

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 840 725**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/67 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12N 7/02 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2008 E 17159323 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2020 EP 3216802**

54 Título: **Procedimiento de producción**

30 Prioridad:

20.08.2007 US 956772 P

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

07.07.2021

73 Titular/es:

**GLAXO GROUP LIMITED (100.0%)
980 Great West Road
Brentford Middlesex TW8 9GS, GB**

72 Inventor/es:

**KOTSOPOULOU, EKATERINI y
UDEN, MARK**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 840 725 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción

La presente invención proporciona un procedimiento para producir una línea celular que es capaz de secretar una proteína terapéutica. El procedimiento comprende el uso de secuencias génicas adaptadas por codones que tienen como resultado plazos de protocolo reducidos y una disminución en las concentraciones de antifolato requeridas a la hora de generar, por ejemplo, líneas celulares productoras de anticuerpos mediante un sistema de selección y amplificación.

Las células de mamífero, tales como las células CHO (células de ovario de hámster chino), NS0 y PerC6 se usan de forma rutinaria en la industria farmacéutica para fabricar productos biofarmacéuticos. Estas células están modificadas genéticamente y, después, se seleccionan de un modo tal que se garantiza que se observa una expresión elevada de títulos de la proteína deseada cuando las líneas celulares resultantes se cultivan en biorreactores.

Actualmente existen varios procedimientos para la modificación y, después, la selección de las células mejores para este fin. A menudo, estos procedimientos implican "amplificación" para aumentar el número de copias del vector o vectores de expresión integradas para mejorar los rendimientos observados de la proteína deseada. Estos procedimientos de "amplificación" se han descrito bien en Bebbington and Hentschel (DNA Cloning Volume III (IRL press, 1987)). Los autores explican que una serie de marcadores seleccionables (que a menudo están en forma de secuencias de ácido nucleico que codifican enzimas implicadas en el metabolismo y esenciales para la supervivencia de las células huésped en determinadas condiciones del medio de cultivo) se pueden unir de forma operativa a los vectores de expresión diseñados para expresar la proteína deseada de forma que tras la selección del marcador seleccionable, también se selecciona para la expresión de la proteína deseada. No obstante, dado que después de esta selección los títulos resultantes de la proteína deseada normalmente no son lo bastante altos, las células seleccionadas también se someten a regímenes de "amplificación". Estos regímenes normalmente implican someter las células a determinados fármacos tóxicos que inhiben el marcador seleccionable. Mediante dicha inhibición, se seleccionarán las poblaciones de células que presenten niveles de expresión aumentados de este marcador. A menudo esto conduce a niveles de expresión aumentados de los casetes de expresión unidos operativamente también. Dicha expresión aumentada o "amplificación" normalmente se produce debido a reorganizaciones genómicas resultantes en un mayor número de copias del marcador seleccionable y casetes de expresión unidos operativamente. A menudo, mediante dicha "coamplificación", los títulos mejoran suficientemente para usar los mejores clones resultantes para producir niveles adecuadamente elevados de la proteína o proteína deseadas. Cuando el número de copias del vector en células individuales sometidas a regímenes de amplificación se han investigado adicionalmente, se ha observado que hasta alcanzar una "meseta" de la producción de proteínas, los niveles de producción observados normalmente son proporcionales al aumento del número de copias de los genes (Bebbington y Hentschel *ibid*).

Hasta la fecha se han identificado muchos marcadores seleccionables diferentes para amplificar y los denominados marcadores de selección amplificables. Cada uno identificado también tiene un agente de "selección y amplificación" asociado añadido al medio de cultivo celular durante los regímenes de selección y amplificación. Los ejemplos de dichas combinaciones de agentes / marcadores seleccionables incluyen: adenosina desaminasa / desoxicoformicina, aspartato transcarbamilasa/ N (fosfoacetil)-L-aspartato, dihidrofolato reductasa / metotrexato, glutamina sintetasa / metionina sulfoximina, metaltioneína-I / metal pesado, resistencia a múltiples fármacos / adriamicina (véase Bebbington y Hentschel *ibid*, Kellems 1991; Current Opinion in Biotechnology 2: pp723 - 729). Adicionalmente, más recientemente se ha notificado que los marcadores de selección de antibióticos, tales como los que confieren resistencia a neomicina/G418 y ceocina, también se pueden usar a veces para aumentar el número de copias y, por tanto, ha veces se han utilizado como marcadores de selección y amplificación cuando se combinan con el agente seleccionable (a base de antibióticos) de amplificación y selección afín adecuado (p. ej., Sauttle y Enenkel: Biotech Bioeng 2004 89 pp530 - 538, y Kwaks et al: Nature Biotech 2003; 21; pp553 - 558)

Aunque hay una serie de procedimientos para seleccionar las mejores células modificadas genéticamente para este fin, las dos presiones de selección más usadas son los procedimientos de selección basados en la glutamina sintetasa (GS) y dihidrofolato reductasa (DHFR).

El procedimiento de la GS implica la unión operativa de un casete de expresión de glutamina sintetasa al del casete o casetes de expresión de proteínas terapéuticas. Los vectores unidos operativamente posteriores se liberan a las células y se selecciona a integración cromosómica en el vector para la depleción o eliminación de glutamina del medio en el que se cultivan las células. La adición de los inhibidores de la glutamina sintetasa, tales como metonina sulfoximina (MSX), a menudo se añaden a los medios de cultivo con el fin de asegurar que se selecciona la actividad de la glutamina sintetasa por encima y más allá de los niveles de las células huésped endógenos. El procedimiento de selección alternativo de la DHFR implica la unión operativa de una presión de selección de DHFR a la del casete casete o casetes de expresión de proteínas terapéuticas. Los vectores unidos operativamente se liberan a las células y se selecciona la integración cromosómica en el vector para la depleción o eliminación de nucleósidos (p. ej., hiposantina y timidina). Normalmente para el procedimiento de la DHFR, es habitual usar cepas huésped negativas para la DHFR, tal como CHO DG44 o CHO DUX-B11. También es habitual emplear agentes de selección y de amplificación, tales como el metotrexato (MTX).

