCAAATGGGAAGAGATAAAAACTTCTCAA  
 CTTTACAAACGGTGTGAGTGTACAGGAGGTGGTCTTACAAGTTTGAGAAAGATTTTCGCACAATTTGAAACC

FIG. 15 (cont.)

TCCACCTGCACAAACTGGATGAACTTGACTGCCTTGTAAGGGCTTGCTGTATATAGATTCTGTCAGTTTCAATGGA  
 CAAGCAGAATGCTATTATTTGCTAATGCCTCAGAACCTGAGCGATGCCAAAAGATGCCTTTAACCTGGATGATC  
 CTTATCCACTGCTGGTAGTGAATATTGGCTCAGGAGTCAGTATTTAGCAGTTCATTCCAAAGACAATAAAAAG  
 AGTGACTGGAACAAGCCTTGGAGGGGTACCTTTCTTGATTATGCAGTTTATTGACTGGCTGTGAAAGTTTTGAA  
 GAGGCTCTTAAAATGGCATCCAAAGGTGACAGCACCCAAGCTGATAGGCTGGTCCGTGATATTTATGGAGGAGAT  
 TATGAAAGATTTGGTCTGCCAGGTTGGGCTGTGGCATCTAGTTTTGGGAATATGATTTATAAGGAGAAGCGAGAA  
 ACTGTTAGTAAAGAGGATCTGGCAAGAGCTACTTTAGTTACTATCACTAATAACATTGGTCCGTGGCCCGGATGT  
 GTGCTGTTAACGAGAAAATTAACAGAGTTGTCTTCGTTGAAACTTTTTACGTGTTAATACTCTCTATGAAACTT  
 CTGGCATATGCTTTGGATTACTGGTCAAAGGTCAATTGAAAGCATTGTTTCTAGAACATGAGGGATACTTTGGAG  
 CTGTTGGTGCACCTTCTGGATTGCCAAATTTAGCTGA

(SEQ ID NO. 36) >PANK3-isoform X2\_CHO\_CDS

ATGAAGATCAAGGATGCCAAAAACCCTCTTTCCCATGGTTTGAATGGACATTGGGGGAACTCTAGTAAAGCTCT  
 CATATTTGAACCTATCGATATCACAGCAGAGGAAGAACAAGAGGAAGTTGAGAGCTTAAAAGCATTTCGGAAAT  
 ATTTGACTTCTAATGTAGCATATGGATCTACTGGCATTGGGATGTACACCTTGAAGGACTTAACCCTTTTT  
 GGACGAAGAGGGAACCTTGCACTTTATCAGATTTCCAACCCAGGACCTGCCTACTTTTATCCAAATGGGAAGAGATA  
 AAACTTCTCAACCTTACAAACGGTGCTGAGTGCTACAGGAGGTGGTGCTTACAAGTTTGAAGAAAGATTTTCGCAC  
 AATTGGAACCTCCACCTGCACAAACTGGATGAACTTGACTGCCTTGTAAGGGCTTGCTGTATATAGATTCTGTC  
 AGTTTCAATGGACAAGCAGAATGCTATTATTTGCTAATGCCTCAGAACCTGAGCGATGCCAAAAGATGCCTTTTA  
 ACCTGGATGATCCTTATCCACTGCTGGTAGTGAATATTGGCTCAGGAGTCAGTATTTAGCAGTTCATTCCAAAGAC  
 AACTATAAAAGAGTGACTGGAACAAGCCTTGGAGGGGTACCTTTCTTGTTTATGCAGTTTATTGACTGGCTGTG  
 AAAGTTTTGAAGAGGCTCTTAAAATGGCATCCAAAGGTGACAGCACCCAAGCTGATAGGCTGGTCCGTGATATTT  
 ATGGAGGAGATTATGAAAGATTTGGTCTGCCAGGTTGGGCTGTGGCATCTAGTTTTGGGAATATGATTTATAAGG  
 AGAAGCGAGAACTGTTAGTAAAGAGGATCTGGCAAGAGCTACTTTAGTTACTATCACTAATAACATTGGTCCGT  
 GGCCCGGATGTGTGCTGTTAACGAGAAAATTAACAGAGTTGTCTTCGTTGAAACTTTTTACGTGTTAATACTCTCT  
 CTATGAAACTTCTGGCATATGCTTTGGATTACTGGTCAAAGGTCAATTGAAAGCATTGTTTCTAGAACATGAGGG  
 ATACTTTGGAGCTGTTGGTGCACCTTCTGGATTGCCAAATTTAGCTGA

