

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 758**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2012 PCT/EP2012/076167**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13092723**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2012 E 12813822 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 2794878**

54 Título: **Organización de vectores de expresión, procedimientos de generación de células de producción novedosos y su uso para la producción recombinante de polipéptidos**

30 Prioridad:

22.12.2011 EP 11195363

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

05.11.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HUELSMANN, PETER MICHAEL y
KNOETGEN, HENDRIK**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 791 758 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Organización de vectores de expresión, procedimientos de generación de células de producción novedosos y su uso para la producción recombinante de polipéptidos

En el presente documento se informa de organizaciones de vectores novedosas, procedimientos novedosos para la generación de líneas celulares de producción, así como el uso de estos vectores de expresión y líneas celulares de producción para la producción recombinante de polipéptidos de interés.

Antecedentes de la invención

El nivel de transcripción de un gen puede tener una fuerte influencia en su nivel de expresión y por lo tanto determina la productividad de una célula. Se ve influenciado principalmente por tres elementos del vector: por el promotor, la secuencia señal de poliA y (si está presente) por un finalizador de la transcripción.

El ácido nucleico que codifica una cadena pesada de anticuerpo en general comprende una secuencia líder (una secuencia señal) (aproximadamente 57 pb/19 aa), que se retira tras la maduración de la proteína, una región variable, VH (aproximadamente 350 pb/115 aa), y la región constante, CH (aproximadamente 990 pb/330 aa). El ácido nucleico que codifica una cadena ligera de anticuerpo en general está compuesto de una secuencia líder (aproximadamente 66 pb/22 aa) que se retira tras la maduración de la proteína, una región variable, VK o VL (aproximadamente 350 pb/115 aa), y una región constante, CK o CL (aproximadamente 321 pb/107 aa).

La producción recombinante de anticuerpos en células eucariotas implica la creación de sistemas de expresión (véase, McCafferty, J., *et al.*, (eds.), *Antibody Engineering, A Practical Approach*, IRL Press (1997)). Para el desarrollo de sistemas de expresión de anticuerpos, se crea un casete de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica la cadena ligera flanqueado por un promotor y una región de poliadenilación (poliA). Además, se crea un casete de expresión de la cadena pesada que comprende un ácido nucleico que codifica la cadena pesada flanqueado por un promotor y una región poliA. El casete de expresión de la cadena pesada se puede combinar en el casete de expresión de la cadena ligera en un único vector que contiene ambos casetes de expresión de la cadena pesada y ligera o se puede integrar en dos vectores separados.

Se informa de moléculas de casete de ADN de inmunoglobulina, construcciones de monocuerpo, procedimientos de producción y procedimientos de uso para los mismos en el documento US 7.053.202. En el documento US 5.168.062 se informa de vectores de transferencia y microorganismos que contienen una secuencia de ADN reguladora del promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano. Se informa en el documento US 5.225.348 de un fragmento de ADN que contiene una región promotora para el factor-1 α de alargamiento de la cadena polipeptídica humana, su secuencia de bases y plásmidos de expresión que contienen el fragmento de ADN que tiene alta aplicabilidad para una amplia gama de células huésped con alta capacidad de expresión. En el documento US 5.266.491 se informa de plásmidos de expresión que contienen origen de replicación SV40 y un fragmento de ADN que tiene una región promotora para un gen de factor-1 α de alargamiento de cadena polipeptídica humana. Se informa en el documento US 5.122.458 de compuestos de ADN recombinante y la expresión de polipéptidos tales como tPA. En el documento US 7.422.874 se informa de un vector de expresión para células animales.

Kim, D., *et al.* informan de una mejora en sistemas de expresión de células de mamífero manipulando regiones de finalización transcripcional (*Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 1620-1622). Se informa de que un segmento de 9 nt de un ARNm celular puede funcionar como sitio de entrada de ribosomas interno (IRES) y cuando está presente en múltiples copias enlazadas potencia enormemente la actividad de IRES por Chappell, S.A., *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 1536-1541). Corish, P. y Tyler-Smith, C., informan de la atenuación de la semivida de la proteína verde fluorescente en células de mamífero (*Prot. Eng.* 12 (1999) 1035-1040). Se informa de un vector GFPneo novedoso diseñado para el aislamiento y análisis de elementos potenciadores en células de mamífero transfectadas por Primig, M., *et al.* (*Gene* 215 (1998) 181-189). Ng, S.K., *et al.* informan de la aplicación de secuencias desestabilizadoras en el marcador de selección para una mejora en la productividad de proteína recombinante en CHO-DG44 (*Metabol. Eng.* 9 (2007) 304-316).

Sanna Pietro, P., informa de la expresión de fragmentos Fab de anticuerpo e inmunoglobulina completa en células de mamífero (*Meth. Mol. Biol.* 178 (2002) 389-395). Se informa de una colección de presentación de células para clonación génica de regiones variables de anticuerpos humanos para el antígeno de superficie de la hepatitis B por Higuchi, K., *et al.* (*J. Immunol. Meth.* 202 (1997) 193-204). Kim, D., *et al.*, informan de una mejora en sistemas de expresión en mamíferos manipulando regiones de finalización transcripcional (*Biotechnol. Progress* 19 (2003) 1620-1622). Se informa de pautas para genomaniplación celular para la producción de anticuerpos monoclonales por Costa, R.A., *et al.* (*Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.* 74 (2010) 127-138). Kim, D.W., *et al.*, informan del uso del promotor del factor 1 alfa de alargamiento humano como sistema de expresión versátil y eficaz (*Gene* 91 (1990) 217-223). Se informa de la comparación de la expresión génica dependiente del intrón e independiente del intrón por Buchman, A.R., *et al.*, (*Mol. Cell. Biol.* 8 (1988) 4395-4405). Wang, F., *et al.*, informan de la expresión de anticuerpos en células de mamífero (en *Therapeutic monoclonal antibodies - From bench to clinic*, Wiley (2009) páginas 557-572). Se informa de un estudio comparativo de diferentes diseños de vectores para la expresión en mamíferos de anticuerpos de IgG

recombinantes por Li *et al.* (J. Immunol. Meth. 318 (2007) 113-124). Ho, S.C.L., *et al.* informan de "IRES-mediated tricistronic vectors for enhancing generation of high monoclonal antibody expressing CHO cell lines" (J. Biotechnol. 157 (2011) 130-139). Se informa de la producción de anticuerpo quimérico anti-CD2 por células de animales recombinantes por Hotta, A., *et al.* (J. Biosci. Bioeng. 98 (2004) 298-303). Lee, J-C., *et al.* informan de "High-efficiency protein expression mediated by enterovirus 71 internal ribosome entry" (Biotechnol. Bioeng. 90 (2005) 656-662). En el documento WO 2008/142124 se informa de la producción de proteína recombinante en células Avian EBX®.

Sumario de la invención

10 La invención se define por las reivindicaciones.

Se ha descubierto que para la producción recombinante de anticuerpos, la posición del casete de expresión de la cadena pesada frente al casete de expresión de la cadena ligera (HC-LC (5'-3')) proporciona mejores resultados de expresión en comparación con el orden inverso (LC-HC (5'-3')). Adicionalmente, se ha descubierto que la posición del marcador de selección después de ambos casetes de expresión de la cadena de anticuerpo proporciona mejores resultados de expresión (HC-LC-SM (5'-3')) en comparación con la posición bidireccional frente a la primera cadena de anticuerpo (SM (3'-5')-HC-LC (5'-3')).

Se ha descubierto que para transfecciones estables, la disposición en fila de 1) cadena pesada de anticuerpo, 2) cadena ligera de anticuerpo y 3) marcador de selección ha demostrado ser óptima. Pero mientras que el promotor de hEF1 α es claramente superior al promotor de hCMV en grupos estables, se ha observado el claro efecto opuesto en el nivel de clon individual. Aquí, el promotor/potenciador temprano inmediato de citomegalovirus humano (hCMV) generó clones con la mayor productividad. Además, su rendimiento se puede mejorar además combinándolo con la señal de poliA bGH y la secuencia finalizadora del gen de la gastrina humana (hGT), que incrementa tanto la productividad como la estabilidad de expresión.

Se ha descubierto que el uso de un vector de expresión que comprende un casete de expresión para una cadena pesada de anticuerpo y un casete de expresión para una cadena ligera de anticuerpo que comprende cada uno un promotor, un gen estructural y una secuencia señal de poliA y opcionalmente una secuencia finalizadora, da como resultado un mayor número de clones de células productoras/secretoras de anticuerpos después de la transfección si 1) el promotor es el promotor de citomegalovirus humano (hCMV), la secuencia señal de poliA es la secuencia señal de poliA de la hormona de crecimiento bovina (poliA bGH) y la secuencia finalizadora es la secuencia finalizadora de la transcripción génica de la gastrina humana (hGT), o 2) el promotor es el promotor del factor de alargamiento humano 1 alfa (EF1alfa), la secuencia señal de poliA es la secuencia señal de poliA de la hormona de crecimiento bovina (poliA bGH) y la secuencia finalizadora está ausente.

Usando un vector de expresión como se explica anteriormente, se puede obtener un mayor número de células productoras/secretoras de anticuerpos después de la transfección y, por tanto, se reducen los esfuerzos requeridos para identificar una célula productora alta adecuada para la producción de anticuerpos recombinantes a gran escala.

Un aspecto de acuerdo con la invención es un vector de expresión que comprende

- un casete de expresión de la cadena ligera de anticuerpo,

45 - un casete de expresión de la cadena pesada de anticuerpo, y

- un casete de expresión de marcador de selección,

50 en el que los casetes de expresión se disponen unidireccionales, y

en el que los casetes de expresión se disponen en la secuencia 5' a 3' del casete de expresión de la cadena pesada de anticuerpo, casete de expresión de la cadena ligera de anticuerpo y casete de expresión del marcador de selección,

55 en el que los tres casetes de expresión comprenden el promotor del factor de alargamiento humano 1 alfa de SEQ ID NO: 05,

en el que el casete de expresión de la cadena ligera y el casete de expresión de la cadena pesada de anticuerpo comprenden la secuencia señal de poliA de la hormona de crecimiento bovina.

60 En un modo de realización de acuerdo con la invención, el casete de expresión no comprende una secuencia finalizadora, es decir, el casete de expresión está libre de una secuencia finalizadora.

65 En un modo de realización de acuerdo con la invención, los tres casetes de expresión comprenden la secuencia señal de poliA de la hormona de crecimiento bovina. En un modo de realización de acuerdo con la invención, el casete de expresión de la cadena ligera de anticuerpo y el casete de expresión de la cadena pesada de anticuerpo y el casete de marcador de selección comprenden la secuencia señal de poliA de la hormona de crecimiento bovina.

- 5 En un modo de realización de acuerdo con la invención, el casete de expresión de la cadena ligera de anticuerpo y/o el casete de expresión de la cadena pesada de anticuerpo y/o el casete de marcador de selección comprenden independientemente entre sí la secuencia finalizadora de gastrina humana después de la secuencia señal de poliA.
- 10 En un modo de realización de acuerdo con la invención, el promotor de uno, dos o los tres casetes de expresión comprende un intrón A.
- 15 En un modo de realización de acuerdo con la invención, un casete de expresión comprende la secuencia señal de poliA SV40.
- 20 En un modo de realización de acuerdo con la invención, el ácido nucleico que codifica la cadena ligera de anticuerpo y/o el ácido nucleico que codifica la cadena pesada de anticuerpo comprende al menos un intrón.
- 25 En un modo de realización de acuerdo con la invención, el ácido nucleico que codifica la cadena ligera de anticuerpo y/o el ácido nucleico que codifica la cadena pesada de anticuerpo es ADNc.
- 30 Un aspecto de acuerdo con la invención es el uso de un vector de expresión de acuerdo con la invención para la producción recombinante de un anticuerpo.
- 35 Un aspecto de acuerdo con la invención es el uso de un vector de expresión de acuerdo con la invención para la generación de una línea celular estable.
- 40 Un aspecto de acuerdo con la invención es el uso de un vector de expresión de acuerdo con la invención para la generación de una línea celular de producción.
- 45 Un aspecto de acuerdo con la invención es un procedimiento para la producción de un anticuerpo que comprende las siguientes etapas:
- 50 - cultivar una célula eucariota que comprende un vector de expresión de acuerdo con la invención, y
- 55 - recuperar el anticuerpo de la célula o del medio de cultivo.
- 60 En un modo de realización de todos los aspectos de acuerdo con la invención, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.
- 65 En un modo de realización de acuerdo con la invención, el anticuerpo biespecífico tiene una primera especificidad de unión o sitio de unión que se une específicamente a un primer antígeno o un primer epítipo en un antígeno y el anticuerpo biespecífico tiene una segunda especificidad de unión o sitio de unión que se une específicamente a un segundo antígeno o segundo epítipo en el antígeno.
- En un modo de realización de acuerdo con la invención, el vector de expresión comprende
- 45 - un primer casete de expresión que comprende en sentido 5' a 3' un promotor, un ácido nucleico que codifica una primera cadena ligera de anticuerpo, una secuencia señal de poliA, y opcionalmente una secuencia finalizadora,
- 50 - un segundo casete de expresión que comprende en sentido 5' a 3' un promotor, un ácido nucleico que codifica una segunda cadena ligera de anticuerpo, una secuencia señal de poliA y opcionalmente una secuencia finalizadora,
- 55 - un tercer casete de expresión que comprende en sentido 5' a 3' un promotor, un ácido nucleico que codifica una primera cadena pesada de anticuerpo, una secuencia señal de poliA y opcionalmente una secuencia finalizadora,
- 60 - un cuarto casete de expresión que comprende en sentido 5' a 3' un promotor, un ácido nucleico que codifica una segunda cadena pesada de anticuerpo, una secuencia señal de poliA y opcionalmente una secuencia finalizadora,
- 65 o bien
- un primer casete de expresión que comprende en sentido 5' a 3' un promotor, un ácido nucleico que codifica una cadena ligera de anticuerpo, una secuencia señal de poliA y opcionalmente una secuencia finalizadora,
- un segundo casete de expresión que comprende en sentido 5' a 3' un promotor, un ácido nucleico que codifica una primera cadena pesada de anticuerpo, una secuencia señal de poliA, y opcionalmente una secuencia finalizadora, y
- un tercer casete de expresión que comprende en sentido 5' a 3' un promotor, un ácido nucleico que codifica una segunda cadena pesada de anticuerpo, una secuencia señal de poliA y opcionalmente una secuencia finalizadora,

con lo que la cadena ligera de anticuerpo es una cadena ligera común para ambas cadenas pesadas de anticuerpo.

En un modo de realización de todos los aspectos de acuerdo con la invención, el vector de expresión comprende

- 5 - un casete de expresión de la cadena ligera de anticuerpo,
- un primer casete de expresión de la cadena pesada de anticuerpo,
10 - un segundo casete de expresión de la cadena pesada de anticuerpo, y
- un casete de expresión de marcador de selección,

en el que al menos uno de los casetes de expresión de la cadena pesada de anticuerpo, el casete de expresión de la cadena ligera de anticuerpo y el casete de expresión de marcador de selección se disponen unidireccionales, y

- 15 en el que los casetes de expresión unidireccionales se disponen en la secuencia 5' a 3' del casete de expresión de la cadena pesada de anticuerpo, casete de expresión de la cadena ligera de anticuerpo y casete de expresión de marcador de selección.

20 En un modo de realización de todos los aspectos de acuerdo con la invención, el vector de expresión comprende

- un casete de expresión de la cadena ligera de anticuerpo,
- un segundo casete de expresión de la cadena ligera de anticuerpo,
25 - un primer casete de expresión de la cadena pesada de anticuerpo,
- un segundo casete de expresión de la cadena pesada de anticuerpo, y
30 - un casete de expresión de marcador de selección,

en el que uno de los casetes de expresión de la cadena pesada de anticuerpo, uno del casete de expresión de la cadena ligera de anticuerpo y el casete de expresión del marcador de selección se disponen unidireccionales, y

- 35 en el que los casetes de expresión unidireccionales se disponen en la secuencia 5' a 3' del casete de expresión de la cadena pesada de anticuerpo, casete de expresión de la cadena ligera de anticuerpo y casete de expresión de marcador de selección.

40 En un modo de realización de acuerdo con la invención, uno de los casetes de expresión de la cadena pesada de anticuerpo codifica una cadena pesada de anticuerpo que comprende una mutación de ojal.

En un modo de realización de acuerdo con la invención, uno de los casetes de expresión de la cadena pesada de anticuerpo codifica una cadena pesada de anticuerpo que comprende una mutación de botón.

45 En un modo de realización de acuerdo con la invención, uno de los casetes de expresión de la cadena ligera de anticuerpo codifica una cadena ligera de anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena ligera de anticuerpo y un dominio CH1 de la cadena pesada de anticuerpo como dominio constante y/o uno de los casetes de expresión de la cadena ligera de anticuerpo codifica una cadena ligera de anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena ligera de anticuerpo y un dominio CL de la cadena ligera de anticuerpo como dominio constante.

50 En un modo de realización de acuerdo con la invención, uno de los casetes de expresión de la cadena pesada de anticuerpo codifica una cadena pesada de anticuerpo que comprende como primer dominio constante un dominio constante de la cadena ligera (CL) de anticuerpo, y/o uno de los casetes de expresión de la cadena pesada de anticuerpo codifica una cadena pesada de anticuerpo que comprende como primer dominio constante un dominio CH1 de la cadena pesada de anticuerpo.

Descripción detallada de la invención

I. Aspectos generales

60 Como es conocido para un experto en la técnica, la producción de numerosos derivados de un ácido nucleico y/o polipéptido permite el uso de tecnología de ADN recombinante. Dichos derivados se pueden modificar, por ejemplo, en una posición individual o en varias por sustitución, alteración, intercambio, delección o inserción. La modificación o derivatización se puede llevar a cabo, por ejemplo, por medio de mutagénesis dirigida a sitio. Dichas modificaciones se pueden llevar a cabo fácilmente por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, J., *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA (1999)). El uso de tecnología

recombinante permite que un experto en la técnica transforme diversas células huésped con ácido(s) nucleico(s) heterólogo(s). Aunque el mecanismo de transcripción y traducción, es decir, expresión, de diferentes células usa los mismos elementos, las células que pertenecen a diferentes especies pueden tener entre otras cosas un denominado 'uso de codón' diferente. De este modo, idénticos polipéptidos (con respecto a la secuencia de aminoácidos) se pueden codificar por diferente(s) ácido(s) nucleico(s). También, debido a la degeneración del código genético, diferentes ácidos nucleicos pueden codificar el mismo polipéptido.

El uso de tecnología de ADN recombinante permite la producción de numerosos derivados de un ácido nucleico y/o polipéptido. Dichos derivados se pueden modificar, por ejemplo, en una posición individual o en varias por sustitución, alteración, intercambio, delección o inserción. La modificación o derivatización se puede llevar a cabo, por ejemplo, por medio de mutagénesis dirigida a sitio. Dichas modificaciones se pueden llevar a cabo fácilmente por un experto en la técnica (véanse, por ejemplo, Sambrook, J., *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA (1999); Hames, B.D., y Higgins, S.J., *Nucleic acid hybridization - a practical approach*, IRL Press, Oxford, England (1985)).

El uso de tecnología recombinante permite la transformación de diversas células huésped con ácido(s) nucleico(s) heterólogo(s). Aunque el mecanismo de transcripción y traducción, es decir, expresión, de diferentes células usa los mismos elementos, las células que pertenecen a diferentes especies pueden tener entre otras cosas un denominado 'uso de codón' diferente. De este modo, idénticos polipéptidos (con respecto a la secuencia de aminoácidos) se pueden codificar por diferente(s) ácido(s) nucleico(s). También, debido a la degeneración del código genético, diferentes ácidos nucleicos pueden codificar el mismo polipéptido.

DEFINICIONES

Un anticuerpo "madurado en afinidad" se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo original que no posee dichas alteraciones, dando como resultado dichas alteraciones una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre que muestren la actividad de unión a antígeno deseada.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen pero no se limitan a Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

El término anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie diferente.

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante poseído por su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

El término "expresión" como se usa en el presente documento se refiere a procesos de transcripción y/o traducción que se producen dentro de una célula. El nivel de transcripción de una secuencia de ácido nucleico de interés en una célula se puede determinar en base a la cantidad de ARNm correspondiente que está presente en la célula. Por ejemplo, el ARNm transcrito de una secuencia de interés se puede cuantificar por RT-PCR o por hibridación Northern (véase Sambrook *et al.*, 1999, *supra*). Los polipéptidos codificados por un ácido nucleico de interés se pueden cuantificar por diversos procedimientos, por ejemplo, por ELISA, analizando la actividad biológica del polipéptido o empleando ensayos que son independientes de dicha actividad, tales como inmunoelectrotransferencia o radioinmunoanálisis, usando inmunoglobulinas que reconocen y se fijan al polipéptido (véase Sambrook *et al.*, 1999, *supra*).

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

Un "vector de expresión" es un ácido nucleico que proporciona todos los elementos requeridos para la expresión del/de los gen(es) estructural(es) comprendido(s) en una célula huésped. Típicamente, un plásmido de expresión comprende una unidad de propagación de plásmido procariota, por ejemplo, para *E. coli*, que comprende un origen de replicación, y un marcador seleccionable, un marcador de selección eucariota, y uno o más casetes de expresión para la expresión

del/de los gen(es) estructural(es) de interés, comprendiendo cada uno un promotor, un gen estructural y un finalizador de la transcripción incluyendo una señal de poliadenilación. La expresión génica se coloca normalmente bajo el control de un promotor y un gen estructural de este tipo se dice que se "enlaza de forma funcional al" promotor. De forma similar, un elemento regulador y un promotor central se enlazan de forma funcional si el elemento regulador modula la actividad del promotor central.

El término "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. En un modo de realización, una región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende de Cys226, o de Pro230, al extremo carboxílico de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de los residuos aminoacídicos en la región Fc o región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también denominado índice EU, como se describe en Kabat, E.A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5,ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), publicación NIH 91-3242.