La adición o ajuste gradual de cantidades crecientes de los agentes de selección y amplificación MSX o MTX en los respectivos sistemas de selección con GS y DHFR a menudo se realiza con el fin de aumentar la expresión mediante el aumento de número de copias del gen. Tales procedimientos pueden implicar la adición del agente de selección y amplificación para el cultivo de células directamente. Como alternativa, el agente puede añadirse al medio de crecimiento antes de los medios de comunicación que se utilizan en tal cultivo celular. Esta adición o titulación de tales agentes directos a los cultivos celulares o a los medios usados para los cultivos celulares normalmente se denomina "amplificación". Por ejemplo, en el sistema de GS se pueden añadir o aumentar los niveles de MSX hasta y más allá de 500 μM , mientras que para el sistema DHFR, se pueden añadir los niveles de MTC antifolato hasta y más allá de los niveles de concentración de 1 μM . Mediante el uso de tales agentes de esta manera, seguido de un período de cultivo para permitir la selección de células que crecen en la nueva concentración del agente de selección, (cada etapa de concentración se denomina una "ronda" de la amplificación), se ha demostrado que el área del genoma que alberga la presión de selección también puede amplificarse, aumentando de ese modo el número de copias del marcador seleccionable. En consecuencia, cuando el marcador seleccionable está unido operativamente a los casetes de expresión de proteínas terapéuticas, estos casetes también pueden amplificarse. Por el uso de agentes de selección y amplificación adecuados cuando se utiliza el sistema de selección de GS y DHFR, los rendimientos de las proteínas deseadas se pueden mejorar significativamente hasta alcanzar una 'meseta de producción' (véase Bebbington y Hentschel (ibid)). Como consecuencia de ello, los clones que crecen a través de tal selección y amplificación se investigan después sobre el título / rendimiento y los mejores clones se seleccionan y se evalúan adicionalmente. A partir de esta titulación y cribado, es típico identificar y, después, comprometerse a un clon para la posterior producción de la proteína o proteínas deseadas.

Típicamente, tanto el número de "rondas" de amplificación como la concentración del agente de selección y amplificación empleado no se establecen o fijan en los protocolos de selección y amplificación. En cambio, es típico que de los regímenes de selección y amplificación que se conviertan progresivamente en rigurosos hasta un punto en el que se acercan a un umbral de producción o meseta. Específicamente, al expresar anticuerpos, los inventores y otros colegas han observado que los clones que se aproximan a esta meseta producen títulos finales en los modelos de cultivo por lotes sin alimentar extendidos actuales y biorreactores de producción en el intervalo de 0,3 g a 1,5 g por litro. Esto normalmente se traduce en productividades de células (Qp) en el intervalo de 10-100 pg / célula / por día durante tales condiciones de cultivo por lotes sin alimentar. Sin embargo, es bien sabido que aunque las Qp (en términos de pg / célula / día) son importante, no es un determinante exclusivo de la productividad, ya que los clones con la mayor Qp no siempre dan lugar a los títulos volumétricos más altos. Para una revisión reciente véase Wurm 2004; Vol. Nature Biotechnology 22; pp1393-1398.

Los procedimientos de selección y amplificación se han empleado con éxito para generar líneas celulares utilizadas en las campañas de fabricación para fabricar proteínas deseadas utilizadas en los ensayos clínicos. Sin embargo, mientras que los títulos generados mediante la selección y la metodología de amplificación son suficientes, tales procedimientos son todavía indeseables para un número de razones, incluyendo el tiempo, los costes y la seguridad. Por ejemplo, la valoración de los agentes de amplificación y selección en los protocolos de "amplificación" de líneas celulares retrasa la selección de clones y el sobrecrecimiento de colonias, de modo que cada ronda de amplificación requiere un más o más en completarse. En segundo lugar, los agentes de selección y amplificación como metotrexato y sulfoximina de metionina son productos químicos tóxicos que deben ser eliminados si se va a utilizar terapéuticamente. En tercer lugar, se puede producir resistencia a los agentes de selección y amplificación en las células de mamífero que puede producir una presión de selección menos rigurosos y dar lugar a una inestabilidad de los rendimientos clonal y del producto. En cuarto lugar, en ocasiones, la amplificación se puede producir de forma episódica. Tales episodios y cualquier casete de expresión funcionales unidos operativamente no siempre se heredan por igual durante la división celular, que conduce a un aumento de la variación y la inestabilidad en el cultivo. En quinto lugar, los reordenamientos del genoma generados durante los protocolos de amplificación pueden dar lugar a cambios significativos en el genoma de la célula huésped, lo que da lugar a fenotipos variables en los clones resultantes. En sexto lugar, los subproductos del agente de selección y amplificación, tales como el metotrexato poliglutamado, pueden inhibir funciones adicionales de las células (por ejemplo, Allegra et al 1985 J Biological Chem 260;17 pp9720 - 9726). En séptimo lugar, muchos de estos agentes de selección y de amplificación también son potencialmente tóxicos para los operadores involucrados en el cultivo de células y la ejecución de los biorreactores si están expuestos a niveles altos. En octavo lugar, también se ha observado que aumentando el número de copias de vectores de expresión integrados en células huésped de mamífero puede dar lugar a un aumento de la actividad de silenciamiento génica inducida por repeticiones (RIGS) por la célula huésped que, en última instancia, puede dar lugar a una reducción en los niveles de expresión de cada uno de los vectores de expresión integrados (véase, por ejemplo, McBurney MW et al Exp. Cell Res. 2002 274:1-8).