## FIG. 16

Secuencias de aminoácidos de los genes de vitamina CHO-M

(SEQ ID NO. 28) >SLC5A6\_CHO\_PROT

MSVEESTSAPFYTTSDTNKVIATFSVVDYVVFGLLLVLSLAIGLYHACRGWGRHTVGEELLADRKMGCPL  
VLSLLATFQSAVAILGAPAEIYRFGTQYWFLGCSYFLGLLIPAHVFIPVFYRLHLTSAYEYLELRFNKAVRIL  
GTVTFIFQMVIYMGVALYAPSLALNAVTFGDLWLSVLALGIVCNITLALGGLKAVIWTDFVQTLVMFLGQLV  
VIIVGSARVGGGLGHVWDVASQHKLISGIELDPDFVRHTFWTLAFGGVFMMLSLYGVNQAQVQRYLSSR  
SEKAAVLSCYAVFPCQQVALCMSSLIGLVMFAYYKKTMSPPQEQEAAPDQLVLYFVMDLLKDMPLPGL  
FVACLFSGSLSTISSAFNSLATVTMEDLIQPWFPELTETRAIMLSRSLAFAYGLICLGMAYISSHLGSVLQAA  
LSIFGMVGGPLLGLFCLGMFFPCANPLGAIVGLLTGLTMAFWIGIGSIVSRMSSAVVSPPINGSSSFLSSNL  
TMATVTTLMPSTTQSKPTGLQRFYLSYLWYSAHNSTTVIVVGLIVSLLTGGMRGRTLNPGTIYPVLPKLL  
SLLPLSCQKRLCWSKSHSQNAPMVPKLCPEKMRNGVLQDSRDKERMAEDGLAHQPCSPTYVVQETSL\*

(SEQ ID NO. 29) >PANK1\_CHO\_PROT

MQIPVRSEVIQLPLGAQGSAGSGCYTGTGSHGIRSAGFWLSRAYLTQYPLGSLCHTKHDPPISSQTLRT  
SFCTLKLVGSGGGQDWACSVAGTGLGEEAAFEPELEAPGAEGVGPRWFLASPIRLTAVAAAPSVTVEKR  
RTLCRLLL VAGSMHPTDLGSGTRHKADCHSPGSLSPNTSFGVCISGYQGCPNRRVTAILMKQTTDEE  
SYQEAVRVCLGTAMADRSLQCVALSCQPAAGLCSQRCKKQLAFPWFGMDIGGTLVKLVYFEPKDITA  
EEEQEEVENLKSIRKYLTSNTAYGKTGIRDVHLELKNLTMCGRKGNLHFIRFPTCAMHMFQMGSEKNFS  
SLHTTLCATGGGAFKFEEDFRMIADLQLHKLDELDCLIQGLLYVDSVGFNGKPECYFENPTNPELQKK  
PYCLDNYPMLLVNMGSGVSILAVYSKDNYKRVTGTSLGGGTFLGLCCLLTGCETFEAELEMAAKGDST  
NVDKLVKDIYGGDYERFGLQGSAVASSFGNMMSKEKREASKEDLARATLVTITNIGSIARMCALLENID  
RVVFGNFLRINMVMKLLAYAMDFWSKGQLKALFLEHEGYFGAVGALLELFKMTDAQ\*

(SEQ ID NO. 30) >PANK2\_CHO\_PROT

MSSGFFKASPSLRSHVQLGQHCIQVTGGVVGYSVFPWFGLDIGGTLVKLVYFEPKDITAEKEEVESELK  
SIRKYLTSNVAYGSTGIRDVHLELKDLTLCGRKGNLHFIRFPTHDMPAFIQMGKDNFSSLHTVFCATGGG  
SYKFEQDFLTIGDLQLHKLDELDCIKGILYIDSVGFNGRSQCYYFENPADSEKQKLPFDLKNPYPLLLVN  
IGSGVSILAVYSKDNYKRVTGTSLGGGTFFGLCCLLTGCSTFEAELEMASRGDSTKVDKLVLDIYGGDYE  
RFGLPGWAVASSFGNMMSKEKREASKEDLARATLITITNIGSIARMCALNENINQVVFVGNFLRVNTIA  
MRLLAYALDYWSKGQLKALFSEHEYQEIPFGAGFYFTLPLCDSCELNALGLADRL\*

(SEQ ID NO. 31) >SLC19A2\_CHO\_PROT

MHGLCSHAAQARKLVRLWDDYAFCLNADGHVGGYGTPEMTTQNMPPQALDQVLKMFDMSTLFRSLL  
AHLAAFVFNIEIYPVWTYSYLVLLFPVFLATDYLRYPVILLQGLSLIVTFMMLLYAQGLLAIQFLEFFYGIAT  
ATEIAYYSIYVVDLGMVQKVTSYCRSATLVGFTVGSVLGQILVSAHWPLFSLNVLSTCVSVAFAVAW  
FLPMPQKSLFFHHIPASCHGVNGIKVQNGGIVTENPASNHLPGWEDIESKIPLNLDPEPVEEPEPKPDLR  
VLKVLWDFLICYSSRPLLCSVWWWALSTCGYFQVVNYTQGLWEKVMPSQSAVIYNGGVEAVSTLLGA  
SAVFAVGYIKISWSTWGEMTLFLCSLLIAAAVYTMDTVNNIWWCYTSYVVFRIIYMLITIAFQIAANLSME  
RYALVFGVNTFIALALQTLTLIVVDNKGLGLEITTQFLIYASYFAVISVWFLANGAFSVLKKCRKQEDPSSSP  
QATTP\*

