(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 776 980**

(51) Int. CI.:

C12N 5/071 (2010.01)
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2010 PCT/US2010/060653**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2011 WO11079004**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2010 E 10839999 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.02.2020 EP 2516624**

(54) Título: **Línea celular 3M**

(30) Prioridad:

23.12.2009 US 289703 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.08.2020

(73) Titular/es:

MERCK SHARP & DOHME CORP. (100.0%)
126 East Lincoln Avenue
Rahway, NJ 07065-0907 , US

(72) Inventor/es:

MERCHANT, ANKIT, A. y
TSAO, YUNG-SHYENG

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

Línea celular 3M

Campo de la invención

El campo de la invención se refiere a células aisladas que son útiles, por ejemplo, para la expresión de proteínas terapéuticas, tales como anticuerpos, así como a los métodos de uso de las células, por ejemplo, para expresar tales proteínas.

Antecedentes de la invención

La producción de proteínas recombinantes adecuadas para su uso como terapéutica es normalmente un proceso arduo y costoso. El sistema de expresión que se utilizará para expresar una proteína dada depende parcialmente del rendimiento de proteína derivado de cada sistema. Al considerar un método adecuado para la fabricación de anticuerpos, por ejemplo, se deben evaluar diversos factores. Estos incluyen la estructura de anticuerpos, la importancia de los carbohidratos y la expresión, que incluye rendimiento y productividad, facilidad de purificación y coste de los productos. El rendimiento afecta en gran medida el coste de los productos asociados con dicho proceso.

En general, la tecnología de expresión recombinante en el cultivo de células de mamífero ha sido el medio principal para la producción comercial de anticuerpos terapéuticos. Los sistemas de mamíferos son beneficiosos para la producción de anticuerpos por varias razones, incluido el patrón de glicosilación en el producto expresado. A menudo, las proteínas recombinantes se producen en cultivos de células de mamíferos utilizando líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO) o mieloma de ratón (NS0).

La generación de líneas celulares superiores, para expresión recombinante, que alcanzan altas densidades celulares y tienen una gran longevidad en el cultivo producen mayores cantidades de proteína terapéutica por litro de cultivo celular cultivado. Esto conduce a una mayor eficiencia y a un menor coste de los productos.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una célula aislada de ovario de hámster chino (CHO) depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo con el número de depósito PTA-10481. En una realización de la divulgación, la célula se produce mediante un método que comprende: adaptar las células CHO-DXB11 en medio libre de componentes animales en suspensión, por ejemplo, durante aproximadamente 83 días; a continuación, subclonar las células en dicho medio, por ejemplo, dos veces. En una realización de la invención, las etapas de subclonación comprenden (a) diluir en serie las células adaptadas (por ejemplo, 1/2 por cada dilución) en medio de crecimiento, por ejemplo, en aproximadamente 100 microlitros, por ejemplo, en una placa de microtitulación que comprende, por ejemplo, 96 pocillos; (b) permitir que crezcan las células de cada dilución; (c) seleccionar las células en la dilución más alta que contiene células viables (por ejemplo, según lo juzgado visualmente, por ejemplo, usando un microscopio, por ejemplo, para identificar la presencia de colonias celulares); y (d) repetir las etapas (a), (b) y (c) una vez más. En una realización de la divulgación, la dilución seleccionada es aproximadamente 1/64. En una realización de la divulgación, la célula está en un medio de cultivo celular líquido acuoso; y/o un recipiente, tal como un vial y/o un medio de congelación que contiene, por ejemplo, DMSO, por ejemplo, en el que el medio de congelación es aproximadamente 80 % de medio libre de suero, aproximadamente 10 % de suero bovino fetal dializado y aproximadamente 10 % de DMSO. Las realizaciones de la invención incluyen un banco de células o un banco de células de trabajo que comprende la célula. En una realización de la invención, la célula comprende un vector que, por ejemplo, comprende un polinucleótido que codifica una o más proteínas, tales como una inmunoglobulina de cadena ligera y/o pesada o una proteína de fusión que comprende un polipéptido (por ejemplo, una citocina o quimiocinas, por ejemplo, MCP-1) fusionado a una inmunoglobulina (por ejemplo, un Fc) o a seroalbúmina humana. En una realización de la invención, la proteína codificada por un polinucleótido en la célula es una inmunoglobulina que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-8, 21,22, 42, 43, 58-69, 79, 80, 81,85, 89, 93 y 101 o un fragmento maduro de la misma o una inmunoglobulina que comprende una o más CDR de dicha inmunoglobulina; opcionalmente unido a una cadena constante de inmunoglobulina; o en la que la proteína es una cadena de inmunoglobulina que comprende:

(1)

CDR-L1: KASKKVTIFGSISALH (SEQ ID NO: 9),
CDR-L2: NGAKLES (20) y
CDR-L3: LQNKEVPYT (SEQ ID NO: 11);

(2)

CDR-H1: SYGIT (SEQ ID NO: 12),
CDR-H2: ENYPRSGNTYYNEKFKG (SEQ ID NO: 13) y

CDR-H3: CEFISTVVAPYYYALDY (SEQ ID NO: 14) o SEFISTVVAPYYYALDY (SEQ ID NO: 15) o AEFISTVVAPYYYALDY (SEQ ID NO: 16) o VEFISTVVAPYYYALDY (SEQ ID NO: 17) o SEFISTVMAPYYYALDY (SEQ ID NO: 18) o SEFTSTVVAPYYYALDY (SEQ ID NO: 19);

(3)

CDRH1: Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser (SEQ ID NO: 23),
CDRH2: Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly
(SEQ ID NO: 24) y CDRH3: Asp Asn His Ala Tyr Asp Arg Gly Pro Phe Phe Asp Tyr (SEQ ID NO: 25);

(4)

CDRL1: Lys Ser Ser Gln Asn Leu Phe Tyr Arg Ser Asn Gln Lys Asn His Leu Ala (SEQ ID NO: 26),
CDRL2: Trp Thr Ser Thr Arg Glu Ser (SEQ ID NO: 27) y
CDRL3: Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Pro Thr (SEQ ID NO: 28);

(5)

CDRH1: Ala Tyr Gly Met Asp (SEQ ID NO: 29),
CDRH2: Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Arg Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly (SEQ ID NO: 30) y
CDRH3: Asp Leu Gly Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val (SEQ ID NO: 31);

(6)

CDRL1: Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser (SEQ ID NO: 32),
CDRL2: Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser (SEQ ID NO: 33) y
CDRL3: Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Leu Phe Tyr Val (SEQ ID NO: 34);

(7)

CDRH1: GKTFWSWGIN (SEQ ID NO: 35),
CDRH2: YIYIGTGYTEPNPKYKG (SEQ ID NO: 36) y
CDRH3: IGGYYGNFAD (SEQ ID NO: 37) o IGGYYGNFDQ (SEQ ID NO: 38);

(8)

CDRL1: RSSQSLLISGGNTYLN (SEQ ID NO: 39),
CDRL2: LVSKLDQ (SEQ ID NO: 40) y
CDRL3: WQGTYFPLT (SEQ ID NO: 41);

(9)

CDRH1: TYWMH (SEQ ID NO: 44) o TYWMH (SEQ ID NO: 45),
CDRH2: EINPTNGHTNYNEKFKS (SEQ ID NO: 46), EINPTNGHTNYNPSFQG (SEQ ID NO: 47) o EINPTNGHTNYNQKFQG (SEQ ID NO: 48) y
CDRH3: NYVGSIFDY (SEQ ID NO: 49) o NYVGSIFDY (SEQ ID NO: 50);

o

(10)

CDRL1: KASENVVSYVS (SEQ ID NO: 51) o KASENVVSYVS (SEQ ID NO: 52),
CDRL2: GASNRNT (SEQ ID NO: 53), GASNRNT (SEQ ID NO: 54) o GASNRES (SEQ ID NO: 55) y
CDRL3: GQSYNYPYT (SEQ ID NO: 56) o GQSYNYPYT (SEQ ID NO: 57); opcionalmente unido a una cadena constante de inmunoglobulina.

La presente divulgación proporciona un método para preparar dicha célula, que comprende adaptar células CHO-DXB11 en medio libre de componentes animales en suspensión durante 83 días; a continuación, subclonar las células en dicho medio do veces.

La presente invención también proporciona un método para fabricar uno o más polipéptidos (por ejemplo, una inmunoglobulina) que comprende introducir uno o más polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos en la célula y cultivar la línea celular en condiciones en las que se producen los polipéptidos; y, opcionalmente, aislar el polipéptido. En una realización de la invención, la inmunoglobulina una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-8, 21, 22, 42, 43, 58-69, 79, 80, 81, 85, 89, 93 y 101 o un fragmento maduro del mismo o una inmunoglobulina que comprende

una o más CDR de dicha inmunoglobulina; opcionalmente unido a una cadena constante de inmunoglobulina. En una realización de la invención, la inmunoglobulina comprende:

(1)

CDR-L1: KASKKVTIFGSISALH (SEQ ID NO: 9),
CDR-L2: NGAKLES (SEQ ID NO: 10) y
CDR-L3: LQNKEVPYT (SEQ ID NO: 11);

(2)

CDR-H1: SYGIT (SEQ ID NO: 12),
CDR-H2: ENYPRSGNTYYNEKFKG (SEQ ID NO: 13) y
CDR-H3: CEFISTVVAPYYYALDY (SEQ ID NO: 14) o SEFISTVVAPYYYALDY (SEQ ID NO: 15) o AEFISTVVAPYYYALDY (SEQ ID NO: 16) o VEFISTVVAPYYYALDY (SEQ ID NO: 17) o SEFISTVMAPYYYALDY (SEQ ID NO: 18) o SEFTSTVVAPYYYALDY (SEQ ID NO: 19);

(3)

CDRH1: Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser (SEQ ID NO: 23),
CDRH2: Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly (SEQ ID NO: 24) y
CDRH3: Asp Asn His Ala Tyr Asp Arg Gly Pro Phe Phe Asp Tyr (SEQ ID NO: 25);

(4)

CDRL1: Lys Ser Ser Gln Asn Leu Phe Tyr Arg Ser Asn Gln Lys Asn His Leu Ala (SEQ ID NO: 26),
CDRL2: Trp Thr Ser Thr Arg Glu Ser (SEQ ID NO: 27) y
CDRL3: Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Pro Thr (SEQ ID NO: 28);

(5)

CDRH1: Ala Tyr Gly Met Asp (SEQ ID NO: 29),
CDRH2: Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Arg Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly (SEQ ID NO: 30) y
CDRH3: Asp Leu Gly Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val (SEQ ID NO: 31);

(6)

CDRL1: Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser (SEQ ID NO: 32),
CDRL2: Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser (SEQ ID NO: 33) y
CDRL3: Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Leu Phe Tyr Val (SEQ ID NO: 34);

(7)

CDRH1: GKTFWSWGIN (SEQ ID NO: 35),
CDRH2: YIYIGTGYTEPNPKYKG (SEQ ID NO: 36) y
CDRH3: IGGYYGNFAD (SEQ ID NO: 37) o IGGYYGNFDQ (SEQ ID NO: 38);

(8)

CDRL1: RSSQSLLISGGNTYLN (SEQ ID NO: 39),
CDRL2: LVSKLDQ (SEQ ID NO: 40) y
CDRL3: WQGTYFPLT (SEQ ID NO: 41);

(9)

CDRH1: TYWMH (SEQ ID NO: 44) o TYWMH (SEQ ID NO: 45),
CDRH2: EINPTNGHTNYNEKFKS (SEQ ID NO: 46), EINPTNGHTNYNPSFQG (SEQ ID NO: 47) o EINPTNGHTNYNQKFQG (SEQ ID NO: 48) y
CDRH3: NYVGSIFDY (SEQ ID NO: 49) o NYVGSIFDY (SEQ ID NO: 50);

o

(10)

CDRL1: KASENVVSYVS (SEQ ID NO: 51) o KASENVVSYVS (SEQ ID NO: 52),
CDRL2: GASNRNT (SEQ ID NO: 53), GASNRNT (SEQ ID NO: 54) o GASNRES (SEQ ID NO: 55) y
CDRL3: GQSYNYPYT (SEQ ID NO: 56) o GQSYNYPYT (SEQ ID NO: 57); opcionalmente unido a una cadena

constante de inmunoglobulina. En una realización de la invención, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de cadena ligera unida a una cadena de inmunoglobulina constante kappa o lambda y/o en la que la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de cadena pesada unida a una cadena constante gamma-1, gamma-2, gamma-3 o gamma-4 de inmunoglobulina.

La presente invención también proporciona un método para producir un anticuerpo que comprende inocular un medio de crecimiento inicial de células de mamífero, precalentado a aproximadamente 37 °C; cuyo medio inicial comprende HEPES, tampones de bicarbonato de sodio, sales inorgánicas, aminoácidos no esenciales, insulina humana recombinante, oligoelementos y tensioactivos; y que no comprende L-glutamina, antibióticos, antimicóticos o componentes derivados de animales; con una o más de dichas células que expresan la inmunoglobulina de cadena ligera y la inmunoglobulina de cadena pesada del anticuerpo, a una densidad celular de aproximadamente 2,5-5 X 10^5 células/ml; y, añadir los siguientes suplementos al medio antes, simultáneamente o inmediatamente después de dicha inoculación:
hidrolizado de soja a una concentración final de aproximadamente 10 g/litro;
y, opcionalmente, una carga de aminoácidos en la que la concentración de los componentes añadidos por dicha carga de aminoácidos es aproximadamente la establecida a continuación:

L-arginina:	126,4 mg/litro
L-cistina:	34 mg/litro
L-histidina:	42 mg/litro
L-isoleucina:	52 mg/litro
L-leucina:	52 mg/litro
L-lisina:	72 mg/litro
L-metionina:	15,2 mg/litro
L-fenilalanina:	33 mg/litro
L-treonina:	47,6 mg/litro
L-triptófano:	10,2 mg/litro
L-tirosina:	36 mg/litro
L-valina:	46,8 mg/litro
L-alanina:	8,9 mg/litro
L-asparagina:	30 mg/litro
L-ácido aspártico:	26,6 mg/litro
L-ácido glutámico:	29,4 mg/litro
glicina:	15 mg/litro
L-prolina:	23 mg/litro
L-serina:	21 mg/litro

; y, cuando la densidad celular viable alcanza más de aproximadamente 1,2 X 10^6 células/ml, añadir cargas de suplementos en las que la concentración de los componentes añadidos por dichas cargas de suplementos son aproximadamente las establecidas a continuación:

selenito de sodio:	0,01426 mg/litro
Sulfato de adenina:	1,632 mg/litro
Adenosina:	17,6 mg/litro
Citidina:	17,6 mg/litro
Guanosina:	17,6 mg/litro
Uridina:	17,6 mg/litro
Hipoxantina:	11,8 mg/litro
L-citrulina:	12,6 mg/litro
L-ornitina-HCl:	25,6 mg/litro
Biotina:	0,28 mg/litro
Dinucleótido de flavina adenina:	0,05 mg/litro
Ácido fólico:	4,6 mg/litro
Ácido lipoico:	0,52 mg/litro
Niacina:	31,4 mg/litro
HCl de piridoxina:	3 mg/litro

(continuación)

Riboflavina:	1,86 mg/litro
HCl de tiamina:	16 mg/litro
Vitamina E:	0,376 mg/litro
Vitamina B12:	3,4 mg/litro
Cloruro de colina:	50,2 mg/litro
HCl de etanolamina:	4,4 mg/litro
i-inositol:	73,2 mg/litro
Timidina:	7,8 mg/litro
2HCl de putrescina:	0,4 mg/litro
Progesterona:	0,015 mg/litro
Pantotenato de D-calcio:	23,8 mg/litro
L-asparagina:	812 mg/litro
L-prolina	216 mg/litro
L-isoleucina	370 mg/litro
L-cisteína-HCl	224 mg/litro
L-leucina	332 mg/litro
L-treonina	164 mg/litro
L-tirosina	198 mg/litro
L-arginina	186 mg/litro
L-acido aspártico	71 mg/litro
L-acido glutámico	126 mg/litro
Glicina	57 mg/litro
L-histidina	125 mg/litro
L-metionina	132 mg/litro
L-triptófano	99 mg/litro
L-lisina	293 mg/litro
L-fenilalanina	174 mg/litro
L-valina	262 mg/litro
L-serina:	260 mg/litro
Fosfato de sodio monobásico:	288,2 mg/litro
Sulfato de cinc:	1,08 mg/litro
Sulfato cúprico:	0,0032 mg/litro
Vanadato de amonio:	0,00078 mg/litro
Cloruro de cobalto:	0,0025 mg/litro
Dicloruro de níquel hexahidrato:	0,0004 mg/litro
Molibdato de sodio deshidratado:	0,00016 mg/litro

; y, mantener la concentración de glucosa en el medio a aproximadamente 1,5 g/litro y mantener la concentración de L-glutamina en el medio a aproximadamente 150 mg/litro; y durante el crecimiento celular mantener la concentración de O_2 aproximadamente al 60 %; pH a aproximadamente 6,8 ± 0,02 y temperatura a aproximadamente 36,5 °C ± 0,5 °C;

y, opcionalmente, eliminar las células huésped del medio cuando la viabilidad celular es inferior a aproximadamente el 60 %; y, opcionalmente, recuperar el medio de cultivo de las células mediante centrifugación por apilamiento de discos del medio, filtrar en profundidad el medio y filtrar el medio a través de un filtro con un tamaño de poro de aproximadamente 0,2 micrómetros; y/o, opcionalmente, purificar las inmunoglobulinas del medio por fraccionamiento cromatográfico en columna.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Evaluación del potencial de crecimiento celular para células huésped 3M e ISA en modo discontinuo.

Figura 2. Eficiencia de recuperación celular después de la transfección para el proyecto murino anti-IL17.

Figura 3. Títulos de anticuerpos después de la clonación en placas de 96 pocillos durante 19 días después de la transfección para proyectos anti-IL23, cino-anti-TSLP y anti-HGF.

Figura 4. Productividad específica de clones exitosos para el proyecto anti-IL23, versión 2.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una célula aislada de ovario de hámster chino (CHO-DXB11) para la producción de anticuerpos terapéuticos, 3M. Se depositaron células 3M, conforme al Tratado de Budapest, el 17 de noviembre de 2009 con la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC); 10801 University Boulevard; Manassas, Virginia 20110-2209. Las células se depositaron en el ATCC con el número de depósito PTA-10481. Todas las restricciones de acceso a las células depositadas en la ATCC se eliminarán irrevocablemente al otorgarse una patente.

La presente divulgación incluye derivados de las líneas celulares de la presente divulgación. Los derivados incluyen mutantes que comprenden el fondo genético 3M para la presencia de una o más mutaciones genéticas adicionales, por ejemplo, en el que tales líneas celulares derivadas retienen las propiedades beneficiosas de la línea celular 3M parental (por ejemplo, producción de proteínas en cultivo en suspensión sin suero, crecimiento celular y/o tasa de recuperación de clones).