Una "región Fc" es un término bien conocido y definido en base a la escisión de papaína de una cadena pesada de anticuerpo. Mientras que la IgG4 muestra una unión al receptor Fcγ (FcγRIIIa) reducida, los anticuerpos de otras subclases de IgG muestran una unión fuerte. Sin embargo, Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (pérdida de carbohidrato de Fc), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 o/y His435 son residuos que, si se alteran, proporcionan también una unión al receptor Fcγ reducida (Shields, R.L., *et al.*, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., *et al.*, FASEB J. 9 (1995) 115-119; Morgan, A., *et al.*, Immunology 86 (1995) 319-324; documento EP 0 307 434). En un modo de realización, el anticuerpo que se va a expresar en un aspecto de acuerdo con la invención se refiere a la unión al receptor Fcγ de la subclase IgG4 o de la subclase IgG1 o IgG2, con una mutación en L234, L235 y/o D265, y/o contiene la mutación PVA236. En un modo de realización, las mutaciones son S228P, L234A, L235A, L235E y/o PVA236 (PVA236 indica que la secuencia de aminoácidos ELLG (dada en un código de aminoácidos de una letra) de la posición de aminoácido 233 a 236 de IgG1 o EFLG de IgG4 se reemplaza por PVA). En un modo de realización, las mutaciones son S228P de IgG4, y L234A y L235A de IgG1. La región Fc de un anticuerpo está implicada directamente en ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) y CDC (citotoxicidad dependiente del complemento). Un complejo que no une el receptor Fcγ y/o el factor del complemento C1q no provoca citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). La modificación de botón indica la mutación T366W en el dominio CH3 de un anticuerpo (numeración de acuerdo con Kabat). La modificación de ojal indica las mutaciones T366S, L368A y Y407V en el dominio CH3 de un anticuerpo. Además de la modificación de botón y ojal, puede estar presente la mutación S354C en un dominio CH3 y la mutación Y349C en el otro dominio CH3.

La "región estructural" o "FR" se refiere a residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable consiste en general en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen en general en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo natural o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento.

Un "gen" indica un ácido nucleico que es un segmento, por ejemplo, en un cromosoma o en un plásmido que puede afectar a la expresión de un péptido, polipéptido o proteína. Además de la región codificante, es decir, el gen estructural, un gen comprende otros elementos funcionales, por ejemplo, una secuencia señal, promotor(es), intrones y/o finalizadores.

Los términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pasos. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde con la de un anticuerpo producido por un humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos aminoacídicos de HVR no humanas y residuos aminoacídicos de FR humanas. En determinados modos de realización, un anticuerpo

humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.

El término "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables"). En general, los anticuerpos tetracatenarios naturales comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR comprenden en general residuos aminoacídicos de los bucles hipervariables y/o de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), siendo las últimas las de variabilidad de secuencia más alta y/o estando implicadas en el reconocimiento antigénico. Los bucles hipervariables ejemplares se producen en los residuos aminoacídicos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia, C. y Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917). Las CDR ejemplares (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) se producen en los residuos aminoacídicos 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2 y 95-102 de H3 (Kabat, E.A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), publicación NIH 91-3242). Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR comprenden en general los residuos aminoacídicos que forman los bucles hipervariables. Las CDR también comprenden "residuos determinantes de la especificidad" o "SDR", que son los residuos que entran en contacto con el antígeno. Los SDR están contenidos dentro de regiones de las CDR llamadas CDR abreviadas o a-CDR. Las a-CDR ejemplares (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 y a-CDR-H3) se producen en los residuos aminoacídicos 31-34 de L1, 50-55 de L2, 89-96 de L3, 31-35B de H1, 50-58 de H2 y 95-102 de H3 (Almagro, J.C. y Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633). A menos que se indique de otro modo, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, residuos de FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra*.

Un "sitio de entrada de ribosomas interno" o "IRES" describe una secuencia que promueve de forma funcional la iniciación de la traducción independiente del gen 5' del IRES y permite que dos cistrones (marcos de lectura abiertos) se traduzcan a partir de un único transcrito en una célula animal. El IRES proporciona un sitio de entrada de ribosomas independiente para la traducción del marco de lectura abierto de inmediato hacia 3' (hacia 3' se usa de manera intercambiable en el presente documento con 3') de este. A diferencia del ARNm bacteriano que puede ser policistrónico, es decir, codificar varios polipéptidos diferentes que se traducen secuencialmente de los ARNm, la mayoría de los ARNm de las células animales son monocistrónicos y codifican la síntesis de solo una proteína. Con un transcrito policistrónico en una célula eucariota, la traducción se iniciaría desde el sitio de iniciación de traducción más hacia 5', finalizaría en el primer codón de parada y el transcrito se liberaría del ribosoma, dando como resultado la traducción de solo el primer polipéptido codificado en el ARNm. En una célula eucariota, un transcrito policistrónico que tiene un IRES enlazado de forma funcional al segundo o posterior marco de lectura abierto en el transcrito permite la traducción secuencial de ese marco de lectura abierto hacia 3' para producir los dos o más polipéptidos codificados por el mismo transcrito. El uso de elementos de IRES en la construcción de vectores se ha descrito previamente, véanse, por ejemplo, Pelletier, J., *et al.*, Nature 334 (1988) 320-325; Jang, S.K., *et al.*, J. Virol. 63 (1989) 1651-1660; Davies, M.V., *et al.*, J. Virol. 66 (1992) 1924-1932; Adam, M.A., *et al.*, J. Virol. 65 (1991) 4985-4990; Morgan, R.A., *et al.*, Nucl. Acids Res. 20 (1992) 1293-1299; Sugimoto, Y., *et al.*, Biotechnology 12 (1994) 694-698; Ramesh, N., *et al.*, Nucl. Acids Res. 24 (1996) 2697-2700; y Mosser, D.D., *et al.*, BioTechniques 22 (1997) 150-152).

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes dichas variantes en general en cantidades insignificantes. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos frente a diferentes determinantes (epítipos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige frente a un único determinante en un antígeno. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se ha obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se ha de interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por una variedad de técnicas, incluyendo pero sin limitarse al procedimiento de hibridoma, procedimientos de ADN recombinante, procedimientos de presentación en fagos y procedimientos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los locus de inmunoglobulina humana, describiéndose dichos procedimientos y otros procedimientos ejemplares para preparar anticuerpos monoclonales en el presente documento.

Un "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula polimérica que consiste en nucleótidos individuales (también llamados bases) a, c, g y t (o u en ARN), por ejemplo, para ADN, ARN o modificaciones de los mismos. Esta molécula polinucleotídica puede ser una molécula polinucleotídica natural o una molécula polinucleotídica sintética o una combinación de una o más moléculas polinucleotídicas naturales con una o más moléculas polinucleotídicas sintéticas. También se engloban por esta definición las moléculas polinucleotídicas

naturales en las que uno o más nucleótidos se cambian (por ejemplo, por mutagénesis), se delecionan o se añaden. Un ácido nucleico se puede aislar o bien integrar en otro ácido nucleico, por ejemplo, en un casete de expresión, un plásmido o el cromosoma de una célula huésped. Un ácido nucleico se caracteriza asimismo por su secuencia de ácido nucleico que consiste en nucleótidos individuales.

Para un experto en la técnica son bien conocidos los procedimientos para convertir una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, de un polipéptido, en una correspondiente secuencia de ácido nucleico que codifica esta secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, un ácido nucleico se caracteriza por su secuencia de ácido nucleico que consiste en nucleótidos individuales y asimismo por la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por el mismo.

Un "ácido nucleico" como se usa en el presente documento, también se refiere a un ácido nucleico natural o parcial o totalmente no natural que codifica un polipéptido que se puede producir de forma recombinante. El ácido nucleico puede estar formado por fragmentos de ADN que se aíslan o bien se sintetizan por medios químicos. El ácido nucleico se puede integrar en otro ácido nucleico, por ejemplo, en un plásmido de expresión o el genoma/cromosoma de una célula huésped eucariota. El plásmido incluye plásmidos lanzadera y de expresión. Típicamente, el plásmido también comprenderá una unidad de propagación procariota que comprende un origen de replicación (por ejemplo, el origen de replicación ColE1) y un marcador seleccionable (por ejemplo, gen de resistencia a ampicilina o tetraciclina), para la replicación y selección, respectivamente, del plásmido en procariotas.

"Enlazado de forma funcional" se refiere a una yuxtaposición de dos o más componentes, en la que los componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar de su manera pretendida. Por ejemplo, un promotor y/o potenciador se enlazan de forma funcional a una secuencia codificante si actúa en cis para controlar o modular la transcripción de la secuencia enlazada. En general, pero no necesariamente, las secuencias de ADN que se "enlazan de forma funcional" son contiguas y, si fuera necesario para unir dos regiones codificantes de proteínas tales como un líder secretor y un polipéptido, contiguas y en marco (de lectura). Sin embargo, aunque un promotor enlazado de forma funcional se localiza en general hacia 5' de la secuencia codificante, no es necesariamente contiguo a ella. Los potenciadores no tienen que ser contiguos. Un potenciador se enlaza de forma funcional a una secuencia codificante si el potenciador incrementa la transcripción de la secuencia codificante. Los potenciadores enlazados de forma funcional se pueden localizar hacia 5', dentro o hacia 3' de las secuencias codificantes y a distancia considerable del promotor. Un sitio de poliadenilación se enlaza de forma funcional a una secuencia codificante si se localiza en el extremo hacia 3' de la secuencia codificante de modo que la transcripción avanza a través de la secuencia codificante en la secuencia de poliadenilación. Un codón de parada de la traducción se enlaza de forma funcional a una secuencia de ácido nucleico exónica si se localiza en el extremo hacia 3' (extremo 3') de la secuencia codificante de modo que la traducción avanza a través de la secuencia codificante hasta el codón de parada y allí finaliza. El enlace se logra por procedimientos recombinantes conocidos en la técnica, por ejemplo, usando metodología de PCR y/o por ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen sitios de restricción convenientes, entonces se usan adaptadores o conectores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

Una "unidad de transcripción policistrónica" es una unidad de transcripción en la que más de un gen estructural está bajo el control del mismo promotor.

El término "señal de poliadenilación" (señal de poliA) como se usa en la presente solicitud indica una secuencia de ácido nucleico usada para inducir la escisión y poliadenilación de transcritos primarios de un segmento de secuencia de ácido nucleico específico. La región no traducida 3' que comprende una señal de poliadenilación se puede seleccionar del grupo que consiste en la región no traducida 3' que comprende una señal de poliadenilación derivada de SV40, el gen de la hormona de crecimiento bovina (bGH), genes de inmunoglobulina y el gen de la timidina cinasa (tk, por ejemplo, señal de poliadenilación de timidina cinasa de herpes simple).

Un "promotor" se refiere a una secuencia polinucleotídica que controla la transcripción de un gen/gen estructural o secuencia de ácido nucleico a la que se enlaza de forma funcional. Un promotor incluye señales para la unión de la ARN polimerasa y la iniciación de la transcripción. Los promotores usados serán funcionales en el tipo celular de la célula huésped en la que se contempla la expresión de la secuencia seleccionada. Un gran número de promotores incluyendo promotores constitutivos, inducibles y reprimibles de una variedad de fuentes diferentes son bien conocidos en la técnica (y están identificados en bases de datos tales como GenBank) y están disponibles como o dentro de polinucleótidos clonados (a partir de, por ejemplo, depósitos tales como ATCC, así como otras fuentes comerciales o individuales).

Un "promotor" comprende una secuencia de nucleótidos que dirige la transcripción de un gen estructural. Típicamente, un promotor se localiza en la región no codificante o no traducida 5' de un gen, próxima al sitio de inicio transcripcional de un gen estructural. Los elementos de secuencia dentro de promotores que funcionan en la iniciación de la transcripción a menudo se caracterizan por secuencias de nucleótidos consenso. Estos elementos promotores incluyen sitios de unión a la ARN polimerasa, secuencias TATA, secuencias CAAT, elementos específicos de diferenciación (DSE; McGehee, R.E., *et al.*, Mol. Endocrinol. 7 (1993) 551), elementos de respuesta al AMP cíclico (CRE), elementos de respuesta al suero (SRE; Treisman, R., Seminars in Cancer Biol. 1 (1990) 47), elementos de respuesta a los glucocorticoides (GRE) y sitios de unión para otros factores de transcripción, tales como CRE/ATF (O'Reilly, M.A., *et al.*, J. Biol. Chem. 267 (1992) 19938), AP2 (Ye, J., *et al.*, J. Biol. Chem. 269 (1994) 25728), SP1,

proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB; Loeken, M.R., *Gene Expr.* 3 (1993) 253) y factores de octámeros (véanse, en general, Watson *et al.*, (eds.), *Molecular Biology of the Gene*, 4.^a ed. (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. (1987)), y Lemaigre, F.P. y Rousseau, G.G., *Biochem. J.* 303 (1994) 1-14). Si un promotor es un promotor inducible, entonces la tasa de transcripción se incrementa en respuesta a un agente inductor. Por el contrario, la tasa de transcripción no se regula por un agente inductor si el promotor es un promotor constitutivo. Los promotores reprimibles también son conocidos. Por ejemplo, el promotor de c-fos se activa específicamente tras la unión de la hormona del crecimiento a su receptor en la superficie celular. La expresión regulada por tetraciclina (tet) se puede lograr por promotores híbridos artificiales que consisten, por ejemplo, en un promotor de CMV seguido de dos sitios operadores de Tet. El represor de Tet se une a los dos sitios operadores de Tet y bloquea la transcripción. Tras la adición de la tetraciclina inductora, se libera el represor de Tet de los sitios operadores de Tet y la transcripción avanza (Gossen, M. y Bujard, H. *PNAS* 89 (1992) 5547-5551). Para otros promotores inducibles que incluyen metalotioneína y promotores de choque térmico, véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.* (*supra*) y Gossen *et al.*, *Curr. Opin. Biotech.* 5 (1994) 516-520. Entre los promotores eucariotas que se han identificado como fuertes promotores para expresión de alto nivel están el promotor temprano de SV40, promotor tardío principal de adenovirus, promotor de metalotioneína I de ratón, repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, factor de alargamiento de hámster chino 1 alfa (CHEF-1, véase, por ejemplo, documento US 5.888.809), EF-1 alfa humano, ubicuitina y promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV IE).

El "promotor" puede ser constitutivo o inducible. Un potenciador (es decir, un elemento de ADN de acción cis que actúa sobre un promotor para incrementar la transcripción) puede ser necesario para funcionar conjuntamente con el promotor para incrementar el nivel de expresión obtenido con un promotor solo, y se puede incluir como elemento regulador transcripcional. A menudo, el segmento polinucleotídico que contiene el promotor incluirá también secuencias potenciadoras (por ejemplo, CMV o SV40).

Los términos "transformado de forma estable", "transfectado estable" o "estable", tal como se usan en la presente solicitud, indican una integración heredable y estable de ácido nucleico exógeno en un genoma/cromosoma de célula huésped. Se obtiene una célula transfectada estable después de un procedimiento de selección celular en condiciones de crecimiento selectivo, es decir, en presencia de uno o más marcadores de selección.

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

El término "finalizador de la transcripción" indica una secuencia de ADN de 50-750 pares de bases de longitud que da a la ARN polimerasa la señal para la finalización de la síntesis de ARNm. Son aconsejables finalizadores muy eficaces (fuertes) en el extremo 3' de un casete de expresión para prevenir la lectura íntegra de la ARN polimerasa, en particular cuando se usan promotores fuertes. Los finalizadores de la transcripción ineficaces pueden dar lugar a la formación de un ARNm de tipo operón que puede ser el motivo de una expresión génica indeseada, por ejemplo, codificada por plásmido.

Dentro del alcance de la presente invención, se pueden obtener células transfectadas con sustancialmente cualquier tipo de procedimiento de transfección conocido en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede introducir en las células por medio de electroporación o microinyección. De forma alternativa, se pueden usar reactivos de lipofección tales como FuGENE 6 (Roche Diagnostics GmbH, Alemania), X-tremeGENE (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) y LipofectAmine (Invitrogen Corp., EE. UU.). Todavía de forma alternativa, el ácido nucleico se puede introducir en la célula por sistemas de vectores víricos apropiados basados en retrovirus, lentivirus, adenovirus o virus adenoasociados (Singer, O., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 5313-5314).

El término "transfección transitoria" como se usa en esta solicitud indica un proceso en el que el ácido nucleico introducido en una célula no se integra en el genoma o ADN cromosómico de esa célula. De hecho, se mantiene como un elemento extracromosómico, por ejemplo, como un episoma, en la célula. Los procesos de transcripción del ácido nucleico del episoma no se ven afectados y, por ejemplo, se produce una proteína codificada por el ácido nucleico del episoma. Una transfección transitoria da como resultado una célula "transfectada de forma transitoria".

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural tienen en general estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales conservadas (FR) y tres regiones hipervariables (HVR) (véase, por ejemplo, Kindt, T.J., *et al.*, *Kuby Immunology*, 6.^a ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), página 91). Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, se pueden aislar anticuerpos que se unen a un antígeno particular usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una colección de dominios VL o VH complementarios, respectivamente (véanse, por ejemplo, Portolano, S., *et al.*, *J. Immunol.* 150 (1993) 880-887; Clackson, T., *et al.*, *Nature* 352 (1991) 624-628).

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que se enlaza. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Determinados vectores pueden dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se enlazan de forma funcional.

Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

ANTICUERPO

- 5 Los procedimientos y composiciones proporcionados en el presente documento son para la producción de anticuerpos monoclonales recombinantes. Un anticuerpo puede tener diversas estructuras, tales como pero sin limitarse a anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), fragmentos de anticuerpo, anticuerpos monovalentes, anticuerpos multivalentes (por ejemplo, anticuerpos bivalentes).
- 10 En determinados modos de realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv y scFv, y otros fragmentos descritos a continuación. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson, P.J., *et al.*, Nat. Med. 9 (2003) 129-134. Para una revisión de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Plueckthun, A., en: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenburg and Moore (eds.), Springer-Verlag, New York (1994), pp. 269-315;
- 15 véanse también los documentos WO 1993/16185; y US 5.571.894 y US 5.587.458. Para un análisis de los fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos de epítomos de unión al receptor de rescate y que tienen un incremento en la semivida *in vivo* véase el documento US 5.869.046.
- Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos (véanse, por ejemplo, los documentos EP 0 404 097; WO 1993/01161; Hudson, P.J., *et al.*, Nat. Med. 9 (2003) 129-134; y Holliger, P., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson, P.J., *et al.*, Nat. Med. 9 (2003) 129-134.
- 20 Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una porción del dominio variable de la cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En determinados modos de realización, un anticuerpo de un dominio único es un anticuerpo de un dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, el documento US 6.248.516).
- 25 Se pueden preparar fragmentos de anticuerpo por diversas técnicas, incluyendo pero sin limitarse a, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción por células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento.
- 30 En determinados modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. Determinados anticuerpos quiméricos se describen, por ejemplo, en el documento US 4.816.567; y Morrison, S.L., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855. En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En otro ejemplo, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo de "clase cambiada" en el que se ha cambiado la clase o subclase de la del anticuerpo original. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.
- 35 40 En determinados modos de realización, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad en humanos, reteniendo mientras la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano original. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR (o porciones de las mismas), se derivan de un anticuerpo no humano y las FR (o porciones de las mismas) se derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. En algunos modos de realización, se sustituyen algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado con los residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que se derivan los residuos de HVR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.
- 45 50 Los anticuerpos humanizados y los procedimientos para prepararlos se revisan, por ejemplo, en Almagro, J.C. y Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633, y se describen además, por ejemplo, en Riechmann, I., *et al.*, Nature 332 (1988) 323-329; Queen, C., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033; documentos US 5.821.337, US 7.527.791, US 6.982.321 y US 7.087.409; Kashmiri, S.V., *et al.*, Methods 36 (2005) 25-34 (que describe el injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, E.A., Mol. Immunol. 28 (1991) 489-498 (que describe el "rebornizado"); Dall'Acqua, W.F., *et al.*, Methods 36 (2005) 43-60 (que describe el "reordenamiento de FR"); y Osbourn, J., *et al.*, Methods 36 (2005) 61-68 y Klimka, A., *et al.*, Br. J. Cancer 83 (2000) 252-260 (que describen el enfoque de "selección guiada" para el reordenamiento de FR).
- 55 60 Las regiones estructurales humanas que se pueden usar para la humanización incluyen pero no se limitan a: regiones estructurales seleccionadas usando el procedimiento de "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims, M.J., *et al.*, J. Immunol. 151 (1993) 2296-2308); regiones estructurales derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de la cadena ligera o pesada (véanse, por ejemplo, Carter, P., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289; y Presta, L.G., *et al.*, J. Immunol. 151 (1993) 2623-2632); regiones estructurales maduras (mutadas somáticamente) humanas o regiones estructurales de línea germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro, J.C. y Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633); y regiones estructurales derivadas del
- 65

cribado de colecciones de FR (véanse, por ejemplo, Baca, M. *et al.*, J. Biol. Chem. 272 (1997) 10678-10684 y Rosok, M.J. *et al.*, J. Biol. Chem. 271 (1996) 22611-22618).

5 En determinados modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano. Se pueden producir anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen en general en van Dijk, M.A. y van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Pharmacol. 5 (2001) 368-374 y Lonberg, N., Curr. Opin. Immunol. 20 (2008) 450-459.