## FIG. 16(cont.)

(SEQ ID NO. 32) >SLC19A3\_CHO\_PROT

METIMKIQGKSAKTSFTLMETENAFVHSRSLGKRQELWSREETECaweITNCHLEDVPGSLWEPQGR  
GDSRRGAGDTIAGCICQTLHCCDKISDPKNITDFQTQYQTAGLTNKPVLAAPAQRPAVILAAALLLAAALL  
TTALPTATSTATATGATAAGAAGGEGGGRRPPPPQPPQPPQPPQPPQPPQPPQPPQPPQPPQPPQPPQ  
PPQ  
ANLELLGSCDLPTQGDCVAEANLELLGSCDLPTQPPQPPQPPQPPQPPQPPQPPQPPQPPQPPQPPQ  
VKRTRVKTLCsIAVGRAVAVAVAVGRAVASRSVAASRSVAARSAAARMAVVSASKLSTAWSLAGCIWDR  
HDLKLNNIWSIGQPHTATNASKVVMsAILAQEPEVTCFSLRAILEDGSGWETAEECALGMHHASEQSSW  
LPRLGPSVICCVPCLEPTQVGLARIPVPPSARVKAIQLGPIHTFLRCANASSNRCGWGVGMKLYQRVWI  
NPNSKTVFSLPSCLELPQSLYLAVLSGHPIYISTPQMTNEVLPVWVTSYLAMLPPVFVLT DYLRYPVIL  
HIMAFIVCYLILFFGGVMLMQVAEFFFGVVSATEIGYYSIYISMVSPHYQKVSSYCRSVTLVAYTVGSVL  
AQLLVSLAALPYSFLFYTTLACVSVAFFFSFLPMPKKSMMFFHTMYDREAHQKPLGQDTVLEEAQKNNKT  
AHPPELPGTSGTPGNIKPRGPEPENVALRVFVHWFQDLKECYSSKHLLYWSLWWAFATSGYNQVLNYYVQ  
VLWEHKAPSDSSINGAVEAAATFGGALAAFsvGYVKVNWDLGELGLAIFSAVIAGALFLMNYTLSIWW  
CYAGYLLVKSSYMFITIAVFQIAVNLSVERYALVFgidTfIALVIQAIMTVIVADQRGLHLPVTTQFLVYGSY  
FAVIAVFLMRSTYIIYSAKQKQEVESLAVCESPNEHPQPPQPRDVSTKF\*

(SEQ ID NO. 33) >TPK1\_CHO\_PROT

MEHAFTPLEPLPTGNLKYCLMVLNQPLDTRFRHLWKKALFRACADGGANCLYDLTEGERERFLPEFISG  
DFDSIRPEVREYYTEKGCDLISTPDQDHTDFTKCLKVLQRKIEEKELQVDVIVTLGGLGGRFDQIMASVNT  
LFQAPHITPVPIIIIGESLIYLLQPGKHRLHVDVTGMEGSWCGLIPVGQRCSQVTTTGLKWNLTNDVLAFTG  
LVSTSNYDGGSGVTVETDHPLLWTVMAVKS\*

(SEQ ID NO. 34) >SLC25A19\_CHO\_PROT

MVGYDAKADIRSNKLEVAVAGSVSGFVTRALISPLDVIKIRFQLQIERLCPSDPKAKYHGILQAIKQILQEE  
GPAAFWKGHVPAQILSVGYGAVQFLTFEELTELLHRINLYETRQFSAHFVCGGLSAGAATLAVHPVDVLR  
TRLAAQGEPKIYSNLRDAVSTMYRTEGPLVFYKGLTPTVIAIFPYAGLQFSCYRSLKQVYDWWVIPPDKQT  
GNLKNLLCGCGSGVSKTLTYPLDLFKKRLQVGGFERARSFAFGEVRSYRGLLDLTKQVLQDEGTQGLFK  
GLSPSLLKAALSTGFMFFWYELFCNLFHCIrSEDR\*

(SEQ ID NO. 37) >PANK3- isoforma X1\_CHO\_PROT

MPKKPSFPWFGMDIGGTLVKLSYFEPIDITAEQEEVESLKSIRKYLTSNVAYGSTGIRDVHLELKDITLFGRRGNLHFI  
RFTQDLPTFIQMGRDKNFSTLQTVLSATGGGAYKFEKDFRTIGNLHLHLKDELDCLVKGLLYIDSVSfNGQAECYFANA  
SEPERCQKMPFNLDPPYLLVNIgSGVSiLAVHskDnykrvtGtSLGGGTFLDLCSLLTGCEsfEEALEMASKGDSTQA  
DRLVRDIYGGDYERFGLPGWAVASSFGNMIYKEKRETVSKEDLARATLVITNIGSVARMCAVNEKINRVVfVGNFLR  
VNTLSMKLLAYALDYWSKGQLKALFLEHEGYFGAVGALLGLPNFS