La línea celular 3M se originó a partir de la conocida línea celular de ovario de hámster chino, CHO-DXB11. Las células CHO-DXB11 están disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo, por ejemplo, con el n.º de depósito CRL-11397. En resumen, CHO-DXB11 era una suspensión adaptada durante tres meses, seguido de dos rondas de posterior clonación en un medio sin proteínas y sin suero. Con respecto a las líneas celulares conocidas y desarrolladas anteriormente, la línea celular 3M es robusta en cultivo celular, superior en la eficiencia de recuperación de clones y produce títulos de anticuerpos elevados en modo de suspensión en medio sin suero. 3M se ha utilizado para generar clones altamente productivos para la producción de varios anticuerpos.

La presente invención incluye no solo células 3M aisladas individuales sino también bancos de células maestras (MCB) y bancos de células de trabajo (WCB), por ejemplo, que comprende células 3M que comprenden uno o más genes que codifican proteínas terapéuticas para su expresión. Normalmente, cuando una línea celular se va a utilizar durante muchos ciclos de fabricación, se puede establecer un sistema de banco celular de dos niveles que consiste en un banco de células maestras o banco de semillas maestras y un banco de células de trabajo. Generalmente se establece una línea celular a partir de un solo clon de la célula huésped y esta línea celular se usa para formar el MCB. Generalmente, este MCB debe ser caracterizado y sometido a pruebas exhaustivas para detectar contaminantes, tales como bacterias, hongos, virus y micoplasma. Una muestra de células del MCB se puede expandir para formar el WCB, que se caracteriza por la viabilidad celular antes de su uso en un proceso de fabricación. Las células en un MCB o WCB se pueden almacenar en viales, por ejemplo, a baja temperatura (por ejemplo, 0 °C o menos, -20 °C u -80 °C, o en nitrógeno líquido, por ejemplo, a -110 °C a -180 °C). Normalmente, el banco de células de trabajo incluye células de un vial del banco maestro que se han cultivado durante varios pasos antes de almacenar. En general, cuando se necesitan células futuras, se toman del banco de células de trabajo; mientras que, el banco de células maestro se usa solo cuando es necesario, asegurando una reserva de células con un número de pase bajo para evitar la variación genética dentro del cultivo celular.

Subclonación se refiere a una dilución progresiva de células en serie, por ejemplo, en pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos, en proporciones predeterminadas para producir colonias individuales.

Biología molecular

De acuerdo con la presente invención, se puede emplear técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y de ADN recombinante dentro de las capacidades de la técnica. Tales técnicas se explican por completo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (en lo sucesivo en el presente documento "Sambrook, *et al.,* 1989"); DNA Cloning: A Practical Approach, Volúmenes I y II (D.N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames y S.J. Higgins eds. (1985)); Transcription And Translation (B.D. Hames y S.J. Higgins, eds. (1984)); Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. (1986)); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, (1986)); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); F. M. Ausubel, et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Un "polinucleótido", ADN y ARN de "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" (por ejemplo, ARNm), monocatenario o bicatenario.

Una "secuencia polinucleotídica", "secuencia de ácido nucleico "o" secuencia de nucleótidos "es una serie de bases nucleotídicas (también llamados" nucleótidos") en un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, y significa cualquier cadena de dos o más nucleótidos.

Una "secuencia de codificación" o una secuencia "que codifica" un producto de expresión, tal como un RNA, polipéptido, proteína o enzima, es una secuencia de nucleótidos que, cuando se expresa, da como resultado la producción del producto.

El término "gen" significa una secuencia de ADN que codifica o corresponde a una secuencia particular de ribonucleótidos o aminoácidos que comprenden la totalidad o parte de una o más moléculas de ARN, proteínas o enzimas, y pueden o no incluir secuencias reguladoras de ADN, tales como secuencias promotoras, que determinan, por ejemplo, las condiciones bajo las cuales se expresa el gen. Los genes pueden transcribirse a partir de ADN a ARN que puede o no traducirse en una secuencia de aminoácidos.

Una "secuencia de proteínas", "secuencia peptídica" o "secuencia polipeptídica" o "secuencia de aminoácidos" se refiere a una serie de dos o más aminoácidos en una proteína, péptido o polipéptido.

"Proteína", "péptido" o "polipéptido" incluye una cadena contigua de dos o más aminoácidos.

Los términos "polinucleótido aislado" o "polipéptido aislado" incluyen un polinucleótido (por ejemplo, molécula de ARN o ADN, o un polímero mixto) o un polipéptido, respectivamente, que están parcialmente (en cualquier grado) o completamente separados de otros componentes que normalmente se encuentran en las células o en los sistemas de expresión de ADN recombinante. Estos componentes incluyen, aunque sin limitación, membranas celulares, paredes celulares, ribosomas, polimerasas, componentes séricos y secuencias genómicas extrañas.

Un polinucleótido o polipéptido aislado será, en una realización de la invención, una composición esencialmente homogénea.

La "amplificación" de ADN como se usa en el presente documento incluye el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para aumentar la concentración de una secuencia de ADN particular dentro de una mezcla de secuencias de ADN. Para una descripción de PCR, véase Saiki, et al., Science (1988) 239:487.

La expresión "célula huésped" incluye cualquier célula de cualquier organismo (por ejemplo, una célula CHO, tal como 3M) que se selecciona, se modifica, se transfecta, se transforma, crece o se usa o manipula de cualquier manera, para la producción de una sustancia por la célula, por ejemplo, la expresión o replicación, por la célula, de un gen, una secuencia de ADN o ARN o una proteína. Las células huésped también incluyen células bacterianas (por ejemplo, *E. coli*), células J774 macrófagos murinos o cualquier otra línea celular de macrófagos y células Caco2 epiteliales intestinales humanas.

Los ácidos nucleicos en el presente documento pueden estar flanqueados por secuencias reguladoras naturales (control de la expresión) o pueden estar asociados con secuencias heterólogas, incluyendo promotores, sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) y otras secuencias del sitio de unión al ribosoma, potenciadores, elementos de respuesta, supresores, secuencias señal, secuencias de poliadenilación, intrones, regiones 5' y 3' no codificantes, y similares.

En general, un "promotor" o "secuencia promotora" es una región reguladora de ADN capaz de unirse a una ARN polimerasa en una célula (por ejemplo, directamente o a través de otras proteínas o sustancias unidas al promotor) e iniciar la transcripción de una secuencia codificante. Una secuencia promotora está, en general, unida en su extremo 3' por el sitio de inicio de la transcripción y se extiende aguas arriba (dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción en cualquier nivel. Dentro de la secuencia promotora se puede encontrar un sitio de inicio de la transcripción (convenientemente definido, por ejemplo, mediante mapeo con nucleasa S1), así como dominios de unión a proteínas (secuencias consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa. El promotor puede estar asociado operativamente con otras secuencias de control de la expresión, incluyendo secuencias potenciadoras y represoras, o con un ácido nucleico de la invención. Los promotores que pueden usarse para controlar la expresión génica incluyen, aunque sin limitación, el promotor de citomegalovirus (CMV) (patentes de Estados Unidos N.º 5,385,839 y 5,168,062), la región promotora temprana SV40 (Benoist, et al., (1981) Nature 290:304-310), el promotor contenido en la repetición terminal larga en 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto, et al., (1980) Cell 22: 787-797), el promotor de la timidina quinasa herpética (Wagner, et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1441-1445), las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneína (Brinster, et al., (1982) Nature 296:39-42); vectores de expresión procariotas, tal como el promotor de h-lactamasa (Villa-Komaroff, et al., (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3727-3731), o el promotor *tac* (DeBoer, et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25); véase también "Useful proteins from recombinant bacteria" in Scientific American (1980) 242:74-94; y elementos promotores de levadura u otros hongos, tal como el promotor *Gal 4*, el promotor *ADC* (alcohol deshidrogenasa), el promotor *PGK* (fosfoglicerol quinasa) o el promotor de fosfatasa alcalina.

Una secuencia de codificación está "bajo el control de", "funcionalmente asociada con" u "operablemente asociada con" secuencias de control de la transcripción y la traducción en una célula cuando las secuencias dirigen la transcripción mediada por ARN polimerasa de la secuencia codificante en ARN, preferentemente ARNm, que después puede ser ARN sometido a corte y empalme (si contiene intrones) y, opcionalmente, traducido en una proteína codificada por la secuencia de codificación.

Los términos "expresar" y "expresión" significan permitir o causar la información en un gen, una secuencia de ARN o ADN para manifestarse; por ejemplo, produciendo una proteína activando las funciones celulares implicadas en la transcripción y traducción de un gen correspondiente. Una secuencia de ADN se expresa en o por una célula para

formar un "producto de expresión" tal como un ARN (por ejemplo, ARNm) o una proteína. También se puede decir que el producto de expresión en sí mismo es "expresado" por la célula.

El término "transformación" significa la introducción de un ácido nucleico en una célula. El gen o secuencia introducida puede llamarse "clon". Una célula huésped que recibe el ADN o ARN introducido se ha "transformado" y es un "transformante" o un "clon". El ADN o ARN introducido en una célula huésped puede provenir de cualquier fuente, incluidas las células del mismo género o especie que la célula huésped, o de células de un género o especie diferente.

El término "vector" incluye un vehículo (por ejemplo, un plásmido) por el cual se puede introducir una secuencia de ADN o ARN en una célula huésped, para transformar el huésped y, opcionalmente, estimular la expresión y/o replicación de la secuencia introducida.

Los vectores que pueden usarse en la presente invención incluyen plásmidos, virus, bacteriófago, fragmentos de ADN integrables y otros vehículos que pueden facilitar la introducción de los ácidos nucleicos en el genoma del huésped. Los plásmidos son la forma de vector más utilizada, pero todas las demás formas de vectores que cumplen una función similar y que se conocen o se convierten en conocidos en la técnica son adecuados para su uso en el presente documento. Véase, por ejemplo, Pouwels, et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual. 1985 y suplementos, Elsevier, N.Y. y Rodríguez et al. (eds.), "Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses", 1988, Buttersworth, Boston, MA.

La expresión "sistema de expresión" significa una célula huésped (por ejemplo, una célula 3M) y un vector compatible que, en condiciones adecuadas, puede expresar una proteína o ácido nucleico que es transportado por el vector e introducido en la célula huésped.

Las células CHO mutantes que comprenden el fondo genético de la célula 3M también están dentro del alcance de la presente divulgación. Dichas células mutantes son idénticas a una célula 3M de la presente divulgación, pero por la presencia de una o más mutaciones genéticas adicionales. Las mutaciones genéticas pueden tomar la forma de desactivaciones genéticas, deleciones, mutaciones puntuales, etc. En consecuencia, la presente divulgación incluye métodos para generar un mutante de línea celular 3M que comprende adaptar células CHO-DXB11 en medio libre de componentes animales en suspensión durante 83 días; a continuación, subclonar las células en dicho medio dos veces, después introducir una o más mutaciones genéticas en tales células. Las células producidas mediante dicho método también están dentro del alcance de la presente divulgación. Los métodos para introducir mutaciones genéticas en las células CHO están dentro de la capacidad de cualquier profesional con experiencia ordinaria en la técnica. Por ejemplo, las mutaciones pueden introducirse mediante mutagénesis química o por radiación (por ejemplo, mediante tratamiento con metanosulfonato de etilo (EMS), tratamiento con N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (NG), tratamiento con luz ultravioleta (UV), irradiación gamma, irradiación de rayos X, irradiación rápida de neutrones) o métodos basados en recombinación homóloga para introducir mutaciones (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio, por ejemplo, la introducción basada en PCR de una mutación puntual específica o desactivación o activación recombinante de un gen o locus dado). Las localizaciones cromosómicas en las que se pueden introducir mutaciones pueden seleccionarse a partir de las que aparecen en las bases de datos de secuencias públicas.

Células 3M

La presente divulgación incluye una célula de ovario de hámster chino aislada, la célula "3M", que exhibe propiedades superiores que permiten la producción eficiente de varios polipéptidos. Las células 3M de la presente invención se depositaron, conforme al Tratado de Budapest, el 17 de noviembre de 2009 con la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC); 10801 University Boulevard; Manassas, Virginia 20110-2209. Las células se depositaron en el ATCC con el número de depósito PTA-10481. Todas las restricciones de acceso a las células depositadas en la ATCC se eliminarán irrevocablemente al otorgarse una patente. Las células 3M pueden producirse mediante un método que comprende adaptar las células CHO-DXB11 en medio libre de componentes animales en suspensión durante aproximadamente 3 meses (por ejemplo, aproximadamente 83 días o aproximadamente 80-90 días o aproximadamente 90 días); a continuación, subclonar las células en dicho medio do veces.

La subclonación puede realizarse mediante un método que comprende las etapas de

(a) diluir en serie las células adaptadas en medio de crecimiento sin suero (por ejemplo, cualquiera de las tratadas en el presente documento), por ejemplo, medio sin componentes animales;
por ejemplo, en el que las células se diluyen por la mitad cada vez.
por ejemplo, en el que las diluciones en serie se realizan en un volumen bajo de aproximadamente 100 microlitros, por ejemplo, en el que las diluciones en serie se realizan en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos.
(b) permitir que crezcan las células de cada dilución;
por ejemplo, en el que las células se dejan crecer durante aproximadamente 2 semanas
por ejemplo, en el que las células se dejan crecer en humedad alta y/o 7,5 % de CO_2.
por ejemplo, en el que las células se dejan crecer a 37 °C.
(c) seleccionar las células en la dilución más alta (es decir, la concentración más baja de células) que contiene

células viables;
por ejemplo, en el que se determina que las células en una dilución son viables tras una inspección visual, por ejemplo, usando un microscopio en el que se observan colonias celulares.
por ejemplo, en el que la dilución más alta es aproximadamente 1/64.
por ejemplo, en el que las células que se seleccionan, se transfieren a un volumen mayor (por ejemplo, aproximadamente 2 ml de medio, por ejemplo, en un matraz T-25) de medio de crecimiento sin suero y se dejaron crecer (por ejemplo, agitando a aproximadamente 70 rpm, por ejemplo, durante aproximadamente 1 semana, por ejemplo, a aproximadamente 37 °C, por ejemplo, a aproximadamente el 7,5 % de CO_2) antes de continuar a la etapa (d) y, después, diluir las células nuevamente en serie, y
(d) repetir las etapas (a), (b) y (c) una vez más.

Proteínas

La presente invención incluye realizaciones que comprenden métodos para producir proteínas de forma recombinante, tales como cadenas de inmunoglobulina o proteínas terapéuticas, en las células 3M. Dichas cadenas de inmunoglobulina incluyen las cadenas de inmunoglobulina ligera y/o pesada para los siguientes anticuerpos: anti-IL23 (por ejemplo, anti-p19), anti-PDl, anti-TSLP, anti-HGF, anti-IL17, receptor anti-IL23, anti-BTLA, cino-anti-TSLP (marcos de cinomolgo y dominio constante de Ig, específico para TSLP de mono cinomolgo) así como sB4-HSA (HAS es seroalbúmina humana), ratón Embrel (receptor soluble de TNF de ratón unido a una porción Fc de ratón de una IgG1) y cTLA4-IgG. Dichos métodos se tratan con detalle en el presente documento. En una realización de la invención, la inmunoglobulina forma parte de un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo humano, anticuerpo humanizado, anticuerpo quimérico) o fragmento de unión a antígeno del mismo, por ejemplo, incluyendo una región variable de cadena ligera y/o pesada de inmunoglobulina, unido opcionalmente a una región constante de inmunoglobulina.

Por ejemplo, la presente invención incluye métodos en los que una proteína que se va a expresar en una célula 3M (por ejemplo, una inmunoglobulina de cadena ligera y/o pesada) está codificada por un polinucleótido en un vector plasmídico, por ejemplo, en el que el polinucleótido está unido operativamente a un promotor, tal como un promotor de CMV. En una realización de la invención, las cadenas ligera y pesada se incluyen en un solo vector plasmídico o en dos vectores plasmídicos separados.

En una realización de la invención, la cadena de inmunoglobulina codifica cualquiera de las establecidas a continuación; por ejemplo, cualquiera de las siguientes cadenas ligera y/o pesada de inmunoglobulina y/o cualquiera de las CDR de las mismas (por ejemplo, las 3 de una sola cadena ligera o pesada). El tipo de puntos subrayado codifica el péptido señal. El tipo subrayado continuo codifica las CDR. El tipo simple codifica las regiones marco. En una realización de la invención, las cadenas se expresan con el péptido señal que se escinde tras la secreción de la célula huésped para generar un fragmento maduro de la cadena.

La presente invención también comprende composiciones que incluyen células 3M en presencia de cadenas de inmunoglobulina pesadas y/o ligeras y/o anticuerpos que comprenden la o las cadenas o fragmentos de unión a antígeno de las mismas, por ejemplo, que están en un medio de cultivo líquido de crecimiento celular, por ejemplo, en el que tales cadenas fueron secretadas de una célula huésped (por ejemplo, 3M).

Los procesos para producir cualquiera de las siguientes cadenas de polipéptidos de inmunoglobulina que comprenden cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos o fragmentos maduros de las mismas o anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden tales cadenas o fragmentos en células 3M forman parte de la presente divulgación junto con las células 3M mismas que comprenden los polipéptidos y/o polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos (por ejemplo, en un vector). En una realización de la invención, la proteína es una cadena variable de inmunoglobulina de cadena ligera o pesada (ya sea madura (sin señal de secreción) o sin procesar), unida opcionalmente a una inmunoglobulina de cadena constante pesada o ligera de inmunoglobulina, por ejemplo, en la que la región variable comprende una secuencia de aminoácidos expuesta a continuación, o un fragmento maduro de la misma o en la que la inmunoglobulina comprende una o más CDR (por ejemplo, 3 CDR de cadena ligera o 3 CDR de cadena pesada) de las expuestas en el presente documento:

Cadena ligera 19D12/15H12 (SEQ ID NO:1)

MSPSQLIGFLLLWVPASRGEIVLTQVPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPD
QSPKLLIKYASQSLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAAAYYCHQSSRLPHTFGGG
TKVEIKRT

Cadena pesada 19D12/15H12 (SEQ ID NO:2)

MEFGLSWVFLVAILKGVQCEVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAASGFTFSSFAMHWVRQ
AP
GKGLEWISVIDTRGATYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARLG
NF

YYGMDVWGQGTTVTVSS

Cadena ligera 19D12/15H12-C (LCC) (SEQ ID NO:3)

M S P S Q L I G F L L L W V P A S

R G E I V L T Q S P D S L S V T P

G E R V T I T C R A S Q S I G S S

L H W Y Q Q K P G Q S P K L L I K

Y A S Q S L S G V P S R F S G S G

S G T D F T L T I S S L E A E D A

A A Y Y C H Q S S R L P H T F G Q

G T K V E I K R T

19D12/15H12 Cadena ligera-D (LCD) (SEQ ID NO:4)

M S P S Q L I G F L L L W V P A S

R G E I V L T Q S P D S L S V T P

G E R V T I T C R A S Q S I G S S

L H W Y Q Q K P G Q S P K L L I K

Y A S Q S L S G V P S R F S G S G

S G T D F T L T I S S L E A E D F

A V Y Y C H Q S S R L P H T F G Q

G T K V E I K R T

19D12/15H12 Cadena ligera-E (LCE) (SEQ ID NO:5)

M S P S Q L I G F L L L W V P A S

R G E I V L T Q S P G T L S V S P

G E R A T L S C R A S Q S I G S S

L H W Y Q Q K P G Q A P R L L I K

Y A S Q S L S G I P D R F S G S G

S G T D F T L T I S R L E P E D A

A A Y Y C H Q S S R L P H T F G Q

G T K V E I K R T

19D12/15H12 Cadena ligera-F (LCF) (SEQ ID NO: 6)

M S P S Q L I G F L L L W V P A S

R G E I V L T Q S P G T L S V S P

G E R A T L S C R A S Q S I G S S

L H W Y Q Q K P G Q A P R L L I K

Y A S Q S L S G I P D R F S G S G

S G T D F T L T I S R L E P E D F

A V Y Y C H Q S S R L P H T F G Q

G T K V E I K R T

19D12/15H12 Cadena pesada-A (HCA) (SEQ ID NO: 7)

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ser Val Ile Asp Thr Arg Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Asn Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

Ser

19D12/15H12 Cadena pesada-B (HCB) (SEQ ID NO: 8)

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly Val

Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ser

Val Ile Asp Thr Arg Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Asn

Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

Ser

Véase la publicación de solicitud internacional n.º WO2003/100008.