10 Se pueden preparar anticuerpos humanos administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se haya modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a la exposición antigénica. Dichos animales contienen típicamente todos o una porción de los locus de inmunoglobulina humana, que reemplazan los locus de inmunoglobulina endógena, o que están presentes de forma extracromosómica o integrados aleatoriamente en los cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos, los locus de inmunoglobulina endógena en general se han inactivado. Para una revisión de los procedimientos para obtener anticuerpos humanos a partir de animales transgénicos, véanse Lonberg, N., Nat. Biotech. 23 (2005) 1117-1125 y también, por ejemplo, los documentos US 6.075.181 y US 6.150.584 que describen la tecnología XENOMOUSE™; el documento US 5.770.429 que describe la tecnología HUMAB®; el documento US 7.041.870 que describe la tecnología K-M MOUSE® y el documento US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®. Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por dichos animales se pueden modificar además, por ejemplo, por combinación con una región constante humana diferente.

25 También se pueden preparar anticuerpos humanos por procedimientos basados en hibridoma. Se han descrito líneas celulares de heteromioma ratón-humano y mieloma humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (véanse, por ejemplo, Kozbor, D., J. Immunol. 133 (1984) 3001-3005; Brodeur, B.R., *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York (1987), pp. 51-63; y Boerner, P., *et al.*, J. Immunol. 147 (1991) 86-95). Los anticuerpos humanos generados por medio de tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos también se describen en Li *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (2006) 3557-3562. Los procedimientos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en el documento US 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales a partir de líneas celulares de hibridoma) y Ni, J., Xiandai Mianyixue 26 (2006) 265-268 (que describe hibridomas humano-humano). La tecnología de hibridoma humano (tecnología Trioma) también se describe en Vollmers, H.P. y Brandlein, S., Histology and Histopathology 20 (2005) 927-937 y Vollmers, H.P. y Brandlein, S., Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology 27 (2005) 185-191.

35 También se pueden generar anticuerpos humanos aislando secuencias de dominio variable del clon Fv seleccionadas de colecciones de presentación en fagos derivadas de ser humano. Dichas secuencias de dominio variable se pueden combinar a continuación con un dominio constante humano deseado. Las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de colecciones de anticuerpos se describen a continuación.

40 Se pueden aislar anticuerpos cribando colecciones combinatorias para determinar los anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, una variedad de procedimientos son conocidos en la técnica para generar colecciones de presentación en fagos y cribar dichas colecciones para determinar los anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Dichos procedimientos se revisan, por ejemplo, en Hoogenboom, H.R., *et al.*, Methods in Molecular Biology 178 (2001) 1-37 y se describen además, por ejemplo, en McCafferty, J., *et al.*, Nature 348 (1990) 552-554; Clackson, T., *et al.*, Nature 352 (1991) 624-628; Marks, J.D., *et al.*, J. Mol. Biol. 222 (1992) 581-597; Marks, J.D. y Bradbury, A., Methods in Molecular Biology 248 (2003) 161-175; Sidhu, S.S., *et al.*, J. Mol. Biol. 338 (2004) 299-310; Lee, C.V., *et al.*, J. Mol. Biol. 340 (2004) 1073-1093; Fellouse, F.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (2004) 12467-12472; y Lee, C.V., *et al.*, J. Immunol. Methods 284 (2004) 119-132.

50 En determinados procedimientos de presentación en fagos, los repertorios de genes VH y VL se clonan por separado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en colecciones de fagos, que a continuación se pueden cribar para determinar el fago de unión a antígeno como se describe en Winter, G. *et al.*, Ann. Rev. Immunol. 12 (1994) 433-455. Típicamente, los fagos presentan fragmentos de anticuerpo, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o bien como fragmentos Fab. Las colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad para el inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. De forma alternativa, se puede clonar el repertorio sin exposición previa (por ejemplo, de humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos para una amplia gama de antígenos propios y no propios sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths, A.D., *et al.*, EMBO J. 12 (1993) 725-734. Finalmente, también se pueden preparar sintéticamente colecciones sin exposición previa clonando segmentos de genes V no reordenados a partir de células madre y usando cebadores de PCR que contienen una secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y conseguir el reordenamiento *in vitro*, como se describe por Hoogenboom, H.R. y Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388. Las publicaciones de patente que describen colecciones de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo, los documentos US 5.750.373 y US 2005/0079574, US 2005/0119455, US 2005/0266000, US 2007/0117126, US 2007/0160598, US 2007/0237764, US 2007/0292936 y US 2009/0002360.

65 Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo aislados de colecciones de anticuerpos humanos se consideran

anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpo humano en el presente documento.

En determinados modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En determinados modos de realización, una de las especificidades de unión es por un primer antígeno y la otra es por un segundo antígeno diferente. En determinados modos de realización, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítomos diferentes del mismo antígeno. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos para células que expresan el antígeno. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (véanse Milstein, C. y Cuello, A.C., *Nature* 305 (1983) 537-540, documento WO 93/08829 y Traunecker, A., *et al.*, *EMBO J.* 10 (1991) 3655-3659) y genomanipulación "botón en ojal" (véase, por ejemplo, documento US 5.731.168). También se pueden preparar anticuerpos multiespecíficos genomanipulando los efectos de conducción electrostática para preparar moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpo (documento WO 2009/089004); reticulando dos o más anticuerpos o fragmentos (véanse, por ejemplo, el documento US 4.676.980 y Brennan, M., *et al.*, *Science* 229 (1985) 81-83); usando cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny, S.A., *et al.*, *J. Immunol.* 148 (1992) 1547-1553); usando tecnología de "diacuerpos" para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico (véase, por ejemplo, Holliger, P., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 6444-6448); y usando dímeros de Fv monocatenarios (sFv) (véase, por ejemplo, Gruber, M., *et al.*, *J. Immunol.* 152 (1994) 5368-5374); y preparando anticuerpos triespecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt, A., *et al.*, *J. Immunol.* 147 (1991) 60-69).

Los anticuerpos genomanipulados con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo "anticuerpos pulpo", también se incluyen en el presente documento (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576).

El anticuerpo puede ser un "Fab de doble acción" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a un primer antígeno así como a otro antígeno diferente (véase el documento US 2008/0069820, por ejemplo).

El anticuerpo o fragmento también puede ser un anticuerpo multiespecífico como se describe en los documentos WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254, WO 2010/112193, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792 o WO 2010/145793.

PROCEDIMIENTOS

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido al mismo. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero comprenden típicamente un oligosacárido biantenarico ramificado que se enlaza en general por un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc (véase, por ejemplo, Wright, A. y Morrison, S.L., *TIBTECH* 15 (1997) 26-32). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a un GlcNAc en el "tallo" de la estructura oligosacárida biantenarica.

La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, con respecto a la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y de alto contenido en manosa) como se mide por espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2008/077546. Asn297 se refiere al residuo de asparagina localizado aproximadamente en la posición 297 en la región Fc (numeración EU de acuerdo con Kabat de residuos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también se puede localizar aproximadamente ± 3 aminoácidos hacia 5' o hacia 3' de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a pequeñas variaciones de secuencia en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una mejora en la función ADCC (véanse, por ejemplo, los documentos US 2003/0157108; US 2004/0093621). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "desfucosilado" o "carente de fucosa" incluyen: documentos US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki, A., *et al.*, *J. Mol. Biol.* 336 (2004) 1239-1249; Yamane-Ohnuki, N., *et al.*, *Biotech. Bioeng.* 87 (2004) 614-622. Los ejemplos de líneas celulares que pueden producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lee13 carentes de fucosilación de proteínas (Ripka, J. *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 249 (1986) 533-545; documento US 2003/0157108; y documento WO 2004/056312, en especial en el ejemplo 11) y líneas celulares con genes desactivados, tales como gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO con genes desactivados (véanse, por ejemplo, Yamane-Ohnuki, N. *et al.*, *Biotech. Bioeng.*, 87 (2004) 614-622; Kanda, Y., *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 94 (2006) 680-688; y documento WO 2003/085107).

Los procedimientos proporcionados se pueden usar para producir anticuerpos con oligosacáridos bisecados, por ejemplo, en los que un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo se bisecciona por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una reducción en la fucosilación y/o una mejora en la función ADCC. Los ejemplos de dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en los documentos WO 2003/011878; US

6.602.684; y US 2005/0123546. También se pueden producir variantes de anticuerpo con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una mejora en la función CDC. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en los documentos WO 1997/30087; WO 1998/58964; y WO 1999/22764.

Los anticuerpos se pueden producir usando composiciones y procedimientos recombinantes, por ejemplo, como se describe en el documento US 4.816.567. El ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende el VL y una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligera y pesada del anticuerpo). De acuerdo con la invención, se proporciona un vector (por ejemplo, vector de expresión) que comprende dichos ácidos nucleicos. Una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado con) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo. En un modo de realización de acuerdo con la invención, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfocitoide (por ejemplo, Y0, NS0, Sp2/0). En un modo de realización de acuerdo con la invención, se proporciona un procedimiento de preparación de un anticuerpo, en el que el procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se proporciona anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo de la célula huésped (o medio de cultivo de células huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo, el ácido nucleico que codifica un anticuerpo se aísla y se inserta en uno o más vectores para su clonación y/o expresión adicional en una célula huésped. Dicho ácido nucleico se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que se pueden unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo).

Los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levadura son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos, incluyendo cepas de hongos y levadura con vías de glucosilación que se han "humanizado", dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o totalmente humano (véanse Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414; y Li, H., et al., Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215).

Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo glucosilado también se derivan de organismos pluricelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus que se pueden usar conjuntamente con células de insecto, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos de células vegetales también se pueden utilizar como huéspedes (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.959.177, US 6.040.498, US 6.420.548, US 7.125.978 y US 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas)).

También se pueden usar células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamífero que se adaptan para cultivar en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 como se describe, por ejemplo, en Graham, F.L. et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); células de tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describe, por ejemplo, en Mather, J.P. et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68; células MRC 5; y células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR negativa (DHFR-) (Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220); y líneas celulares de mieloma, tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki, P. y Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268.

II. Aspectos específicos de la invención

Se ha descubierto que dependiendo de la organización del vector, el rendimiento del vector de expresión difiere dependiendo del diseño del vector en transfecciones estables.

Se ha descubierto, sin quedar limitado por esta teoría, que al rendimiento de la organización del vector para transfecciones estables podrían contribuir varios puntos: 1) fenómenos de interferencia transcripcional entre copias de vector integradas en el genoma huésped que dependen de y son específicas para el diseño de vector respectivo y que no existen en el sistema transitorio, 2) la influencia del procedimiento de selección y la restricción de selección que depende de la respectiva organización del vector y que desempeña un papel importante en el sistema estable, y

3) la proporción de polipéptido LC con respecto a HC óptima.

Sin embargo, se ha descubierto que para transfecciones estables, la expresión bidireccional de LC y HC fue peor que la organización en fila HC-LC-SM. Sin quedar limitado por esta teoría 1) la organización convergente de los casetes de expresión para LC, HC y SM podría reducir los fenómenos de interferencia transcripcional entre copias de vector integradas, 2) el HC hacia 5' del LC obviamente facilita una proporción de polipéptido LC con respecto a HC que es (más) óptima para transfecciones estables, y 3) la posición hacia 3' del marcador de selección obviamente incrementa la restricción de selección. Además, se ha descubierto que el porcentaje de células productoras de IgG y la productividad de líneas celulares se incrementan. El incremento en la concentración de la presión de selección para vectores que contienen el marcador de selección bidireccionalmente hacia 5' de los casetes de expresión de anticuerpo no incrementó la productividad de grupos o clones estables, aunque la restricción de selección se incrementó claramente (datos no mostrados).

Se ha descubierto que el promotor de hEF1 α genera un alto número de clones de alta producción y un número muy bajo de clones de nula o baja producción. Sin embargo, los valores de producto para los mejores clones individuales del promotor de hEF1 α en el análisis discontinuo fueron menores que para los clones del promotor de hCMV. Pero el número global de clones superiores para el promotor de hCMV es relativamente bajo y su identificación en general requiere grandes esfuerzos de cribado.

Se ha descubierto que el uso de hGT incrementó significativamente la productividad para vectores que contienen el promotor de hCMV cuando se combina con la señal de poliA SV40 o bGH en transfecciones estables. Sin embargo, para vectores que contienen el promotor de hEF1 α , su efecto sobre el valor de producto fue insignificante cuando se combinó con la señal de poliA bGH. Por tanto, se ha descubierto que la influencia de hGT en el rendimiento del vector es dependiente del promotor usado.

La elección de clones apropiados para la evaluación final en fermentaciones a gran escala totalmente controladas normalmente se basa en el análisis por lotes o discontinuo en matraces de agitación. Se ha descubierto que existen diferencias en el rendimiento y la clasificación de algunos vectores o elementos de expresión entre el análisis por lotes y discontinuo. Reemplazar el SV40 por la señal de poliA bGH incrementó la productividad para los vectores que contienen el promotor de hCMV en el análisis por lotes pero no en el discontinuo. La hGT no tiene influencia significativa en el valor de producto de los clones en lotes sino en el análisis discontinuo. Las diferencias absolutas en el rendimiento de vectores entre análisis por lotes y discontinuo difirieron parcialmente. Las diferencias entre los vectores que difieren en la posición del marcador de selección o en el promotor (promotor de hEF1 α o hCMV) fueron moderadamente pronunciadas en análisis por lotes, pero fuertemente evidentes en el discontinuo. Los niveles de expresión y tasas de producción específicas son mayores en un modo discontinuo que en un modo por lotes.

Se ha descubierto una buena correlación en el rendimiento del análisis discontinuo y fermentaciones de 2 l para la mayoría de los clones, no solo en el nivel de valores absolutos de producto, sino también en la clasificación entre diferentes vectores y clones.

Se ha descubierto que la posición hacia 3' del marcador de selección redujo ligeramente la pérdida de productividad en comparación con la posición bidireccional del marcador de selección hacia 5' de los casetes de expresión de anticuerpo. Sin quedar limitado por la teoría, esto se podría deber a un incremento en la restricción de selección y, por tanto, a un mayor nivel de ARNm o por una mejora en la proporción de ARNm o polipéptido de LC con respecto a HC. Ambos factores pueden dar lugar a una mayor tolerancia a los cambios en la productividad.

La señal de poliA bGH disminuyó significativamente la estabilidad de la expresión de anticuerpo en clones en comparación con la señal de poliA SV40. Sin embargo, la inserción de la hGT hacia 3' de la señal de poliA bGH incrementó claramente la estabilidad de la expresión. El efecto positivo de la hGT sobre la estabilidad fue más evidente en ausencia de presión de selección. El análisis de estabilidad de los grupos estables reveló que las células perdieron rápidamente productividad cuando se generaron con el hCMV pero no cuando se generaron con el promotor de hEF1 α . Sorprendentemente, aunque la hGT disminuyó la productividad de los clones para vectores que contienen el promotor de hEF1 α , se incrementó ligeramente su estabilidad.

Solo una pequeña porción de los clones produjo anticuerpos significativamente después del procedimiento de selección. Sin embargo, las modificaciones del vector en la organización y/o elementos incrementaron significativamente la proporción de clones productores de IgG con respecto a los no productores. Las diferentes organizaciones de vectores y, por tanto, los diferentes niveles de expresión del marcador de selección que determinan la restricción de selección también afectan claramente al porcentaje de células productoras de IgG. Las simulaciones estadísticas basadas en datos del procedimiento de cribado demostraron que algunos vectores de expresión también tienen el potencial de disminuir considerablemente la carga de trabajo durante el procedimiento de cribado. Este hecho tiene un gran impacto en los costes para las compañías biofarmacéuticas.

Organización de casetes de expresión

Cuatro vectores diferentes con posiciones variables de la cadena ligera y la pesada del anticuerpo y/o el marcador de

- selección se sometieron a prueba para determinar su productividad (para más detalles, véase la figura 1).
- Los vectores p5137, p5156, p5158 y p5159 se sometieron a prueba en transfecciones transitorias y en análisis por lotes de grupos estables. Los vectores p5137 y p5156 también se sometieron a prueba en análisis por lotes de clones individuales estables.
- Los vectores p5137, p5156, p5158 y p5159 se transfectaron de forma transitoria en células CHO-K1 y la productividad se determinó por ELISA el día 5 después de la transfección (figura 2).
- Se ha descubierto que para la transfección transitoria, la posición de la cadena pesada frente a la cadena ligera de anticuerpo proporciona mejores resultados de expresión en comparación con el orden inverso. Por tanto, se puede obtener una mayor productividad: vector p5137 - 11,6 µg/ml; vector p5156 - 7,1 µg/ml; vector p5159 - 8,0 µg/ml; vector p5158 - 4,2 µg/ml.
- Se ha descubierto que la posición del marcador de selección después de ambas cadenas de anticuerpo proporciona mejores resultados de expresión en comparación con la posición bidireccional frente a la primera cadena de anticuerpo. Por tanto, se puede obtener una mayor productividad.
- Los vectores p5137, p5156, p5158 y p5159 se transfectaron en células CHO-K1 por nucleofección y se seleccionaron grupos estables. La productividad de los grupos estables se determinó en análisis por lotes.
- Se ha descubierto que la posición del marcador de selección después de ambas cadenas de anticuerpo (en sentido 5'-3') proporciona mejores resultados de expresión en comparación con la posición bidireccional (sentido 3'-5') frente a la primera cadena de anticuerpo. Por tanto, se puede obtener una mayor productividad: vector p5156 - 18,0 µg/ml; vector p5158 - 9,1 µg/ml; vector p5137 - 15,6 µg/ml; vector p5159 - 5,7 µg/ml (figura 3).
- Los vectores p5137 y p5156 se transfectaron en células CHO-K1 por nucleofección. Se seleccionaron células transfectadas estables y se analizó la productividad de los mejores 15 clones en análisis por lotes.
- La productividad promedio de los mejores 15 clones generados con el vector p5137 y el vector p5156, respectivamente, fue de 159 µg/ml para el vector p5137 y 141 µg/ml para el vector p5156. La distribución de productividad de los mejores 15 clones de cada vector en el análisis por lotes es muy similar. Las productividades de los clones en el análisis por lotes varían de aproximadamente 50 µg/ml a 300 µg/ml (una excepción: el mejor clon generado con el vector p5137 logra una productividad de > 450 µg/ml).
- La posición del marcador de selección después de ambas cadenas de anticuerpo (en sentido 5'-3') da lugar a productividades significativamente mayores que la posición 3'-5' bidireccional del marcador de selección frente a la primera cadena de anticuerpo tanto en transfecciones transitorias como en análisis por lotes de grupos estables.
- Se ha descubierto que la posición de la cadena de anticuerpo pesada frente a la cadena de anticuerpo ligera (ambas en sentido 5'-3') proporciona una mejor expresión en comparación con el orden inverso en transfecciones transitorias.
- Se ha descubierto que la posición/orden de las cadenas de anticuerpo ligera y pesada no tiene influencia significativa en la productividad de grupos estables y clones individuales. Se debe garantizar que se exprese un ligero exceso de la cadena ligera. Por tanto, la secuencia de los casetes de expresión de la cadena de anticuerpo se dispone para cumplir este requisito.
- Se ha descubierto que el casete de expresión de la cadena de anticuerpo (en cualquier orden) frente a/seguido del casete de expresión del marcador de selección (todo en sentido 5'-3') es especialmente adecuado.
- Si dos genes se expresan directamente uno tras otro, el segundo gen en general se expresa a una tasa menor. La lectura íntegra de la ARN polimerasa a través de la segunda unidad de transcripción influye negativamente en la iniciación de la transcripción en el promotor de la segunda unidad de transcripción.
- En el vector px6068, los casetes de expresión de la cadena ligera y la pesada del anticuerpo se dispusieron bidireccionales (figura 4).
- Para evitar la competencia o interferencia del promotor (iniciación de la transcripción ineficaz debido a la estrecha proximidad de dos promotores, es decir, impedimento estérico de acceso del promotor para los factores de transcripción y la ARN polimerasa, reducción en la disponibilidad de recursos del mecanismo de transcripción) los dos promotores de hCMV cortos que dirigen la expresión de la cadena de anticuerpo ligera y pesada se separaron regionalmente (por el origen de replicación puc).
- Los vectores p5068 y px6068 se transfectaron de forma transitoria en células CHO-K1 por nucleofección.
- El vector px6068 mostró un incremento en la productividad en transfecciones transitorias en comparación con el vector

de expresión p5068: 9,0 µg/ml para el vector px6068, 4,5 µg/ml para el vector p5068 (figura 5).

5 Se ha descubierto que la posición bidireccional y separada de la cadena ligera y la pesada del anticuerpo proporciona una mejora en la expresión de anticuerpo en comparación con la posición posterior con posterior de la cadena ligera y la pesada en la transfección transitoria.

Los vectores p5068 y px6068 se transfectaron en células CHO-K1 por nucleofección y se seleccionaron grupos estables. La productividad de los grupos estables se determinó en análisis por lotes.

10 El análisis por lotes de grupos estables mostró que la productividad de los vectores p5068 y px6068 en grupos estables es similar: 12,5 µg/ml para el vector p5068; 12,5 µg/ml para el vector px6068.

Protocolo de transfección

15 Para transfecciones estables, los vectores se linealizan por digestión de restricción con enzimas que cortan la cadena principal del vector de expresión. En el caso del vector px6068, fueron posibles dos posibles sitios de restricción:

1. entre las unidades de transcripción de la cadena ligera y el marcador de selección (SgrAI);
- 20 2. en el origen puc entre los promotores de hCMV de la cadena ligera y la pesada (BssHII).

El vector px6068 linealizado por digestión de restricción con SgrAI o bien BssHII se transfectó en células CHO-K1 por nucleofección y se seleccionaron grupos estables. La productividad de los grupos estables se determinó en análisis por lotes.

25 Se ha descubierto que la posición del sitio de linealización en el vector de expresión aparentemente tiene una influencia sobre la productividad de los vectores en el análisis por lotes de grupos estables.

30 Los grupos generados con el vector px6068 linealizado por la enzima de restricción BssHII muestran mayores productividades en comparación con los grupos estables generados con el vector px6068 linealizado por la enzima de restricción SgrAI: 1.º experimento: 6,4 µg/ml para el vector px6068 linealizado por la enzima de restricción BssHII y 2,8 µg/ml para el vector px6068 linealizado por la enzima de restricción SgrAI; 2.º experimento: 12,5 µg/ml para el vector px6068 linealizado por la enzima de restricción BssHII y 9,6 µg/ml para el vector px6068 linealizado por la enzima de restricción SgrAI (véase la figura 6).