(SEQ ID NO. 38) >PANK3- isoforma X2\_CHO\_PROT

MKIKDAKKPSFPWFGMDIGGTLVKLSYFEPIDITAEQEEVESLKSIRKYLTSNVAYGSTGIRDVHLELKDITLFGRRGNL  
HFIRFPTQDLPTFIQMGRDKNFSTLQTVLSATGGGAYKFEKDFRTIGNLHLHLKDELDCLVKGLLYIDSVSfNGQAECYF  
ANASEPERCQKMPFNLDPPYLLVNIgSGVSiLAVHskDnykrvtGtSLGGGTFGLCSLLTGCEsfEEALEMASKGDS

## FIG. 16(cont.)

TQADRLVRDIYGGDYERFGLPGWAVASSFGNMIYKEKRETVSKEDLARATLVTITNNIGSVARMCAVNEKINRVFVG  
NFLRVNTLSMKLLAYALDYWSKGQLKALFLEHEGYFGAVGALLGLPNFS

FIG. 17

# 5a6 Longitud: 636  
 # 5a6 Número de TMH predichos: 13  
 # 5a6 Número EXP de AA en TMH: 288,7242  
 # 5a6 Número EXP, primeros 60 AA: 23,19072  
 # 5a6 Prob. total de N-in: 0,01766  
 # 5a6 Secuencia de señal N-term POSIBLE

5a6	TMHMM2.0	afuera	1	19
5a6	TMHMM2.0	héliceTM	20	42
5a6	TMHMM2.0	adentro	43	66
5a6	TMHMM2.0	héliceTM	67	89
5a6	TMHMM2.0	afuera	90	98
5a6	TMHMM2.0	héliceTM	99	121
5a6	TMHMM2.0	adentro	122	140
5a6	TMHMM2.0	héliceTM	141	163
5a6	TMHMM2.0	afuera	164	177
5a6	TMHMM2.0	héliceTM	178	200
5a6	TMHMM2.0	adentro	201	208
5a6	TMHMM2.0	héliceTM	209	231
5a6	TMHMM2.0	afuera	232	250
5a6	TMHMM2.0	héliceTM	251	273
5a6	TMHMM2.0	adentro	274	293
5a6	TMHMM2.0	héliceTM	294	316
5a6	TMHMM2.0	afuera	317	352
5a6	TMHMM2.0	héliceTM	353	375
5a6	TMHMM2.0	adentro	376	395
5a6	TMHMM2.0	héliceTM	396	416
5a6	TMHMM2.0	afuera	417	425
5a6	TMHMM2.0	héliceTM	426	448
5a6	TMHMM2.0	adentro	449	454
5a6	TMHMM2.0	héliceTM	455	477
5a6	TMHMM2.0	afuera	478	525
5a6	TMHMM2.0	héliceTM	526	548
5a6	TMHMM2.0	adentro	549	636