Otras inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera variables que pueden formar parte de un anticuerpo anti-IGF1R y su fragmento de unión a antígeno son las siguientes:

Dominios V_H

(1) EVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAGS **GFTFRNYAMY** WVRQAPGKGLEWVS **AIGSGGGTYYADSVKG**

(2) QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAAS **GFTFSSYGMH** WVRQAPGKGLEWVA **IIWFDGSSTYYADSVRG**

(3) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTAS **GFTFSSYAMN** WVRQAPGKGLEWVS **AISGSGGTTFYADSVKG**

(4) EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS **GGTFSSYAIS** WVRQAPGQGLEWMG **GIIPIFGTANYAQKFQG**

(5) QVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVS **GGSISSSNWWS** WVRQPPGKGLEWIG **EIYHSGSTNYNPSLKS**

(6) QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS **GYSISGGYLWN** WIRQPPGKGLEWIG **YISYDGTNNYKPSLKD**

(1) RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDMAVYYCAR **APNWGSDA----------FDI** WGQGTMVTVSS

(2) RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAR **ELGRR----------YFDL** WGRGTLVSVSS

(3) RFTISRDNSRTTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK **DLGWSDS-----YYYYYGMDV** WGQGTTVTVSS

(4) RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR **APLRFLEWSTQDHYYYYYMDV** WGKGTTVTVSS

(5) RVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR **WTGRTD----------AFDI** WGQGTWVTVSS

(6) RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR **YGRV----------FFDY** WGQGTLVTVSS

1= SEQ ID NO: 58
2= SEQ ID NO: 60
3= SEQ ID NO: 62
4= SEQ ID NO: 64
5= SEQ ID NO: 66
6= SEQ ID NO: 68

Dominios V_L

(a) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC **RASQGISSWLA** WYQQKPEKAPKSLIY **AASSLQS**

(b) EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC **RASQSVSSYLA** WYQQKPGQAPRLLIY **DASKRAT**

(c) DIQMTQFPSSLSASVGDRVTITC **RASQGIRNDLG** WYQQKPGKAPKRLIY **AASRLHR**

(d) SSELTQDP-AVSVALGQTVRITC **QGDSLRSYYAT** WYQQKPGQAPILVIY **GENKRPS**

(e) DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISC **RSSQSLLHSNGYNYLD** WYLQKPGQSPQLLIY **LGSNRAS**

(f) DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC **RSSQSIVHSNGNTYLQ** WYLQKPGQSPQLLIY **KVSNRLY**

(a) GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC **QQYNSYPPT** FGPGTKVDIK

(b) GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC **QQRSKWPPWT** FGQGTKVESK
(c) GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC **LQHNSYPCS** FGQGTKLEIKRT
(d) GIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC **KSRDGSGQHLV** FGGGTKLTVLG
(e) GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC **MQGTHWPLT** FGQGTKVEIK
(f) GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC **FQGSHVPWT** FGQGTKVEIK

a= SEQ ID NO: 59
b= SEQ ID NO: 61
c= SEQ ID NO: 63
d= SEQ ID NO: 65
e= SEQ ID NO: 67
f= SEQ ID NO: 69

En una realización de la invención, V_H1 está apareada, en un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, con V_La; V_H2 está apareada, en un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, con V_Lb; V_H3 está apareada, en un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, con V_Lc; V_H4 está apareada, en un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, con V_Ld; V_H5 está apareada, en un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, con V_Le; y/o V_H6 está apareada, en un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, con V_Lf.

Las realizaciones de la invención incluyen aquellas en las que la inmunoglobulina se expresa en células 3M, por ejemplo, en combinación con cualquiera de las expuestas en el presente documento (por ejemplo, LCC y HCA; o LCF y HCA; o LCC y HCB). El apareamiento de las cadenas ligera y pesada puede dar como resultado la generación de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En una realización de la invención, el polipéptido es una o más cadenas de inmunoglobulina que pueden formar un anticuerpo anti-IGF1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende las inmunoglobulinas de cadena ligera y/o pesada que se exponen a continuación, o regiones variables de las mismas, o cadenas que comprenden las 3 CDR de cadena ligera y/o 3 CDR de cadena pesada que, en una realización de la invención, están subrayados en las secuencias que se exponen a continuación, por ejemplo, en el que el anticuerpo o fragmento comprende las inmunoglobulinas de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas expuestas a continuación:

CADENA LIGERA (1)

1 DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSIV HSNGNTYLQW YLQKPGQSPQ
51 LLIYKVSNRL YGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQGSHVP
101 WTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
151 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
201 VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 79)

CADENA PESADA (2)

1 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGYSIT GGYLWNWIRQ PPGKGLEWIG
51 YISYDGTNNY KPSLKDRVTI SRDTSKNQFS LKLSSVTAAD TAVYYCARYG
101 RVFFDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF
151 PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC
201 NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT
251 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
301 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
351 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS
401 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
(SEQ ID NO: 80)

CADENA PESADA (3)

```
1    QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGYSIT GGYLWNWIRQ PPGKGLEWIG
51   YISYDGTNNY KPSLKDRVTI SRDTSKNQFS LKLSSVTAAD TAVYYCARYG
101  RVFFDYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF
151  PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC
201  NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT
251  LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
301  RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
351  LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS
401  DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
```

CADENA LIGERA (4)

```
1    DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSIV HSNGNTYLQW YLQKPGQSPQ
51   LLIYKVSNRL YGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQGSHVP
101  WTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
151  VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
201  VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
```

En una realización de la divulgación, las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo anti-IGF1R o fragmento de unión a antígeno del mismo comprenden uno o más puentes disulfuro dispuestos de la siguiente manera:

PUENTES DISULFURO (NÚMERO DE CADENA: NÚMERO DE AMINOÁCIDO)

1:23	a	1:93
1:139	a	1:199
1:219	a	2:220
2:22	a	2:96
2:144	a	2:200
2:261	a	2:321
2:367	a	2:425
2:226	a	3:226
2:229	a	3:229
3:22	a	3:96
3:144	a	3:200
3:261	a	3:321
3:367	a	3:425
3:220	a	4:219
4:23	a	4:93
4:139	a	4:199

En una realización de la invención, una cadena de inmunoglobulina que puede formar un anticuerpo anti-IL-23 o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende 3 CDR de cadena ligera y/o 3 de cadena pesada se selecciona de:

CDR-L1: KASKKVTIFGSISALH (SEQ ID NO: 9);
CDR-L2: NGAKLES (SEQ ID NO: 10); y
CDR-L3: LQNKEVPYT (SEQ ID NO: 11);
o
CDR-H1: SYGIT (SEQ ID NO: 12);
CDR-H2: ENYPRSGNTYYNEKFKG (SEQ ID NO: 13); y
CDR-H3: CEFISTVVAPYYYALDY (SEQ ID NO: 14) o SEFISTVVAPYYYALDY (SEQ ID NO: 15) o AEFISTVVAPYYYALDY (SEQ ID NO: 16) o VEFISTVVAPYYYALDY (SEQ ID NO: 17) o SEFISTVMAPYYYALDY (SEQ ID NO: 18) o SEFTSTVVAPYYYALDY (SEQ ID NO: 19)

En una realización de la invención, una cadena de inmunoglobulina que puede formar parte de un anticuerpo anti-IL-23 p19 o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

Cadena ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIYNAKTLAEGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYGIPFTFGQGTKVEIKR
(SEQ ID NO: 20);

Cadena pesada:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFITYWMTWVRQAPGQGLEWMGQIFPASGS
ADYNEMFEGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGGGFAYWGQGTLVTV
SS
(SEQ ID NO: 21);

y

Cadena pesada: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFITYWMTWVRQAPGQGLEWMGQIFPASGS ADY AQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGGGFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 22). En una realización de la invención, la inmunoglobulina comprende 3 CDR de cadena pesada y/o 3 de cadena ligera tomadas de las cadenas de inmunoglobulina tratadas anteriormente.

En una realización de la invención, una inmunoglobulina que puede formar parte de un anticuerpo anti-IL23 p19 o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las siguientes CDR:

CDRH1: Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser (SEQ ID NO: 23);

CDRH2: Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly (SEQ ID NO: 24);
y

CDRH3: Asp Asn His Ala Tyr Asp Arg Gly Pro Phe Phe Asp Tyr (SEQ ID NO: 25);
o

CDRL1: Lys Ser Ser Gln Asn Leu Phe Tyr Arg Ser Asn Gln Lys Asn His Leu Ala (SEQ ID NO: 26);

CDRL2: Trp Thr Ser Thr Arg Glu Ser (SEQ ID NO: 27); y

CDRL3: Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Pro Thr (SEQ ID NO: 28).

En una realización de la invención, una inmunoglobulina que puede formar parte de un anticuerpo anti-IL23 p19 o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las siguientes CDR:

CDRH1: Ala Tyr Gly Met Asp (SEQ ID NO: 29);

CDRH2: Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Arg Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly (SEQ ID NO: 30);
y

CDRH3: Asp Leu Gly Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val (SEQ ID NO: 31);
o

CDRL1: Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser (SEQ ID NO: 32);

CDRL2: Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser (SEQ ID NO: 33); y

CDRL3: Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Leu Phe Tyr Val (SEQ ID NO: 34).

En una realización de la invención, una inmunoglobulina que puede formar parte de un anticuerpo anti-IL23 p19 o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las siguientes CDR:

CDRH1: GKTFWSWGIN (SEQ ID NO: 35);

CDRH2: YIYIGTGYTEPNPKYKG (SEQ ID NO: 36); y

CDRH3: IGGYYGNFAD (SEQ ID NO: 37) o IGGYYGNFDQ (SEQ ID NO: 38);
o

CDRL1: RSSQSLLISGGNTYLN (SEQ ID NO: 39);

CDRL2: LVSKLDQ (SEQ ID NO: 40); y CDRL3: WQGTYFPLT (SEQ ID NO: 41).

En una realización de la invención, una inmunoglobulina puede formar parte de un anticuerpo anti-IL23 p19 o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende cualquiera de las inmunoglobulinas, regiones variables de los mismos o CDR de los mismos que se establecen en cualquiera de las patentes de Estados Unidos n.º 7.247.711 o 7.491.391; la solicitud publicada de Estados Unidos n.º US 2007/0218064; o US 2008/0095775; o la solicitud de PCT publicada n.º WO 2007/024846.

Por ejemplo, en una realización de la invención, una inmunoglobulina que puede formar parte de un anticuerpo anti-IL-17 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una inmunoglobulina de cadena pesada y/o ligera que se selecciona de las siguientes; o una cadena de inmunoglobulina que puede formar parte de un anticuerpo anti-IL-17 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende 3 CDR de cadena ligera y/o 3 de cadena pesada de cualquiera de las cadenas expuestas a continuación:

Cadena ligera:

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKSSQSLLFSENQKNYLAWYLQKPGQSPQLLIYWTSTR
QSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQSYYTPYTFGQGTKVEIKR
(SEQ ID NO: 42);

y
Cadena pesada:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLPSHSVSWIRQPPGKGLEWIGIIWNQGGTDYN
SAFKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARNAYITDYYYENYFMDAWGQGT
LV
TVSS
(SEQ ID NO: 43).

En una realización de la invención, una inmunoglobulina que puede formar parte de un anticuerpo anti-HGF o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las siguientes 3 CDR de cadena ligera y/o 3 de cadena pesada
<u>CDR1 de cadena pesada</u>

a TYWMH (SEQ ID NO: 44)
b y c TYWMH (SEQ ID NO: 45);

<u>CDR2 de cadena pesada</u>

a EINPTNGHTNYNEKFKS (SEQ ID NO: 46)
b EINPTNGHTNYNPSFQG (SEQ ID NO: 47)
c EINPTNGHTNYNQKFQG (SEQ ID NO: 48); y

<u>CDR3 de cadena pesada</u>

a NYVGSIFDY (SEQ ID NO: 49)
b y c NYVGSIFDY (SEQ ID NO: 50);

o
<u>CDR1 de cadena ligera (kappa)</u>

a KASENVVSYVS (SEQ ID NO: 51)
b y c KASENVVSYVS (SEQ ID NO: 52);

CDR2 de cadena ligera (kappa)

a GASNRNT (SEQ ID NO: 53)
b GASNRNT (SEQ ID NO: 54)
c GASNRES (SEQ ID NO: 55); y

CDR3 de cadena ligera (kappa)

a GQSYNYPYT (SEQ ID NO: 56)
b y c GQSYNYPYT (SEQ ID NO: 57)

En una realización de la invención, la proteína es una cadena variable de inmunoglobulina de cadena ligera o pesada (ya sea madura (sin señal de secreción) o sin procesar), unida opcionalmente a una inmunoglobulina de cadena constante pesada o ligera de inmunoglobulina, por ejemplo, en el que la región variable comprende una secuencia de aminoácidos expuesta a continuación o un fragmento maduro de la misma o en el que la inmunoglobulina comprende una o más CDR (por ejemplo, 3 CDR de cadena ligera o 3 CDR de cadena pesada) de las expuestas en el presente documento (las CDR están subrayadas):

Cadena ligera XPA.10.064

SYVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGINYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNDQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDDSLSGVVFGGGTKVTVL (SEQ ID NO: 70);

Cadena pesada XPA.10.064.03

EVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYSFTGHYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPYSGG TNFPREFQGRVTMTRDTSVNTVYMELTRLTSDDTSVYYCARDQMVHGGLDYWGQGTL VTVSS (SEQ ID NO: 71);

XPA. Cadena pesada 10.064.04

EVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYSFTGHYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPYSGG TNFPREFQGRVTMTRDTSVNTVYMELTRLTSDDTSVYYCARDEMQNGGLDYWGQGTL VTVSS (SEQ ID NO: 72);

XPA. Cadena pesada 10.064.06

EVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYSFTGHYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPYSGG TNFPREFQGRVTMTRDTSVNTVYMELTRLTSDDTSVYYCARDEMTRGGLDYWGQGTL VTVSS (SEQ ID NO: 73);

XPA. Cadena pesada 10.064.07

EVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYSFTGHYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPYSGG

TNFPREFQGRVTMTRDTSVNTVYMELTRLTSDDTSVYYCARDEMHVGGLDYWGQGTL

VTVSS (SEQ ID NO: 74);

Cadena pesada XPA.10.064.10

EVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYSFTGHYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPYSGG

TNFPREFQGRVTMTRDTSVNTVYMELTRLTSDDTSVYYCARDEMVWGGLDYWGQGT

LVTVSS (SEQ ID NO: 75).

En una realización de la invención, la inmunoglobulina de la cadena ligera se fusiona con una cadena constante de inmunoglobulina, por ejemplo, una cadena kappa o una cadena lambda. En una realización de la invención, la inmunoglobulina de cadena pesada se fusiona con una cadena constante de inmunoglobulina, por ejemplo, una cadena gamma-1, gamma-2, cadena gamma-3 o gamma-4.

Otras proteínas de interés que pueden expresarse usando los métodos y las células 3M de la presente invención incluyen receptores, ligandos, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, hormonas y enzimas.

Por ejemplo, en una realización de la invención, la célula 3M se usa para expresar MCP1 maduro procesado o inmaduro sin procesar (por ejemplo, MCP1 humano) fusionado a un gen de inmunoglobulina (por ejemplo, gamma-1, 2, 3 o 4). En una realización de la invención, MCP1 se fusiona a la inmunoglobulina por un enlazador peptídico. En una realización de la invención, una secuencia polipeptídica no procesadade MCP1 humano comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: MKVSAALLCLLLIAATFIPQGLAQPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPK EAVIFKTIVAKEICADPKQKWVQDSMDHLDKQTQTPKT (SEQ ID NO: 76). En una realización de la invención, una secuencia polipeptídica madura de MCP1 humano comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: QPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEICADPKQKWV QDSMDHLDKQTQTPKT (SEQ ID NO: 77). En una realización de la invención, la inmunoglobulina es una secuencia polipeptídica madura de la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina humana (bisagra a CH3 solamente), variante monomérica de isotipo γ1 (mutaciones C a S en la bisagra subrayadas)

VEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF

NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI

EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY

KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 78).