Punto de tiempo de inicio de la presión de selección

La presión de selección se ejerció en diferentes puntos de tiempo después de la transfección, es decir, a las 0 horas, 4 horas, 8 horas, 24 horas y 48 horas, para la generación de clones celulares estables.

40 Se ha descubierto que por la adición de la presión de selección 24 horas después de la transfección, independientemente de la concentración del agente de selección, da como resultado el mayor valor de anticuerpo en el sobrenadante de cultivo (véase la figura 7).

Influencia de la cadena principal del vector en el rendimiento de las líneas celulares

En general, un vector de expresión se linealiza antes de la transfección en una célula eucariota. Adicionalmente, los vectores de expresión comprenden secuencias procariotas requeridas para la amplificación del vector de expresión en células procariotas.

50 Se ha descubierto que la retirada de los elementos procariotas del vector de expresión linealizado antes de la transfección en células eucariotas da como resultado

- reducción del tiempo de selección requerido para la generación de clones celulares estables (figura 8a),
- 55 - potenciación en la productividad de grupos (figura 8b) y clones individuales (figura 8c),
- aceleración en la recuperación (figura 8d), y
- 60 - mejora en el crecimiento celular (figura 8e).

Elementos del vector y orientación del casete de expresión

65 Se han comparado varios elementos genéticos pertinentes transcripcionales diferentes y combinaciones de los mismos con una combinación de elementos genéticos de referencia. En base a experimentos transitorios comparativos, se han obtenido los siguientes resultados (véase la tabla a continuación, organización del vector bidireccional, SM (3"-

5'')-LC HC (5'-3''))).

elemento genético en el vector px5068	elemento insertado	resultado en experimentos transitorios	resultados en experimentos estables
sin finalizador de la transcripción			
	finalizador de la transcripción hGT	potenciación en la expresión (+ 31 %)	potenciación en la expresión: + 37 %, grupos estables; + 23 % clones individuales
señal de poliA SV40	reemplazado por elemento		
	señal de poliA bGH	potenciación en la expresión (+ 46 %)	grupos estables: + 38 %; clones individuales: - 8 % (para los 15 mejores clones)
	poliA bGH + hGT	potenciación en la expresión (+ 58 %)	potenciación en la expresión: grupos estables + 63 %; clones individuales + 40 % (para los 15 mejores clones)
promotor de hCMV corto			
	hCMV de longitud completa + intrón A	potenciación en la expresión (+ 134 %)	grupo: potenciación en la expresión (+ 23 %) clones individuales: reducción en la expresión (- 62 % para los mejores 15 clones)
	hCMV rata + intrón A	reducción en la expresión (- 50 %)	Grupos estables, reducción en la expresión (- 40 %)
	hEF 1α + intrón A	incremento en la expresión (+ 53 %)	grupo: potenciación en la expresión (+ 460 %) clones: -16 % para los mejores 15 clones (lote)

5 Se han combinado diferentes promotores con la señal de poliA bGH el finalizador de la transcripción hGT (véase la tabla a continuación).

elementos genéticos en el vector px5068	reemplazado por elemento	resultado en experimentos transitorios	resultados en experimentos estables
promotor de hCMV corto señal de poliA SV40			
	promotor de hCMV de longitud completa con intrón A señal de poliA bGH finalizador de la transcripción hGT	incremento en la expresión (+ 75 %)	clones individuales: reducción en la expresión (- 34 % para los mejores 15 clones)
	promotor de hEf1α con intrón A señal de poliA bGH finalizador de la transcripción hGT	incremento en la expresión (+20 %)	clones individuales: expresión similar (- 1 %)

Vectores usados:

vector	promotor	señal de poliA	finalizador de la transcripción
px5068	hCMV corto sin intrón A	señal de poliA SV40	sin finalizador de la transcripción

px6001	hCMV corto sin intrón A	señal de poliA SV40	finalizador de la transcripción hGT
px6008	hCMV corto sin intrón A	señal de poliA bGH	sin finalizador de la transcripción
px6007	hCMV corto sin intrón A	señal de poliA bGH	finalizador de la transcripción hGT
px6051	hCMV de longitud completa con intrón A	señal de poliA SV40	sin finalizador de la transcripción
px6052	promotor de hEF 1α con intrón A	señal de poliA SV40	sin finalizador de la transcripción
px6053	promotor de CMV de rata con intrón A	señal de poliA SV40	sin finalizador de la transcripción
px6062	hCMV de longitud completa con intrón A	señal de poliA bGH	finalizador de la transcripción hGT
px6063	promotor de hEF 1α con intrón A	señal de poliA bGH	finalizador de la transcripción hGT

Se ha descubierto que se puede lograr un incremento en la expresión (productividad) usando los elementos del vector/combinación de elementos como se informa en el presente documento:

- CMV humano sin intrón A: 100 % (referencia)
- CMV humano con intrón A: transitorio 234 %, grupo 123 %, clones 38 %
- CMV de rata con intrón A: transitorio 50 %, grupo 60 %
- EF1α humano con intrón A: transitorio 153 %, grupo 564 %, clones individuales: 84 % (poliA SV40) aprox. 100 % (bGH y hGT)
- EF1α humano con intrón A y: 5'UTR optimizada + 40 % (para EF1α humano)
- MPSV: 29 %
- poliA bGH: transitorio 146 %, grupo + 38%, clones estables 92 %
- hGT: transitorio 131 %, grupos estables 137 %, clones individuales 123 %
- poliA bGH y hGT: transitorio 158 %, grupos estables 163 %, clones individuales 140 %

5

promotor de CMV humano:

Xu *et al.*, J. Control. Release, 81 (2002) 155-163.

10

Xia *et al.*, Prot. Expr. Purif. 45 (2006) 115-124.

promotor de CMV de rata:

Xia *et al.*, Prot. Expr. Purif. 45 (2006) 115-124.

15

promotor de EF1α humano:

Teschendorf *et al.*, Anticancer Res. 22 (2002) 3325-3330.

20

Li *et al.*, J. Immunol. Methods 318 (2007) 113-124.

promotor de MPSV:

Xia *et al.*, Prot. Expr. Purif. 45 (2006) 115-124.

Artelt *et al.*, Gene 68 (1988) 213-219.

5

Stocking *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 5746-5750.

Lin *et al.*, Gene 147 (1994) 287-292.

10

promotor de híbrido MPSV-CMV:

Liu *et al.*, Anal. Biochem. 246 (1996) 150-152.

15

Se puede proporcionar un procedimiento de selección de alta selectividad y alta restricción usando un casete de expresión enlazado a IRES para la expresión del marcador de selección:

- la presión de selección en la expresión de anticuerpo da como resultado una alta selectividad

20

- la expresión enlazada de anticuerpo y marcador de selección da como resultado una alta selectividad

- se ha descubierto que el uso de un elemento IRES con actividad débil da como resultado una alta restricción, es decir, alta producción de anticuerpos y baja producción de marcadores de selección

25

- enlace de la expresión del anticuerpo y el marcador de selección por elementos IRES

- identificación de elementos IRES (EMCV/Gtx) con actividad débil que alteran marginalmente la expresión de IgG

- uso de una proteína de fusión que funciona como selección y como marcador de cribado

30

- proteína de fusión bifuncional GFP-neomicina

- la secuencia PEST de la ornitina descarboxilasa es una secuencia señal proteolítica fuerte y confiere una reducción en la semivida de la proteína

35

- la expresión enlazada a IRES de la proteína de fusión da como resultado una alta selectividad

- semivida corta por secuencia señal proteolítica da como resultado una alta restricción

- debido a la expresión débil y semivida corta de la proteína de fusión se requiere una expresión fuerte

40

- identificación rápida de altos productores por FACS (la clasificación de clones con alta expresión de GFP permite la selección de altos productores)

marcador de selección enlazado a la cadena de anticuerpo pesada por diferentes elementos IRES

45

- px5068 (sin IRES): 100 % expresión de anticuerpo (referencia)

- Gtx-IRES: 20-27 %

- EMCV-IRES 81-94 %

- EV71-IRES 20-36 %

- ELF4G-IRES 3-17 %

- Gtx-IRES (sintético) 88 %

proteína de fusión GFP-Neo enlazada a la cadena de anticuerpo pesada por diferentes elementos IRES

	Gtx	EV71	ELF4G	EMCV
expresión de GFP:	+	+++	-	+
expresión de anticuerpo:	-	-	-	+

50

Gtx-IRES:

Komuro *et al.*, EMBO J. 12 (1993) 1387-1401.

EMCV-IRES:

Mountford *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1991) 4303-4307.

5 EV71-IRES:

Lee *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 90 (2005) 656-662.

ELF4G-IRES:

10

Wong *et al.*, Gene Ther. 9 (2002) 337-344.

Gtx (sintético)-IRES:

15 Chappell *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA97 (2000) 1536-1541.

Se ha descubierto que un incremento en la expresión (productividad) usando el enlace del casete de expresión de la cadena ligera al casete de expresión de la cadena pesada se puede lograr por el elemento EV71-IRES:

- px5068 sin IRES: 100 % expresión de anticuerpo (referencia)
- Gtx-IRES (sintético): 3 %
- EV71-IRES: 82 %
- ELF4G-IRES: 5 %
- EMCV-IRES: 7 %

20

Elementos del vector en combinación con organización del vector

Los siguientes vectores se sometieron a prueba en una línea celular huésped CHO-K1 en transfecciones transitorias, en grupos estables y a nivel de clon individual.

25

vector	organización	promotor	señal de poliA	finalizador de la transcripción
px9001	SM(3'-5')-LC-HC	hCMV	poliA SV40	no presente
px9002	LC-HC-SM	hCMV	poliA SV40	no presente
px9003	LC-HC-SM	hEF1 α	poliA SV40	no presente
px9004	LC-HC-SM	hCMV	poliA bGH	no presente
px9005	LC-HC-SM	hCMV	poliA bGH	hGT
px9006	LC-HC-SM	hEF1 α	poliA bGH	no presente
px9007	LC-HC-SM	hEF1 α	poliA bGH	hGT
px9010	LC(3'-5')-HC-SM	hEF1 α	poliA bGH	no presente
px9011	LC(3'-5')-HC-SM	hCMV	poliA SV40	hGT

Se han comparado varios elementos genéticos relacionados con la transcripción y combinaciones de los mismos con un vector de referencia (px9001, organización del vector SM (orientación 3'-5')-LC-HC (orientación 5'-3')). En base a los experimentos comparativos, se han obtenido los siguientes resultados para la organización del vector unidireccional con el casete de expresión para la cadena ligera y pesada (casete de expresión de la cadena ligera hacia 5' del casete de expresión de la cadena pesada) y para el marcador de selección en el mismo sentido (véase la tabla a continuación) en comparación con un vector de referencia (px9001, organización del vector bidireccional SM (3'-5')-LC-HC (5'-3')).

30

Vector de referencia px9001 (bidireccional, SM (3'-5')-LC_HC (5'-3')) o px9002 (unidireccional, LC-HC-SM (5'-3'))	elemento insertado	resultado en experimentos transitorios	resultados en experimentos estables
	sin elementos diferentes pero diferente organización del vector (px9002, LC-HC-SM)	reducción en la expresión de px9002 en comparación con px9001 (- 10 %)	clones individuales + 37 % en análisis por lotes y + 80 % en discontinuo para px9002 en comparación con px9001

elemento genético en el vector px9002 (LC-HC-SM)	elemento insertado	resultado en experimentos transitorios	resultados en experimentos estables
señal de poliA SV40	reemplazado por elemento		
	señal de poliA bGH (px9004)	potenciación en la expresión (+ 15 % en comparación con px9002)	grupos estables + 115 %; clones individuales + 61 % y + 58 % en análisis por lotes y en discontinuo para los mejores 36 y 15 clones, respectivamente (en comparación con px9001)
	poliA bGH + hGT (px9005)	potenciación en la expresión (+ 30 % en comparación con px9002)	grupo estable + 125 %; clones individuales + 53 % y + 92 % en análisis por lotes y en discontinuo para los mejores 36 y 15 clones, respectivamente (en comparación con px9001)
promotor corto de hCMV + poliA SV40			
	hEF1 α + intrón A + poliA SV40 (px9003)	incremento en la expresión (+ 34 % en comparación con px9002)	grupo estable: potenciación en la expresión, + 596 %; clones: clones individuales + 53 % y + 92 % en análisis por lotes y en discontinuo para los mejores 36 y 15 clones, respectivamente (en comparación con px9001)
	hEF1 α + intrón A + poliA bGH (px9006)	incremento en la expresión (+ 50 % en comparación con px9002)	grupo estable: potenciación en la expresión, + 704 %; clones individuales + 19 % y - 7 % en análisis por lotes y en discontinuo para los mejores 36 y 15 clones, respectivamente (en comparación con px9001)
	hEF1 α + intrón A + poliA bGH + hGT (px9007)	incremento en la expresión (+ 47 % en comparación con px9002)	grupo: potenciación en la expresión + 583 % clones: clones individuales + 7 % y - 14 % en análisis por lotes y en discontinuo para los mejores 36 y 15 clones, respectivamente (en comparación con px9001)

El rendimiento de diferentes vectores en transfecciones transitorias se sometió a prueba después de la nucleofección en células CHO-K1 (véase la figura 9).

- 5 Los vectores que contienen el promotor del factor de alargamiento humano 1 alfa (hEF1 α) (basado en la organización del vector LC-HC-SM) tienen un incremento en la productividad de aproximadamente + 34 % (px9003 frente a px9002; secuencia señal de poliA SV40) y + 30 % (px9006 frente a px9004; secuencia señal de poliA bGH), dependiente de la secuencia señal de poliA usada, respectivamente, en comparación con el uso del promotor de hCMV.
- 10 La adición del finalizador de gastrina humana (hGT) a la secuencia señal de poliA bGH tiene un efecto positivo sobre la productividad para vectores que contienen el hCMV-(px9005 frente a px9004; + 13 %).

Los vectores de expresión basados en la expresión bidireccional de la cadena ligera y la pesada del anticuerpo muestran una mejora en el rendimiento. Los valores de producto se incrementan aproximadamente de 2,7 a 3,4 veces en comparación con el vector de control px9001 dependiente del promotor usado (hEF1 α o hCMV) y la secuencia señal de poliA usada (secuencia señal de poliA SV40 o bGH).

Se ha descubierto que el uso del promotor del factor de alargamiento humano 1 alfa y la secuencia señal de poliA bGH tiene un efecto positivo sobre la productividad en la organización del vector LC-HC-SM (+ 50 %; comparando px9006 y px9002) pero no en la organización del vector LC(3'-5')-HC-SM (- 28comparando %; comparando px9010 y px9011).

Para comparar la productividad del vector de expresión px9002 con los vectores px9003 - 9007, los vectores se transfectaron en células CHO-K1 por nucleofección y se seleccionaron grupos estables. La productividad de los grupos se analizó en análisis por lotes (véase la figura 10).

ES 2 791 758 T3

5 El análisis por lotes de grupos estables mostró que los valores de anticuerpo de grupos transfectados con el vector que contiene el promotor del factor de alargamiento humano 1 alfa (px9003, px9006, px9007) fueron aproximadamente 7-8 veces mayores que los de las células transfectadas con el vector de referencia que contiene el promotor de hCMV de longitud corta (vector px9002) (comparando 97,5 µg/ml, 112,5 µg/ml y 95,6 µg/ml y para los vectores px9003, px9006 y px9007 frente a 14,0 µg/ml para el vector px9002).

10 Los vectores px9001, px9002 y px9004 a px9007 se transfectaron en células CHO-K1 por nucleofección y los mejores clones individuales se identificaron por el procedimiento de cribado clásico. La productividad de los mejores 36 clones de cada vector se analizó en análisis por lotes y los mejores 15 clones en análisis por lotes se sometieron a prueba en análisis discontinuo.

15 La productividad promedio de los mejores 36 clones individuales generados con el vector px9001 en el análisis por lotes es de 356 µg/ml. Los clones generados con el vector px9002 o con los vectores px9004 y 9005 (que contienen adicionalmente la señal de poliA bGH (sola o en combinación con el HGT) en lugar de la señal de poliA SV40) muestran un 37 % (px9002) respectivamente de un 61 % (px9004) a un 53 % (px9005) de incremento en la productividad en comparación con el vector de control px9001. Los clones del vector px9006 y px9007 muestran un incremento en la productividad de aproximadamente un 19% y un 7%, respectivamente.

20 En experimentos discontinuos, los mejores 15 clones obtenidos con cada vector en análisis por lotes se sometieron a prueba en análisis discontinuo durante 14 días.

25 La productividad promedio de los 15 mejores clones individuales internos (generados con el vector px9001) en el análisis discontinuo es de 1345 µg/ml. Los clones generados con el vector px9002 o con los vectores px9004 y px9005 (que contienen adicionalmente la secuencia señal de poliA bGH (sola o en combinación con hGT) en lugar de la secuencia señal de poliA SV40) muestran un 80 % (px9002) respectivamente de un 58 % (px9004) a un 92 % (px9005) de incremento en la productividad en comparación con el vector de control px9001.

30 Además de un incremento en la productividad promedio (véase arriba) también se mejora fuertemente el rendimiento de los clones superiores. Los vectores px9002, px9004 y px9005 muestran, con respecto a la productividad de los 5 clones superiores, un incremento de aproximadamente un 64 % (px9002), 50 % (px9004) y 88 % (px9005) en comparación con el vector de control px9001.

35 A continuación, se comparó directamente el porcentaje de células productoras respecto a no productoras para cada uno de los diferentes vectores. El 14,2 % de los clones generados con el vector px9001 producen anticuerpos, en el resto de los clones resistentes la expresión de anticuerpo está silenciada o bien los clones tienen otros defectos.

40 La organización del vector del vector px9002 casi duplicó el porcentaje de células productoras (a un 26,0 %). El vector que contiene adicionalmente la secuencia señal de poliA bGH sola en lugar de la secuencia señal de poliA SV40 sola (vector px9004) o bien en combinación con hGT (vector px9005) muestra un incremento de aproximadamente 3 veces en el porcentaje de células productoras (39 % y 43 %, respectivamente).

45 El uso del promotor del factor de alargamiento humano 1 alfa en lugar del promotor de hCMV incrementó el número de células productoras hasta 5 veces (más del 70 % de los clones obtenidos después del procedimiento de selección realmente producen anticuerpos).

50 Los 15 mejores clones obtenidos por transfección con los vectores px9001-9007 (basados en resultados de lotes alimentados) se cultivaron en presencia y en ausencia de higromicina B durante 15 pases (= aproximadamente 60 generaciones). Los valores de producto de clones en el análisis por lotes después de 15 pasos se compararon con el valor de producto de clones en el lote al comienzo de la prueba de estabilidad.

En presencia de presión de selección, el cambio en el valor de producto entre 15 clones de cada vector varía de -14,7 % para el vector px9007 y + 0,2 % para el vector px9002 después de 15 pasos.

55 En ausencia de presión de selección, la disminución en el valor de producto varía de un 25,5 % para el vector px9004 hasta un 5,9 % para el vector px9005.

60 El número de clones que cumplen los criterios de estabilidad definidos, tales como > 80 % del valor de producto en el análisis por lotes en comparación con los valores en el punto de partida (G0) tanto en presencia como en ausencia de marcador de selección, varía de 4 a 10. Los vectores px9005, px9007 y px9002 dar lugar al mayor número de clones estables en presencia y ausencia de presión selectiva/marcador de selección (px9005: 10; px9007: 7; px9002: 6)).

65 Por tanto, se ha descubierto que la organización de los vectores px9005 muestra efectos positivos sobre la estabilidad e incrementa el número de clones estables, en especial en ausencia de presión de selección.

Se ha descubierto que la combinación de poliA bGH y hGT en comparación con poliA SV40 sin finalizador de

transcripción (hGT) incrementa claramente la productividad de clones estables independientemente del promotor usado.