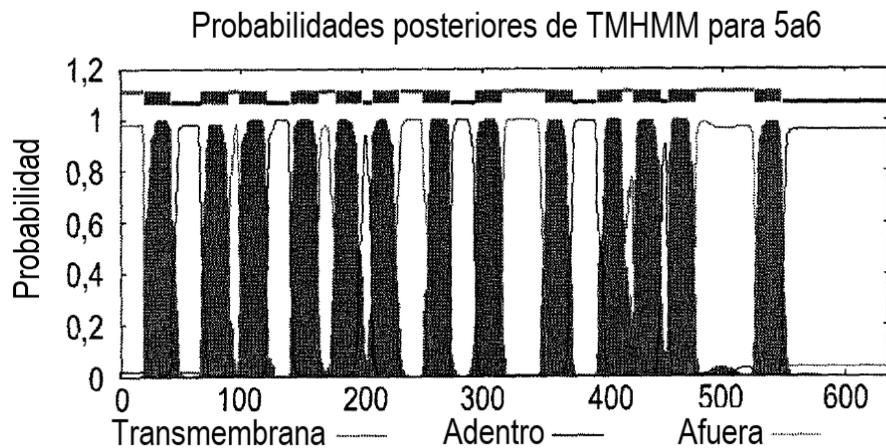


FIG. 18

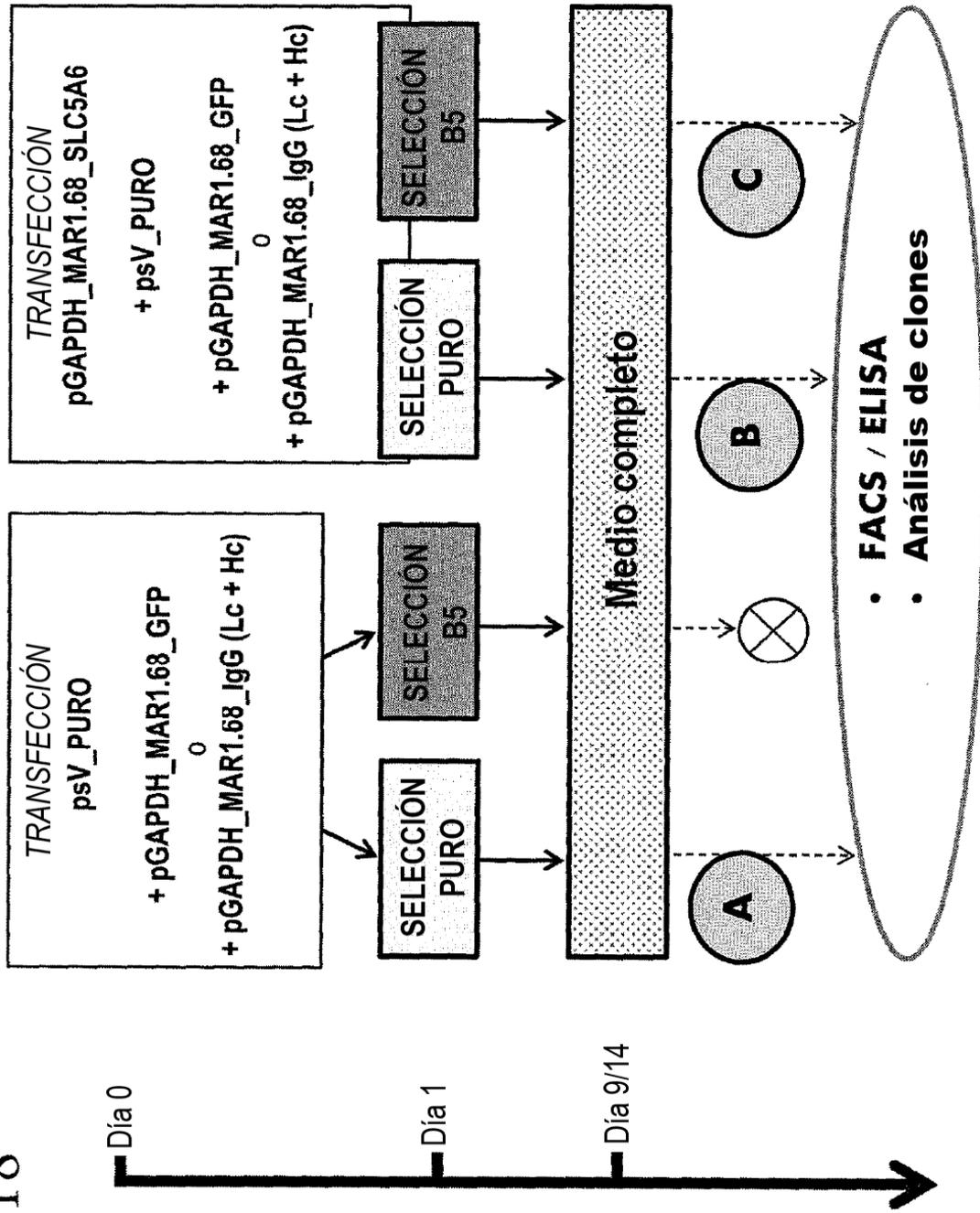


FIG. 19A

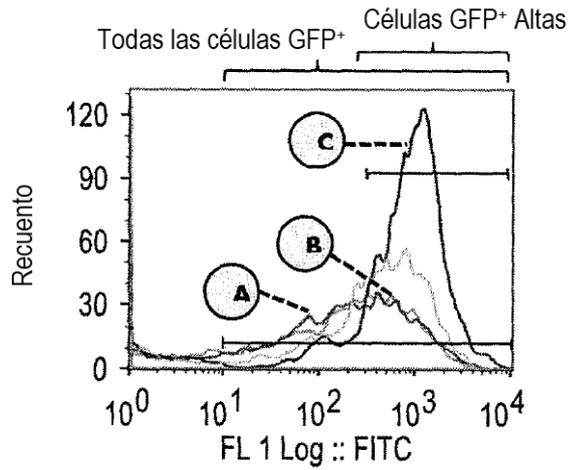


FIG. 19B

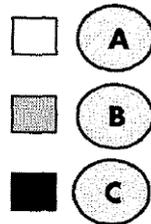
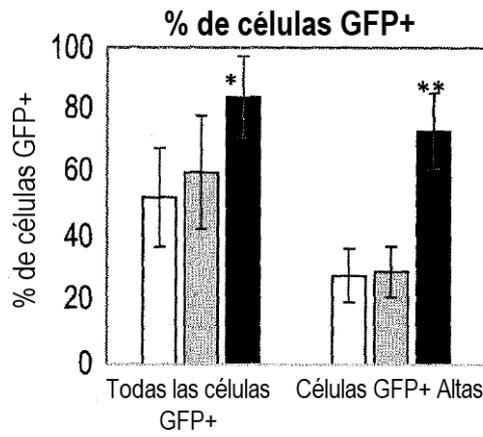