Por ejemplo, en una realización de la invención, una inmunoglobulina que puede formar parte de un anticuerpo anti-PCSK9 (por ejemplo, AX132, AX189 o 1462/1282) o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una inmunoglobulina de cadena pesada y/o ligera que se selecciona de las siguientes; o una cadena de inmunoglobulina que puede formar parte de un anticuerpo anti-PCSK9 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende 3 CDR de cadena ligera y/o 3 de cadena pesada de cualquiera de las cadenas expuestas a continuación:

Secuencia de aminoácidos de VH AX132:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCKASGYTFSSYGMYWVRQAPGKGLEWIGWIDPGSGGT

KYNEKFKGKATISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERYGYYFDYWGQGTLVT

VSS

(SEQ ID NO: 81)

por ejemplo, en la que la cadena pesada comprende las CDR:

AX132 HCDR1
GYTFSSYGMY
(SEQ ID NO: 82)

AX132 HCDR2
WIDPGSGGTKYNEKFKG
(SEQ ID NO: 83)

AX132 HCDR3
ERYGYYFDY
(SEQ ID NO: 84)

Secuencia de aminoácidos de VL AX132:

EIVLTQSPATLSLSPGERATITCRASQYVGSYLNWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQVWDSSPPVVFGGGTKVEIK
(SEQ ID NO: 85)

por ejemplo, en la que la cadena ligera comprende las CDR:

AX132 LCDR1
RASQYVGSYLN
(SEQ ID NO: 86)

AX132 LCDR2
DASNRAT
(SEQ ID NO: 87)

AX132 LCDR3
QVWDSSPPVV
(SEQ ID NO: 88)

Secuencia de aminoácidos de VL AX189:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSRYLTWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQAYDYSLSGYVFGGGTKVEIK
(SEQ ID NO: 89)

por ejemplo, en la que la cadena ligera comprende las CDR:

AX189 LCDR1
RASQDVSRYLT
(SEQ ID NO: 90)

AX189 LCDR2
AASSLQS
(SEQ ID NO: 91)

AX189 LCDR3
QAYDYSLSGYV
(SEQ ID NO: 92)

Secuencia de aminoácidos de VH AX189:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGKGLEWIGRIDPYNGGT
KYNEKFKGKATISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYGYYLGSYAMDYWGQG
TLVTVSS
(SEQ ID NO: 93)

por ejemplo, en la que la cadena pesada comprende las CDR:

AX189 HCDR1
GYTFSSYWMH
(SEQ ID NO: 94)

AX189 HCDR2
RIDPYNGGTKYNEKFKG
(SEQ ID NO: 95)

AX189 HCDR3
YGYYLGSYAMDY

(SEQ ID NO: 96)

secuencia de aminoácidos de cadena pesada 1462/1282:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVS GYTFTDYYMN WVRQAPGQGLEWIG
DINPNNGGAIYNQKFKG RATLTVDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCTS GIITEIAEDF
WGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO: 97)

por ejemplo, en la que la cadena pesada comprende las CDR:

1462/1282 HCDR1
GYTFTDYYMN (SEQ ID NO: 98),
1462/1282 HCDR2
DINPNNGGAIYNQKFKG (SEQ ID NO: 99)
1462/1282 HCDR3
GIITEIAEDF (SEQ ID NO: 100);

secuencia de aminoácidos de la cadena ligera 1462/1282:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVVWYQQKPGKAPKALIHSASYRYSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYKTYPYTFGQGTKVEIKR
(SEQ ID NO: 101)

por ejemplo, en la que la cadena ligera comprende las CDR:

1462/1282 LCDR1
KASQNVGTNVV
(SEQ ID NO: 102),
1462/1282 LCDR2
SASYRYS
(SEQ ID NO: 103)
1462/1282 LCDR3
QQYKTYPYT
(SEQ ID NO: 104).

Por ejemplo, en una realización de la invención, la célula 3M se usa para expresar una o ambas cadenas de etanercept (n.º CAS 185243-69-0; banco de fármacos n.º DB00005).

Expresión de proteínas

Los procesos de la presente invención incluyen métodos para expresar un polipéptido que comprende etapas en las que se añaden diversas cargas a un medio de crecimiento inicial de células 3M de mamífero. Estas cargas incluyen carga hidrolizada, carga de vitaminas/sal, carga de aminoácidos y carga de nutrientes. La presente invención también incluye composiciones que comprenden una célula 3M en cualquiera de los medios tratados en el presente documento.

El "medio inicial de crecimiento de células de mamífero" puede ser cualquiera de varios tipos de medios acuosos conocidos en la técnica; y el significado de este término sería fácilmente conocido por cualquier profesional con experiencia ordinaria en la técnica. Los ejemplos incluyen el medio EX-CELL ACF CHO (Sigma-Aldrich (St.Louis, MO)). El medio EX-CELL ACF CHO es un medio comercial que no contiene componentes animales, con HEPES, sin L-glutamina. El medio contiene sales inorgánicas, HEPES y tampones de bicarbonato de sodio, aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, insulina humana recombinante, hidrolizados vegetales, otros compuestos orgánicos, oligoelementos y tensioactivos. El medio no contiene antibióticos, antimicóticos, L-glutamina o transferencias y tampoco contiene proteínas derivadas de animales u otros componentes.

Otros ejemplos de medio inicial de crecimiento de células de mamífero incluyen DMEM, DMEM/F-12, mezcla de nutrientes F-10, medio RPMI 1640, mezcla de nutrientes F-12, Medio 199, MEM de Eagle, RPMI, medio 293 y medio de Iscove. Por ejemplo, el medio esencial mínimo de Eagle (MEM) comprende clorhidrato de L-Arginina (126 mg/l), L-Cistina 2HCl (31 mg/l), clorhidrato de L-Histidina-H_2O (42 mg/l), L-isoleucina (52 mg/l), L-leucina (52 mg/l), clorhidrato de L-lisina (73 mg/l), L-metionina (15 mg/l), L-fenilalanina (32 mg/l), L-treonina (48 mg/l), L-triptófano (10 mg/l), L-tirosina sal disodio deshidratada (52 mg/l), L-valina (46 mg/l), cloruro de colina (1 mg/l), D-pantotenato de calcio (1 mg/l), ácido fólico (1 mg/l), niacinamida (1 mg/l), clorhidrato de piridoxal (1 mg/l), riboflavina (0,1 mg/l), clorhidrato de

tiamina (1 mg/l), i-inositol (2 mg/l), cloruro de calcio ($CaCl_2$) (anhid.) (200 mg/l), sulfato de magnesio ($MgSO_4$) (anhid.) (97,67 mg/l), cloruro de potasio (KCl) (400 mg/l), bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) (2200 mg/l), cloruro de sodio (NaCl) (6800 mg/l), fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4–H_2O) (140 mg/ml), D-glucosa (dextrosa) (1000 mg/l) y rojo fenol (10 mg/l).

El medio Eagle modificado (MEM) (2X) comprende clorhidrato de L-arginina (504 mg/l), L-cistina (96 mg/l), L-glutamina (870 mg/l), clorhidrato de L-Histidina-H_2O (168 mg/l), L-isoleucina (208 mg/l), L-leucina (208 mg/l), clorhidrato de L-lisina (290 mg/l), L-metionina (60 mg/l), L-fenilalanina (128 mg/l), L-treonina (192 mg/l), L-triptófano (40 mg/l), L-tirosina sal disodio deshidratada (208 mg/l), L-valina (155 mg/l), cloruro de colina (4 mg/l), D-pantotenato de calcio (4 mg/l), ácido fólico (4 mg/l), niacinamida (4 mg/l), clorhidrato de piridoxal (4 mg/l), riboflavina (0,4 mg/l), clorhidrato de tiamina (4 mg/l), i-inositol (8 mg/l), cloruro de calcio ($CaCl_2$) (anhid.) (285 mg/l), Nitrato férrico ($Fe(NO_3)_3$–"$9H_2O$) (1 mg/ml), sulfato de magnesio ($MgSO_4$) (anhid.) (195 mg/l), cloruro de potasio (KCl) (800 mg/l), bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) (8400 mg/l), cloruro de sodio (NaCl) (12800 mg/l), fosfato sódico monobásico (NaH_2PO_4-H_2O) (250 mg/l) y D-glucosa (dextrosa) (9000 mg/l).

El medio RPMI 1640 (1X) comprende glicina (10 mg/l), L-arginina (200 mg/l), L-asparagina (50 mg/l), L-ácido aspártico (20 mg/l), L-Cistina 2HCl (65 mg/l), L-ácido glutámico (20 mg/l), L-glutamina (300 mg/l), L-histidina (15 mg/l), L-hidroxiprolina (20 mg/l), L-isoleucina (50 mg/l), L-leucina (50 mg/l), clorhidrato de L-lisina (40 mg/l), L-metionina (15 mg/l), L-fenilalanina (15 mg/l), L-prolina (20 mg/l), L-serina (30 mg/l), L-treonina (20 mg/l), L-triptófano (5 mg/l), L-tirosina sal disodio deshidratada (29 mg/l), L-valina (20), biotina (0,2 mg/l), cloruro de colina (3 mg/l), D-pantotenato de calcio (0,25 mg/l), ácido fólico (1 mg/l), niacinamida (1 mg/l), ácido para-aminobenzoico (1 mg/l), clorhidrato de piridoxina (1 mg/l), riboflavina (0,2 mg/l), clorhidrato de tiamina (1 mg/l), vitamina B12 (0,005 mg/l), i-inositol (35 mg/l), nitrato de calcio ($Ca(NO_3)_2$ $4H_2O$) (100 mg/l), sulfato de magnesio ($MgSO_4$) (anhid.) (48,84 mg/l), cloruro de potasio (KCl) (400 mg/l), bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) (2000 mg/l), cloruro de sodio (NaCl) (6000 mg/l), Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) anhidro (800 mg/dl), D-glucosa (dextrosa) (2000 mg/l) y glutatión (reducido) (1 mg/l).

Generalmente, para los fines de la presente invención, un "alimento hidrolizado" incluye hidrolizados de trigo y/o soja. Generalmente, un hidrolizado de soja o trigo es el producto de una digestión enzimática de soja o trigo y se puede comprar comercialmente. Normalmente, el hidrolizado está en agua de calidad de cultivo celular y es estéril. En una realización de la invención, el hidrolizado es una solución madre a 200 g/litro. En una realización de la invención, el hidrolizado se añade al medio de cultivo para alcanzar una concentración final de aproximadamente 10 g/litro. En una realización de la invención, cuando se utiliza el proceso de nivel 3 o el proceso mejorado, el hidrolizado se añade al medio de cultivo, ya sea inicialmente, antes, con o inmediatamente después de la inoculación o aproximadamente 3 días después de la inoculación o cuando la densidad celular viable alcanza más de aproximadamente 1 X 10^6 células/ml.

La "densidad celular viable" se refiere a la concentración de células en el medio que se analiza (por ejemplo, células/ml) que son viables, por ejemplo, capaces de crecer y replicarse (por ejemplo, cuando se usa para inocular un cultivo líquido o un medio de cultivo sólido) o capaz de excluir un colorante, tal como azul triptán, eosina o propidio en un ensayo de exclusión de colorantes. Dichos ensayos son bien conocidos en la técnica.

Generalmente, para los fines de la presente invención, una "carga de vitaminas/sal" incluye:

Selenito de sodio	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 7,13 X 10^{-4} g/litro
Sulfato de adenina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,0816 g/litro
Adenosina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,88 g/litro
Citidina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,88 g/litro
Guanosina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,88 g/litro
Uridina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,88 g/litro
Hipoxantina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,59 g/litro
L-citrulina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,63 g/litro
L-ornitina-HCl	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 1,28 g/litro
Biotina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,014 g/litro
Dinucleótido de flavina adenina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,0025 g/litro
Ácido fólico	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,23 g/litro
Ácido lipoico	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,026 g/litro
Niacina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 1,57 g/litro
HCl de piridoxina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,15 g/litro
Riboflavina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,093 g/litro

(continuación)

HCl de tiamina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,8 g/litro
Vitamina E	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,0188 g/litro
Vitamina B12	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,17 g/litro
Cloruro de colina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 2,51 g/litro
HCl de etanolamina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,22 g/litro
i-inositol	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 3,66 g/litro
timidina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,39 g/litro
Putrescina 2HCl	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,02 g/litro
Progesterona	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,00075 g/litro; y
Pantotenato de D-Calcio	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 1,19 g/litro

En una realización de la invención, la carga de vitaminas/sal es una solución madre 50X. En una realización de la invención, la carga de vitaminas/sal se añade al medio de cultivo para alcanzar una concentración final de aproximadamente 20 ml/litro. En una realización de la invención, la carga de vitaminas/sal se añade al cultivo entre los días 3 y 5, después de la inoculación, o cuando la densidad celular viable alcanza más de aproximadamente 1,2 X 10^6 células/ml.

Generalmente, para los fines de la presente invención, una "carga de aminoácidos" incluye:

L-arginina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 6,32 g/litro
L-cistina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 1,7 g/litro
L-histidina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 2,1 g/litro
L-isoleucina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 2,6 g/litro
L-leucina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 2,6 g/litro
L-lisina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 3,6 g/litro
L-Metionina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,76 g/litro
L-fenilalanina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 1,65 g/litro
L-treonina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 2,38 g/litro
L-triptófano	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,51 g/litro
L-tirosina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 1,8 g/litro
L-valina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 2,34 g/litro
L-alanina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,89 g/litro
L-asparagina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 1,5 g/litro
L-acido aspártico	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 1,33 g/litro
L-acido glutámico	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 1,47 g/litro
Glicina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,75 g/litro
L-prolina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 1,15 g/litro; y
L-serina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 1,05 g/litro

En una realización de la invención, se preparan dos soluciones de carga de aminoácidos separadas: una solución madre 100X que incluye L-alanina, L-asparagina, ácido L-aspártico, ácido L-glutámico, glicina, L-prolina y L-serina a las concentraciones establecidas anteriormente; y una solución 50X que incluye L-arginina, L-cistina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina y L-valina en las concentraciones establecidas anteriormente. Las madre se pueden hacer y añadir por separado al medio de cultivo. En una realización de la invención, la solución madre de aminoácidos se añade al medio inicial el día 0, antes, con o inmediatamente después de la inoculación celular.

Generalmente, para los fines de la presente invención, una "carga de nutrientes" incluye:

L-asparagina:	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 40,6 g/litro
L-prolina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 10,81 g/litro
L-isoleucina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 18,53 g/litro
L-cisteína-HCl	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 11,19 g/litro
L-leucina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 16,58 g/litro

(continuación)

L-treonina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 8,2 g/litro
L-tirosina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 9,9 g/litro
L-arginina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 9,29 g/litro
L-acido aspártico	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 3,56 g/litro
L-acido glutámico	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 6,28 g/litro
Glicina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 2,83 g/litro
L-histidina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 6,23 g/litro
L-metionina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 6,58 g/litro
L-triptófano	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 4,93 g/litro
L-lisina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 14,66 g/litro
L-fenilalanina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 8,64 g/litro
L-valina	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 13,08 g/litro
L-serina:	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 13 g/litro
Fosfato de sodio monobásico:	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 14,41 g/litro
Sulfato de cinc:	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,054 g/litro
Sulfato cúprico:	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,00016 g/litro
Vanadato de amonio:	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,000039 g/litro
Cloruro de cobalto:	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,000125 g/litro
Dicloruro de níquel hexahidrato:	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,00002 g/litro
Molibdato de sodio deshidratado:	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,000008 g/litro
Cloruro de estaño deshidratado:	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,000004 g/litro
Cloruro de manganeso: tetrahidrato:	por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,000015 g/litro

En una realización de la divulgación, la carga de nutrientes es una solución madre 50X. En una realización de la divulgación, la carga de nutrientes se añade al medio de cultivo para alcanzar una concentración final de aproximadamente 20 ml/litro. En una realización de la invención, la carga de nutrientes se añade al cultivo entre los días 3 y 5, después de la inoculación o cuando la densidad celular viable alcanza aproximadamente 1,2 X 10^6 células/ml.

Adicionalmente, en una realización de la invención, se añaden glucosa (de una solución madre 2,5 M) y L-glutamina (de una solución madre 0,2 M) al medio de cultivo en cualquier momento, por ejemplo, cuando la concentración de los nutrientes cae por debajo de 1,5 g/litro de glucosa y/o 150 mg/litro de L-glutamina.

La presente divulgación también incluye procesos en los que la osmolalidad y/o la temperatura del cultivo se desplaza opcionalmente. El cambio de osmolalidad o de temperatura se pueden realizar en cualquier punto del proceso.

Se ha demostrado que el cambio de osmolalidad aumenta la productividad específica del cultivo, así como la viabilidad celular. Normalmente, el medio de crecimiento inicial de células de mamífero tiene una osmolalidad inicial de aproximadamente 300 mOsm. El "cambio de osmolalidad" de la presente divulgación, sin embargo, incluye el cambio de la osmolalidad del cultivo de aproximadamente 400 mOsM a aproximadamente 500 mOsm.

La osmolalidad es una medida de los osmoles de soluto por kilogramo de disolvente. La osmolalidad se puede medir usando un osmómetro que mide las propiedades coligativas, tal como la depresión en el punto de congelación, la presión de vapor o la elevación del punto de ebullición.

La osmolalidad de un cultivo celular puede modificarse por varios medios. Por ejemplo, una solución salina concentrada (por ejemplo, que incluye una reserva de sales de NaCl 5 M, 8-12 ml/l añadido), solución de hidrolizado de soja (200 g/l de reserva, 50-80 ml/l añadido), se puede añadir carbonato de sodio o bicarbonato de sodio o dióxido de carbono. En una realización de la divulgación, la adición de la carga de nutrientes al medio cambia la osmolalidad.

En una realización de la divulgación, la temperatura del cultivo se modifica opcionalmente, por ejemplo, en un cambio de etapa, desde aproximadamente 36,5 °C (± 0,5 °C) hasta entre aproximadamente 33 °C y 35 °C.

Los vectores, tales como plásmidos, incluyendo un gen para su expresión mediante un proceso de la presente invención, por ejemplo, una cadena de inmunoglobulina, tal como cualquiera de las tratadas en el presente documento, puede introducirse en una célula huésped 3M por cualquiera de los varios métodos conocidos en la técnica. La transformación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el método de precipitación con fosfato de calcio descrito por Graham y Van der Eb, Virology, 52: 546 (1978). También se pueden usar otros métodos para introducir ADN en células 3M, como por inyección nuclear o por fusión de protoplastos. Los métodos para la transformación también

incluyen electroporación, transformación liposómica y transformación con DEAE-Dextrano.

Las células 3M huésped que comprenden un gen para su expresión usando un proceso de la presente invención pueden seleccionarse y cribarse adicionalmente para identificar el clon con las características requeridas para la expresión de un gen diana. Un enfoque común, para lograr la máxima expresión, implica el uso de líneas celulares mutantes y un aumento gradual de la presión de selección durante varios meses para un marcador de selección cotransfectado, tal como la dihidrofolato reductasa (DHFR) (Kaufman et al. (1982) J. Mol. Biol. 159: 601-621; Schimke et al. (1982) Natl. Cancer Inst. Monogr. 60: 79-86). Para lograr altas tasas de producción, una línea celular negativa para la dihidrofolato reductasa *(DHFR)* (por ejemplo, una línea celular de CHO) (Urlaub et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220) se transforma con un vector de expresión que contiene un gen de la *DHFR* funcional en combinación con el gen diana que se va a expresar. La amplificación de los genes diana insertados en el vector se produce en respuesta a la adición de cantidades crecientes del antagonista de DHFR metotrexato (MTX) al medio de cultivo y se generan clones o subpoblaciones que llevan múltiples copias de los genes recombinantes y se pueden seleccionar (Wurm (1990) Biologicals 18: 159-164). El proceso de amplificación génica generalmente requiere varios meses hasta que se obtienen líneas celulares estables que muestran altos números de copias de genes diana y altas tasas de producción de la proteína deseada. Las células 3M que comprende un gen *DHFR*, así como las células que han sufrido amplificación del gen *DHFR* un gen diana (por ejemplo, un gen de inmunoglobulina) de parte de la divulgación. En una realización de la divulgación, las células 3M no han sufrido ninguna amplificación (por ejemplo, amplificación de *DHFR*). En una realización de la divulgación, los genes diana que se van a expresar en las células 3M existen en solo aproximadamente una copia por célula.