Transfecciones transitorias:

- 5 - el uso del promotor del factor de alargamiento humano 1 alfa (con intrón A) proporciona una potenciación en la productividad (en la organización LC-HC-SM)
- 10 - el uso de la secuencia señal de poliA de la hormona de crecimiento bovina proporciona una potenciación en la productividad en comparación con el uso de la secuencia señal de poliA SV40
- la adición de HGT a la secuencia señal de poliA bGH da como resultado un incremento en la productividad en vectores que contienen el promotor de hCMV
- 15 - la organización del vector LC(3'-5')-HC-SM da como resultado una mejora en la expresión

Grupos estables

- 20 - los grupos generados con vectores que contienen el promotor de hEF1α muestran una potenciación en la productividad en el análisis por lotes
- los clones generados con vectores que contienen el promotor de hEF1α muestran una reducción en el número de clones de baja producción
- 25 - los clones generados con vectores que contienen el promotor de hEF1α muestran una mayor estabilidad de la expresión de IgG

Clones individuales

- 30 - la organización del vector con la posición hacia 3' del marcador de selección (LC-HC-SM) tiene un efecto positivo sobre la productividad de clones individuales
- los clones generados con vectores que contienen la secuencia señal de poliA bGH y la hGT tienen mayores productividades y estabildades

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

Secuencias

- 40 **SEQ ID NO: 01** promotor de CMV humano corto sin intrón A
- SEQ ID NO: 02** promotor de CMV humano corto sin intrón A con 5'UTR
- SEQ ID NO: 03** promotor de CMV humano de longitud completa con intrón A
- SEQ ID NO: 04** promotor de EF1 alfa humano de longitud completa sin intrón A
- SEQ ID NO: 05** promotor de EF1 alfa humano de longitud completa con intrón A
- SEQ ID NO: 06** promotor de EF1 alfa humano corto con intrón A con 5'UTR
- SEQ ID NO: 07** promotor de CMV de rata de longitud completa con intrón A
- SEQ ID NO: 08** secuencia señal de poliA SV40
- SEQ ID NO: 09** secuencia señal de poliA bGH
- SEQ ID NO: 10** secuencia finalizadora hGT
- SEQ ID NO: 11** promotor de SV40
- SEQ ID NO: 12** secuencia PEST de ornitina descarboxilasa
- SEQ ID NO: 13** secuencia de ácido nucleico que codifica GFP
- SEQ ID NO: 14** marcador de selección de neomicina
- SEQ ID NO: 15** ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión GFP-PEST-NEO
- SEQ ID NO: 16** EMCV-IRES
- SEQ ID NO: 17** EV71-IRES

Figuras

- 5 **Figura 1** Resumen esquemático sobre diferentes diseños de vector sometidos a prueba en transfecciones transitorias, en grupos estables y al nivel de clon individual. Los vectores p5158, p5137, p5156 y p5159 varían en la posición de la cadena ligera (LC) y la pesada (HC) respectivamente y/o en la posición del marcador de selección (SM).
- 10 **Figura 2** Productividad de los vectores p5137, p5156, p5158 y p5159 en células CHO-K1 transfectadas transitoriamente. Se muestra la productividad promedio de ocho transfecciones independientes de cada vector el día 5 después de la transfección medida por ELISA.
- 15 **Figura 3** Productividad de grupos estables generados con los vectores p5137, p5156, p5158 y p5159 en análisis por lotes. Se muestra la productividad promedio de tres grupos de cada vector el día 7.
- 20 **Figura 4** Resumen esquemático del diseño de vector del vector de expresión p5068 y del diseño de vector del vector px6068. Se indican LC (cadena ligera), HC (cadena pesada), SM (marcador de selección (dirigido por un promotor de SV40)) y ori (origen de replicación).
- 25 **Figura 5** Productividad de los vectores p5068 y px6068 en células CHO-K1 transfectadas transitoriamente. Se muestra la productividad promedio de ocho transfecciones independientes de cada vector el día 7 después de la transfección medida por ELISA.
- 30 **Figura 6** La productividad de los grupos estables generados con el vector px6068 linealizado por la enzima de restricción SgrAI o bien por la enzima de restricción BssHII. Se muestra la productividad promedio de dos grupos de cada vector en análisis por lotes el día 7.
- 35 **Figura 7** Dependencia del valor de IgG de grupos de células estables en el punto de tiempo del inicio de la selección después de la transfección.
- 40 **Figura 8** (A) tiempo de selección para la generación de clones celulares estables; (B) productividad de grupos; (C) productividad de clones individuales; (D) evolución temporal de recuperación de densidad celular viable; (E) densidad celular viable después de 4, 7 y 10 días de cultivo; preparación del vector A: vector completo linealizado, preparación del vector B: corte de elementos del vector procariota, preparación del vector C: corte y retirada de elementos del vector procariota.
- 45 **Figura 9** Productividad de los vectores px9001-px9011 en transfecciones transitorias usando nucleofección: se muestra la productividad promedio de ocho transfecciones independientes de cada vector el día seis después de la transfección; los valores se normalizan a los valores de referencia px9001 (establecido en un 100 %).
- 50 **Figura 10** Resumen del valor de producto de grupos estables generados con los vectores px9001-px9007 en el análisis por lotes el día 10. Se muestra el promedio de dos (px9001 y px9002) a tres transfecciones independientes cada vector.

Ejemplos

45 Vector de expresión p5068 y p5069

Los plásmidos de expresión p5068 y p5069 comprenden casetes de expresión para la expresión de un anticuerpo anti-P-selectina (casete de expresión genómicamente organizado con organización retenida de exón-intrón) como se informa en el documento WO 2005/100402.

50 Los genes que codifican la cadena ligera y pesada de HuMab anti-P-selectina se ensamblaron por separado en vectores de expresión de células de mamífero.

55 De este modo, los segmentos de genes que codifican la región variable de la cadena ligera (VL) de HuMab anti-P-selectina y la región constante de la cadena ligera (CL) κ humana se unieron como segmentos de genes para la región variable de la cadena pesada (VH) de HuMab anti-P-selectina y la región constante de la cadena pesada γ 1 humana o la región constante de la cadena pesada γ 4 humana (CH1-Bisagra-CH2-CH3).

60 La información general sobre las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligera y pesada humanas a partir de las que se puede deducir el uso del codón se proporciona en: Kabat, E. A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), n.º publicación NIH 91-3242.

65 La unidad de transcripción de la cadena ligera κ de HuMab anti-P-selectina se compone de los siguientes elementos:

- el potenciador y promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (hCMV),

- una 5'-UT sintética que incluye una secuencia de Kozak,
- una secuencia señal de la cadena pesada de inmunoglobulina murina que incluye el intrón de secuencia señal,
- el ADNc de la cadena ligera variable de HuMab anti-P-selectina clonado dispuesto con un sitio de restricción BsmI único en el extremo 5' y un sitio dador de empalme y un sitio de restricción NotI único en el extremo 3',
- la región constante del gen κ humano genómico, que incluye el potenciador de Ig- κ de ratón de intrón 2 (Picard, D. y Schaffner, W. Nature 307 (1984) 80-82), y
- la secuencia señal de poliadenilación ("poliA") κ de inmunoglobulina humana.

La unidad de transcripción de la cadena pesada $\gamma 1$ de HuMab anti-P-selectina se compone de los siguientes elementos:

- el potenciador y promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (hCMV),
- una 5'-UT sintética que incluye una secuencia de Kozak,
- una secuencia señal de la cadena pesada de inmunoglobulina murina modificada que incluye el intrón de secuencia señal,
- el ADNc de la cadena pesada variable de HuMab anti-P-selectina clonado dispuesto con un sitio de restricción BsmI único en 5' y un sitio dador de empalme y un sitio de restricción NotI único en el extremo 3',
- la región constante del gen de cadena pesada $\gamma 1$ humana genómica, que incluye el potenciador μ de Ig de ratón (Neuberger, M.S., EMBO J. 2 (1983) 1373-1378), y
- la secuencia señal de poliadenilación de inmunoglobulina- $\gamma 1$ humana ("poli A").

Además del casete de expresión de la cadena ligera κ o cadena pesada $\gamma 1$ de HuMab anti-P-selectina, estos plásmidos contienen

- un gen de resistencia a higromicina,
- un origen de replicación, oriP, del virus de Epstein-Barr (VEB),
- un origen de replicación del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli* y
- un gen de β -talactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*.

Técnicas de ADN recombinante

La clonación se realizó usando técnicas de clonación estándar como se describe en Sambrook *et al.*, 1999 (*supra*). Todos los reactivos biológicos moleculares estaban disponibles comercialmente (si no se indica de otro modo) y se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Síntesis de ácido nucleico

Se sintetizó ADN de los diferentes elementos genéticos por Genart AG, Regensburg.

Determinación de la secuencia de ácido nucleico

Se determinaron las secuencias de ADN por secuenciación de doble hebra realizada en SequiServe (SequiServe GmbH, Alemania).

Análisis de la secuencia de ADN y proteínas y gestión de datos de secuencia

Se usó el paquete de programas Vector NTI Advance versión 9.0 para la creación, cartografía, análisis, anotación e ilustración de secuencias.

Técnicas de cultivo celular

Se cultivaron células CHO-K1 en medio CD-CHO (Invitrogen Corp., Gibco®, n.º cat. 10743-011) complementado con 1x complemento HT (Invitrogen Corp., Gibco®, n.º cat. 11067-030).

Para la selección de grupos/líneas celulares de CHO-K1 transfectadas de forma estable, se añadieron de 400 a 800 µg/ml de G418 o de 200 a 400 µg/ml de higromicina (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Sciences, Alemania, n.º cat.: 843555).

- 5 Todas las líneas celulares se mantuvieron en estufas humidificadas a 37 °C con CO₂ al 5 % bajo agitación constante a 120 a 140 rpm/min. Cada 3 a 4 días las células se dividieron en medio recién preparado. Se determinaron la densidad y viabilidad de los cultivos usando el contador celular Casey TT o Cedex Hires (Roche innova AG, Bielefeld). Se realizó la transfección de células por la tecnología de nucleofección de Amaxa (Lonza GmbH, Alemania).
- 10 Además se aplicaron técnicas de cultivo celular estándar como se describe, por ejemplo, en Bonifacino, J.S., *et al.*, (eds.), *Current Protocols in Cell Biology*, John Wiley and Sons, Inc. (2000).

Recuento celular y determinación de la viabilidad celular

15 **a) Sistema de recuento celular de campo eléctrico (CASY)**

El contador CASY® Technology Cell Counter, modelo Model TT (Roche Innovatis AG, Bielefeld) usa corriente eléctrica para el recuento celular. Se usó el análisis del área de pulsos para obtener información de las señales creadas cuando una célula pasa a través del poro de medición en un campo de voltaje bajo. La integridad estructural de la membrana celular es un grado de viabilidad celular. Por lo tanto, los tintes tales como el azul tripano no son necesarios para determinar la viabilidad.

b) Procedimiento de exclusión de azul de tripano automatizado (Cedex)

25 Se usó un sistema Cedex HiRes (Roche Innovatis AG, Bielefeld) para determinar las viabilidades celulares durante la selección de grupos y para el recuento celular automatizado.

El azul de tripano es un tinte que no puede entrar en las células a través de membranas celulares intactas. Solo se tiñen esas células y se marcan como muertas, que tienen una membrana celular dañada. Se realizaron el procedimiento de tinción, recuento celular y análisis gráfico de los resultados automáticamente por el sistema Cedex por reconocimiento de imagen digital. Otros parámetros de medición son tamaño, morfología y tasa de agregación celulares. Con el muestreo múltiple, se midieron hasta 20 muestras consecutivamente.

Preparación de plásmido y comparación de calidad para una comparación exacta de plásmidos en transfecciones

35 La eficacia de transfección y, por lo tanto, la productividad se ven fuertemente influenciadas por varios factores tales como cantidad y calidad del ADN. Para garantizar condiciones de inicio iguales para cada vector, se comprobó exhaustivamente la cantidad y calidad de ADN de todos los vectores antes de la transfección.

40 **- Preparación simultánea de vectores de expresión**

Se prepararon todos los vectores simultáneamente por el kit de aislamiento de plásmidos High Speed Maxi (Qiagen GMBH, Hilden) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

45 **- Purificación de fenol/cloroformo y precipitación de etanol**

Se purificaron todos los vectores simultáneamente por una purificación con fenol/cloroformo. Se mezclaron 500 µg de cada ADN plasmídico linealizado con 200 µl de fenol tamponado con Tris al 50 % (v/v), cloroformo al 48 % (v/v), solución de alcohol isoamílico al 2 % (v/v) y se centrifugó durante 1 min a 13.000 rpm. A continuación se transfirió la fase acuosa superior a un tubo nuevo y se mezcló con 200 µl de cloroformo al 96 % (v/v), alcohol isoamílico al 4 % (v/v) y se centrifugó durante 1 min a 13.000 rpm. De nuevo se transfirió la fase superior a un tubo nuevo y se mezcló con 1/10 (volumen total) de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) y 2,5 veces (volumen total) de etanol al 100 %. Después de mezclar e incubar la reacción durante 5 min a temperatura ambiente, se centrifugó la mezcla durante 5 min a 13.000 rpm para sedimentar el ADN. Se desechó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 900 µl de etanol al 70 % (v/v) y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Después de una etapa de centrifugación final a la velocidad máxima durante 5 min, se desecharon los sobrenadantes y se secaron los sedimentos y se resuspendieron con H₂O estéril.

60 **- Determinación de ADN**

Se determinó la cantidad de ADN de cada vector usando el BioPhotometer (Eppendorf; Hamburg). La medición de ADN se realizó siempre por triplicado usando una dilución 1:20 en Tris (pH 8,0).

65 **- Gel de agarosa**

Se comprobó la calidad del ADN de cada plásmido en un gel de agarosa al 0,8 %. Se determinaron la degradación

del ADN, conformaciones de vector y concentraciones de ADN. Se usaron vectores que muestran cantidades y cualidades comparables (sin degradación de ADN, formas superhelicoidales similares (ccc), cantidades de ADN similares en gel) para transfecciones transitorias y estables.

5 Transfecciones transitorias

Se transfectaron todos los vectores en células CHO-K1 por el sistema Amaxa 96-well Shuttle System (Lonza GmbH, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se transfectó cada vector en 8 replicados. Se normalizaron las cantidades de ADN del vector transfectado a cantidades molares iguales/números de copias de acuerdo con 1 µg del plásmido de expresión de referencia (p5068 o p5069). Para determinar la productividad, se analizó el sobrenadante de cultivo celular libre de células para determinar el valor de IgG el día 4 a 7 después de la transfección por un ELISA universal de una etapa (Dianova).

15 **Sistema Amaxa 96-well Shuttle System:**

Se sedimentaron células CHO-K1 que crecen en matraces giratorios por centrifugación a 850 rpm durante 5 min y se resuspendieron en medio de cultivo. Se sembraron plásmidos circulares en placas de nucleofección de 96 pocillos a concentraciones equimolares de acuerdo con 1 µg del vector de expresión de referencia p5068 o p5069. A continuación se añadieron las células a las placas a una concentración de 4×10^5 células por pocillo. Se llevó a cabo la transfección por el programa Amaxa DN-137. Se incubaron las células durante 10 min después de la transfección y a continuación se transfirieron a placas de incubación de fondo plano de 96 pocillos que contenían 200 µl de medio de cultivo. Se cultivaron las estáticamente. El día 4 a 6 después de la transfección, se determinaron los niveles de IgG usando el ELISA universal de una etapa.

25 Transfecciones estables y generación de líneas celulares de CHO recombinantes

Se realizaron transfecciones estables por la tecnología de nucleofección (Amaxa Biosystems, Lonza Cologne AG) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Antes de la transfección, se linealizaron los plásmidos por la enzima de restricción SgrA I. Se transfectó cada plásmido por duplicado o triplicado. Se usaron 5×10^6 células y se usaron 1,2 pmol de plásmido linealizado por transfección individual. (Nucleofector Kit T, Amaxa Program A33).

Para la transfección, se resuspendieron las células en la solución Nucleofector T y se alicuotó en tubos de 2 ml. Después de la adición del plásmido, se llevó a cabo la transfección aplicando el pulso. A continuación se transfirieron las células a matraces de cultivo de tejido T25 que contenían 4 ml de medio recién preparado precalentado y 4 ml de medio acondicionado. Se aplicó presión selectiva 24 horas después de la transfección añadiendo 250 µg/ml de higromicina B.

35 Generación de grupos estables

40 Se transfectaron los vectores en células CHO-K1 por tecnología de nucleofección de Amaxa y se seleccionaron grupos estables usando higromicina B o G418 como agente de selección. Cada transfección se realizó por triplicado. Para la generación de grupos estables, se linealizaron uniformemente todos los plásmidos por digestión de restricción con SgrA I. Se usó el Nucleofector Kit T de Amaxa para llevar a cabo transfecciones estables y se transfectó cada plásmido por triplicado.

45 Se establecieron grupos estables como sigue: se usaron 5×10^6 células y 1,2 pmol de plásmido linealizado para cada transfección. Se resuspendieron las células en solución T y se alicuotó en tubos de 2 ml. Después de la adición del plásmido, se llevó a cabo la transfección aplicando el pulso (Amaxa Program A33). Los grupos de células transfectadas se cultivaron estáticamente en matraces de cultivo de tejido T25 que contenían 4 ml de medio recién preparado precalentado y 4 ml de medio acondicionado.

50 Después de 24 h después de la transfección, se aplicó presión de selección: se centrifugaron las células durante 5 min a 800 rpm, se resuspendieron en 3 ml de medio de cultivo que contenía 300 µg/ml de higromicina B. Se transfirieron las células a placas de fondo plano de 6 pocillos 3 días después de la transfección. A continuación se cultivaron las células durante dos semanas hasta que la viabilidad celular se redujo al mínimo y aumentó de nuevo por encima de un 99 %. Se determinaron el número de células y las viabilidades constantemente con un sistema Cedex HiRes (Innovatis, Bielefeld). Durante el cultivo, se retiraron restos celulares por centrifugación y las células se resuspendieron siempre en 3 ml de medio recién preparado.

60 Generación de clones estables usando el sistema robótico Caliper

65 Se transfectaron los vectores en células CHO-K1 como se describe anteriormente. 48 horas después la transfección, se aplicó presión de selección (higromicina B o G418) y se sembraron células en placas de fondo plano de 384 pocillos a una concentración de 350 a 700 células por pocillo usando un sistema de aislamiento de clones de alto rendimiento automatizado (estación de trabajo Sciclone ALH 3000, Caliper Life Sciences GmbH, Maguncia).

Después de 10 a 14 días, se cribaron las placas de 384 pocillos para determinar los niveles de IgG usando un cribado de rendimiento ultraelevado basado en ELISA (ELSIA uHTS). De un cribado primario, se eligieron los mejores clones productores y se transfirieron a placas de 96 pocillos de fondo plano. Después de 3 a 6 días, se cribaron las células para determinar los niveles de IgG en una segunda ronda. Se eligieron de nuevo los mejores clones productores y se transfirieron manualmente a placas de 24 pocillos de fondo plano. Después de otra etapa de cribado basada en ELISA, se eligieron los mejores clones y se transfirieron a placas de 6 pocillos de fondo plano. Se determinaron los niveles de IgG en las placas de 6 pocillos por medición de ProtA para identificar los mejores clones finales para el cultivo por lotes en placas de 6 pocillos agitados.

10 Análisis por lotes de grupos/clones individuales

Para detectar diferencias en la productividad y estabilidad, se contaron los números celulares de los clones/grupos usando un contador celular Casey y se sembraron uniformemente en placas de 6 pocillos de fondo plano a una concentración de 3×10^5 células/ml y un volumen total de 3,0 ml. Se cultivaron todos los cultivos por lotes durante 12 días y se cribaron los sobrenadantes de cultivo celular para determinar los niveles de IgG humana el día 4, 7, 9, 11 o 12.

Cuantificación de IgG

20 Se determinó el valor de IgG en experimentos transitorios y en los formatos de cribado (384 pocillos a 24 pocillos) usando el ELISA universal de una etapa. Se determinaron la productividad de grupos estables y clones individuales estables en experimentos por lotes por HPLC de proteína A.

ELISA universal de una etapa

25 Se usó un ELISA universal de una etapa (Dianova) para determinar los niveles de IgG humana a partir de sobrenadantes de cultivo celular. Se preparó una curva estándar usando diluciones en serie de un anticuerpo anti-P-selectina (F. Hoffmann-La Roche AG, Basilea, Suiza) con un intervalo de 0.3125-20 ng/ml usando tampón de dilución (PBS + RPLA1 al 5 % (p/v)). Se añadieron 95 µl de mezcla de anticuerpos que contenía 0,5 µg/ml de anticuerpo anti-Fc humano F(ab')₂ biotilado (Jackson Laboratories) y 0,1 µg/ml de anticuerpo anti-Fcγ humano F(ab')₂ conjugado con peroxidasa (laboratorios Jackson; Suffolk) se añadió a MTP de 96 pocillos recubiertos con estreptavidina (StreptaWell, Roche Diagnostics GmbH). Se añadieron 5 µl de sobrenadante de cultivo celular diluido a 1:20.000 a las placas y se incubaron durante 1 hora. Se lavaron las placas recubiertas con anticuerpo tres veces con 200 µl de tampón de lavado (PBS + Tween²⁰ al 0,05 % (v/v)). Se añadieron 100 µl de ABTS (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) a las placas y se midió la absorbancia a 405 nm con una longitud de onda de referencia de 492 nm.

Medición de ProtA

40 Se determinó el valor de IgG del análisis por lotes por proteína A usando una cromatografía basada en HPLC en combinación con el ELISA universal de una etapa.