FIG. 19C

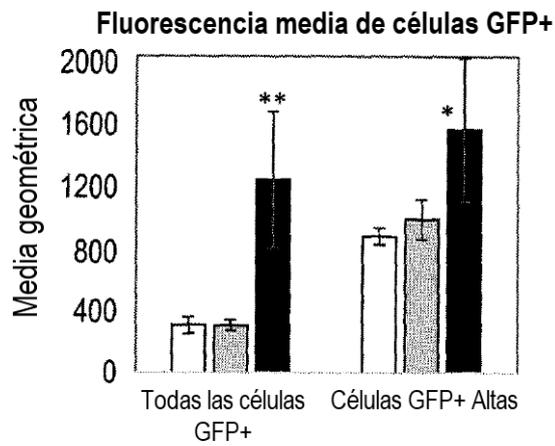


FIG. 20A

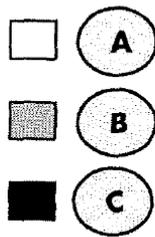
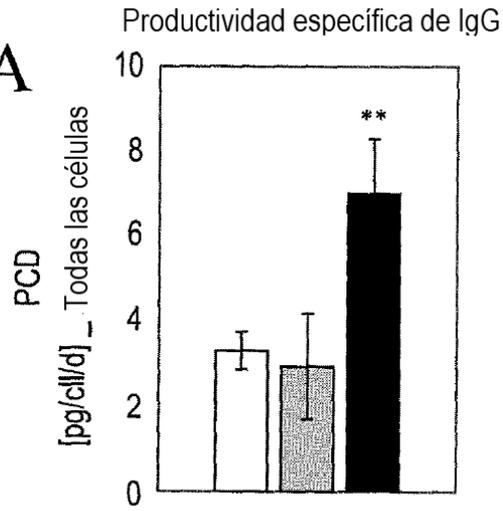
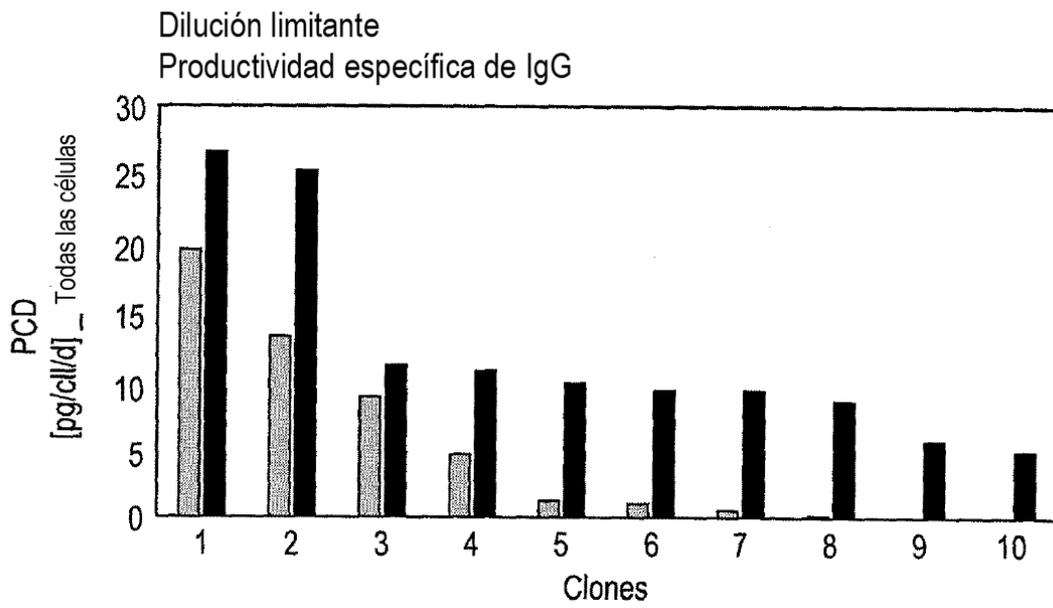