En una realización de la divulgación, un polinucleótido, por ejemplo, que codifica una cadena de inmunoglobulina y/o un gen *DHFR*, se integrado en el ADN cromosómico de la célula huésped 3M o está en un vector que es ectópico y se replica de forma autónoma. En una realización de la divulgación, el polinucleótido de la presente divulgación está presente en la célula 3M a varias copias por célula (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20). Cuando un vector de expresión se ha integrado en el ADN genómico de la célula huésped 3M para mejorar la estabilidad, el número de copias del vector de ADN y, concomitantemente, la cantidad de producto que podría expresarse, puede aumentarse seleccionando líneas celulares en las que las secuencias del vector se han amplificado después de la integración en el ADN de la célula huésped. Los genes integrados pueden cribarse para detectar la presencia y la cantidad relativa de ADN incorporado cromosómicamente y la correspondiente síntesis de ARNm y polipéptido por métodos estándar. Por ejemplo, la presencia de la integración deseada puede detectarse mediante procedimientos estándar, tal como secuenciación de ADN, transferencia de tipo Southern, transferencia de tipo Northern y/o transferencia de tipo Western.

Una línea celular 3M también puede almacenarse en un banco de células maestro (MCB) y/o banco de células de trabajo (WCB). Normalmente, cuando una línea celular se va a utilizar durante muchos ciclos de fabricación, se puede establecer un sistema de banco celular de dos niveles que consiste en un banco de células maestro o banco de semillas maestro (MSB) y un banco de células de trabajo. Se establece una línea celular a partir de un solo clon de la célula huésped y esta línea celular se utiliza para formar el MCB. Generalmente, este MCB debe ser caracterizado y sometido a pruebas exhaustivas para detectar contaminantes, tales como bacterias, hongos, virus y micoplasma. Una muestra de células del MCB se puede expandir para formar el WCB, que se caracteriza por la viabilidad celular antes de su uso en un proceso de fabricación. Las células en un MCB o WCB se pueden almacenar en viales, por ejemplo, a baja temperatura (por ejemplo, 0 °C o menos, -20 °C u -80 °C).

Los métodos para expresar un polipéptido, por ejemplo, una inmunoglobulina, usando una célula 3M de la presente invención comprende, en una realización de la presente invención:

células 3M en expansión 1 que expresan el polipéptido en un medio de crecimiento inicial de mamífero estándar. Esta expansión se puede hacer, por ejemplo, en matraces de agitación. En una realización de la divulgación, la expansión se produce por crecimiento a aproximadamente 1-2 X 10^6 células/ml, dilución de una muestra de esas células (por ejemplo, a una densidad de aproximadamente 2,5-5 X 10^5 células/ml) y, después, recrecimiento a aproximadamente 1-2 X 10^6 células/ml, durante aproximadamente 10-30 ciclos.
2-inoculación de un medio de crecimiento inicial de células de mamífero con las células 3M expandidas, a una densidad celular de aproximadamente 2,5-5 X 10^5 células/ml y adición de suplementos al medio. Los suplementos son hidrolizados de soja y/o trigo, carga de aminoácidos, carga de vitaminas/sal, carga de nutrientes, glucosa y L-glutamina.

El día de la inoculación es el "día 0", el día siguiente es el "día 1", el día siguiente es "día 2", y así sucesivamente.

Se añaden hidrolizados de soja y/o trigo, por ejemplo, ya sea el día 0 o después de que la densidad celular viable haya alcanzado más de aproximadamente 10^6 células/ml. En una realización de la divulgación, el o los hidrolizados se añaden simplemente el día 3.

las cargas de aminoácidos (tratados en el presente documento) se añaden, por ejemplo, el día 0, por ejemplo, para alcanzar concentraciones de cultivo finales aproximadas como se establece a continuación (sin incluir la concentración de ningún componente indicado de otras fuentes, tal como el medio de crecimiento inicial de células de mamífero):

Componente	Concentración final en cultivo (mg/litro)
L-arginina	126,4
L-cistina	34
L-histidina	42
L-isoleucina	52
L-leucina	52
L-lisina	72
L-Metionina	15,2
L-fenilalanina	33
L-treonina	47,6
L-triptófano	10,2
L-tirosina	36
L-valina	46,8
L-alanina	8,9
L-asparagina	30
L-acido aspártico	26,6
L-acido glutámico	29,4
Glicina	15
L-prolina	23
L-serina	21

En una realización de la invención, las cargas de aminoácidos no se añaden al medio.

Se añade solución de carga de vitaminas/sal (tratada anteriormente), por ejemplo, entre los días 3 y 5 o cuando la densidad celular viable alcanza aproximadamente 1,2 X 10^6 células/ml, por ejemplo, para alcanzar las concentraciones de cultivo finales aproximadas establecidas a continuación (sin incluir la concentración de ningún componente indicado de otras fuentes, tal como el medio de crecimiento inicial de células de mamífero):

Componente	Concentraciones finales de cultivo (mg/litro)
Selenito de sodio	0,01426
Sulfato de adenina	1,632
Adenosina	17,6
Citidina	17,6
Guanosina	17,6
Uridina	17,6
Hipoxantina	11,8
L-citrulina	12,6
L-ornitina-HCl	25,6
Biotina	0,28
Dinucleótido de flavina adenina	0,05
Ácido fólico	4,6
Ácido lipoico	0,52
Niacina	31,4
HCl de piridoxina	3
Riboflavina	1,86
HCl de tiamina	16
Vitamina E	0,376
Vitamina B12	3,4
Cloruro de colina	50,2
HCl de etanolamina	4,4

(continuación)

Componente	Concentraciones finales de cultivo (mg/litro)
i-inositol	73,2
timidina	7,8
Putrescina 2HCl	0,4
Progesterona	0,015
Pantotenato de D-Calcio	23,8

Algunos componentes de la carga de vitaminas/sal también se encuentran en otras cargas, tal como la carga de aminoácidos. Estas concentraciones de cultivo finales son de los componentes de la carga de vitaminas/sal y no reflejan las concentraciones acumulativas de los componentes indicados tanto de la carga de aminoácidos como de la carga de vitaminas/sal.

La carga de nutrientes (tratada en el presente documento) se añade, por ejemplo, entre los días 3 y 5 o cuando la densidad celular viable alcanza aproximadamente 1,2 X 10^6 células/ml, por ejemplo, para alcanzar las concentraciones de cultivo finales aproximadas establecidas a continuación (sin incluir la concentración de ningún componente indicado de otras fuentes, tal como el medio de crecimiento inicial de células de mamífero o la carga de aminoácidos):

Componente	Concentración final de cultivo (mg/litro)
L-asparagina:	812 mg/litro
L-prolina	216 mg/litro
L-isoleucina	370 mg/litro
L-cisteína-HCl	224 mg/litro
L-leucina	332 mg/litro
L-treonina	164 mg/litro
L-tirosina	198 mg/litro
L-arginina	186 mg/litro
L-acido aspártico	71 mg/litro
L-acido glutámico	126 mg/litro
Glicina	57 mg/litro
L-histidina	125 mg/litro
L-metionina	132 mg/litro
L-triptófano	99 mg/litro
L-lisina	293 mg/litro
L-fenilalanina	174 mg/litro
L-valina	262 mg/litro
L-serina:	260 mg/litro
Fosfato de sodio monobásico:	288,2 mg/litro
Sulfato de cinc:	1,08 mg/litro
Sulfato cúprico:	0,0032 mg/litro
Vanadato de amonio:	0,00078 mg/litro
Cloruro de cobalto:	0,0025 mg/litro
Dicloruro de níquel hexahidrato:	0,0004 mg/litro
Molibdato de sodio deshidratado:	0,00016 mg/litro
Cloruro de estaño deshidratado:	0,00008 mg/litro
Tetrahidrato de cloruro de manganeso:	0,0003 mg/litro

Algunos componentes de la carga de nutrientes también se encuentran en otras cargas, tal como la carga de aminoácidos. Estas concentraciones finales de cultivo son de los componentes de la carga de nutrientes y no reflejan las concentraciones acumulativas de los componentes indicados tanto de la carga de aminoácidos como de la carga de nutrientes.

La glucosa se añade, por ejemplo, cuando la concentración de glucosa en el medio de cultivo cae por debajo de aproximadamente 1,5 g/litro y se añade L-glutamina, por ejemplo, cuando la concentración de glutamina en el medio de cultivo cae por debajo de aproximadamente 150 mg/litro.

3-Opcionalmente, cosechar las células 3M del medio de cultivo celular de producción, por ejemplo, cuando la

viabilidad es inferior al 60 %, eliminando las células del medio de cultivo (por ejemplo, bajando la temperatura de las células a aproximadamente 15 °C, añadiendo tampón fosfato de sodio para estabilizar el pH a aproximadamente 6,8 y centrifugando el medio de cultivo para eliminar las células). Si la proteína es secretada, el medio puede ser retenido para su posterior procesamiento, si la proteína no es secretada, las células 3M se pueden conservar para su posterior procesamiento.

Se puede usar cualquiera de varios métodos para eliminar las células 3M del medio, por ejemplo, por centrifugación. Por ejemplo, usando una centrífuga continua de apilamiento de disco, por ejemplo, con un caudal/sigma (cm/s) de aproximadamente 9,27 X 10^{-7}.

Adicionalmente, el medio se puede filtrar para eliminar las células 3M, por ejemplo, mediante filtración profunda con o sin centrífuga.

Por ejemplo, con una centrífuga, el proceso puede, en una realización de la divulgación, comprende el uso de un filtro de 8 ± 2 l de caldo/pie^2 (por ejemplo, filtro de celulosa cargada); sin una centrífuga, el proceso puede, en una realización de la divulgación, comprender el uso de un filtro de 20 ± 3 l de caldo/pie^2.

Además, el medio se puede filtrar a través de un filtro fino, por ejemplo, con un tamaño de poro de 0,2 micrómetros (por ejemplo, un filtro PVDF) y;

4-Opcionalmente purificar aún más la proteína, por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, cromatográficamente.

Opcionalmente, la osmolalidad del cultivo se desplaza a aproximadamente 400 mOsm a aproximadamente 500 mOsm (tratado en el presente documento). En una realización de la divulgación, este cambio se produce cuando las células tienen una densidad igual o superior a 1 X 10^6 células/ml.

Opcionalmente, la temperatura de la temperatura del cultivo celular 3M se desplaza a 33 °C a aproximadamente 35 °C (tratado en el presente documento). En una realización de la divulgación, este cambio se produce, entre los días 4 y 8, por ejemplo, cuando el cambio en la densidad celular viable durante un período de 24 horas es inferior al 10 %.

En una realización de la divulgación, la concentración de O_2 en el cultivo celular 3M, las condiciones de pH y temperatura se controlan y ajustan continuamente durante el crecimiento celular. En una realización de la divulgación, la concentración de O_2 se controla y se mantiene a aproximadamente 60 % durante el crecimiento celular; y/o el pH se controla y mantiene continuamente a aproximadamente 6,8 (por ejemplo, ± 0,02) durante el crecimiento celular; y/o la temperatura se controla y mantiene continuamente a aproximadamente 36,5 °C (por ejemplo, aproximadamente + 0,5 °C) durante el crecimiento celular.

El crecimiento celular 3M se puede realizar en cualquiera de varios sistemas. Por ejemplo, el crecimiento celular se puede hacer en un matraz simple, por ejemplo, un matraz de agitación de vidrio. Otros sistemas incluyen biorreactores de tanque, biorreactores de bolsa y biorreactores desechables. Un biorreactor de tanque incluye, normalmente, un recipiente de metal (por ejemplo, un recipiente con camisa de acero inoxidable) en el que las células crecen en un medio líquido. Los biorreactores de tanque se pueden usar para una amplia gama de volúmenes de cultivo (por ejemplo, 100 1, 150 1, 10000 1, 15000 1). Los biorreactores de tanque a menudo tienen características adicionales para controlar las condiciones de crecimiento celular, incluyendo medios para el control de la temperatura, agitación del media, control de las concentraciones de gas de lavado, control del pH, control de la concentración de O_2, eliminación de las muestras del medio, indicación y control de peso del reactor, limpieza del hardware, esterilización del hardware, uso de los tubos y canalización para brindar todos los servicios, adición del medio, control de pH, soluciones de control y gases de control, bombeo de fluidos estériles en el vaso de crecimiento y, control de supervisión y adquisición de datos. Las clasificaciones del biorreactor de tanque incluyen reactores de tanque agitado en el que se usan agitadores mecánicos (por ejemplo, impulsores) para mezclar el reactor para distribuir calor y materiales (como oxígeno y sustratos). Los reactores de columna de burbuja son reactores altos que usan aire solo para mezclar el contenido. Los reactores de elevación de aire son similares a los reactores de columna de burbuja, pero difieren en el hecho de que contienen un tubo de aspiración. El tubo de aspiración es normalmente un tubo interno que mejora la circulación y la transferencia de oxígeno e iguala las fuerzas de corte en el reactor. En los reactores de lecho fluidizado, las células están "inmovilizadas" en pequeñas partículas que se mueven con el fluido. Las partículas pequeñas crean una gran superficie para que las células se adhieran y permiten una alta tasa de transferencia de oxígeno y nutrientes a las células. En reactores de lecho empaquetado, las células se inmovilizan en partículas grandes. Estas partículas no se mueven con el líquido. Los reactores de lecho empaquetado son simples de construir y accionar, pero pueden sufrir bloqueos y una pobre transferencia de oxígeno. Un biorreactor desechable es un biorreactor desechable de un solo uso. A menudo, los biorreactores desechables poseen características similares a los biorreactores no desechables (por ejemplo, un sistema de agitación, rociado, sondas, puertos, etc.).

La presente divulgación incluye cualquier medio de cultivo líquido, que comprende una o más células 3M, generado por cualquiera de los procesos establecidos en el presente documento, incluyendo medios de cultivo que contienen 3M generados como intermedios durante la práctica de cualquiera de los métodos de cultivo celular tratados en el presente documento; por ejemplo, producidos por un proceso que comprende la inoculación de un medio de crecimiento inicial de células de mamífero, precalentado a aproximadamente 37 °C; en el que el medio comprende HEPES, tampones de bicarbonato de sodio, sales inorgánicas, aminoácidos no esenciales, insulina humana recombinante, oligoelementos y tensioactivos; y que no comprende L-glutamina, antibióticos, antimicóticos o componentes derivados de animales; con células 3M que expresan un anticuerpo inmunoglobulina de cadena ligera e

inmunoglobulina de cadena pesada, a una densidad celular de aproximadamente 2,5-5 X 10^5 células/ml; y, añadir los siguientes suplementos al medio antes, simultáneamente o inmediatamente después de dicha inoculación: hidrolizado de soja a una concentración final de aproximadamente 10 g/litro;
y, opcionalmente, una carga de aminoácidos en la que la concentración de los componentes añadidos por dicha carga de aminoácidos es aproximadamente la establecida a continuación:

L-arginina:	126,4 mg/litro
L-cistina:	34 mg/litro
L-histidina:	42 mg/litro
L-isoleucina:	52 mg/litro
L-leucina:	52 mg/litro
L-lisina:	72 mg/litro
L-metionina:	15,2 mg/litro
L-fenilalanina:	33 mg/litro
L-treonina:	47,6 mg/litro
L-triptófano:	10,2 mg/litro
L-tirosina:	36 mg/litro
L-valina:	46,8 mg/litro
L-alanina:	8,9 mg/litro
L-asparagina:	30 mg/litro
L-ácido aspártico:	26,6 mg/litro
L-ácido glutámico:	29,4 mg/litro
glicina:	15 mg/litro
L-prolina:	23 mg/litro
L-serina:	21 mg/litro

; y, cuando la densidad celular viable alcanza más de aproximadamente 1,2 X 10^6 células/ml, añadir cargas de suplementos en las que la concentración de los componentes añadidos por dichas cargas de suplementos son aproximadamente las establecidas a continuación:

selenito de sodio:	0,01426 mg/litro
Sulfato de adenina:	1,632 mg/litro
Adenosina:	17,6 mg/litro
Citidina:	17,6 mg/litro
Guanosina:	17,6 mg/litro
Uridina:	17,6 mg/litro
Hipoxantina:	11,8 mg/litro
L-citrulina:	12,6 mg/litro
L-ornitina-HCl:	25,6 mg/litro
Biotina:	0,28 mg/litro
Dinucleótido de flavina adenina:	0,05 mg/litro
Ácido fólico:	4,6 mg/litro
Ácido lipoico:	0,52 mg/litro
Niacina:	31,4 mg/litro
HCl de piridoxina:	3 mg/litro
Riboflavina:	1,86 mg/litro
HCl de tiamina:	16 mg/litro
Vitamina E:	0,376 mg/litro
Vitamina B12:	3,4 mg/litro
Cloruro de colina:	50,2 mg/litro
HCl de etanolamina:	4,4 mg/litro
i-inositol:	73,2 mg/litro
Timidina:	7,8 mg/litro

(continuación)

2HCl de putrescina:	0,4 mg/litro
Progesterona:	0,015 mg/litro
Pantotenato de D-calcio:	23,8 mg/litro
L-asparagina:	812 mg/litro
L-prolina	216 mg/litro
L-isoleucina	370 mg/litro
L-cisteína-HCl	224 mg/litro
L-leucina	332 mg/litro
L-treonina	164 mg/litro
L-tirosina	198 mg/litro
L-arginina	186 mg/litro
L-acido aspártico	71 mg/litro
L-acido glutámico	126 mg/litro
Glicina	57 mg/litro
L-histidina	125 mg/litro
L-metionina	132 mg/litro
L-triptófano	99 mg/litro
L-lisina	293 mg/litro
L-fenilalanina	174 mg/litro
L-valina	262 mg/litro
L-serina:	260 mg/litro
Fosfato de sodio monobásico:	288,2 mg/litro
Sulfato de cinc:	1,08 mg/litro
Sulfato cúprico:	0,0032 mg/litro
Vanadato de amonio:	0,00078 mg/litro
Cloruro de cobalto:	0,0025 mg/litro
Dicloruro de níquel hexahidrato:	0,0004 mg/litro
Molibdato de sodio deshidratado:	0,00016 mg/litro

; y, durante el crecimiento celular, añadir glucosa al medio cuando los niveles de glucosa caen por debajo de aproximadamente 1,5 g/litro y añadir L-glutamina cuando los niveles de L-glutamina caen por debajo de aproximadamente 150 mg/litro; y

durante el crecimiento celular mantener la concentración de O_2 aproximadamente al 60 %; pH a aproximadamente 6,8 ± 0,02 y temperatura a aproximadamente 36,5 °C ± 0,5 °C; por ejemplo, en el que el medio comprende células que han alcanzado aproximadamente el 60 % de viabilidad.