En consecuencia, sería altamente deseable emplear la metodología de selección y amplificación con niveles reducidos de agente de selección y amplificación en un número reducido de rondas de amplificación, mientras que todavía consigue el mismo rendimiento final de la proteína terapéutica, de tal manera que el tiempo necesario para generar la línea celular final es más rápido y / o el nivel del agente tóxico no deseado necesario para generar la línea final se reduce o se excluye totalmente durante la generación de la línea celular, la selección y el cultivo (M. Celina de la Cruz Edmonds et al (Mol Biotecnología 2006 34:179-190).

Con combinaciones de codones triples de 64 pares de bases pero solo 20 aminoácidos, durante muchas décadas se ha sabido que existe redundancia en el código genético. No obstante, el uso de sesgo de codones para aumentar la

expresión no se realizó hasta la década de 1980. Por ejemplo, en 1982 Bennetzen y Hall (J Biol Chem 257 pp3026 - 3031) observaron un sesgo de codones específico de la especie en genes de expresión fuerte de procariotas y eucariotas. También observaron que este sesgo era taxonómicamente divergente. Como consecuencia, pronto se observó que se podría modificar el uso de codones de tales marcos de lectura abiertos para aumentar la expresión en sistemas de expresión recombinantes. Por ejemplo, Kotula y Curtis (Biotechnology NY (1991) 9: Alcanzaron una expresión significativamente mejorada de la cadena ligera de anticuerpo de mamífero en la levadura mediante la adaptación de codones del marco de lectura abierto como para desviar el uso del codón hacia los codones preferidos por los genes de levadura endógenos altamente expresados. Otro ejemplo muy notable fue la adaptación de codones de la proteína verde fluorescente para mejorar la expresión en células de mamífero (Zolotukhin Virol SJ (1996) 70: de codones 4646 - 54 y Yang et al Nucleic Acids Res 1996 24:4592 - 3).

Los datos recientes sugieren que al elevar la puntuación del índice de adaptación de codones (CAI) de los marcos de lectura abiertos que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos cadenas se puede mejorar marginalmente los rendimientos de producción en las células huésped de mamífero cuando los casetes de expresión adaptados resultantes están unidos operativamente a los marcadores seleccionables de glutamina sintetasa y cuando las células se incuban con el agente de selección y amplificación MSX. Estos datos (presentados en la IBC 2005 Cell Line Development and Engineering Conference) sugirieron que mientras que los niveles de expresión no mejoraron significativamente, el clon positivo mediano en un grupo aumentó marginalmente (de 37,8 µg/ml a 51,3 µg/ml), pero sólo cuando los marcos de lectura abiertos de las cadenas pesadas y ligeras se adaptaron por codones. Más recientemente, M. Celina de la Cruz Edmonds et al (ibid) también reconoció el deseo de reducir los niveles del agente de selección y amplificación cuando se generan líneas celulares de ingeniería que expresan proteínas deseables con ayuda de regímenes de selección y amplificación. Ellos demostraron que mediante la modificación de la densidad de siembra de las células transfectadas se pueden reducir los niveles de MSX empleados y reducir el número de semanas requeridas para generar y mantener las líneas de células modificadas genéticamente que expresan niveles equivalentes o mayores de la proteína deseada.

Un trabajo reciente publicado ha investigado los enfoques de optimización de codones combinado con el uso del marcador seleccionable glutamina sintetasa. Por ejemplo, el trabajo presentado por Kawley et al (Molecular Biotechnology 2006 Vol 34; pp151 - 156) evalúa el impacto de la adaptación de codones sobre los niveles de expresión siguientes generados, sin embargo, los resultados presentados sugieren sólo pequeñas mejoras en los niveles de expresión alcanzados.

Incluso más recientemente, Cartón et al (Protein Expression and Purification 55 (2007) pp279-286) también investigaron el impacto de la optimización de codones. Su trabajo consistió la optimización de codones parcial de los marcos de lectura abiertos de las cadenas pesada y ligera de anticuerpos mediante diversos enfoques. Estas secuencias de codificación modificadas se expresaron después en células de mieloma como formatos de mini-gen (es decir, que contienen intrones) en casetes de expresión unidos operativamente al marcador seleccionable gpt. No se discutieron enfoques de amplificación.

Hay una necesidad en la técnica de reducir los niveles de los agentes de selección y amplificación requeridos cuando se emplean sistemas de expresión unidos operativamente a los marcadores de selección amplificables.

Declaración de la invención

La presente invención proporciona procedimientos para reducir los niveles de una presión seleccionable titulable requerida, el número de ciclos de amplificación y el tiempo necesario para generar líneas celulares que expresan la proteína mediante la alteración de los codones de los marcos de lectura abiertos deseados. A través de la utilización de la adaptación de codones para este propósito, los procedimientos de la invención proporcionan consistentemente rendimientos suficientes en marcos de tiempo más rápidos, lo que ahorra muchas semanas en las actividades de desarrollo de líneas celulares. Además, los procedimientos de la invención también se generan líneas celulares con concentraciones más bajas del agente de selección y amplificación que las alcanzadas previamente. De acuerdo con lo anterior, se observan niveles más bajos del marcador de selección y amplificación en las líneas de células finales.