FIG. 20B



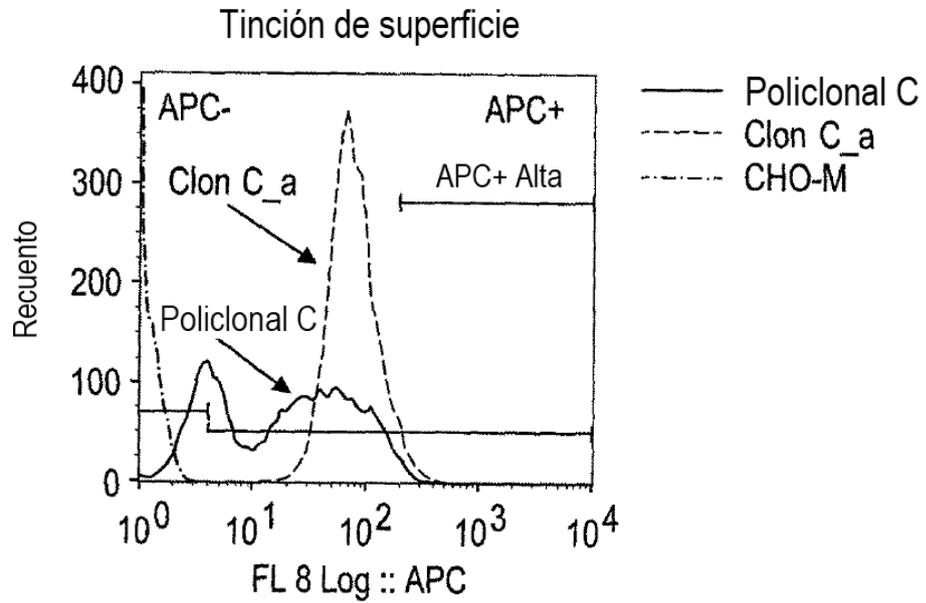


FIG. 21A

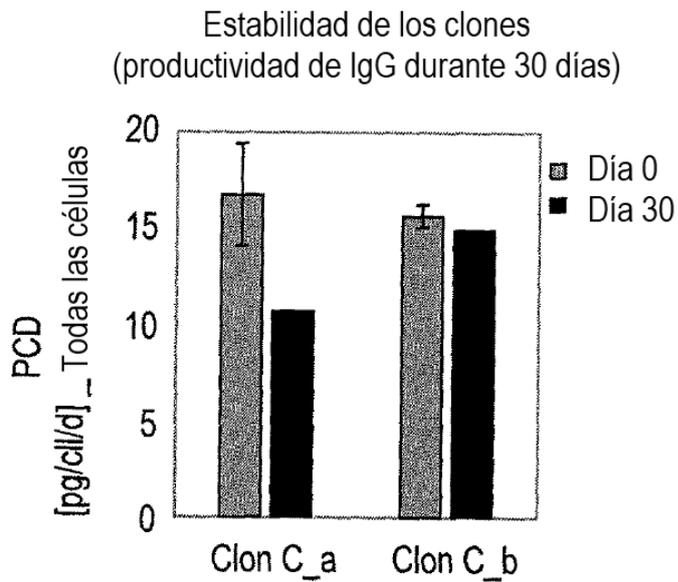


FIG. 21B

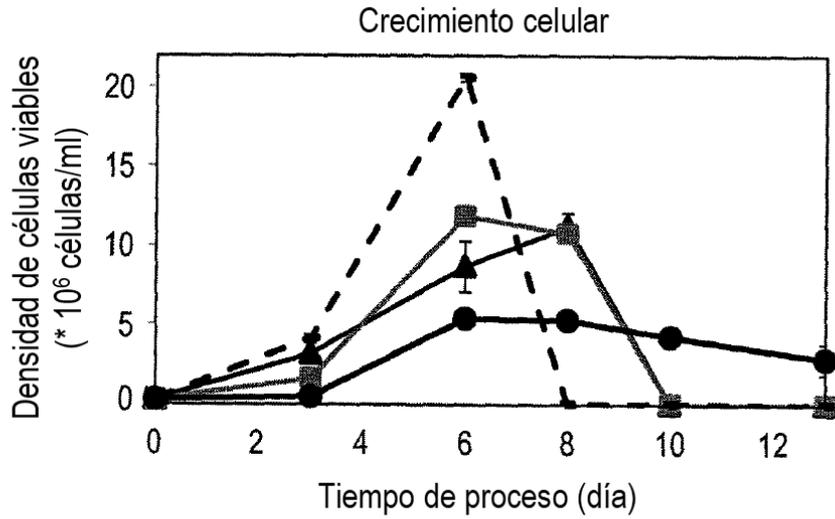


FIG. 21C