FACS

45 Se usó la separación celular activada por fluorescencia para determinar las eficacias de transfección (en base a células que expresan GFP) o los niveles de expresión de GFP de células transfectadas de forma estable o transitoria. En general, se midieron 5×10^6 células de cada clon o grupo usando el citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, CA). Se usaron datos de dispersión directa y lateral para determinar tamaño, viabilidad y morfología celulares.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Combinaciones de elementos de vectores de expresión, procedimientos de generación de células de reproducción novedosos y su uso para la producción recombinante de polipéptidos

5 <130> 30790 WO

<150> EP11195363.4

<151> 22/12/2011

<160> 17

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1

<211> 608

<212> ADN

<213> Citomegalovirus humano

<400> 1

gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata	60
gccccatataat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggccccgcct ggctgaccgc	120
ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag	180
ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac	240
atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccg	300
cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg	360
tattagtcac cgctattagc atgggtgatgc ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat	420
agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt	480
tttggcacca aaatcaacgg gactttcca aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc	540
aaatgggccc taggcgtgta cgggtgggagg tctatataag cagagctccg tttagtgaac	600

15 gtcagatc 608

<210> 2

<211> 696

<212> ADN

<213> Citomegalovirus humano

20 <400> 2

ES 2 791 758 T3

gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata 60
 gccatataat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc 120
 ccaacgaccc cgcgccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 180
 ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac 240
 atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggg aatggcccg 300
 cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 360
 tattagtcac cgctattagc atggtgatgc ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat 420
 agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt 480
 tttggcacca aatcaacgg gactttccaa aatgctgtaa caactccgcc ccattgacgc 540
 aatggggcgg taggcgtgta cgggtggagg tctatataag cagagctccg tttagtgaac 600
 gtcagatcta gctctgggag aggagcccag cactagaagt cggcgggtgtt tccattcggg 660
 gatcagcact gaacacagag gaagcttgcc gccacc 696

<210> 3

<211> 2125

5 <212> ADN

<213> Citomegalovirus humano

<400> 3

ctgcagtgaa taataaaatg tgtgtttgtc cgaaatacgc gttttgagat ttctgtcgcc 60
 gactaaattc atgtcgcgcg atagtgggtg ttatcgccga tagagatggc gatattggaa 120
 aatcgatat ttgaaaatat ggcatattga aatgctcgcc gatgtgagtt tctgtgtaac 180
 tgatatcgcc atttttccaa aagtgatttt tgggcatacgc cgatatctgg cgatagcgct 240
 tatatcgttt acgggggatg gcgatagacg actttggtga cttgggagat tctgtgtgtc 300
 gcaaatatcg cagtttcgat ataggtgaca gacgatatga ggctatatcg ccgatagagg 360
 cgacatcaag ctggcacatg gccaatgcat atcgatctat acattgaatc aatattggcc 420
 attagccata ttattcattg gttatatagc ataaatcaat attggctatt ggccattgca 480
 tacgttgtat ccatatcata atatgtacat ttatattggc tcatgtccaa cattaccgcc 540
 atgttgacat tgattattga ctagttatta atagtaatca attacggggg cattagttca 600
 tagcccatat atggagtcc gogttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc 660
 gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat 720
 agggactttc cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgc taaactgccc acttggcagt 780
 acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc 840
 cgctggcat tatgccagat acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta 900

ES 2 791 758 T3

cgtattagtc atcgctatta ccatgggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg 960
 atagcgggtt gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt 1020
 gttttggcac caaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac 1080
 gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtgga ggtctatata agcagagctc gtttagtgaa 1140
 ccgtcagatc gcctggagac gccatccacg ctgttttgac ctccatagaa gacaccggga 1200
 ccgatccagc ctcccgggcc gggaacgggtg cattggaacg cggattcccc gtgccaagag 1260
 tgacgtaagt accgcctata gagtctatag gccaccccc ttggcttctt atgcatgcta 1320
 tactgttttt ggcttggggg ctatacacc cgccttctc atgttatagg tgatggtata 1380
 gcttagccta taggtgtggg ttattgacca ttattgacca ctcccctatt ggtgacgata 1440
 ctttccatta ctaatccata acatggctct ttgccacaac tctctttatt ggctatatgc 1500
 caatacactg tccttcagag actgacacgg actctgtatt ttacaggat ggggtctcat 1560
 ttattattta caaattcaca tatacaaac caccgtcccc agtgcccga gtttttatta 1620
 aacataacgt gggatctcca cggaatctc gggtagctgt tccggacatg ggctcttctc 1680
 cggtagcggc ggagcttcta catccgagcc ctgctcccat gcctccagcg actcatggtc 1740
 gctcggcagc tccttgctcc taacagtga gccagactt aggcacagca cgatgccac 1800
 caccaccagt gtgccgcaca aggcctggc ggtagggtat gtgtctgaaa atgagctcgg 1860
 ggagcgggct tgcaccgctg acgcatttg aagacttaag gcagcggcag aagaagatgc 1920
 aggcagctga gttgtgtgt tctgataaga gtcagaggta actcccgtt cggtgctggt 1980
 aacgggtggag ggagtgtag tctgagcagt actcgttgct gccgcgcgcg ccaccagaca 2040
 taatagctga cagactaaca gactgttctt ttccatgggt cttttctgca gtcaccgtcc 2100
 ttgacacggt ttaaacgcc ccacc 2125

<210> 4

<211> 575

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

cccgggctgg gctgagaccc gcagaggaag acgctctagg gatttgtccc ggactagcga 60
 gatggcaagg ctgaggacgg gaggtgatt gagaggcga ggtacaccct aatctcaata 120
 caacctttgg agctaagcca gcaatggtag agggaagatt ctgcacgtcc ottccaggcg 180
 gcctccccgt caccaccccc cccaaccgc cccgaccgga gctgagagta attcatacaa 240
 aaggactcgc ccctgccttg gggaatccca gggaccgtcg ttaaactccc actaacgtag 300
 aaccagaga tcgctgcggt cccgccccct caccgcccg ctctcgtcat cactgaggtg 360

ES 2 791 758 T3

gagaagagca tgcgtgagggc tccgggtgccc gtcagtgggc agagcgcaca tcgcccacag 420
 tccccgagaa gttgggggga ggggtcggca attgaaccgg tgcctagaga aggtggcgcg 480
 gggtaaactg ggaaagtgat gtcgtgtact ggctccgcct ttttcccgag ggtgggggag 540
 aaccgtatat aagtgcagta gtcgccgtga acgtt 575

<210> 5

<211> 1571

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

ccccggctgg gctgagacct gcagaggaag acgctctagg gatttgtccc ggactagcga 60
 gatggcaagg ctgaggacgg gaggtgatt gagagggcga ggtacaccct aatctcaata 120
 caacctttgg agctaagcca gcaatgtag agggaagatt ctgcacgtcc cttccaggcg 180
 gcctccccgt caccaccccc cccaaccgac cccgaccgga gctgagagta attcatacaa 240
 aaggactcgc ccctgccttg gggaatccca gggaccgtcg ttaaactccc actaacgtag 300
 aaccagaga tcgctgcgtt cccgccccct caccgccccg ctctcgatcat cactgaggtg 360
 gagaagagca tgcgtgagggc tccgggtgccc gtcagtgggc agagcgcaca tcgcccacag 420
 tccccgagaa gttgggggga ggggtcggca attgaaccgg tgcctagaga aggtggcgcg 480
 gggtaaactg ggaaagtgat gtcgtgtact ggctccgcct ttttcccgag ggtgggggag 540
 aaccgtatat aagtgcagta gtcgccgtga acgttctttt tcgcaacggg tttgccgcca 600
 gaacacaggt aagtgccgtg tgtggttccc gcgggcctgg cctctttacg ggttatggcc 660
 cttgcgtgcc ttgaattact tccacgcccc tggctgcagt acgtgattct tgatcccagag 720
 cttcgggttg gaagtgggtg ggagagttcg aggccttggc cttaaggagc cccttcgcct 780
 cgtgcttgag ttgaggcctg gcctgggagc tggggccgac gcgtgcgaat ctggtggcac 840
 cttcgcgcct gtctcgctgc tttcgataag tctctagcca tttaaaattt ttgatgacct 900
 gctgcgacgc ttttttctg gcaagatagt cttgtaaatg cgggccaaga tctgcacact 960
 ggtatttcgg tttttggggc cgcgggcggc gacggggccc gtgcgtccca gcgcacatgt 1020
 tcggcgagggc ggggcctgag agcgcggcca ccgagaatcg gacgggggta gtctcaagct 1080
 ggccggcctg ctctggtgcc tggcctcggc ccgcccgtga tcgccccgcc ctgggcggca 1140
 aggtggccc ggtcggcacc agttgcgtga gcggaaagat ggccgcttcc cggccctgct 1200
 gcagggagct caaaatggag gacgcggcgc tcgggagagc gggcgggtga gtcacccaca 1260
 caaaggaaaa gggcctttcc gtcctcagcc gtcgcttcat gtgactccac ggagtaccgg 1320

ES 2 791 758 T3

gcgcccgtcca ggcacctcga ttagttctcg atcttttggga gtacgtcgtc tttaggttgg 1380
 ggggaggggt tttatgcat ggagtttccc cacactgagt gggaggagac tgaagttagg 1440
 ccagcttggc acttgatgta attctccttg gaatttgccc tttttgagtt tggatcttgg 1500
 ttcattctca agcctcagac agtggttcaa agtttttttc ttccatttca ggtgggttaa 1560
 acgccgccac c 1571

<210> 6

<211> 1653

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> promotor del factor de alargamiento humano 1 alfa con intrón A y con 5'UTR optimizada

<400> 6

cccgggctgg gctgagacct gcagaggaag acgctctagg gatttgtccc ggactagcga 60
 gatggcaagg ctgaggacgg gaggtgatt gagagggcga ggtacaccct aatctcaata 120
 caacctttgg agctaagcca gcaatggtag agggaagatt ctgcacgtcc cttccaggcg 180
 gcctccccgt caccaccccc cccaaccgac cccgaccgga gctgagagta attcatacaa 240
 aaggactcgc ccctgccttg gggaatcccc gggaccgtcg ttaaactccc actaacgtag 300
 aaccagaga tcgctgcgtt cccgccccct caccgccccg ctctcgtcat cactgaggtg 360
 gagaagagca tgcgtgaggc tccggtgccc gtcagtgggc agagcgaca tcgcccacag 420
 tccccagaaa gttgggggga ggggtcggca attgaaccgg tgcctagaga aggtggcgcg 480
 gggtaaactg ggaaagtgat gtcgtgtact ggctccgctt ttttcccgag ggtgggggag 540
 aaccgtatat aagtgcagta gtcgccgtga acgttctttt tcgcaacggg tttgccgcca 600
 gaacacaggt aagtgccgtg tgtggttccc gcgggcctgg cctctttacg ggttatggcc 660
 cttgcgtgcc ttgaattact tccacgcccc tggctgcagt acgtgattct tgatcccagag 720
 cttcgggttg gaagtgggtg ggagagttag aggccttgcg cttaaggagc cccttcgcct 780
 cgtgcttgag ttgaggcctg gcctgggccc tggggccgcc gcgtgcgaat ctggtggcac 840
 cttcgcgcct gtctcgtgc tttcgataag tctctagcca tttaaaattt ttgatgacct 900
 gctgcgacgc ttttttctg gcaagatagt cttgtaaag cgggccaaga tctgcacact 960
 ggtatttcgg tttttggggc cgcgggccc gacggggccc gtgcgtcca gcgcacatgt 1020
 tcggcgaggc ggggcctgc agcgcggcca ccgagaatcg gacgggggta gtctcaagct 1080
 ggccggcctg ctctgggtgc tggcctcgcg ccgccgtgta tcgccccgcc ctgggcggca 1140
 aggctggccc ggtcggcacc agttgcgtga gcggaaagat ggccgcttcc cggccctgct 1200

ES 2 791 758 T3

gcagggagct caaaatggag gacgcggcgc tcgggagagc gggcgggtga gtcacccaca 1260
 caaaggaaaa gggcctttcc gtcctcagcc gtcgcttcat gtgactccac ggagtaccgg 1320
 gcgccgtcca ggcacctcga ttagttctcg atcttttggg gtacgtcgtc tttaggttgg 1380
 ggggaggggt tttatgcat ggagtttccc cacactgagt ggggtggagac tgaagttagg 1440
 ccagcttggc acttgatgta attctccttg gaatttgccc tttttgagtt tggatcttgg 1500
 ttcatctca agcctcagac agtggttcaa agtttttttc ttocatttca ggtgtcgtga 1560
 ggaattagct ctgggagagg agcccagcac tagaagtcgg cggtggtttcc attcgggtgat 1620
 cagcactgaa cacagaggaa gcttgccgcc acc 1653

<210> 7

<211> 2473

<212> ADN

5 <213> Rattus norvegicus

<400> 7

gatattttta tggaaathtt aaaaaattct ggtaagctat ttaaaaaat gaactttatt 60
 atgaaactat tgcccttttc tctaaaaaac aacacaattt cacggaatat cctatgatta 120
 attatgacct tttagccagt tcccatatta agaatgagtt atagatgact ctctttaaaa 180
 aattattcga tttaaacct ctgtttttaa gcacagcatt tgtgaataat gtgaagaact 240
 tagaagtata atctactcca aggtctgatg tatttttcaa ggccacgta aagtgtatgc 300
 ttgtaacaga gtgcttacat tcaagccaaa tgtaatatata acaatcctga attogtacat 360
 aatgtgaata agacactcaa ctctatttaa atccagatct aaatagttac ttttatctaa 420
 atgtcaccat ctgtttctac ttagaataat aaacttctta aaggtcacgt atcgggctga 480
 ttataaatca ttataattat aacaaaacag atgatttggt taaaggtcac atcccgttcc 540
 gtggtctttt tagtcgaaat aactattaat cttcattatg tttctgagaa agtttaata 600
 tcacgatttc caccataac agtcattatg agtcagtggg agtcatactg aatcagggta 660
 ttttaactgg aaattttttg aaaaacatga gtttttctta aggtcaacat ctggtcttat 720
 aaacagaact gagatttatg gccggtaatt accactggac gatttcccgg gaaatcgta 780
 tgggaacggc ccgttttgca acttctttga ccaaaatata tcgagttaag caacttttaa 840
 ggccaagtca ctatgactat gccaaataaa gcaactatta aggtcatttc actatggaaa 900
 cacccaattc agcaacattg taagccaaat ctccatagaa acctcataag tcagccaaaa 960
 gtcaacgacc taccatctgt ttctgcttat ttctctaatt ttaattgcag actttgtcat 1020

ES 2 791 758 T3

tttatgttcc tcttattctg agaatacgtg acgcccgctc gttaaggaca cggaaactgc 1080
 ataagagtca cgttgactca gatgacctcg acatctggtc tggtttttct gccaatTTTT 1140
 cgtctaaact gtggaaaatc cccacagatg acctacaaaa ctccgatttc tattggacga 1200
 tgaccgtcag acgtaggtat aaatctccta acgccgttcg ggcagtcaca gtcttcggat 1260
 cggacgccgt ggaacgcagt tctcagcga gaaggacacc gcccgactcc agaagacacc 1320
 gctgcccga gaagagaaga cttcatcggc aagagacca gcttctctc cccggagctt 1380
 cggccacgcc gctccacacc cgggaaccga ggcttcggag cccgataccc ggacagaagc 1440
 ttctccccgg ccgctccaca tcagggagcc ttgaccggcg agcctgctat cgggtagag 1500
 actgtcctgc ggccgcttca gcagctccac gatcgacgac tgtgaccggt gagcccgcg 1560
 tttaggcaga ggctccgctt caactaccct accgacacat tcgcggttct tcctccagaa 1620
 catcttacc tctactcggc cactctacaa ggaccggtaa gcaatTTTTa tatactagac 1680
 ttaaagtgtt ctatgatcat tatgtggtga tggttctgtg tatgaagaga gctaggtgga 1740
 ggctatcttt cgcttcgggt atggaacact actcttacia tggcggtctt aatgacggtt 1800
 ttctcaacat cggtgggcgc tctaattacg gttctctcaa catcgggtggg ggtcttcgca 1860
 tgcgagctct agatTTTTTT tatctgtaaa ataagattga agatggttga ctgtgtatca 1920
 attctTTTTc ataggcatca gatcttgcac accgttatta atcttttagga tcagatgaac 1980
 ttgcgagctc gatatctaga atagaatccc cgtgactgct aagatcatct ccgttcatac 2040
 accagatggt acaggccacg gctaccatta tgaatccaaa catgaacaga attgccagaa 2100
 tgggtgctcaa tggttgtatc catctcgcgt gtctattttc tctcaccgac gagaccccaa 2160
 catcgagagt tccgtttatt tcatgagtcg accttttagt tcgtgattta ttttctgtgt 2220
 taagaaaatc agtgagatca attattgtca gtctatacga ttacaataat gtctgaatta 2280
 tcgacgtgca taagatcgtc tcaccggcgc cagattccaa cagatctttg togccatgcc 2340
 ttccgttaga aaggtagtat agtaatatga taccagcaat gcacagaatc gaacatttga 2400
 taacaatTTT gttgatgtcg tatatctgtt aaaaattaat aaatatatta cagtcagttt 2460
 aaacgccgcc acc 2473

<210> 8

<211> 129

5 <212> ADN

<213> Virus símico 40

<400> 8

ES 2 791 758 T3

aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca 60
aataaagcat ttttttcacc attctagttg tggtttgcc aaactcatca atgtatctta 120
tcatgtctg 129

<210> 9
<211> 225
<212> ADN
5 <213> Bos taurus

<400> 9
ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg tttgccctc ccccgtcct tccttgacct 60
tggaaagggtgc cactcccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc 120
tgagtaggtg tcattctatt ctggggggtg gggtagggca ggacagcaag ggggaggatt 180
gggaagacaa tagcaggcat gctggggatg cggtagggctc tatgg 225

<210> 10
<211> 73
10 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 10
caggataata tatggtaggg ttcatagcca gagtaacctt tttttttaat ttttatttta 60
ttttattttt gag 73

<210> 11
15 <211> 288
<212> ADN
<213> Virus símico 40

<400> 11
agtcagcaac caggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca 60
tgcactctcaa ttagtcagca accatagtcc cgcccctaac tccgcccatac ccgcccctaa 120
ctccgcccag ttccgcccatac tctccgcccc atggctgact aatttttttt atttatgcag 180
aggccgagggc cgcctctgcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttgag 240
gcctaggctt ttgcaaaaag ctcccgggag cttgtatata catttttcg 288

20 <210> 12
<211> 81
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 12

ES 2 791 758 T3

catggcttcc cgccggaggt ggaggagcag gatgatggca cgctgcccat gtcttgtgcc 60
 caggagagcg ggatggaccg t 81

<210> 13
 <211> 798
 <212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ácido nucleico que codifica la proteína verde fluorescente

<400> 13
 atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60
 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
 ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180
 ctogtgacca ccctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240
 cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360
 gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggag acggcaacat cctggggcac 420
 aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
 ggcacatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
 gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600
 tacctgagca cccagtcgac cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660
 ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcgca tggacgagct gtacaagtcc 720
 ggactcagat ctcgagctca agcttcgaat tctgcagtcg acggtaccgc gggccccgga 780
 10 tccaccggat ctagatga 798

<210> 14
 <211> 795
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> marcador de selección de neomicina

<400> 14

ES 2 791 758 T3

atgattgaac aagatggatt gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga gaggctattc 60
 ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtggt cgggctgtca 120
 gcgcaggggc gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg 180
 caggacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg 240
 ctogacgttg tcaactgaagc ggggaaggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag 300
 gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg 360
 cggcggctgc atacgcttga tccggctacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc 420
 atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgtcg atcaggatga tctggacgaa 480
 gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccgac 540
 ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat 600
 ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac 660
 atagcgttgg ctaccctgga tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc 720
 ctcgtgcttt acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt 780
 gacgagttct tctga 795

<210> 15

<211> 1677

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión GFP-PEST-NEO

<400> 15

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60
 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
 ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180
 ctcgtgacca ccctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240
 cagcacgact tcttcaagtc cgccatgcc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360
 gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420

ES 2 791 758 T3

aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
 ggcatacaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
 gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600
 tacctgagca cccagtcggc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660
 ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagtcc 720
 ggactcagat ctgagctca agcttcgaat tctgcagtcg acggtaccgc gggcccggga 780
 tccaccggat ctagacatgg cttcccggcg gaggtggagg agcaggatga tggcacgctg 840
 cccatgtctt gtgcccagga gagcgggatg gaccgtagtt taaacattga acaagatgga 900
 ttgcacgcag gttctccggc cgcttgggtg gagaggctat tcggctatga ctgggcacaa 960
 cagacaatcg gctgctctga tgccgccgtg ttccggctgt cagcgcaggg gcgcccggtt 1020
 ctttttgtca agaccgacct gtccggtgcc ctgaatgaac tgaggacga ggcagcgcgg 1080
 ctatcgtggc tggccacgac gggcgcttct tgccgagctg tgctcgacgt tgtcactgaa 1140
 gcgggaaggg actggctgct attgggcgaa gtgccggggc aggatctcct gtcactcac 1200
 cttgctcctg ccgagaaagt atccatcatg gctgatgcaa tgccggcggt gcatacgctt 1260
 gatccggcta cctgccatt cgaccaccaa gcgaaacatc gcatcgagcg agcacgtact 1320
 cggatggaag ccggtcttgt cgatcaggat gatctggacg aagagcatca ggggctcgcg 1380
 ccagccgaac tgttcgccag gctcaaggcg cgcatgcccg acggcgagga tctcgtcgtg 1440
 acccatggcg atgcctgctt gccgaatatc atggtgaaa atggccgctt ttctggattc 1500
 atcgactgtg gccggctggg tgtggcggac cgctatcagg acatagcgtt ggctaccgct 1560
 gatattgctg aagagcttgg cggcgaatgg gctgaccgct tcctcgtgct ttacggtatc 1620
 gccgctcccg attcgcagcg catcgccttc tatcgccttc ttgacgagtt cttctga 1677

<210> 16

<211> 583

<212> ADN

5 <213> Virus de la encefalomiocarditis

<400> 16

ggcgcgcccc cctctccctc cccccccct aacgttactg gccgaagccg cttggaataa 60
 ggccgggtgtg cgtttgtcta tatgtgattt tccaccatat tgccgtcttt tggcaatgtg 120
 agggcccggga aacctggccc tgtcttcttg acgagcattc ctaggggtct tccccctctc 180
 gccaaaggaa tgcaaggtct gttgaatgtc gtgaaggaaag cagttcctct ggaagcttct 240
 tgaagacaaa caacgtctgt agcgaccctt tgcaggcagc ggaaccccc acctggcgac 300

ES 2 791 758 T3

aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta taagatacac ctgcaaaggc ggcacaaccc 360
 cagtgccacg ttgtgagttg gatagttgtg gaaagagtca aatggctctc ctcaagcgta 420
 ttcaacaagg ggctgaagga tgcccagaag gtacccatt gtatgggatc tgatctgggg 480
 cctcggtgca catgctttac atgtgttag tcgaggttaa aaaaacgtct agggcccccg 540
 aaccacgggg acgtggtttt cctttgaaaa acacgatgga tcc 583

<210> 17

<211> 655

5 <212> ADN

<213> Enterovirus 71

<400> 17

ggcgcgcccc cgaagtaact tagaagctgt aatcaacga tcaatagcag gtgtggcaca 60
 ccagtcatc cttgatcaag cacttctgtt tccccggact gagtatcaat aggctgctcg 120
 cgcggctgaa ggagaaaacg ttcggtaccg gaccaactac ttcgagaagc ttagtaccac 180
 catgaacgag gcaggggtgt tcgctcagca caacccagc gtagatcagg ctgatgagtc 240
 actgcaaccc ccatgggcca ccatggcagc ggctgcgttg gcggcctgcc catggagaaa 300
 tccatgggac gctctaattc tgacatggtg tgaagagcct attgagctag ctggtagtcc 360
 tccggcccct gaatgcggct aatcctaact gcggagcaca tgctcacaaa ccagtgggtg 420
 gtgtgtcgta acgggcaact ctgcagcggg accgactact ttgggtgtcc gtgtttcctt 480
 ttattcctat attggctgct tatggtgaca atcaaaaagt tgttaccata tagctattgg 540
 attggccatc cgggtgtgca cagggaatt gtttacctat ttattggttt tgtaccatta 600
 tcaactgaagt ctgtgatcac tctcaaattc attttgacct tcaacacaat caaac 655