En un aspecto de la invención se proporciona un procedimiento para producir una línea celular de mamífero que produce al menos un anticuerpo, derivado del mismo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende las etapas de: (a) transformar una célula de mamífero con una secuencia de polinucleótidos que comprende (i) una secuencia que codifica el anticuerpo, derivado del mismo o fragmento de unión al antígeno del mismo y tiene un índice de adaptación de codones igual o superior a 0,9; y (ii) una secuencia que codifica un marcador de selección que es capaz de proporcionar amplificación de la secuencia polinucleotídica; (b) proporcionar al menos una ronda de amplificación en presencia de un agente de selección y amplificación; y (c) seleccionar la línea celular de mamífero una vez que se alcance un rendimiento de producción celular de 0,3-1,5 g/l en cultivo por lotes no alimentado extendido y/o una productividad celular de 10-100 pg/célula/día en cultivo por lotes sin alimento del anticuerpo, derivado del mismo o un fragmento de unión a antígeno del mismo; en el que la concentración de agente de selección y amplificación es el 50 % o menos que la concentración utilizada para alcanzar un rendimiento de producción equivalente, en comparación con una célula de mamífero de (a) transformada con dicha secuencia polinucleotídica que codifica el anticuerpo, derivado del mismo o fragmento de unión al antígeno del mismo y tiene un índice de adaptación de codones menor de 0,9.

En otro aspecto de la invención, se proporciona una línea celular de mamífero que se puede obtener mediante los procedimientos descritos en el presente documento, en los que la línea celular de mamífero tiene un número menor de copias de ADN transformado en comparación con una misma línea celular de mamífero transformada con dicha secuencia de polinucleótidos que tiene un índice de adaptación de codones que es menor de 0,9 y codifica el anticuerpo, derivado del mismo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En otro aspecto más de la invención, se proporciona el uso de una secuencia de polinucleótidos que codifica un anticuerpo, derivado del mismo o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el índice de adaptación de codones de la secuencia de polinucleótidos es igual o superior a 0,9, para reducir los niveles requeridos de un agente de selección y amplificación titulable que aumente el número de copias del gen en un procedimiento para producir una línea celular de mamífero que produzca dicho anticuerpo, derivado del mismo o fragmento de unión al antígeno del mismo, en comparación con una secuencia de polinucleótidos que codifica el anticuerpo, derivado del mismo o unión al antígeno. fragmento del mismo en el que el índice de adaptación de codones es inferior a 0,9.

Se desvelan procedimientos para producir una línea celular que produce una proteína terapéutica que comprende las etapas de:

a) obtener una primera secuencia de polinucleótidos que codifica dicha proteína terapéutica,
 b) alterar la primera secuencia de polinucleótidos para obtener una segunda secuencia de polinucleótidos, en la que el índice de adaptación de codones de la segunda secuencia de polinucleótidos es mayor que la de la primera secuencia de polinucleótido y el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido codifican la misma proteína terapéutica.

c) transformar al menos una célula con la segunda secuencia de polinucleótidos de la etapa (b) y una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica un marcador de selección que es capaz de proporcionar la amplificación de la segunda secuencia de polinucleótidos dentro de dicha célula,

d) cultivar dicha al menos una célula de la etapa (c) para crear una primera línea celular que comprende una pluralidad de células, en un medio que contiene una concentración de un agente de selección que inhibe el crecimiento de células en dicha línea celular que expresa niveles insuficientes del marcador de selección codificado por el tercer polinucleótido de la etapa (c), de manera que la meseta de producción de la proteína codificada por el segundo polinucleótido se alcanza con menos rondas de amplificación y/o se alcanza a una concentración más baja de agente de selección de la que sería necesaria para alcanzar una meseta equivalente de producción de dicha proteína producida en una línea celular transformada con el primer polinucleótido.

En todos los procedimientos comparativos como se describe en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, todos los otros parámetros tales como protocolos de amplificación o concentraciones de agentes de selección permanecen constantes.

En una realización de la presente invención, la primera línea celular se cultiva en biorreactores y la proteína terapéutica producida se purifica.

En una realización de la presente invención, el índice de adaptación de codones de la segunda secuencia de polinucleótidos es mayor que 0,9, en una realización adicional el índice de adaptación de codones de la segunda secuencia de polinucleótidos que es mayor que 0,91, en una realización adicional el índice de adaptación de codones de la segunda secuencia de polinucleótidos que es mayor que 0,92, en una realización adicional más el índice de adaptación de codones de la segunda secuencia de polinucleótidos que es mayor que 0,95.

En otra forma de realización de la presente invención, el nivel de agente selectivo necesario para lograr la equivalencia terapéutica aritmética del rendimiento de la producción de proteína se reduce a menos de 50% en comparación con la cantidad del agente selectivo utilizado para el mismo procedimiento utilizando la primera secuencia de polinucleótidos. En una realización adicional, el nivel de agente selectivo se reduce a menos del 25% en comparación con la cantidad de agente selectivo utilizado para el mismo procedimiento que utiliza la primera secuencia de polinucleótido, en una realización adicional más, el nivel de agente selectivo se reduce a menos del 5% en comparación con la cantidad de agente selectivo utilizado para el mismo procedimiento que utiliza la primera secuencia de polinucleótidos, en todavía una realización adicional, el nivel de agente selectivo se reduce a menos del 3% en comparación con la cantidad de agente selectivo utilizado para el mismo procedimiento que utiliza la primera secuencia de polinucleótido.

En una forma de realización desvelada en el presente documento se proporciona un procedimiento para producir una línea celular que produce una proteína terapéutica que comprende las etapas de:

a) obtener una primera secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína terapéutica y que posee una puntuación de índice de adaptación de codones de menos de 0,9.

b) obtener una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína terapéutica en la que el índice de adaptación de codones de la secuencia de polinucleótidos es mayor de 0,9.

c) transformar una línea celular con la segunda secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína terapéutica y una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica un marcador de selección que es capaz de proporcionar la amplificación del segundo polinucleótido.