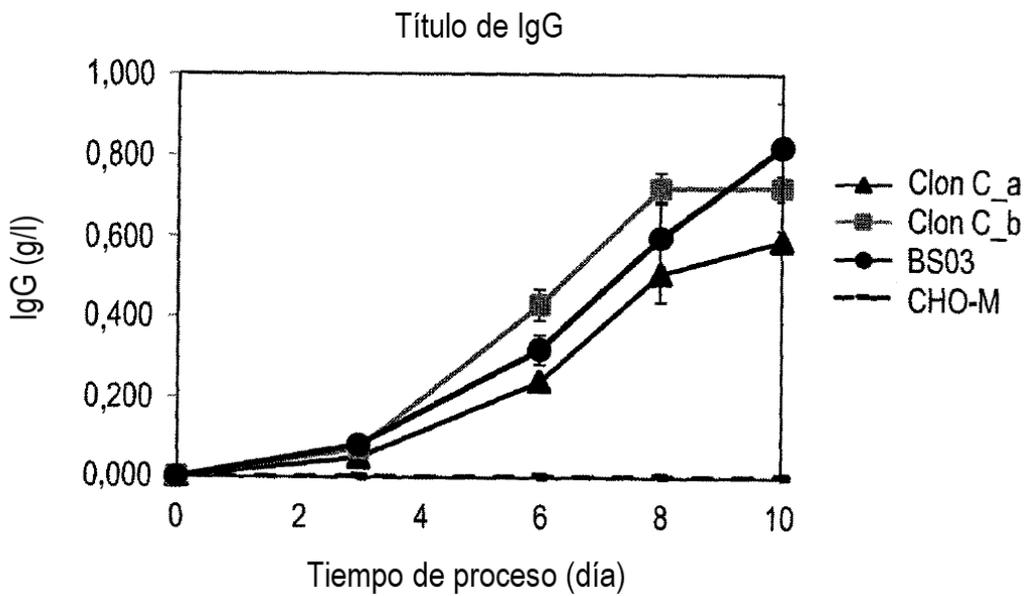


FIG. 21D

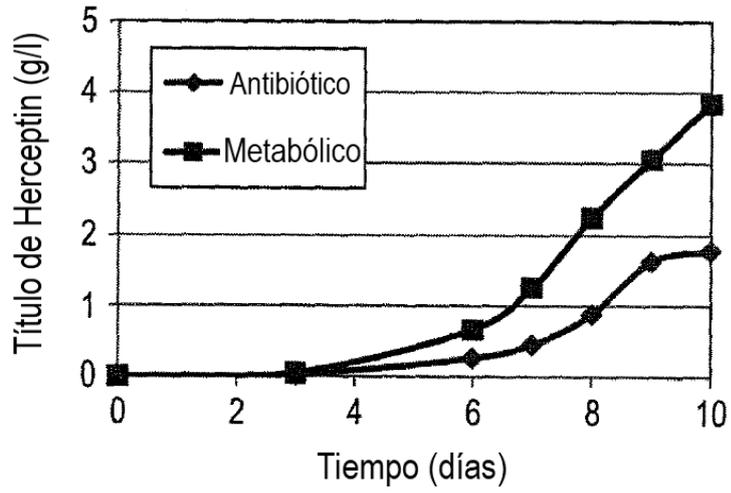


FIG. 22A

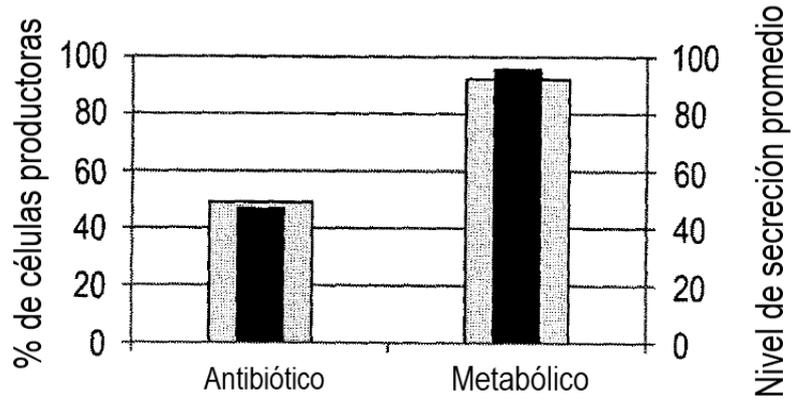


FIG. 22B

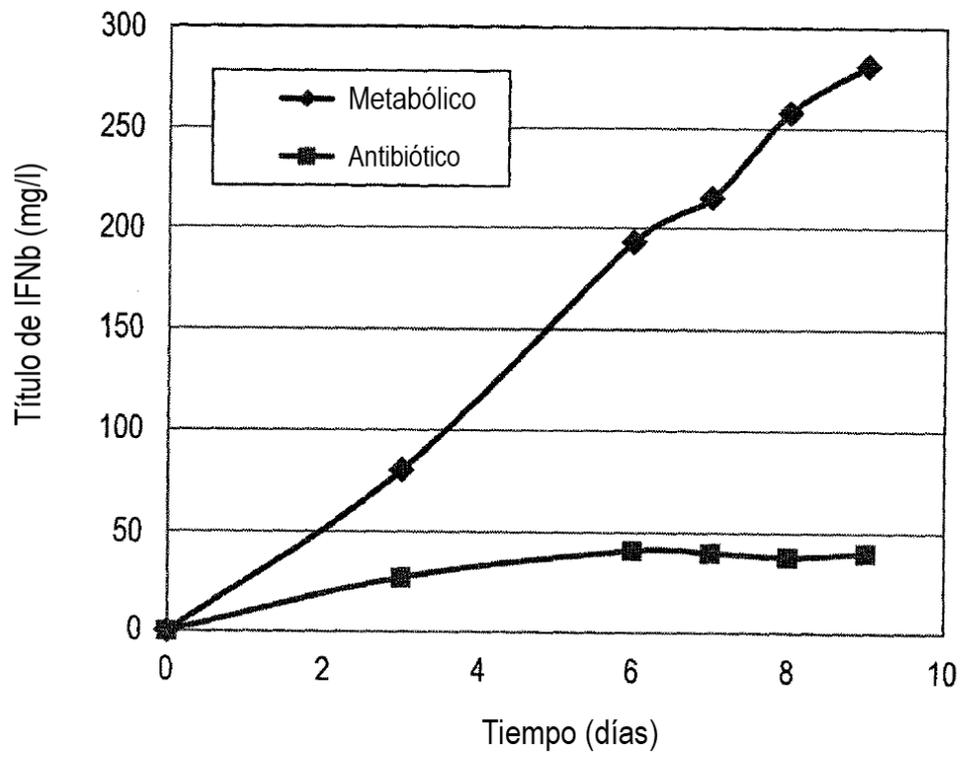


FIG. 22C