REIVINDICACIONES

1. Un vector de expresión que comprende
- 5 - un casete de expresión de la cadena ligera de anticuerpo,
- un casete de expresión de la cadena pesada de anticuerpo, y
- un casete de expresión de marcador de selección,
- 10 en el que los casetes de expresión se disponen unidireccionales, y
- en el que los casetes de expresión se disponen en la secuencia 5' a 3' del casete de expresión de la cadena pesada de anticuerpo, casete de expresión de la cadena ligera de anticuerpo y casete de expresión del marcador de selección,
- 15 en el que los tres casetes de expresión comprenden el promotor del factor de alargamiento humano 1 alfa de SEQ ID NO: 05,
- en el que el casete de expresión de la cadena ligera y el casete de expresión de la cadena pesada de anticuerpo comprenden la secuencia señal de poliA de la hormona de crecimiento bovina.
- 20 2. El vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que los casetes de expresión no comprenden una secuencia finalizadora.
- 25 3. El vector de expresión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que el ácido nucleico que codifica la cadena ligera de anticuerpo y/o el ácido nucleico que codifica la cadena pesada de anticuerpo comprende al menos un intrón.
- 30 4. El vector de expresión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el ácido nucleico que codifica la cadena ligera de anticuerpo y/o el ácido nucleico que codifica la cadena pesada de anticuerpo es ADNc.
5. Uso de un vector de expresión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la producción recombinante de un anticuerpo.
- 35 6. Uso de un vector de expresión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la generación de una línea celular estable.
7. Uso de un vector de expresión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la generación de una línea celular de producción.
- 40 8. Un procedimiento para la producción de un anticuerpo que comprende las siguientes etapas:
- 45 - cultivar una célula eucariota que se ha transfectado con un vector de expresión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y
- recuperar el anticuerpo de la célula o del medio de cultivo.
9. El vector de expresión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el vector de expresión comprende
- 50 - un primer casete de expresión que comprende en sentido 5' a 3' un promotor, un ácido nucleico que codifica una primera cadena ligera de anticuerpo, una secuencia señal de poliA, y opcionalmente una secuencia finalizadora,
- 55 - un segundo casete de expresión que comprende en sentido 5' a 3' un promotor, un ácido nucleico que codifica una segunda cadena ligera de anticuerpo, una secuencia señal de poliA y opcionalmente una secuencia finalizadora,
- 60 - un tercer casete de expresión que comprende en sentido 5' a 3' un promotor, un ácido nucleico que codifica una primera cadena pesada de anticuerpo, una secuencia señal de poliA y opcionalmente una secuencia finalizadora,
- 65 - un cuarto casete de expresión que comprende en sentido 5' a 3' un promotor, un ácido nucleico que codifica una segunda cadena pesada de anticuerpo, una secuencia señal de poliA y opcionalmente una secuencia finalizadora,
- o bien
- un primer casete de expresión que comprende en sentido 5' a 3' un promotor, un ácido nucleico que codifica una

cadena ligera de anticuerpo, una secuencia señal de poliA y opcionalmente una secuencia finalizadora,

- un segundo casete de expresión que comprende en sentido 5' a 3' un promotor, un ácido nucleico que codifica una primera cadena pesada de anticuerpo, una secuencia señal de poliA, y opcionalmente una secuencia finalizadora, y

- un tercer casete de expresión que comprende en sentido 5' a 3' un promotor, un ácido nucleico que codifica una segunda cadena pesada de anticuerpo, una secuencia señal de poliA y opcionalmente una secuencia finalizadora,

con lo que la cadena ligera de anticuerpo es una cadena ligera común para ambas cadenas pesadas de anticuerpo.

10. El vector de expresión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 9, caracterizado por que el vector de expresión comprende

- un casete de expresión de la cadena ligera de anticuerpo,

- un primer casete de expresión de la cadena pesada de anticuerpo,

- un segundo casete de expresión de la cadena pesada de anticuerpo, y

- un casete de expresión de marcador de selección,

en el que al menos uno de los casetes de expresión de la cadena pesada de anticuerpo y el casete de expresión de la cadena ligera de anticuerpo y el casete de expresión de marcador de selección se disponen unidireccionales, y

en el que los casetes de expresión unidireccionales se disponen en la secuencia 5' a 3' del casete de expresión de la cadena pesada de anticuerpo, casete de expresión de la cadena ligera de anticuerpo y casete de expresión de marcador de selección.

11. El vector de expresión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 9 a 10, caracterizado por que el vector de expresión comprende

- un primer casete de expresión de la cadena ligera de anticuerpo,

- un segundo casete de expresión de la cadena ligera de anticuerpo,

- un primer casete de expresión de la cadena pesada de anticuerpo,

- un segundo casete de expresión de la cadena pesada de anticuerpo, y

- un casete de expresión de marcador de selección,

en el que uno de los casetes de expresión de la cadena pesada de anticuerpo y uno del casete de expresión de la cadena ligera de anticuerpo y el casete de expresión del marcador de selección se disponen unidireccionales, y

en el que los casetes de expresión unidireccionales se disponen en la secuencia 5' a 3' del casete de expresión de la cadena pesada de anticuerpo, casete de expresión de la cadena ligera de anticuerpo y casete de expresión de marcador de selección.