5 d) cultivar dicha al menos una célula de la etapa (c) para crear una primera línea celular que comprende una pluralidad de células en medio que contiene una concentración de un agente de selección que inhibe el crecimiento de células en dicha línea celular que expresa niveles insuficientes del marcador de selección codificado por el tercer polinucleótido de la etapa (c), de tal manera que la meseta de producción de la proteína codificada por el segundo polinucleótido se alcanza con menos rondas de amplificación y/o se alcanza a una menor concentración de agente de selección de lo que sería necesaria para alcanzar una meseta de producción equivalente de dicha proteína producida en una línea celular transformada con el primer polinucleótido.

En una realización de la presente invención, la línea celular que se va a transformar es metabólicamente deficiente debido a la interrupción o la inhibición de una enzima celular endógena.

10 En una forma de realización adicional de la presente invención, la línea celular que se va a transformar es deficiente en una vía de síntesis de nucleósidos.

En una realización de la presente invención, la proteína terapéutica es un anticuerpo, un derivado del mismo o un fragmento de unión a antígeno.

En una realización de la presente invención, la proteína terapéutica es un anticuerpo monoclonal.

15 En una realización de la presente invención, el marcador de selección es un polinucleótido que codifica la dihidrofolato reductasa (DHFR) y el agente de selección es antifolato. En una realización adicional, el antifolato es metotrexato.

En una realización de la presente invención, el marcador de selección es un polinucleótido que codifica la glutamina sintetasa y el agente de selección es metionina sulfoximina.

20 En una forma de realización de la presente invención sólo se requiere una ronda de amplificación para alcanzar una meseta de producción de proteínas.

En una realización de la presente invención, el rendimiento final de proteína terapéutica es mayor que 0,3 g/l en un lote sin alimentar, en una realización adicional, el rendimiento final es mayor de 0,5 g / l en un lote sin alimentar, en una realización adicional más el rendimiento final es mayor que 0,8 g / l en un lote sin alimentar.

25 En otra forma de realización de la presente invención, la concentración de MTX utilizado es menor que 50 nM o menor que 25 nM o menor que 10 nM. En una forma de realización adicional de la presente invención, la concentración de MTX utilizada es 5 nM.

En otra forma de realización de la invención, sólo una etapa de amplificación, y, por lo tanto, sólo se requiere una concentración del agente de selección y de amplificación en el medio de cultivo celular para alcanzar una meseta de producción de proteínas en las células que se seleccionan en dicho medio de cultivo.

30 En el presente documento se desvela un anticuerpo producido por el procedimiento de la invención. En una realización adicional, se proporciona un anticuerpo producido por este procedimiento en el que el anticuerpo producido comprende al menos una cadena pesada y que tiene menos de o igual a 5% de la cadena pesada no glicosilada. En una realización adicional, la cadena pesada del anticuerpo está un 95% glicosilada o un 96% glicosilada o un 97% glicosilada o está un 98% glicosilada o un 99% glicosilada. En una realización adicional más, el anticuerpo está un 100% glicosilado.

35 En una realización de la presente invención, el anticuerpo altamente glicosilado es un anticuerpo monoclonal. En una realización adicional, el anticuerpo altamente glicosilado es un anticuerpo anti-β-amilode. En una realización adicional más, el anticuerpo tiene una secuencia de la cadena pesada de la SEQ ID 18 y una secuencia de la cadena ligera de SEQ ID NO 19.

40 En el presente documento se desvela adicionalmente un fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la invención descrita en el presente documento en la que el fragmento es un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, biespecíficos, diacuerpos, triacuerpo, tetracuerpos, minianticuerpos, minicuerpos, la región variable de la cadena pesada aislada o la región variable de la cadena ligera aislada, proteínas derivadas de suero (por ejemplo, factores de crecimiento, citocinas, albúminas, etc) o fusión combinatoria de los mismos.

45 En otra realización de la invención se proporciona una célula huésped transformada de manera estable que comprende un vector que comprende uno o más casetes de expresión que codifican una cadena pesada y / o una cadena ligera del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, tales células huésped pueden comprender un primer vector que codifica la cadena ligera y un segundo vector que codifica la cadena pesada. Como alternativa, tales casetes de expresión se pueden combinar antes de la liberación.

50 En otra realización de la presente invención se proporciona una célula huésped de acuerdo con la invención descrita en el presente documento en la que la célula es eucariota, por ejemplo, en la que la célula es de mamífero. Ejemplos de tales líneas celulares incluyen ovarios de hámster chino, BHK, HEK-293, ONE o PERC6. (para una revisión reciente véase Wurm 2004: Nature Biotechnology 22;11 pp 1393 - 1398). Tales células huésped también pueden contener modificaciones genotípicas y / o fenotípicas ventajosas, por ejemplo la cepa huésped CHO-DG44 tiene copias de su gen dhfr inactivadas mientras que otros huéspedes podrían tener los genes de la glutamina sintetasa inactivados..