Ejemplos

Los presentes ejemplos pretenden ilustrar la presente invención y no ser una limitación de la misma.

<u>Ejemplo 1:</u> Generación de línea celular 3M

Se han realizado intentos fallidos previos para preadaptar las líneas celulares del huésped CHO para un crecimiento eficiente en medios libres de suero. Se realizó un intento para adaptar gradualmente las células huésped en IS-CHO-V (un medio de cultivo celular disponible comercialmente que no contiene componentes animales; disponible en Irvine Scientific; Santa Ana, CA) medio libre de suero en suspensión durante 56 días y luego volver a adaptarse al medio que contiene suero en la unión. La línea celular se denominó DXB-IS-A (también conocida como ISA).

En otro intento, una nueva formulación de medios sin proteínas sin suero, C5467, desarrollada por Sigma-Aldrich Inc. se adaptó para aumentar la producción de anticuerpos para clones seleccionados. Por lo tanto, se intentó adaptar gradualmente las células huésped medio Sigma C5467 en suspensión durante 41 días y, a continuación, volver a adaptarlas al medio que contiene suero en la unión. La línea celular generada con este método se denominó DXB-Sig-A. Esta línea celular se comparó con ISA. Se compararon el crecimiento y la viabilidad celulares, durante la adaptación de la suspensión al medio C5467, de las líneas celulares transfectadas derivadas de DXB-Sig-A y de la línea celular ISA. Sin embargo, se descubrió que la línea celular DXB-Sig-A era todavía más difícil que ISA para adaptarse al medio C5467.

Además, se realizó un intento de simular la estrategia recién desarrollada adaptando de forma brusca las células

huésped en medio Sigma C5467 modificado en suspensión durante 83 días. La línea celular generada con este método se denominó huésped DXB (3 meses). Esta nueva línea celular tuvo un rendimiento similar al de ISA. Se compararon el crecimiento y la viabilidad celulares durante la adaptación de la suspensión al medio C5467 modificado, de las líneas celulares transfectadas derivadas del huésped DXB (3 meses) y la línea celular ISA.

Se concluyó que un nuevo enfoque, aparte de la mera adaptación sin suero, era necesario para hacer estas células más robustas. El enfoque de la presente divulgación se realizó subclonando el huésped DXB (3 meses) en medio C5467 en placas de 96 pocillos dos veces para garantizar la pureza, la recuperabilidad, la estabilidad y la consistencia en el rendimiento en un ambiente libre de suero. Se descubrió que la nueva línea celular que se hizo, 3M (también conocida como "DXBHost 2XSusp"), era superior a ISA cuando se transformaba con construcciones de expresión anti-IL23, anti-HGF o cino-anti-TSLP, en términos de crecimiento celular, recuperación de clones y la tasa de clones exitosos que crecen y producen cantidades deseables de anticuerpos en condiciones de suspensión sin suero.

Materiales y métodos

Descongelación celular. Para revivir las células huésped DXB11 CHO (3 meses) para la expansión, un vial congelado se sumergió parcialmente en un baño de agua circulante a 37 °C hasta que el contenido se descongeló (aproximadamente 1-2 min). A continuación, el contenido se transfirió a un matraz T75 con 20 ml de medio del huésped y luego se cultivó. Se realizó un intercambio de medio con medio huésped nuevo al día siguiente.

Subclonación. Cuando las células en el matraz T75 alcanzaron aproximadamente el 90 % de confluencia, las células se digirieron con tripsina y se resuspendieron en 8 ml de medio huésped. Se centrifugaron cuatro ml de la suspensión celular a 1000 rpm durante 15 minutos. El sedimento celular se resuspendió con 4 ml de medio huésped sin suero y se diluyeron dos veces en serie 100 ul de suspensión celular en cada pocillo en las 8 filas de una placa de 96 pocillos que contenía 100 ul de medio en cada pocillo. Cada pocillo de la placa de 96 pocillos se suplementó con 100 ul adicionales de medio huésped nuevo libre de suero. Las placas se incubaron a 37 °C en una incubadora de CO_2 al 7,5 % con alta humedad durante 2 semanas. Las células de los pocillos en el punto final de dilución de cada fila se cosecharon y se transfirieron a matraces T25 que contenían 2 ml de medio huésped sin suero. Los matraces T-25 se mantuvieron en una incubadora a 37 °C con 7,5 % de CO_2 y se agitaron a 70 rpm en un agitador orbital durante una semana. Las células de los matraces T-25 se subclonaron en placas de 96 pocillos y se volvieron a escalar a matraces T25 con los procedimientos descritos anteriormente.

Expansión celular. Dos ml de células en un matraz T25 se transfirieron a un matraz T75 con 5 ml de medio huésped sin suero y se agitaron a 70 rpm durante 4 días. Luego, las células se transfirieron a matraces de agitación para escalar, es decir, 18 ml para matraz de 125 ml, 45 ml para un matraz de 250 ml y 135 ml para un matraz de 500 ml, y se agitaron a 105 rpm.

Preparación del banco celular. Cuando las células en el matraz de agitación de 500 ml alcanzaron una densidad de 1,7 x 10^6 células/ml, las células se cosecharon y centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 20 ml de medio de congelación. Las células se dividieron en alícuotas en veinte CryoTubes de 1,8 ml, se cargaron en un recipiente de congelación y se colocaron en un congelador a -80 °C durante la noche. A continuación, los viales congelados se transfirieron a un congelador de nitrógeno líquido para su almacenamiento a largo plazo.

Tabla 1. Lista de medios (véase en la Tabla 2 la Lista de componentes o productos químicos)

Nombre del medio	Componentes
Medio de crecimiento (término general para los medios utilizados para cultivar células huésped o células transfectadas, ya sea en modo adherente o en suspensión).	El medio de crecimiento podría ser medio huésped o medio huésped libre de suero.
Medio huésped	MEMα + con 10 % de cFBS
Medio huésped sin suero	JRH ImMEDIAte ADVANTAGE 65778 con 40 ml/l de glutamina, 10 ml/l de HT, 20 ml/l de GSEM, 1 ml/l de traza A, 1 ml/l de traza B, 1 ml/l de lípidos CD, 1 ml/l de mezcla 1
Medio de congelación	Medio de crecimiento (añadir 10 % de suero si no tiene suero) ± 10 % de DMSO

Tabla 2. Lista de materiales utilizados

Componente o nombre químico	Comentarios
MEMα + = Medio esencial mínimo con nucleótidos y nucleósidos	(Gibco n.º CAT 12571-063)
cFBS * = Suero bovino fetal caracterizado, irradiado con γ	HyClone n.º cat. SH30071.03

(continuación)

Componente o nombre químico	**Comentarios**
JRH ImMEDIAte ADVANTAGE 65778 = SAFC C5467-44 (sin ATA (ácido aurina tricarboxílico), sin L-Glutamina).	SAFC n.º de cat. 65778-1000M3367
Solución de glucosa al 45 %	Sigma n.º de cat. G8769
Glutamina (200 mM)	Gibco n.º de cat. 25030-081
HT = Suplemento HT (100X) - mezcla de hipoxantina de sodio y timidina	Gibco n.º de cat. 11067-030
GSEM = Suplemento GSEM (50X)	SIGMA n.º de cat. G9785
Mezcla 1 = CHO Kit 2 Quelante de hierro	SIGMA
Traza A = Oligoelementos A (1000X)	Cellgro n.º de cat. 99-182-C
Traza B = Oligoelementos B (1000X)	Cellgro n.º de cat. 99-175-CI
Lípido CD = Concentrado de lípidos definido químicamente	Gibco n.º de cat. 11905-031
Tripsina = Tripsina-EDTA (1X)	Gibco n.º de cat. 25300-054
DMSO = Dimetilsulfóxido	Sigma n.º de cat. 2650

Oligoelementos A (1000X)

1,6 mg/l de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
863,00 mg/l de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
17,30 mg/l de Selenita • 2Na
1155,10 mg/l de citrato férrico

Oligoelementos B (1000X)

0,17 mg/l de $MnSO_4 \cdot H_2O$
140,00 mg/l de $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$
1,24 mg/l de ácido molibdico,
Sal de amonio
0,65 mg/l de NH_4VO_3
0,13 mg/l de $NiSO_4 \cdot 6H_2O$
0,12 mg/l de SnCl (anhidro)

Concentrado de lípidos definido químicamente

2 mg/l de ácido araquidónico 220 mg/l de colesterol
70 mg/l de acetato de DL-alfa-tocoferol
100 % alcohol etílico
10 mg/l de ácido linoleico
10 mg/l de ácido linolénico
10 mg/l de ácido mirístico
10 mg/l de ácido oleico
10 mg/l de ácido palmítico
10 mg/l de ácido palmitoleico
90000 mg/l de Pluronic F-68
10 mg/l de ácido esteárico
2200 mg/l de Tween 80®

Suplemento GSEM

450,0 mg/l de L-alanina; 4261,0 mg/l de L-asparagina · H_2O; 650,0 mg/l de L-ácido aspártico; 3750,0 mg/l de L-ácido glutámico; 575,0 mg/l de L-prolina; 500,0 mg/l de L-serina; 350,0 mg/l de adenosina; 350,0 mg/l de guanosina; 350,0 mg/l de citidina; 350,0 mg/l de uridina; y 12,0 mg/l de timidina.

Tabla 3. Equipo de laboratorio y suministros

Equipos de laboratorio y suministros	Número de catálogo, parte o modelo
Contador CEDEX = Analizador de cultivo celular automatizado CEDEX	Innovatis
Incubador de 7,5 % de CO_2	Forma Scientific Modelo n.º 3950
Agitador orbital	Forma Scientific Modelo n.º 416
Centrífuga de mesa Allegra-6R	Beckman Modelo n.º 366816
Biocongelador -80 °C	Forma Scientific Modelo n.º 8584
Nitrógeno líquido Cryo plus 3 congelador	Forma Scientific Modelo n.º 7404
Baño de agua circulante	Modelo de precisión n.º 51221035
Placas de 96 pocillos	Falcon n.º cat. 353072
Matraces T-25	Corning n.º cat. 430639
Matraces T-75	Corning n.º cat. 430725
Matraz de agitación de 125 ml	Corning n.º cat. 431143
Matraz de agitación de 250 ml	Corning n.º cat. 431144
Matraz de agitación de 500 ml	Corning n.º cat. 431145
Matraz de agitación 1 l	Corning n.º cat. 431147
CryoTube de 1,8 ml	Nunc n.º cat. 368632
Tubo cónico de 15 ml	Falcon n.º cat. 352097
Contenedor de congelación = Contenedor de congelación de velocidad controlada = Mr. Escarchado.	Nalgene n.º de cat. 5100-0001

Resultados y análisis

La línea celular 3M (DXBHost 2XSusp) se comparó con la antigua línea celular huésped estándar ISA (DXB-IS-A) en el rendimiento del potencial de crecimiento celular y la producción de anticuerpos.
El potencial de crecimiento celular se evaluó en la etapa de célula huésped (es decir, antes de transfectar y subclonar) para evitar las variaciones clonales. El potencial de producción de anticuerpos de estas dos líneas celulares se evaluó en la etapa de clonación (es decir, después de 19 días de incubación en 96 pocillos después de la transfección) y también después de la adaptación a la suspensión en medios sin suero.

3M tenía un mejor potencial de crecimiento celular que ISA. Se sembraron células 3M e ISA a 0,5 x 10^6 células/ml con 60 ml de medio huésped sin suero en matraces de agitación de 250 ml. Los matraces se agitaron a 105 rpm hasta que la viabilidad celular alcanzó justo por debajo del 40 %. En modo discontinuo (como se muestra en la Figura 1), las células 3M alcanzaron una mayor densidad celular (2,3 x 10^6 células/ml frente a 1,7 x 10^6 células/ml) y duraron más tiempo de cultivo (20 días frente a 10 días) que las células ISA. Esto significa que las células 3M eran más robustas que las células ISA en condiciones de suspensión sin suero. En teoría, si la productividad específica de anticuerpos es la misma para ambas líneas celulares después de la transfección, 3M produciría más anticuerpos que ISA debido a la mayor densidad y longevidad de las células.

La eficiencia de recuperación de la clonación de las líneas celulares 3M e ISA se comparó después de la transfección con vectores que codifican cadenas de inmunoglobulina murina anti-IL17. Esto se hizo contando el número de clones, incluyendo múltiples clones en pocillos individuales, recuperados de cinco placas de 96 pocillos con la misma densidad celular de siembra. Como se muestra en la Figura 2, el número de clones recuperados de cinco placas de 96 pocillos fue 58 para 3M y solo 17 para ISA. El recuento de clones múltiples se realizó solo una vez. 3M tuvo una mejor eficiencia de recuperación de clonación que ISA en todos los demás proyectos (es decir, anticuerpo anti-IL23, factor de crecimiento anti-hepatocitos y anti-TSLP de cino).

Tanto las células 3M como ISA se transfectaron usando los vectores que contenían ADNc para la selección de marcadores (es decir, resistencia a dhfr Y A HIGROMICINA B) y para las Cadenas libera de anticuerpo y pesada de inmunoglobulina. Los títulos de anticuerpos en 96 pocillos después de la subclonación durante 19 días entre los huéspedes 3M e ISA se compararon para tres construcciones de expresión, anti-IL23 (3 versiones de ADNc), anti-HGF y cino-anti-TSLP.

Como se muestra en la Figura 3, en los casos de las versiones 2 y 3 de anti-IL-23, la distribución de títulos de 3M fue

solo ligeramente superior a la de ISA (en el intervalo inferior). En los casos de la versión 1 de anti-IL23, cino-anti-TSLP y la primera transfección de anti-HGF, la distribución de los títulos de 3M fue mucho mayor que la de ISA. Mientras, para la segunda transfección de anti-HGF, la distribución del título se invirtió, es decir, SA fue ligeramente más alto que la de 3M. Por tanto, la distribución de los títulos de 3M fue estadísticamente mayor que la de ISA. Sin embargo, sí había excepciones. La razón de las excepciones puede ser que las comparaciones se realizaron en modo de unión (es decir, en las que las células se cultivaron en matraces T75 en cultivo adherente que contenía medio con suero, en lugar de crecer en matraces con agitación en condiciones de suspensión en un medio sin suero); por lo tanto, la ventaja de la robustez (obtenida mediante la adaptación de la suspensión libre de suero y la clonación) de 3M puede no haber sido evidente en esta etapa de subclonación en 96 pocillos.

Una comparación clave entre 3M e ISA se encuentra en la etapa final del desarrollo de la línea celular, es decir, en modo de suspensión sin suero. Dado que, en este momento, solo se puede seleccionar un número limitado de clones debido a su buen crecimiento y productividad de anticuerpos sostenible, los inventores compararon la cantidad de clones exitosos de 3M e ISA en diferentes proyectos. Se definieron clones exitosos, en este caso, como líneas celulares con buen crecimiento celular y productividad específica relativamente alta y estable en suspensión sin suero durante más de 40 generaciones. Como se describe a continuación, se descubrió que la mayoría de los clones exitosos de tres proyectos principales provenían de 3M, en lugar de ISA:

Para anti-IL23, se probaron 3 versiones de ADNc.

1) Para la versión 1, anti-IL23, el único clon exitoso fue de 3M con una productividad específica de 8 pcd (picogramos por célula por día) de inmunoglobulina;
2) Para la versión 2, anti-IL23, 6 de 7 clones exitosos eran de 3M (Figura 4). La productividad específica en pcd para estos clones 3M fue 28, 25, 22, 13 y 8. Un clon ISA tenía una productividad específica de 12 pcd de inmunoglobulina, que era bajo en comparación con el de los clones 3M.
3) Para la versión 3, anti-IL-23, los 5 clones exitosos fueron de 3M. La productividad específica en pcd de inmunoglobulina para estos clones 3M fue 25, 21, 19, 15 y 10.

Para anti-HGF, se generaron versiones no optimizadas y optimizadas del gen. Los factores que afectan a la estabilidad del ARNm, por ejemplo, en el contenido en GC, sitios de unión a ribosomas, consenso y sitios de corte y empalme crípticos, repeticiones y estructuras secundarias, se consideraron durante la optimización de genes.

1) Para las versiones no optimizadas, los dos clones exitosos fueron de 3M. Un clon de ISA creció muy bien en suspensión sin suero, sin embargo, la productividad específica cayó, hasta volverse insignificante, en solo unas pocas generaciones.
2) Para las versiones optimizadas, las líneas celulares transfectadas no solo producían más anticuerpos sino que también eran estables durante generaciones más largas.