Figura 1

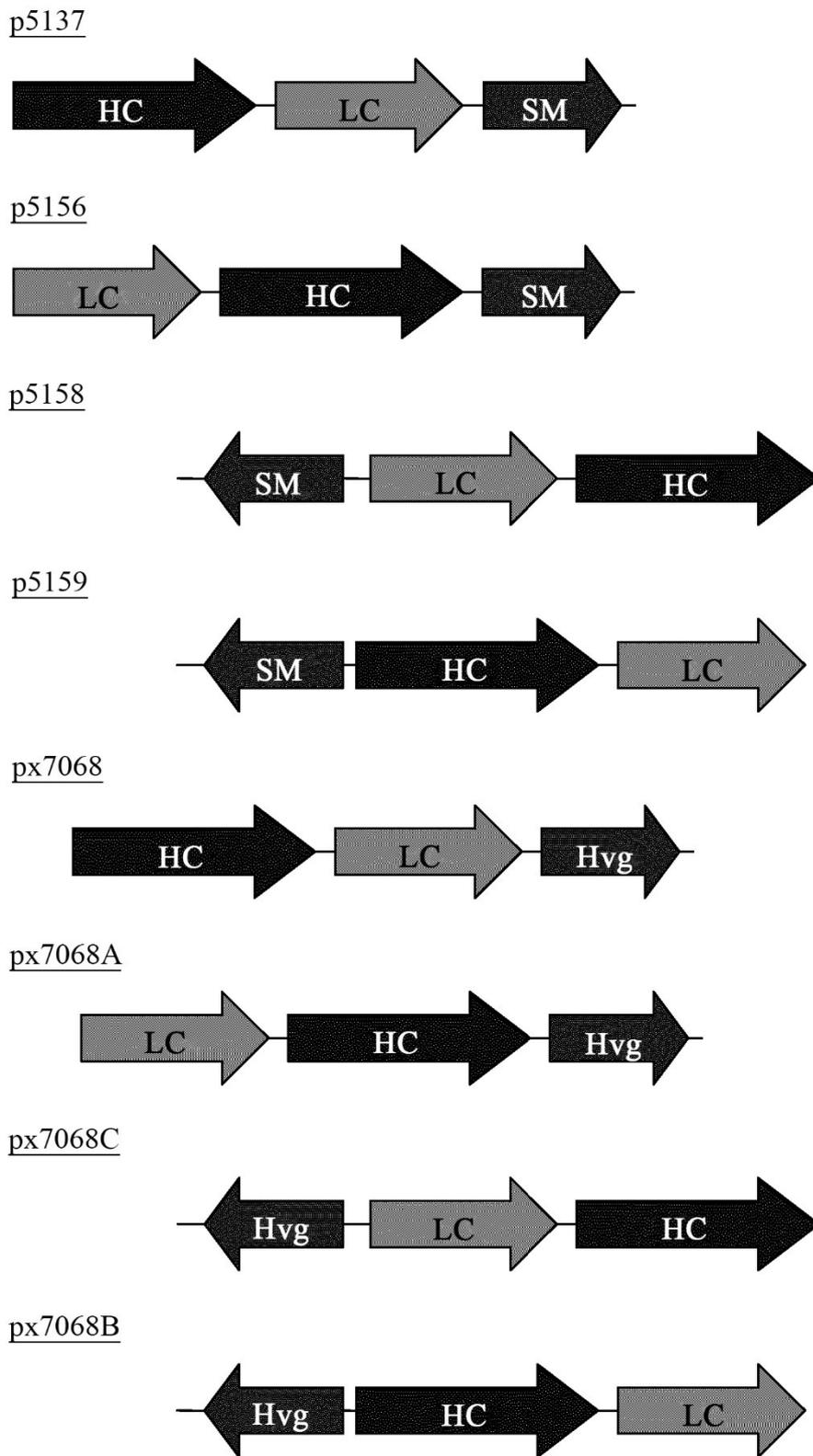


Figura 2

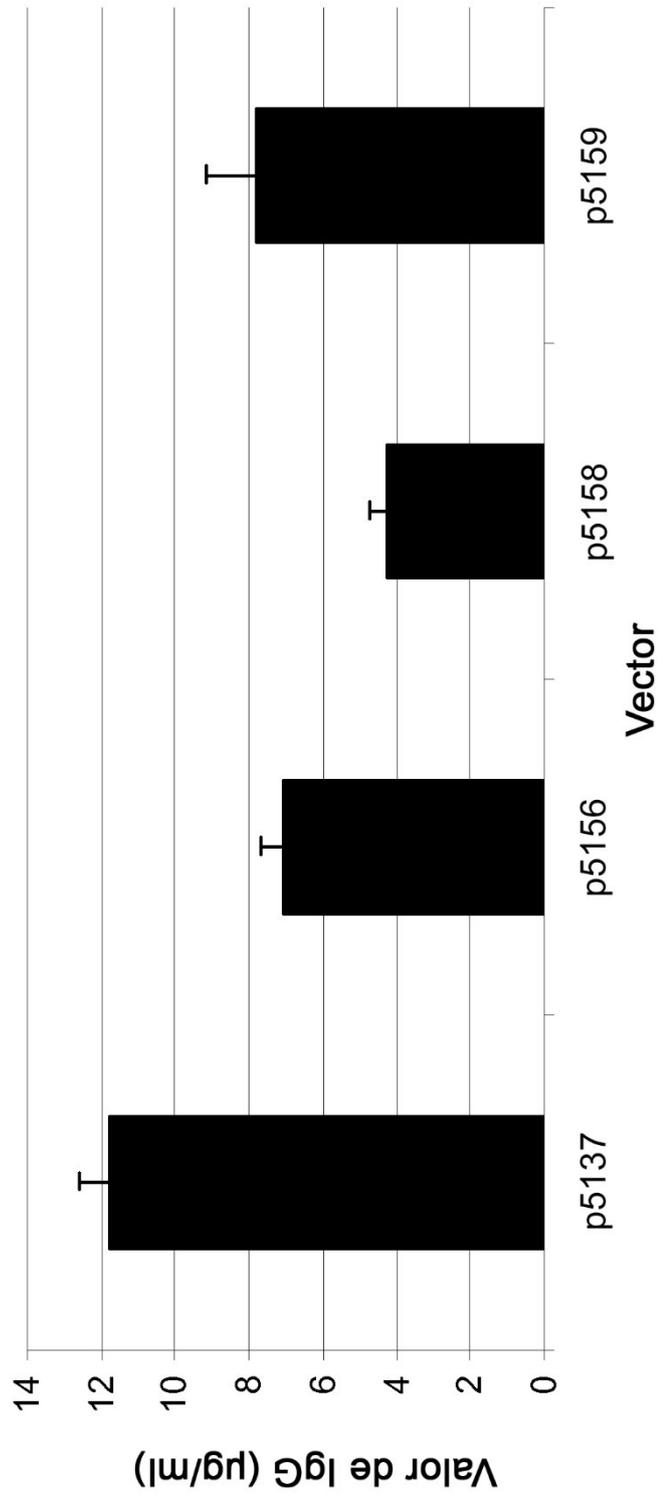


Figura 3

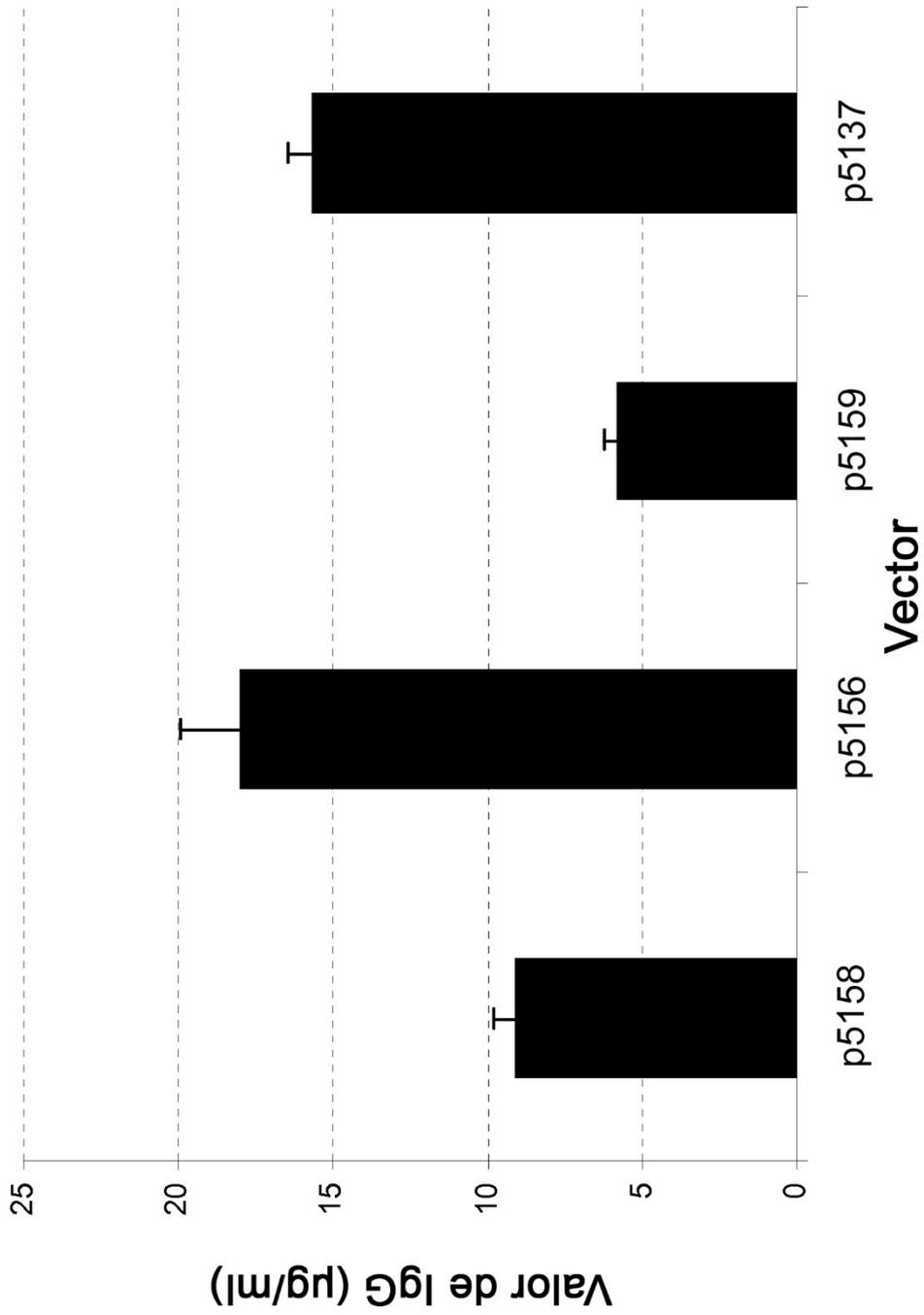


Figura 4

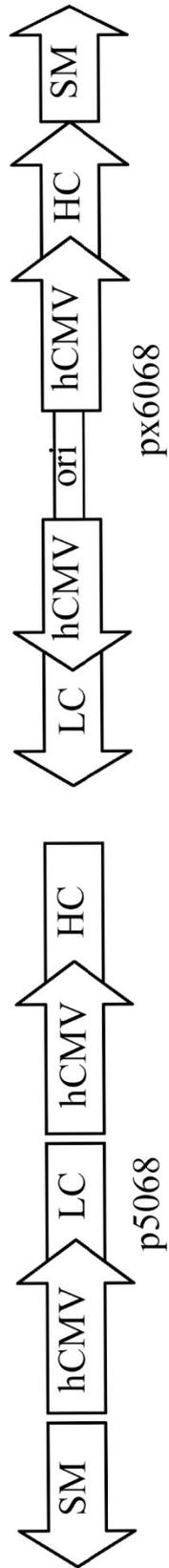


Figura 5

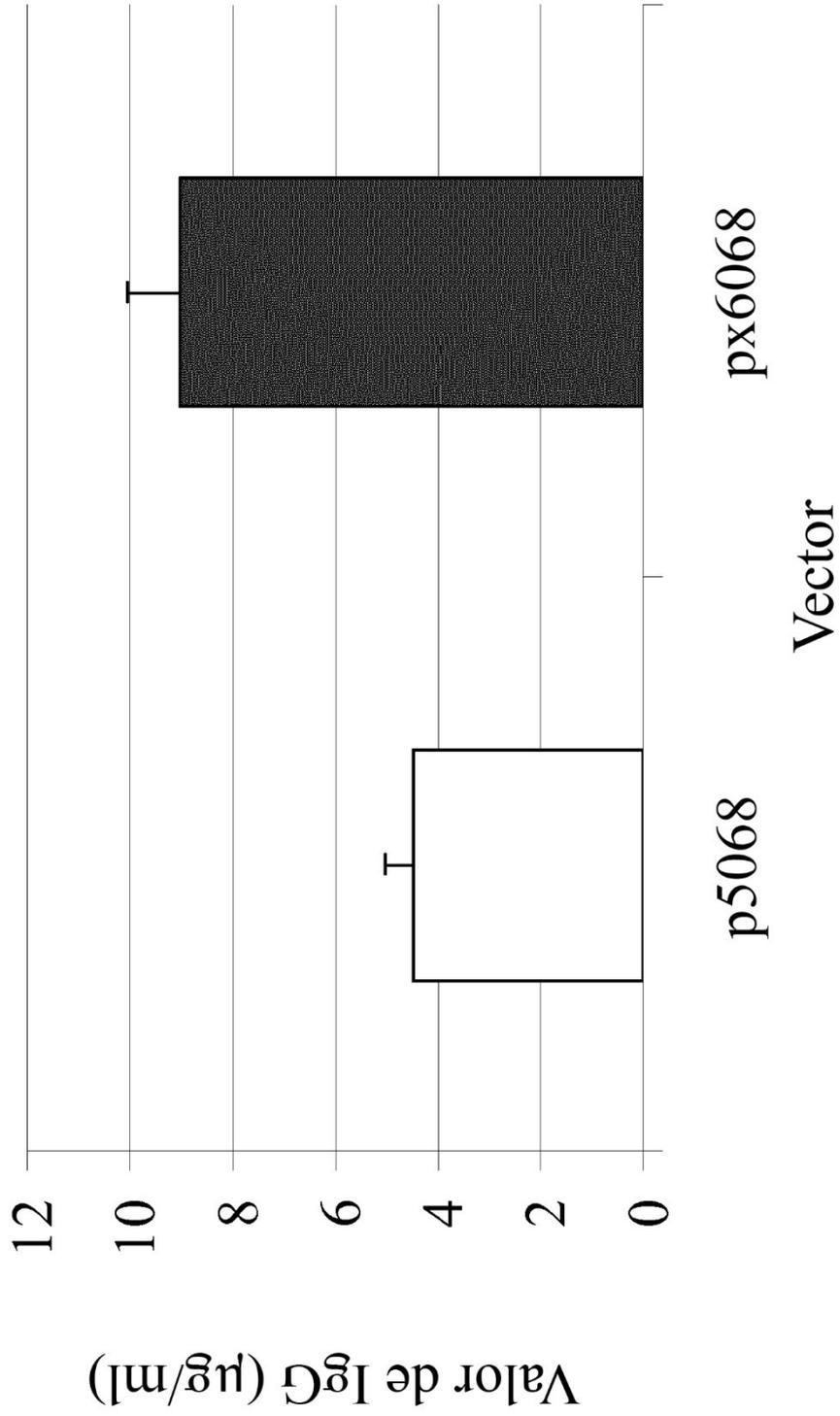


Figura 6

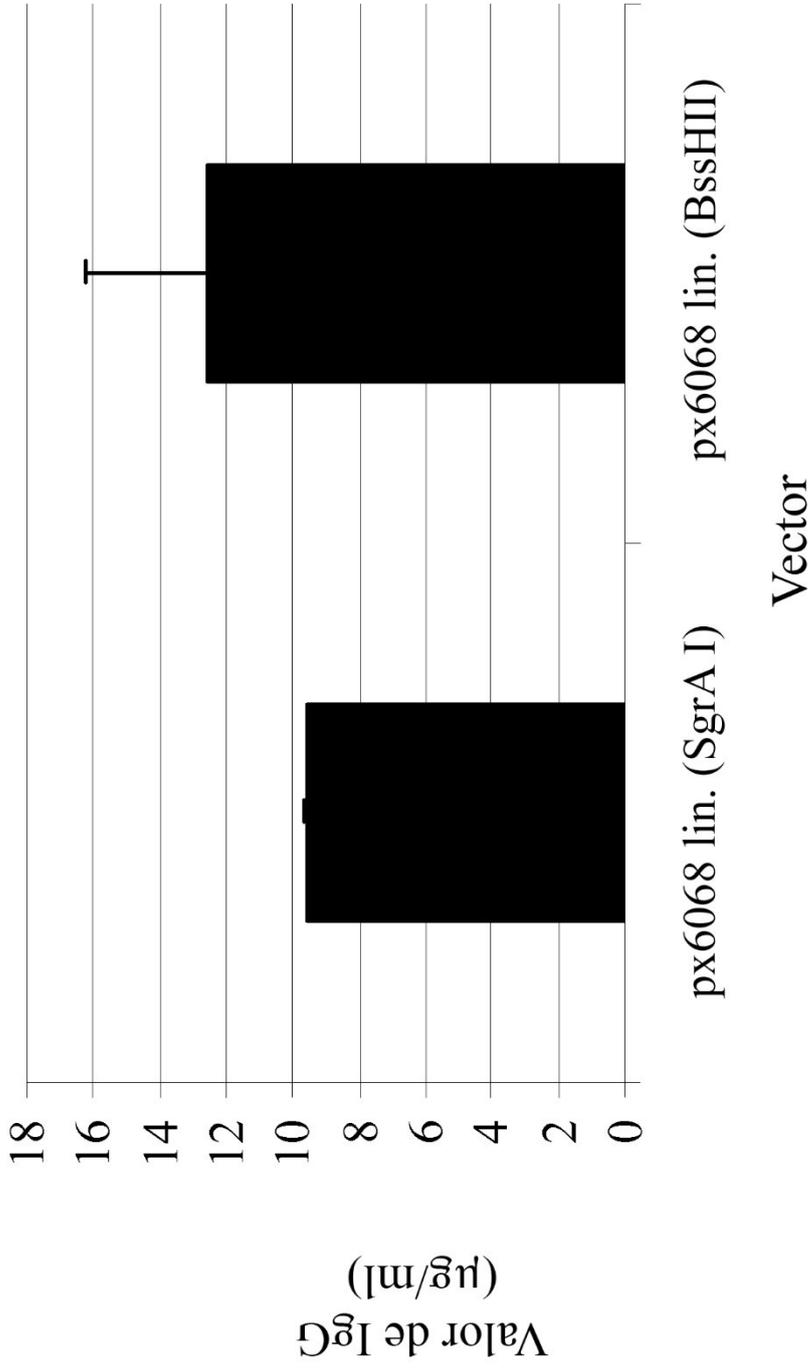


Figura 7

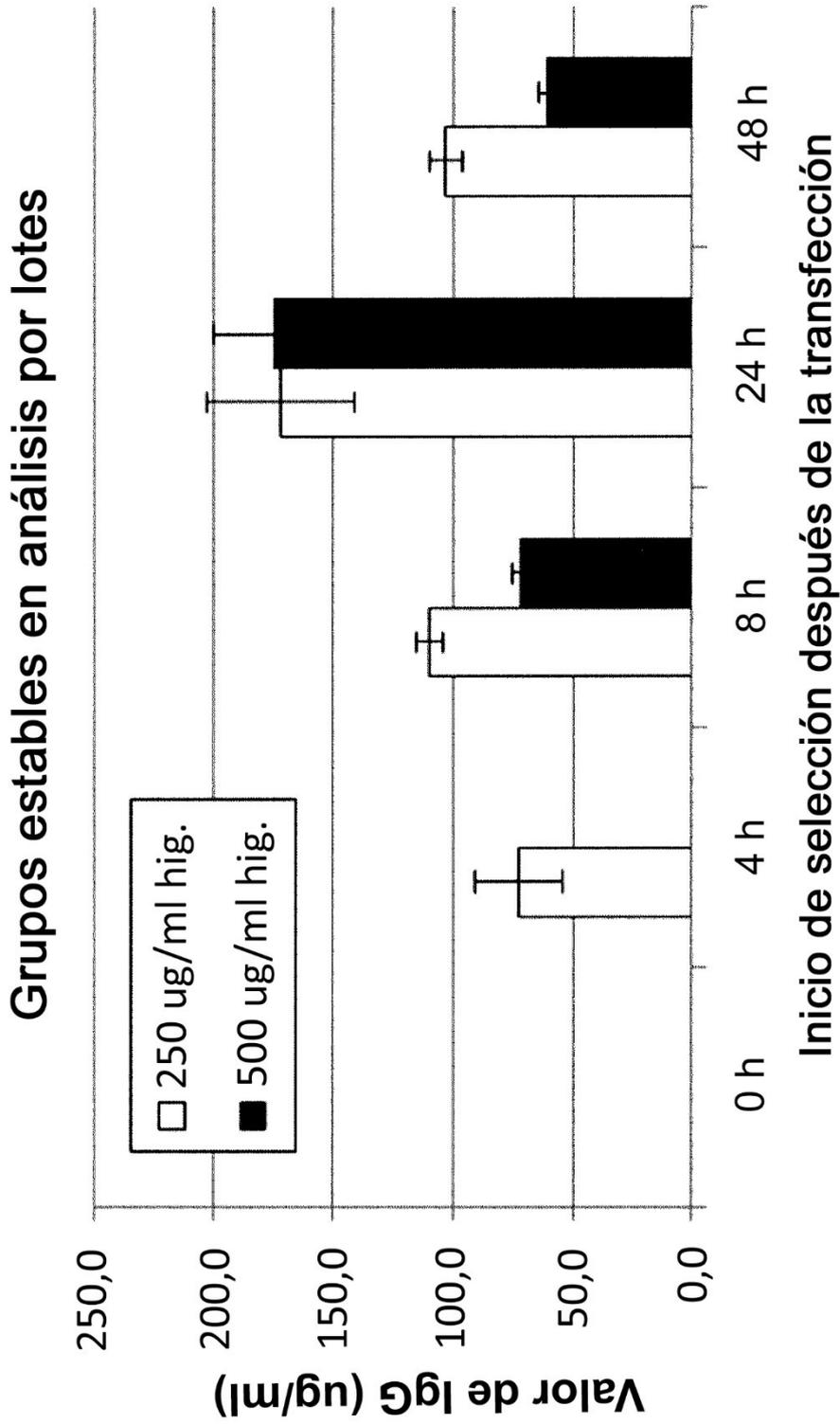
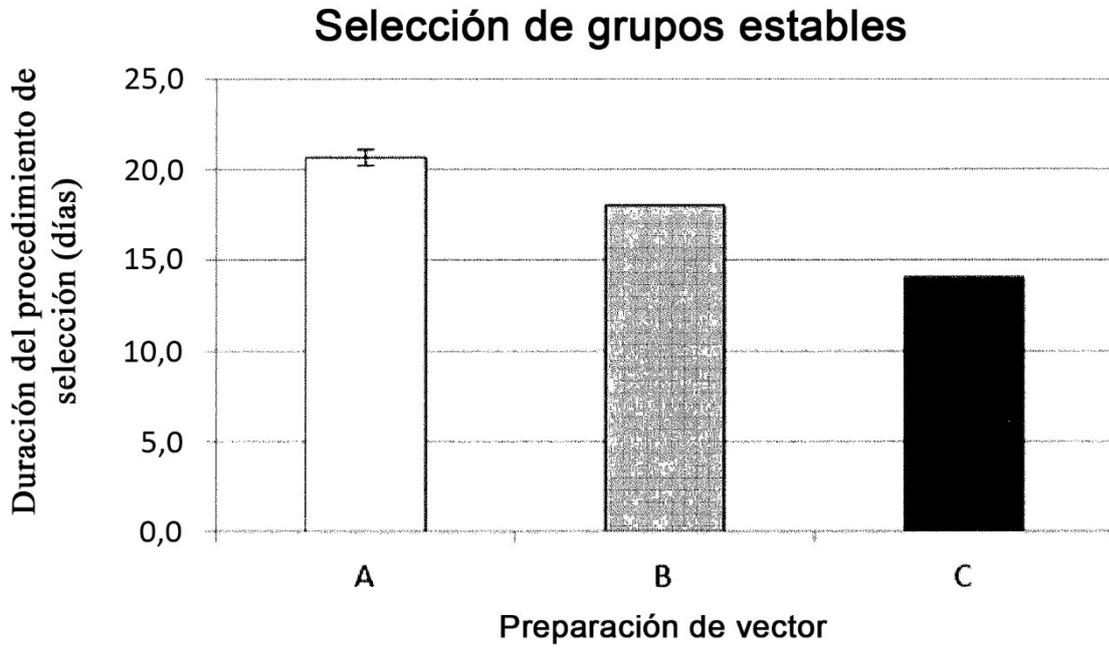


Figura 8

(A)



(B)

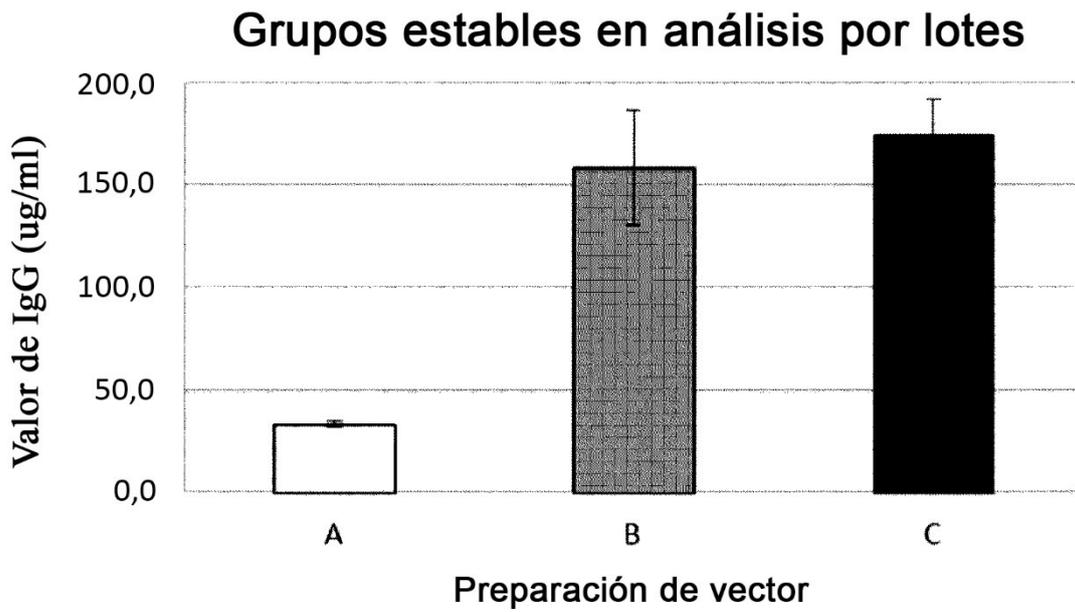


Figura 8

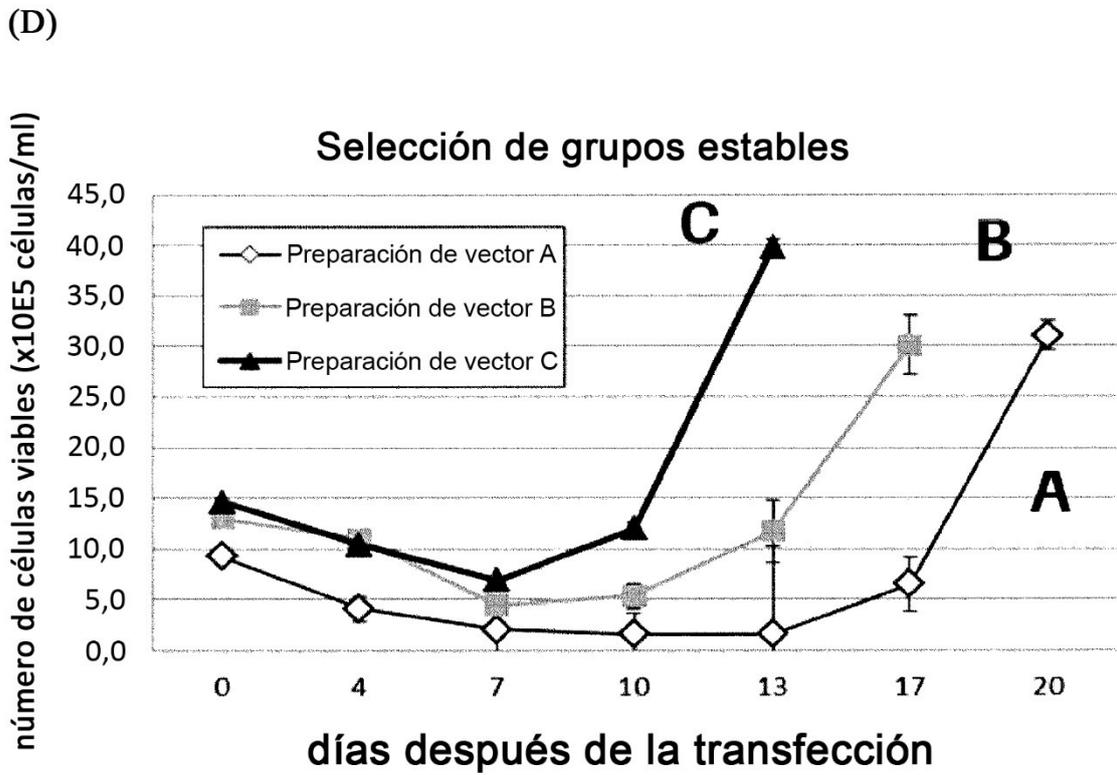
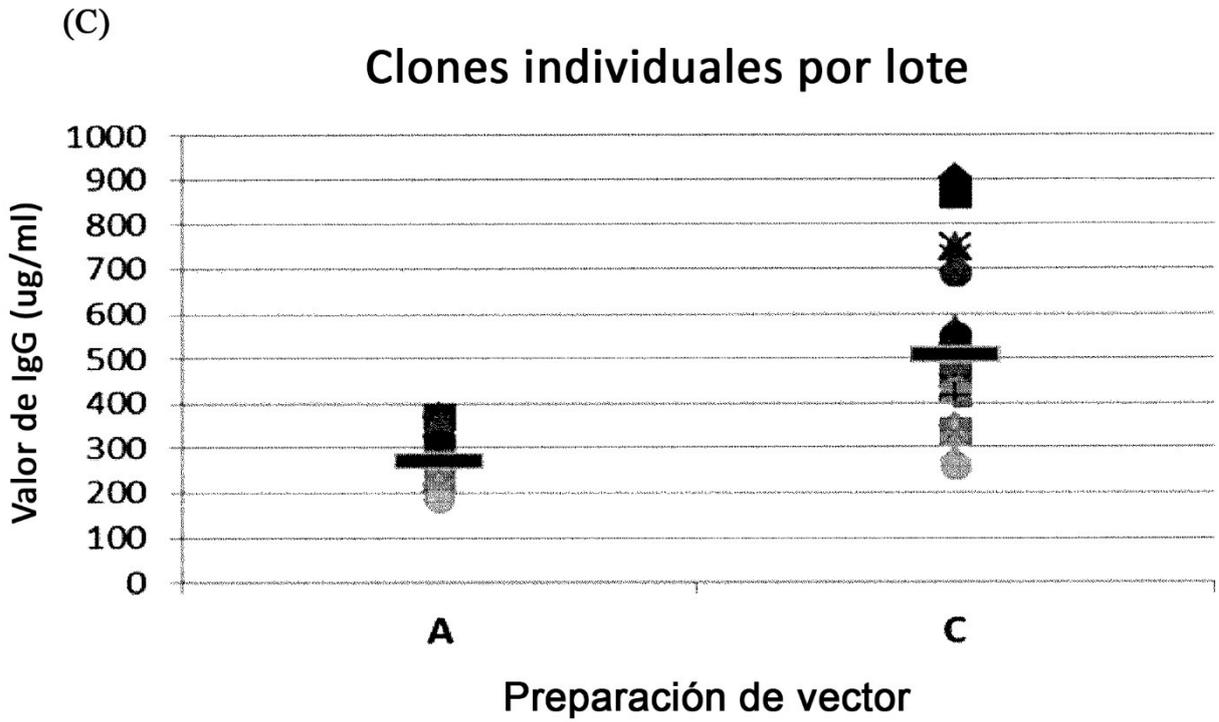


Figura 8

(E)

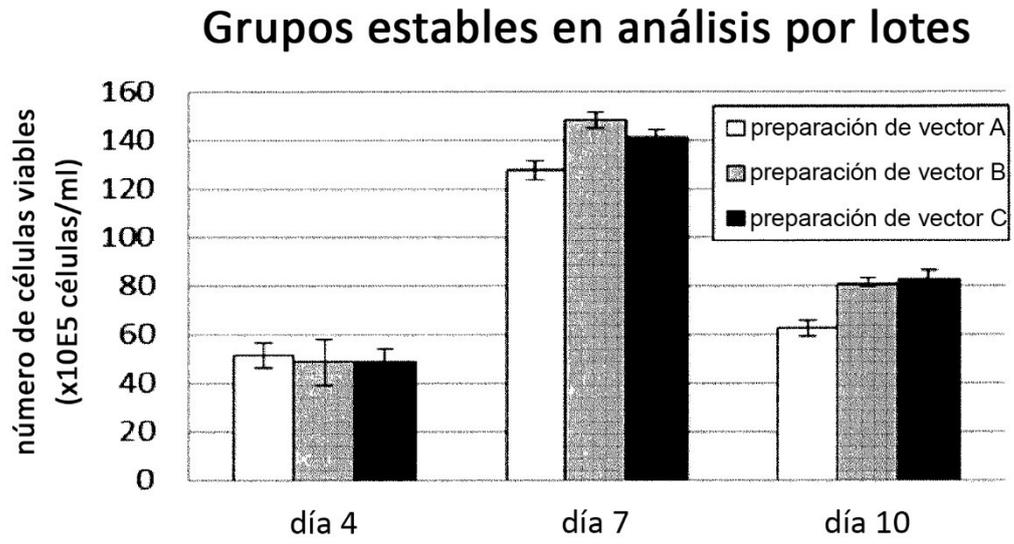


Figura 9

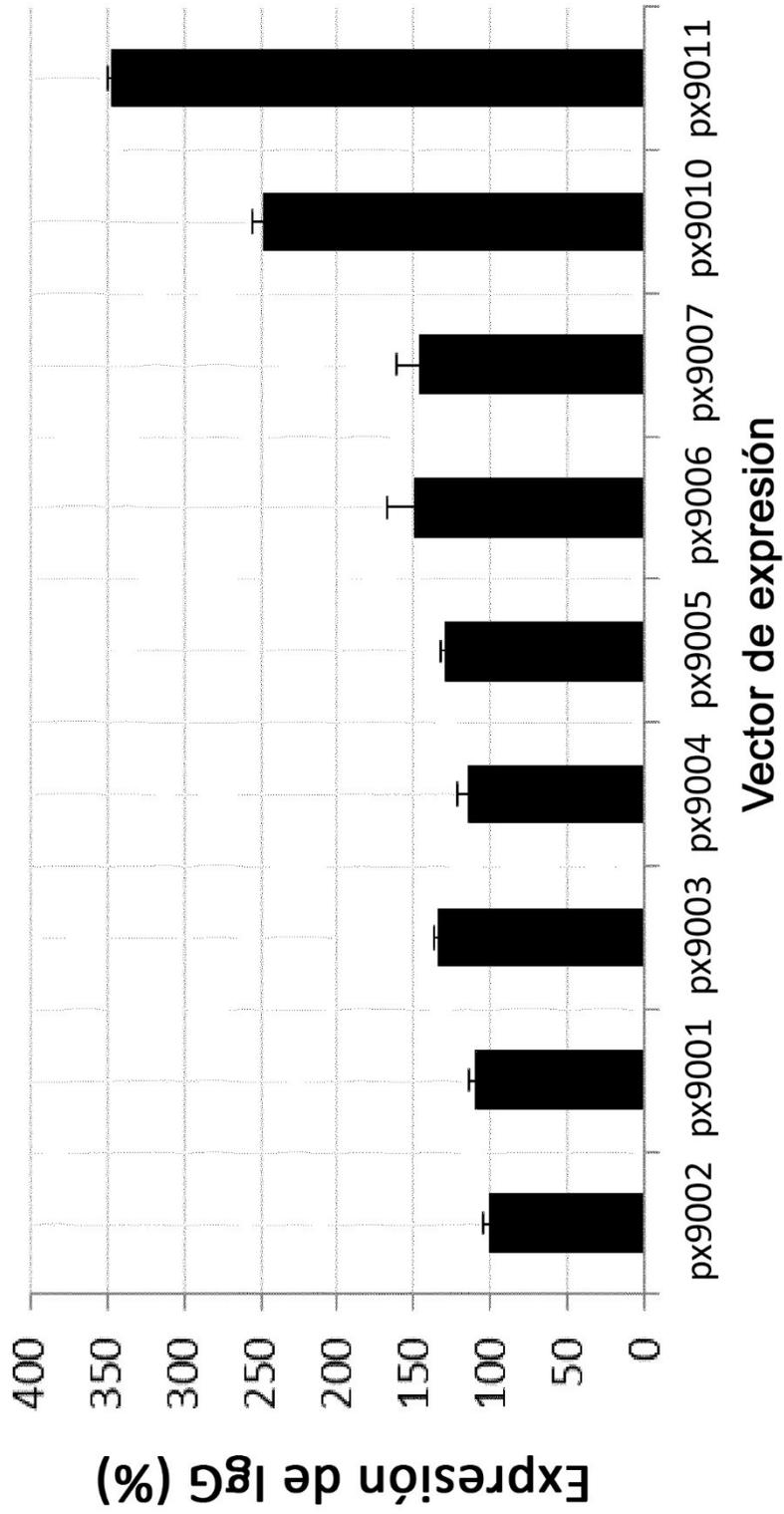


Figura 10