5 Modificaciones alternativa pueden ser la maquinaria enzima implicada en la glicosilación de proteínas (por ejemplo, Yamane-Ohnuki et al, Biotech Bioeng 2004 87: pp 614 - 622, Kanda et al, Journal of Biotechnology, 2007 130: pp 300 - 310, Imai-Nishiya et al BMC Biotechnol, 2007 7:84). Sin embargo, otros pueden tener modificaciones genotípicas y / o fenotípicas ventajosas de apoptosis del huésped, de expresión y de vías de supervivencia (por ejemplo, vías Tey et al Biotechnol Bioeng 2000 68: 31 - 43, Yallop et al Modern Biopharmaceuticals 2005 Chapter 3 pp779 - 807, Nivitchanyang et al Biotechnol Bioeng 2007 98:825 - 41, Figueroa et al Biotechnol Bioeng 2007 97:87 - 92). Estas y otras modificaciones del huésped solo o en combinación, se pueden generar mediante técnicas convencionales, tales como la sobreexpresión de genes no huéspedes o del huésped, enfoques de inactivación de genes. enfoques de silenciamiento de genes (por ejemplo, siRNA) o la evolución y la selección de subcepas con los fenotipos deseados.
10 Dichos técnicas están bien establecidas en la técnica.

En el presente documento se desvela un procedimiento para la producción de una proteína terapéutica de acuerdo con la invención descrita en el presente documento, en la que el procedimiento comprende la etapa de cultivar una célula huésped en un medio de cultivo, por ejemplo medio de cultivo sin suero.

15 En el presente documento se desvela un procedimiento de acuerdo con la presente divulgación en el que dicha proteína terapéutica se purifica adicionalmente a por lo menos un 95% o mayor (por ejemplo, 98% o mayor) con respecto a dicho medio de cultivo sin suero que contiene el anticuerpo.

En el presente documento se proporcionan vectores de expresión de mamíferos que contienen marcos de lectura abiertos que poseen puntuaciones del CAI superiores a 0,9 y que codifican anticuerpos, polipéptidos relacionados con los anticuerpos o derivados o fusiones de los mismos.

20 En otra realización se proporciona una primera línea celular transformada con una segunda secuencia de polinucleótidos que tiene un índice de adaptación de codones que es mayor que una primera secuencia de polinucleótidos en la que el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido codifican la misma proteína terapéutica y que comprende además una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica un marcador de selección que es capaz de proporcionar la amplificación de la primera secuencia de polinucleótidos, en el que dicha primera línea celular produce un rendimiento más alto de dicha proteína terapéutica en comparación con una segunda línea celular transformada con dicho primer polinucleótido que codifica dicha proteína terapéutica cuando se cultivan en un medio seleccionable.
25

30 En una realización adicional se proporciona una segunda línea celular transformada con una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína terapéutica y tiene un índice de adaptación de codones que es mayor que 0,9 y que comprende además una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica un marcador de selección que es capaz de proporcionar amplificación de una segunda secuencia de polinucleótidos, en el que dicha segunda línea celular produce un mayor rendimiento de dicha proteína terapéutica en comparación con una primera de dicha línea celular transformada con un primer polinucleótido que codifica dicha proteína terapéutica en el que dicho primer polinucleótido tiene un índice de adaptación de codones que es menor de 0,9 cuando se cultiva en un medio seleccionable.
35

En una realización de la presente invención, la puntuación del CAI por encima de 0,9 se calcula usando la métrica de puntuación del CAI EMBOSS tal como se describe en la Tabla 6.

La presente divulgación proporciona una línea celular que comprende un vector o un casete de expresión de acuerdo con las realizaciones previas tal como se describe en el presente documento.

40 En una realización adicional más se proporciona una línea celular o su progenie que se puede obtener mediante los procedimientos de la presente invención.

45 En otra realización se proporcionan células de mamífero con genomas que contienen marcos de lectura abiertos integrados o mantenidos episómicamente que poseen puntuaciones del CAI superiores a 0,9 (derivados usando la tabla de uso de codones EMBOSS E.human.cut) que codifican anticuerpos, polipéptidos relacionados con los anticuerpos o derivados de los mismos.

A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, el término "que comprende" y "comprende" incorpora "que consiste en" y "consiste en". Es decir, se pretende que "que comprende" y "comprende" transmitan la posible inclusión de otros elementos o números enteros no citados específicamente, cuando el contexto lo permita.

50 A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, el término "meseta de la producción" significa el nivel de expresión alcanzado en cultivos discontinuos sin alimentar extendidos, por el que las rondas adicionales de amplificación típicamente producen un incremento inferior a 2 veces en relación con el clon amplificado de los padres. Cuando los clones se modifican específicamente para producir anticuerpos, los clones que producen entre 0,3 g y 1,5 g por litro en los cultivos estándar de producción sin alimentar extendidos típicamente pueden considerarse como que se aproximan a esta meseta de la producción cuando se utilizan regímenes actuales de cultivos sin alimentar extendidos y recetas de los medios.
55