De las observaciones descritas anteriormente, los inventores concluyeron que 3M es un huésped superior en comparación con ISA para el desarrollo de líneas celulares en la producción de anticuerpos terapéuticos, inmunoglobulinas y otras proteínas, particularmente proteínas de interés terapéutico.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Schering Corporation

<120> Línea celular 3M

<130> UB2009.7044 <160> 104

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
1               5                   10                  15

Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Val Pro Asp Phe Gln Ser Val
            20                  25                  30

Thr Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
        35                  40                  45

Gly Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys
    50                  55                  60

Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg
65                  70                  75                  80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser
                85                  90                  95

Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Arg
            100                 105                 110

Leu Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
        115                 120                 125
```

<210> 2
<211> 137
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1               5                   10                  15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His
            20                  25                  30
```

```
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
        35                  40                  45

Ser Ser Phe Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Ile Ser Val Ile Asp Thr Arg Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
65                  70                  75                  80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
                85                  90                  95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr
            100                 105                 110

Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Asn Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
        115                 120                 125

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
    130                 135
```

<210> 3
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

```
Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
1               5                  10                  15

Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val
            20                  25                  30

Thr Pro Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
        35                  40                  45

Gly Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
    50                  55                  60

Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg
65                  70                  75                  80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
                85                  90                  95

Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Arg
            100                 105                 110

Leu Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr

            115                 120                 125
```

<210> 4
<211> 128
<212> **PRT**
<213> Homo sapiens

<400> 4

```
Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
1               5                  10                  15

Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val
            20                  25                  30

Thr Pro Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
        35                  40                  45

Gly Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
    50                  55                  60

Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg
65                  70                  75                  80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
                85                  90                  95

Leu Glu Ala Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Arg
            100                 105                 110

Leu Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
        115                 120                 125
```

<210> 5
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

```
Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
1               5                  10                  15

Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Val
            20                  25                  30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
        35                  40                  45

Gly Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
    50                  55                  60
```

Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Leu Ser Gly Ile Pro Asp Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Arg
100 105 110

Leu Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

<210> 6
<211> 128
<212> **PRT**
<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
1 5 10 15

Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Val
20 25 30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
35 40 45

Gly Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
50 55 60

Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Leu Ser Gly Ile Pro Asp Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Arg
100 105 110

Leu Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

<210> 7
<211> 137
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

```
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1               5                  10                  15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
            20                  25                  30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
        35                  40                  45

Ser Ser Phe Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Ile Ser Val Ile Asp Thr Arg Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
65                  70                  75                  80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
                85                  90                  95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
            100                 105                 110

Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Asn Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
        115                 120                 125

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
    130                 135
```

<210> 8
<211> 137
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

```
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1               5                  10                  15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
        35                  40                  45

Ser Ser Phe Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Ile Ser Val Ile Asp Thr Arg Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
65                  70                  75                  80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
                85                  90                  95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr

            100                 105                 110

Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Asn Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
        115                 120                 125

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
    130                 135
```

<210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 9

```
Lys Ala Ser Lys Lys Val Thr Ile Phe Gly Ser Ile Ser Ala Leu His
1               5                  10                  15
```

<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 10

Asn Gly Ala Lys Leu Glu Ser
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 11

Leu Gln Asn Lys Glu Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 12

Ser Tyr Gly Ile Thr
1 5

<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 13

Glu Asn Tyr Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 14

Cys Glu Phe Ile Ser Thr Val Val Ala Pro Tyr Tyr Tyr Ala Leu Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 15

Ser Glu Phe Ile Ser Thr Val Val Ala Pro Tyr Tyr Tyr Ala Leu Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 16

Ala Glu Phe Ile Ser Thr Val Val Ala Pro Tyr Tyr Tyr Ala Leu Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 17
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 17

Val Glu Phe Ile Ser Thr Val Val Ala Pro Tyr Tyr Tyr Ala Leu Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 18

Ser Glu Phe Ile Ser Thr Val Met Ala Pro Tyr Tyr Tyr Ala Leu Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 19

Ser Glu Phe Thr Ser Thr Val Val Ala Pro Tyr Tyr Tyr Ala Leu Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 20
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena ligera de Ig

<400> 20

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Ile Pro Phe
85 90 95

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

<210> 21
<211> 116

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada de Ig

<400> 21

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 22
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cadena pesada de Ig

<400> 22

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

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

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

Gly Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Leu
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 23

```
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser
1               5                   10
```

<210> 24
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 24

```
Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1               5                   10                  15

Gly
```

<210> 25
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 25

Asp Asn His Ala Tyr Asp Arg Gly Pro Phe Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 26

Lys Ser Ser Gln Asn Leu Phe Tyr Arg Ser Asn Gln Lys Asn His Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 27

Trp Thr Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 28

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 29
<211> 5
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 29

Ala Tyr Gly Met Asp
1 5

<210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 30

Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Arg Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 31
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 31

Asp Leu Gly Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 32

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 33

Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 34
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 34

Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Leu Phe Tyr Val
1 5 10

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 35

Gly Lys Thr Phe Trp Ser Trp Gly Ile Asn
1 5 10

<210> 36
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 36

Tyr Ile Tyr Ile Gly Thr Gly Tyr Thr Glu Pro Asn Pro Lys Tyr Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 37

Ile Gly Gly Tyr Tyr Gly Asn Phe Ala Asp
1 5 10

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 38

Ile Gly Gly Tyr Tyr Gly Asn Phe Asp Gln
1 5 10

<210> 39
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 39

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ile Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 40
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 40

Leu Val Ser Lys Leu Asp Gln
1 5

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 41

Trp Gln Gly Thr Tyr Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 42
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera de Ig

<400> 42

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Phe Ser
20 25 30

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

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Thr Ser Thr Arg Gln Ser Gly Val
50 55 60

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

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

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

Lys Arg

<210> 43
<211> 124
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada de Ig

<400> 43

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

```
1               5                   10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Pro Ser His
            20                  25                  30

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

Gly Ile Ile Trp Asn Gln Gly Gly Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Phe Lys
    50                  55                  60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Asn Ala Tyr Ile Thr Asp Tyr Tyr Tyr Glu Asn Tyr Phe Met Asp
            100                 105                 110

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

<210> 44
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 44

```
Thr Tyr Trp Met His
1               5
```

<210> 45
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 45

```
Thr Tyr Trp Met His
1               5
```

<210> 46
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 46

Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 47
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 47

Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 48
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 48

Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 49

Asn Tyr Val Gly Ser Ile Phe Asp Tyr
1 5

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 50

Asn Tyr Val Gly Ser Ile Phe Asp Tyr
1 5

<210> 51
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 51

Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Ser Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 52
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 52

Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Ser Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 53

Gly Ala Ser Asn Arg Asn Thr
1 5

<210> 54
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 54

Gly Ala Ser Asn Arg Asn Thr
1 5

<210> 55

<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 55

Gly Ala Ser Asn Arg Glu Ser
1 5

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 56

Gly Gln Ser Tyr Asn Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR

<400> 57

Gly Gln Ser Tyr Asn Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 58
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada de Ig

<400> 58

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

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

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

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

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

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

Arg Ala Pro Asn Trp Gly Ser Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 59
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera de Ig

<400> 59

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
            100                 105
```

<210> 60
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada de Ig

<400> 60

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Ser Val Ser Ser
        115
```

<210> 61
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera de Ig

<400> 61

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

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

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

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

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

```
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro
                85                  90                  95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys
            100                 105
```

<210> 62
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada de Ig

<400> 62

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Leu Gly Trp Ser Asp Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
            100                 105                 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 63
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera de Ig

<400> 63

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105
```

<210> 64
<211> 130
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada de Ig

<400> 64

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ala Pro Leu Arg Phe Leu Glu Trp Ser Thr Gln Asp His Tyr
            100                 105                 110

Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val
        115                 120                 125

                            Ser Ser
                                130
```

<210> 65
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera de Ig

<400> 65

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

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

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

Gly Glu Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65                  70                  75                  80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Lys Ser Arg Asp Gly Ser Gly Gln His
                85                  90                  95

Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
            100                 105
```

<210> 66
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada de Ig

<400> 66

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
            20                  25                  30

Asn Trp Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
        35                  40                  45
```

```
Ile Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Trp Thr Gly Arg Thr Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Trp Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 67
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera de Ig

<400> 67

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
            20                  25                  30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

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

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

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

Thr His Trp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 68
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada de Ig

<400> 68

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Gly Gly
            20                  25                  30

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu
    50                  55                  60

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

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

Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 69
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera de Ig

<400> 69

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
            20                  25                  30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr Gly Val Pro
    50                  55                  60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
                85                  90                  95

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 70
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn
            20                  25                  30

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

Ile Tyr Arg Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65                  70                  75                  80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
                85                  90                  95

Ser Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
            100                 105                 110
```

<210> 71

<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Ser Gly Gly Thr Asn Phe Pro Arg Glu Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Asp Gln Met Val His Gly Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 72
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Ser Gly Gly Thr Asn Phe Pro Arg Glu Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Asp Glu Met Gln Asn Gly Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 73
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 73

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Ser Gly Gly Thr Asn Phe Pro Arg Glu Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Asp Glu Met Thr Arg Gly Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 74
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 74

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Ser Gly Gly Thr Asn Phe Pro Arg Glu Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Asp Glu Met His Val Gly Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

                    Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                            115
```

<210> 75
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Ser Gly Gly Thr Asn Phe Pro Arg Glu Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Asp Glu Met Val Trp Gly Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 76
<211> 99
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 76

```
Met Lys Val Ser Ala Ala Leu Leu Cys Leu Leu Leu Ile Ala Ala Thr
1               5                  10                  15

Phe Ile Pro Gln Gly Leu Ala Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val
            20                  25                  30

Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu
        35                  40                  45

Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val
    50                  55                  60

Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln
65                  70                  75                  80

Lys Trp Val Gln Asp Ser Met Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr
                85                  90                  95

Pro Lys Thr
```

<210> 77
<211> 76
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77

```
Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr
1               5                  10                  15

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

Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala
        35                  40                  45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Met
    50                  55                  60

Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr Pro Lys Thr
65                  70                  75
```

<210> 78
<211> 233
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78

```
Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro
1               5                   10                  15

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
            20                  25                  30

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
        35                  40                  45

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
    50                  55                  60

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
65                  70                  75                  80

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
                85                  90                  95

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
            100                 105                 110

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
        115                 120                 125

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
    130                 135                 140

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
145                 150                 155                 160

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
                165                 170                 175

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
            180                 185                 190

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
        195                 200                 205

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
    210                 215                 220

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225                 230
```

<210> 79
<211> 219
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> inmunoglobulina humanizada

<400> 79

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
            20                  25                  30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr Gly Val Pro
    50                  55                  60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
                85                  90                  95

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
        115                 120                 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
    130                 135                 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145                 150                 155                 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
                165                 170                 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
            180                 185                 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
        195                 200                 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 80
<211> 447
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> inmunoglobulina humanizada

<400> 80

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly
            20                  25                  30

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu
```

```
    50                  55                  60

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

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

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
        115                 120                 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
    130                 135                 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145                 150                 155                 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
                165                 170                 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
            180                 185                 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
        195                 200                 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
    210                 215                 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225                 230                 235                 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                245                 250                 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
            260                 265                 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
        275                 280                 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    290                 295                 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305                 310                 315                 320
```

```
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
                325                 330                 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
            340                 345                 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
        355                 360                 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    370                 375                 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385                 390                 395                 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
                405                 410                 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
            420                 425                 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440                 445
```

<210> 81
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> inmunoglobulina

<400> 81

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

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

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

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

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

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

                85                  90                  95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 82
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> inmunoglobulina

<400> 82

```
Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Tyr
1               5                   10
```

<210> 83
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> inmunoglobulina

<400> 83

```
Trp Ile Asp Pro Gly Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1               5                   10                  15

Gly
```

<210> 84
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> inmunoglobulina

<400> 84

Glu Arg Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 85
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> inmunoglobulina

<400> 85

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

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

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

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

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

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

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

<210> 86
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> inmunoglobulina

<400> 86

Arg Ala Ser Gln Tyr Val Gly Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 87
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> inmunoglobulina

<400> 87

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 88
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> inmunoglobulina

<400> 88

Gln Val Trp Asp Ser Ser Pro Pro Val Val
1 5 10

<210> 89
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> inmunoglobulina

<400> 89

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

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

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

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

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

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

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

<210> 90
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> inmunoglobulina

<400> 90

```
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Arg Tyr Leu Thr
1               5                   10
```

<210> 91
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> inmunoglobulina

<400> 91

```
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1               5
```

<210> 92
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> inmunoglobulina

<400> 92

Gln Ala Tyr Asp Tyr Ser Leu Ser Gly Tyr Val
1 5 10

<210> 93
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> inmunoglobulina

<400> 93

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Tyr Gly Tyr Tyr Leu Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 94
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> inmunoglobulina

<400> 94

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met His
1 5 10

<210> 95

<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> inmunoglobulina

<400> 95

Arg Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 96
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> inmunoglobulina

<400> 96

Tyr Gly Tyr Tyr Leu Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 97
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> inmunoglobulina

<400> 97

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 98
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> inmunoglobulina

<400> 98

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 99
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> inmunoglobulina

<400> 99

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Ala Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 100
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> inmunoglobulina

<400> 100

Gly Ile Ile Thr Glu Ile Ala Glu Asp Phe
1 5 10

<210> 101

<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> inmunoglobulina

<400> 101

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

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

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

His Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

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

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

<210> 102
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> inmunoglobulina

<400> 102