- La subclonación de una sola célula de los clones finales que se acercan a la meseta de producción puede llevarse a cabo mediante muchos procedimientos estándar, incluyendo la clasificación de flujo (por ejemplo, el depósito de una célula por pocillo en una placa de 96 pocillos), la recolección de colonias en agar blando, o clonación por dilución límite. Para garantizar el sobrecrecimiento de una sola célula en los pocillos receptores, los medios acondicionados a veces o los cultivos de alimentación temporal también deben emplearse como soporte del crecimiento de la célula de otra manera solitaria depositada. Si se requieren cocultivos de alimentación, éstos pueden comprender fácilmente células huésped parentales sin vectores seleccionables integrados, como tales células huésped, pueden seleccionarse en contra una vez que el clon de células individuales depositado comienza a dividirse de forma sana.
- La expresión marco de lectura abierto (ORF) tal como se utiliza a lo largo de esta memoria descriptiva se refiere a la secuencia de codificación de ácido nucleico que codifica una cadena o cadenas polipeptídicas deseadas. Los codones contenidos dentro de tales secuencias de codificación ORF pueden ser contiguos o, alternativamente, pueden contener intrones. Cuando están incluidos, tales intrones o secuencias intermedias normalmente se eliminan mediante reacciones de corte y empalme en la célula huésped antes de la formación del marco de lectura abierto final contiguo en el ARNm maduro.
- El "rendimiento" como se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva se refiere a la concentración de un producto (por ejemplo, un polipéptido expresado de forma heteróloga) en solución (por ejemplo, caldo de cultivo o mezcla de lisis celular o tampón) y por lo general se expresa como mg / l o g / l. Un incremento en el rendimiento puede referirse a un aumento absoluto o relativo en la concentración de un producto producido en dos conjuntos definidos de condiciones.
- El término unido operativamente se refiere al uso de marcadores de selección y de amplificación empleados para seleccionar células huésped que contienen casetes de expresión que expresan los productos de proteína deseados. Esto se puede lograr por clonación del marcador seleccionable y de amplificación en el mismo plásmido o vector que el que contiene el casete de expresión que expresa la proteína deseada o, alternativamente, se puede liberar en la célula en un plásmido o vector separado.
- Breve descripción de las figuras**
- Figura 1: Una representación esquemática de los vectores basados en el promotor de RSV utilizados en proyecto 2,3,4,5, 6 (a), 6 (b) y 7 (a). Para las evaluaciones basadas en el promotor de EF-1 alfa (de proyecto 6 y 7), el promotor de RSV se sustituyó con un promotor humano derivado de EF-1 alfa más el primer intrón (véase Kim DW 1990 Gene 91: 217 - 23). Este se obtuvo mediante PCR a partir del ADN genómico humano. Este promotor alfa EF-1 se clonó a continuación en estos vectores en lugar de en el promotor basado en RSV.
- Figura 2: Cadena pesada no adaptada del proyecto 5 con una puntuación CAI de 0,809 CAI y empleado en el proyecto 5 (a) SEQ ID NO 10
- Figura 3: Cadena ligera no adaptada del proyecto 5 con una puntuación CAI de 0,761 y empleado en el proyecto 5 (a) SEQ ID NO 11
- Figura 4: ORF de la cadena pesada del proyecto 5 (b) con una puntuación del CAI mayor (0,847). Véase Tabla 5. Véase la SEQ ID 12
- Figura 5: ORF de la cadena ligera del proyecto 5 (b) con una puntuación del CAI mayor (0,833). Véase Tabla 5. Véase la SEQ ID 13
- Figura 6: ORF de la cadena pesada del proyecto 5 con una puntuación del CAI mayor (0,872). Esta secuencia se empleó en el proyecto de anticuerpo 5 (c). Véase la SEQ ID NO 14.
- Figura 7: ORF de la cadena ligera del proyecto 5 con una puntuación del CAI mayor (0,894). Esta secuencia se empleó en el proyecto de anticuerpo 5 (c). Véase la SEQ ID NO 15.
- Figura 8: ORF de la cadena pesada del proyecto 5 con una puntuación del CAI mayor (0,982). Esta secuencia se empleó en el proyecto de anticuerpo 5 (d). Véase también la SEQ ID 16.
- Figura 9: ORF de la cadena ligera del proyecto 5 con una puntuación del CAI mayor (0,976). Esta secuencia se empleó en el proyecto de anticuerpo 5 (d). Véase también la SEQ ID 17.
- Figura 10: Niveles de ARN y de proteínas de la cadena pesada y de la cadena ligera para el anticuerpo del proyecto 5.
- Figura 11: Metodología de la adaptación de codones con detalles.
- Figura 12: Datos del producto de ejemplo NGHC obtenidos durante la selección de clones final del proyecto 5.
- Figura 13: Título de ejemplo generado de 097-7 (proyecto 5 (d), 5 nM MTX clon elegido CAI HC 0,982, 0,976 LC) con aproximadamente 3 meses de trabajo de desarrollo adicional después de la amplificación y selección de la línea celular final.
- Figura 14: Niveles relativos de la proteína y copia del gen de DHFR y la copia del gen Neo observados en células modificadas con ingeniería en diversos proyectos.

Descripción detallada

La frecuencia de uso de los codones de los genes que codifican los polipéptidos terapéuticos producidos de acuerdo con la presente invención se mide y se define por el índice de adaptación de codones (CAI).

La adaptación de codones es la adaptación de los codones de un marco de lectura abierto a los codones sinónimos

preferidos en los genes humanos / de mamífero al tiempo que se evita la introducción de funciones de secuencias secundarias no deseadas que impiden la expresión de los marcos de lectura abiertos resultantes. Los inventores han observado que los codones humanos preferidos son también muy adecuados, incluso cuando está prevista la posterior expresión en células de mamíferos no humanas (por ejemplo, células derivadas de hámster). Sin embargo, si el codón más preferido para un aminoácido dado difiere en una especie de mamífero dada, también se puede usar en lugar de la preferencia humana. La "puntuación del CAI" generada para cada marco de lectura abierto pone de relieve el grado en el que el marco de lectura abierto está adaptado al uso de codones sinónimos más preferidos por los genes humanos / de mamífero.

En el contexto de la presente invención, una puntuación del CAI de 1 significa que el codón más óptimo se utiliza para cada aminoácido en cada posición de codón. Para obtener resultados óptimos en los procedimientos de la presente invención, los genes que codifican la proteína terapéutica tienen un CAI que está suficientemente cercano a 1 de tal manera que el nivel deseado de expresión de la proteína terapéutica se logra con significativamente menos agente de selección y amplificación y / o en un tiempo más rápido respecto a lo observado en la expresión de la secuencia de partida de origen natural, por ejemplo, el CAI es al menos 0,9, o al menos 0,95 o al menos 0,975.