```
Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala Val Val
1               5                   10
```

<210> 103
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> inmunoglobulina

<400> 103

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser

1 5

<210> 104
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> inmunoglobulina

<400> 104

Gln Gln Tyr Lys Gln Tyr Pro Tyr Thr
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una célula aislada de ovario de hámster chino depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo con el número de depósito PTA-10481.

2. La célula de la reivindicación 1 en un medio de cultivo celular líquido acuoso.

3. La célula de las reivindicaciones 1 o 2 en un recipiente.

4. Un banco de células maestro o banco de células de trabajo que comprende la célula de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

5. La célula de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en un medio de congelación celular.

6. La célula de la reivindicación 5 en la que el medio de congelación celular comprende dimetilsulfóxido.

7. La célula de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que comprende un vector.

8. La célula de la reivindicación 7 en la que el vector comprende un polinucleótido que codifica una o más proteínas.

9. La célula de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que comprende una proteína que es una inmunoglobulina que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-8, 21, 22, 42, 43, 58-69, 79, 80, 81, 85, 89, 93 y 101 o un fragmento maduro de la misma o una inmunoglobulina que comprende una o más CDR de dicha inmunoglobulina; opcionalmente unido a una cadena constante de inmunoglobulina; o una o ambas cadenas de etanercept.

10. La célula de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que comprende una proteína que es una cadena de inmunoglobulina que comprende:

(1)

CDR-L1: KASKKVTIFGSISALH (SEQ ID NO: 9),
CDR-L2: NGAKLES (SEQ ID NO: 10) y
CDR-L3: LQNKEVPYT (SEQ ID NO: 11);

(2)

CDR-H1: SYGIT (SEQ ID NO: 12),
CDR-H2: ENYPRSGNTYYNEKFKG (SEQ ID NO: 13) y
CDR-H3: CEFISTVVAPYYYALDY (SEQ ID NO: 14) o SEFISTVVAPYYYALDY (SEQ ID NO: 15) o AEFISTVVAPYYYALDY (SEQ ID NO: 16) o VEFISTVVAPYYYALDY (SEQ ID NO: 17) o SEFISTVMAPYYYALDY (SEQ ID NO: 18) o SEFTSTVVAPYYYALDY (SEQ ID NO: 19);

(3)

CDRH1: Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser (SEQ ID NO: 23),
CDRH2: Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly (SEQ ID NO: 24) y
CDRH3: Asp Asn His Ala Tyr Asp Arg Gly Pro Phe Phe Asp Tyr (SEQ ID NO: 25);

(4)

CDRL1: Lys Ser Ser Gln Asn Leu Phe Tyr Arg Ser Asn Gln Lys Asn His Leu Ala (SEQ ID NO: 26),
CDRL2: Trp Thr Ser Thr Arg Glu Ser (SEQ ID NO: 27) y
CDRL3: Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Pro Thr (SEQ ID NO: 28);

(5)

CDRH1: Ala Tyr Gly Met Asp (SEQ ID NO: 29),
CDRH2: Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Arg Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly (SEQ ID NO: 30) y
CDRH3: Asp Leu Gly Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val (SEQ ID NO: 31);

(6)

CDRL1: Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser (SEQ ID NO: 32),
CDRL2: Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser (SEQ ID NO: 33) y
CDRL3: Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Leu Phe Tyr Val (SEQ ID NO: 34);

(7)

CDRH1: GKTFWSWGIN (SEQ ID NO: 35),
CDRH2: YIYIGTGYTEPNPKYKG (SEQ ID NO: 36) y
CDRH3: IGGYYGNFAD (SEQ ID NO: 37) o IGGYYGNFDQ (SEQ ID NO: 38);

(8)

CDRL1: RSSQSLLISGGNTYLN (SEQ ID NO: 39),
CDRL2: LVSKLDQ (SEQ ID NO: 40) y
CDRL3: WQGTYFPLT (SEQ ID NO: 41);

(9)

CDRH1: TYWMH (SEQ ID NO: 44) o TYWMH (SEQ ID NO: 45),
CDRH2: EINPTNGHTNYNEKFKS (SEQ ID NO: 46), EINPTNGHTNYNPSFQG (SEQ ID NO: 47) o EINPTNGHTNYNQKFQG (SEQ ID NO: 48) y
CDRH3: NYVGSIFDY (SEQ ID NO: 49) o NYVGSIFDY (SEQ ID NO: 50);

(10)

CDRL1: KASENVVSYVS (SEQ ID NO: 51) o KASENVVSYVS (SEQ ID NO: 52),
CDRL2: GASNRNT (SEQ ID NO: 53), GASNRNT (SEQ ID NO: 54) o GASNRES (SEQ ID NO: 55) y
CDRL3: GQSYNYPYT (SEQ ID NO: 56) o GQSYNYPYT (SEQ ID NO: 57);

(11)

CDRH1: GYTFSSYGMY (SEQ ID NO: 82);
CDRH2: WIDPGSGGTKYNEKFKG (SEQ ID NO: 83); y
CDRH3: ERYGYYFDY (SEQ ID NO: 84);

(12)

CDRL1: RASQYVGSYLN (SEQ ID NO: 86);
CDRL2: DASNRAT (SEQ ID NO: 87); y
CDRL3: QVWDSSPPVV (SEQ ID NO: 88);

(13)

CDRL1: RASQDVSRYLT (SEQ ID NO: 90);
CDRL2: AASSLQS (SEQ ID NO: 91); y
CDRL3: QAYDYSLSGYV (SEQ ID NO: 92);

(14)

CDRH1: GYTFSSYWMH (SEQ ID NO: 94);
CDRH2: RIDPYNGGTKYNEKFKG (SEQ ID NO: 95); y
CDRH3: YGYYLGSYAMDY (SEQ ID NO: 96);

(15)

CDRH1: GYTFTDYYMN (SEQ ID NO: 98);
CDHR2: DINPNNGGAIYNQKFKG (SEQ ID NO: 99); y
CDRH3: GIITEIAEDF (SEQ ID NO: 100);

o

(16)

CDRL1: KASQNVGTNVV (SEQ ID NO: 102);
CDRL2: SASYRYS (SEQ ID NO: 103); y
CDRL3: QQYKTYPYT (SEQ ID NO: 104);

opcionalmente unido a una cadena constante de inmunoglobulina.

11. Un método para preparar uno o más polipéptidos; o anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden dichos polipéptidos, que comprende introducir uno o más polinucleótidos que codifican estos

polipéptidos en la célula de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y cultivar la célula en condiciones en las que se producen los polipéptidos.

12. El método según la reivindicación 11, que además comprende, aislar el polipéptido.

13. El método de la reivindicación 11 en el que el polipéptido es una inmunoglobulina.

14. El método de la reivindicación 13, en el que la inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-8, 21, 22, 42, 43, 58-69, 79, 80, 81, 85, 89, 93 y 101 o un fragmento maduro de la misma o una inmunoglobulina que comprende una o más CDR de dicha inmunoglobulina; opcionalmente unido a una cadena constante de inmunoglobulina.

15. El método de la reivindicación 13 en el que la inmunoglobulina comprende:

(1)

CDR-L1: KASKKVTIFGSISALH (SEQ ID NO: 9),
CDR-L2: NGAKLES (SEQ ID NO: 10) y
CDR-L3: LQNKEVPYT (SEQ ID NO: 11);

(2)

CDR-H1: SYGIT (SEQ ID NO: 12),
CDR-H2: ENYPRSGNTYYNEKFKG (SEQ ID NO: 13) y
CDR-H3: CEFISTVVAPYYYALDY (SEQ ID NO: 14) o SEFISTVVAPYYYALDY (SEQ ID NO: 15) o AEFISTVVAPYYYALDY (SEQ ID NO: 16) o VEFISTVVAPYYYALDY (SEQ ID NO: 17) o SEFISTVMAPYYYALDY (SEQ ID NO: 18) o SEFTSTVVAPYYYALDY (SEQ ID NO: 19);

(3)

CDRH1: Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser (SEQ ID NO: 23),
CDRH2: Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly (SEQ ID NO: 24) y
CDRH3: Asp Asn His Ala Tyr Asp Arg Gly Pro Phe Phe Asp Tyr (SEQ ID NO: 25);

(4)

CDRL1: Lys Ser Ser Gln Asn Leu Phe Tyr Arg Ser Asn Gln Lys Asn His Leu Ala (SEQ ID NO: 26),
CDRL2: Trp Thr Ser Thr Arg Glu Ser (SEQ ID NO: 27) y
CDRL3: Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Pro Thr (SEQ ID NO: 28);

(5)

CDRH1: Ala Tyr Gly Met Asp (SEQ ID NO: 29),
CDRH2: Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Arg Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly (SEQ ID NO: 30) y CDRH3: Asp Leu Gly Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val (SEQ ID NO: 31);

(6)

CDRL1: Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser (SEQ ID NO: 32),
CDRL2: Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser (SEQ ID NO: 33) y
CDRL3: Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Leu Phe Tyr Val (SEQ ID NO: 34);

(7)

CDRH1: GKTFWSWGIN (SEQ ID NO: 35),
CDRH2: YIYIGTGYTEPNPKYKG (SEQ ID NO: 36) y
CDRH3: IGGYYGNFAD (SEQ ID NO: 37) o IGGYYGNFDQ (SEQ ID NO: 38);

(8)

CDRL1: RSSQSLLISGGNTYLN (SEQ ID NO: 39),
CDRL2: LVSKLDQ (SEQ ID NO: 40) y
CDRL3: WQGTYFPLT (SEQ ID NO: 41);

(9)

CDRH1: TYWMH (SEQ ID NO: 44) o TYWMH (SEQ ID NO: 45),
CDRH2: EINPTNGHTNYNEKFKS (SEQ ID NO: 46), EINPTNGHTNYNPSFQG (SEQ ID NO: 47) o EINPTNGHTNYNQKFQG (SEQ ID NO: 48) y
CDRH3: NYVGSIFDY (SEQ ID NO: 49) o NYVGSIFDY (SEQ ID NO: 50);

(10)

CDRL1: KASENVVSYVS (SEQ ID NO: 51) o KASENVVSYVS (SEQ ID NO: 52),
CDRL2: GASNRNT (SEQ ID NO: 53), GASNRNT (SEQ ID NO: 54) o GASNRES (SEQ ID NO: 55) y
CDRL3: GQSYNYPYT (SEQ ID NO: 56) o GQSYNYPYT (SEQ ID NO: 57);

(11)

CDRH1: GYTFSSYGMY (SEQ ID NO: 82);
CDRH2: WIDPGSGGTKYNEKFKG (SEQ ID NO: 83); y
CDRH3: ERYGYYFDY (SEQ ID NO: 84);

(12)

CDRL1: RASQYVGSYLN (SEQ ID NO: 86);
CDRL2: DASNRAT (SEQ ID NO: 87); y
CDRL3: QVWDSSPPVV (SEQ ID NO: 88);

(13)

CDRL1: RASQDVSRYLT (SEQ ID NO: 90);
CDRL2: AASSLQS (SEQ ID NO: 91); y
CDRL3: QAYDYSLSGYV (SEQ ID NO: 92);

(14)

CDRH1: GYTFSSYWMH (SEQ ID NO: 94);
CDRH2: RIDPYNGGTKYNEKFKG (SEQ ID NO: 95); y
CDRH3: YGYYLGSYAMDY (SEQ ID NO: 96);

(15)

CDRH1: GYTFTDYYMN (SEQ ID NO: 98);
CDHR2: DINPNNGGAIYNQKFKG (SEQ ID NO: 99); y
CDRH3: GIITEIAEDF (SEQ ID NO: 100);

o

(16)

CDRL1: KASQNVGTNVV (SEQ ID NO: 102);
CDRL2: SASYRYS (SEQ ID NO: 103); y
CDRL3: QQYKTYPYT (SEQ ID NO: 104); opcionalmente unido a una cadena constante de inmunoglobulina.

16. El método de la reivindicación 13 en el que la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de cadena ligera unida a una cadena de inmunoglobulina constante kappa o lambda y/o en el que la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de cadena pesada unida a una cadena gamma-1, gamma-2, gamma-3 o gamma-4.

17. Un método para producir un anticuerpo que comprende, inocular un medio de crecimiento inicial de células de mamífero, precalentado a 37 °C; cuyo medio inicial comprende HEPES, tampones de bicarbonato de sodio, sales inorgánicas, aminoácidos no esenciales, insulina humana recombinante, oligoelementos y tensioactivos; y que no comprende L-glutamina, antibióticos, antimicóticos o componentes derivados de animales; con una o más células de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que expresan la inmunoglobulina de cadena ligera y la inmunoglobulina de cadena pesada de anticuerpo, a una densidad celular de 2,5-5 X 10^5 células/ml; y, añadir los siguientes suplementos al medio antes, simultáneamente o inmediatamente después de dicha inoculación:

hidrolizado de soja a una concentración final de 10 g/litro;
y, opcionalmente, una carga de aminoácidos en la que la concentración de los componentes añadidos por dicha carga de aminoácidos son las que se exponen a continuación:

L-arginina:	126,4 mg/litro
L-cistina:	34 mg/litro
L-histidina:	42 mg/litro
L-isoleucina:	52 mg/litro
L-leucina:	52 mg/litro
L-lisina:	72 mg/litro
L-metionina:	15,2 mg/litro
L-fenilalanina:	33 mg/litro
L-treonina:	47,6 mg/litro
L-triptófano:	10,2 mg/litro
L-tirosina:	36 mg/litro
L-valina:	46,8 mg/litro
L-alanina:	8,9 mg/litro
L-asparagina:	30 mg/litro
L-ácido aspártico:	26,6 mg/litro
L-ácido glutámico:	29,4 mg/litro
glicina:	15 mg/litro
L-prolina:	23 mg/litro
L-serina:	21 mg/litro

; y, cuando la densidad celular viable alcanza más de 1,2 X 10^6 células/ml, añadir cargas de suplementos en las que la concentración de los componentes añadidos por dichas cargas de suplementos son las establecidas a continuación:

selenito de sodio:	0,01426 mg/litro
sulfato de adenina:	1,632 mg/litro
adenosina:	17,6 mg/litro
citidina:	17,6 mg/litro
guanosina:	17,6 mg/litro
uridina:	17,6 mg/litro
hipoxantina:	11,8 mg/litro
L-citrulina:	12,6 mg/litro
L-ornitina-HCl:	25,6 mg/litro
Biotina:	0,28 mg/litro
dinucleótido de flavina adenina:	0,05 mg/litro
ácido fólico:	4,6 mg/litro
ácido lipoico:	0,52 mg/litro
niacina:	31,4 mg/litro
HCl de piridoxina:	3 mg/litro
riboflavina:	1,86 mg/litro
HCl de tiamina:	16 mg/litro
vitamina E:	0,376 mg/litro
vitamina B12:	3,4 mg/litro
cloruro de colina:	50,2 mg/litro
HCl de etanolamina:	4,4 mg/litro
i-inositol:	73,2 mg/litro
timidina:	7,8 mg/litro
2HCl de putrescina:	0,4 mg/litro
progesterona:	0,015 mg/litro
pantotenato de D-calcio:	23,8 mg/litro
L-asparagina:	812 mg/litro
L-prolina	216 mg/litro

(continuación)

L-isoleucina	370 mg/litro
L-cisteína-HCl	224 mg/litro
L-leucina	332 mg/litro
L-treonina	164 mg/litro
L-tirosina	198 mg/litro
L-arginina	186 mg/litro
L-acido aspártico	71 mg/litro
L-acido glutámico	126 mg/litro
glicina	57 mg/litro
L-histidina	125 mg/litro
L-metionina	132 mg/litro
L-triptófano	99 mg/litro
L-lisina	293 mg/litro
L-fenilalanina	174 mg/litro
L-valina	262 mg/litro
L-serina:	260 mg/litro
fosfato de sodio monobásico:	288,2 mg/litro
sulfato de cinc:	1,08 mg/litro
sulfato cúprico:	0,0032 mg/litro
vanadato de amonio:	0,00078 mg/litro
cloruro de cobalto:	0,0025 mg/litro
dicloruro de níquel hexahidrato:	0,0004 mg/litro
molibdato de sodio deshidratado:	0,00016 mg/litro

; y, mantener la concentración de glucosa en el medio a 1,5 g/litro y mantener la concentración de L-glutamina en el medio a 150 mg/litro; y durante el crecimiento celular mantener la concentración de O_2 al 60 %; pH a 6,8 ± 0,02 y temperatura a 36,5 °C ± 0,5 °C; y, opcionalmente, eliminar las células huésped del medio cuando la viabilidad celular es inferior al 60 %.

18. El método según la reivindicación 17, que además comprende, recuperar el medio de cultivo de las células mediante centrifugación por apilamiento de discos del medio, filtrar el medio en profundidad y filtrar el medio a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,2 micrómetros.

19. El método según la reivindicación 18, que además comprende, purificar las inmunoglobulinas del medio por fraccionamiento cromatográfico en columna.

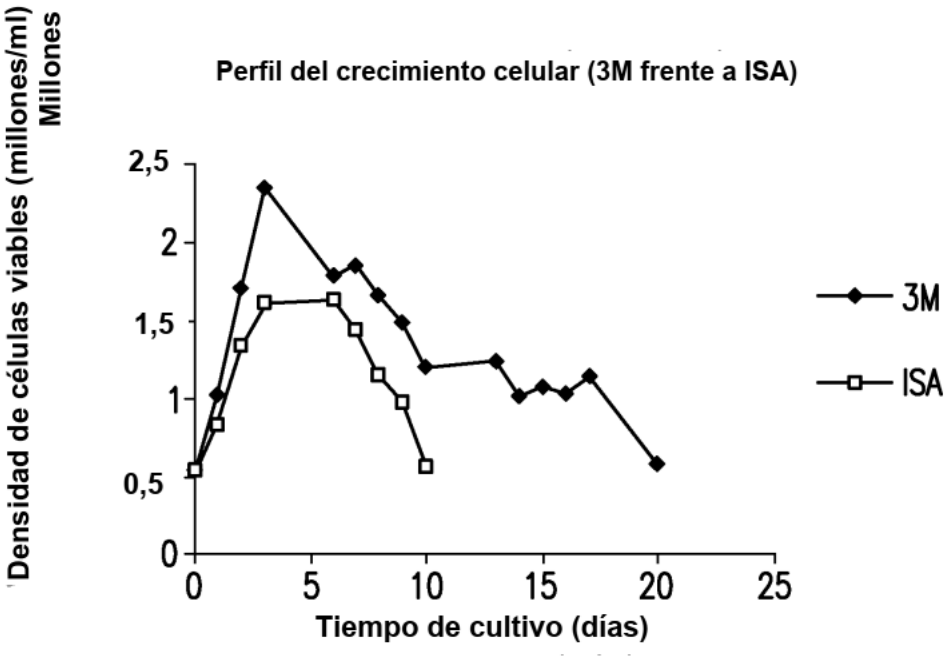
Perfil del crecimiento celular (3M frente a ISA)
Densidad de células viables (millones/ml)
Millones
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0
5
10
15
20
25
Tiempo de cultivo (días)
3M
ISA

FIG. 1

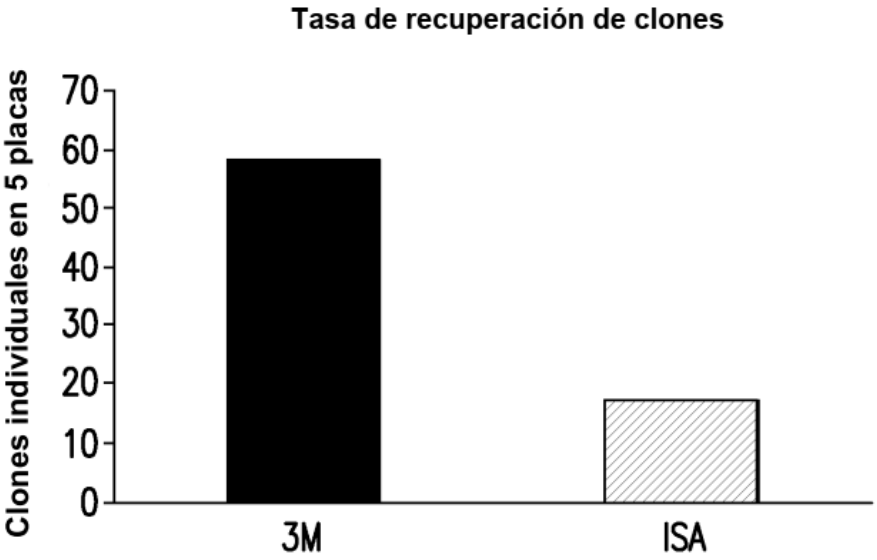
Tasa de recuperación de clones
Clones individuales en 5 placas
70
60
50
40
30
20
10
0
3M
ISA

FIG.2

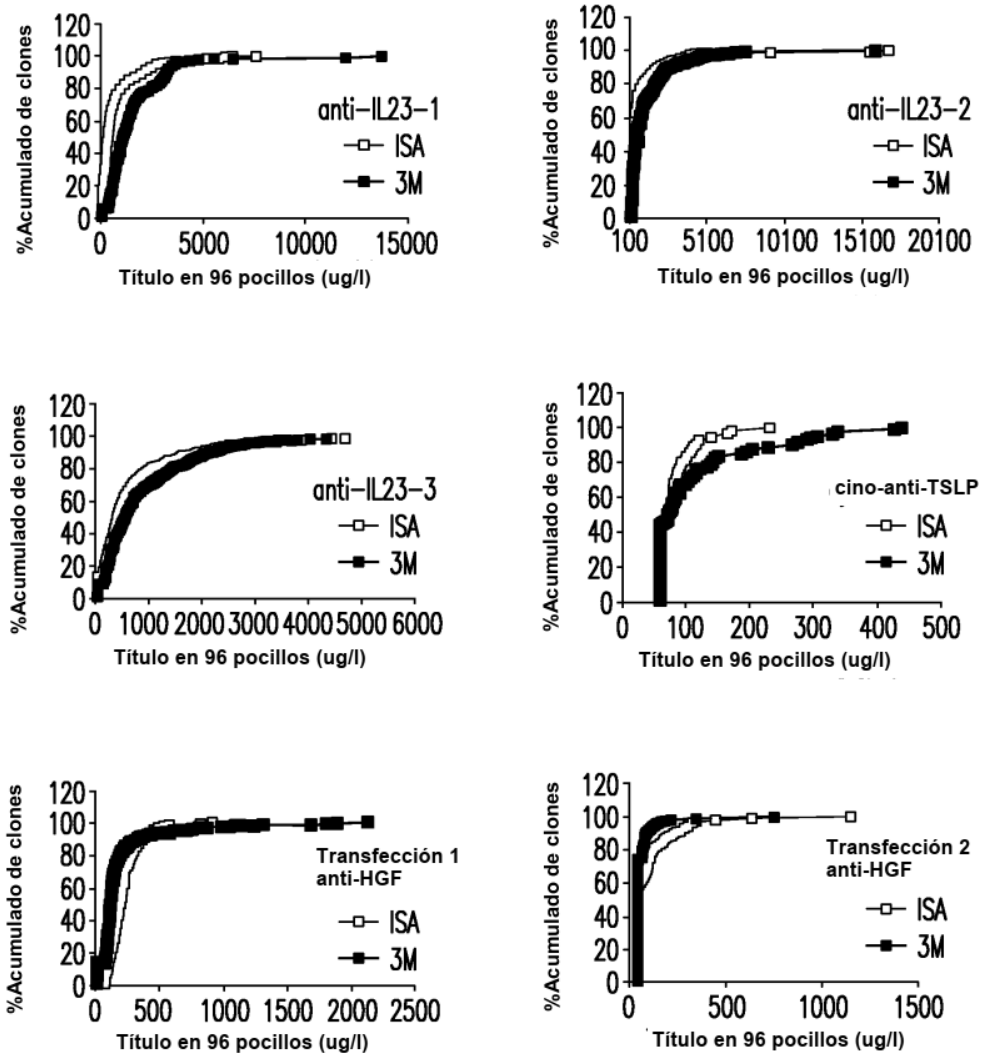
%Acumulado de clones
Título en 96 pocillos (ug/l)
anti-IL23-1
ISA
3M
anti-IL23-2
anti-IL23-3
cino-anti-TSLP
Transfección 1
anti-HGF
Transfección 2
anti-HGF

FIG.3

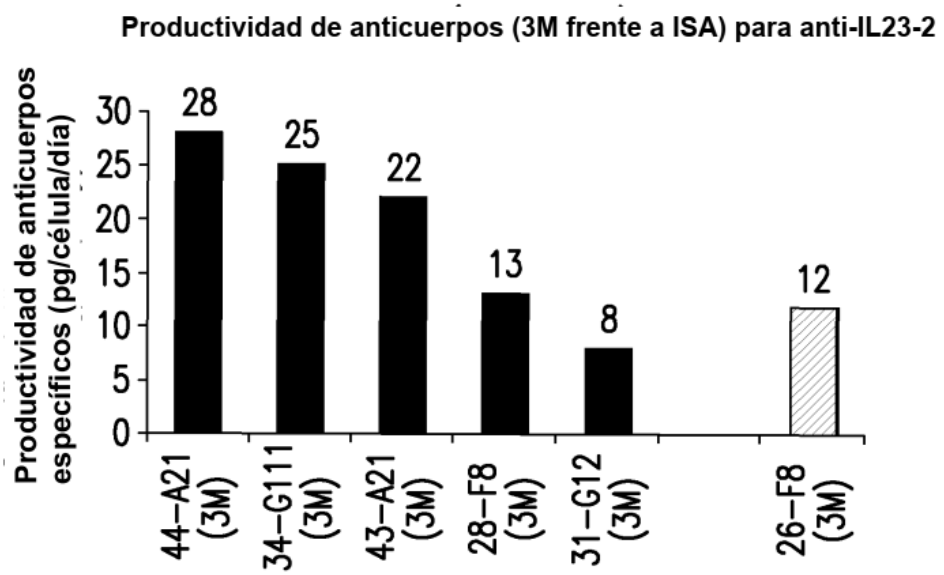
Productividad de anticuerpos (3M frente a ISA) para anti-IL23-2
Productividad de anticuerpos específicos (pg/célula/día)
30
25
20
15
10
5
0
28
25
22
13
8
12
44-A21 (3M)
34-G111 (3M)
43-A21 (3M)
28-F8 (3M)
31-G12 (3M)
26-F8 (3M)

FIG.4