Sin embargo, no es necesario cambiar todos los codones con los codones más preferidos o reemplazar todos los menos preferidos por los codones más preferidos. El único requisito es que la secuencia resultante posee una puntuación del CAI anormalmente alta y que no contiene elementos de alteración de la expresión. Software disponible en el mercado, como Leto 1.0 (Entelechon, Regensburg, Alemania) puede diseñar una secuencia de puntuación del CAI adecuadamente alta. Para mayor guía de ayuda en el diseño de secuencias adaptadas por codones para su utilización en la presente invención, se han analizado las bases de datos 24044 RefSeq de productos de transcripción humanos (números de acceso NM_prefixed) derivados del genoma del NCBI generado con el número 36. Se calculó el intervalo de puntuación del CAI y fue de 0,593-0,894 con una puntuación media de 0,720. La puntuación más alta (0,894) para un gen conocido y expresado (en lugar de la teórica) en esta base de datos se ha generado con la proteína asociada a queratina 5-8 (KRTAP5-8; NM_021046) y mediante la cubierta cornificada 1A (LCE1A; NM_178348). Además una base de datos de 21182 humana ADNC de IgG reveló que las puntuaciones de IgG van 0,576 hasta 0,878, con un promedio de 0.766. Para ayudar a guiar a los expertos en la técnica, secuencias adecuadas para su uso en la invención podrían poseer puntuaciones del CAI por encima y más allá de la cubierta cornificada tardía 1A (LCE1A; NM_178348). Más preferentemente se deben emplear puntuaciones del CAI de 0,9.

Se observó que si la adaptación de codones se llevaba a cabo a través de una secuencia más corta (por ejemplo, sólo la región variable), se observa un mayor nivel de clones de alta producción, aunque, cuando la adaptación de codones se lleva a cabo en la totalidad del marco de lectura abierto, la amplitud (es decir, el número) de clones de alta producción generados se incrementa aún más (véase, la Tabla 5).

Debido a la secuencia de codones preferidos, los enfoques típicos de adaptación normalmente, por defecto, también evitarán la introducción de secuencias de inestabilidad de ARN con ARE (elementos ricos en AU, véase Akashi et al Blood 1994; Vol 83 pp 3182 - 3187)) alta puntuación. Sin embargo, de vez en cuando, después de la adaptación de codones existe el requisito de eliminar elementos de secuencias de alteración de la expresión introducidos accidentalmente. Estos incluyen entre otros:

- (i) sitios de corte y empalme funcionales,
- (ii) Áreas de simetría de díada (por ejemplo, secuencias directas, invertidas o palindrómicas) que reducen notablemente los niveles de expresión y / o aumentan las tasas de recombinación entre las secuencias.
- (iii) Secuencias de inestabilidad funcionales.

En las raras ocasiones en las que se crean estos elementos perturbadores no deseados durante la adaptación se recomienda usar un codón humano menos preferido, pero no el menos preferido (a menos que la elección sea limitado) para interrumpir la secuencia local para inactivar la función. Las pequeñas desviaciones de las puntuaciones máximas no afectarán significativamente al uso de los marcos de lectura abiertos resultantes en la presente invención. También se reconoce que si las pequeñas áreas de un marco de lectura abierto siguen siendo no adaptadas (por ejemplo, para conservar los sitios de restricción útiles), por lo tanto, esto no afectará significativamente a la puntuación global del CAI.

Si el marco de lectura abierto codifica para una proteína de fusión, híbrida o quimérica, se fomenta el incremento de la puntuación del CAI del mismo modo que se ha descrito anteriormente. Una vez más, esta adaptación hacia codones sinónimos preferidos por la célula huésped para la expresión de genes endógenos altamente expresados debe llevarse a cabo para todos y cada uno de los componentes del gen o ADN afinDNA afin de los marcos de lectura abiertos fusionados o modificados con ingeniería. Para las secuencias de codificación puramente sintéticas presentes en una proteína (es decir, secuencia para la que no existe ninguna secuencia previa), se aconseja introducir las puntuaciones anormalmente altas del CAI del gen humano precisamente de la misma manera. Los marcos de lectura abiertos con puntuaciones de CAI puntuaciones superiores y más altas de gen humano de la cubierta cornificada tardía 1A deberán emplearse en la presente invención.

La presente invención descrita en el presente documento es la primera en describir un procedimiento de reducir los niveles de un agente seleccionable y de amplificación requerido, el tiempo requerido y el número de ciclos de amplificación requeridos para generar líneas celulares modificadas genéticamente que expresan los niveles deseados

de la proteína mediante adaptación por codones de los marcos de lectura abiertos. A través de la utilización de la adaptación de codones para este propósito, se observan rendimientos suficientes en marcos de tiempo más rápidos y, por tanto, se ahorran muchas semanas en las actividades de desarrollo de líneas celulares. Además, los inventores también están generando líneas celulares equivalentes o mejoradas usando concentraciones más bajas del agente de selección y amplificación que lo que los inventores ya han conseguido previamente. De hecho, es probable que cuando tales mejoras como se describe en el presente documento se combinan con el cultivo de células estándar y mejoras de protocolo de la siembra, como los descritos por Celina de la Cruz Edmonds et al (ibid), se observarán otras reducciones en los niveles de selección y agentes de amplificación y una mayor reducción en el tiempo necesario para generar rendimientos equivalentes o mejoradas de líneas celulares modificadas genéticamente.

La presente invención es adecuada para su uso cuando la proteína terapéutica es una glicoproteína. Mientras que el trabajo previo divulga el hecho de que uno puede controlar la glicosilación del producto proteico mediante la modificación de la duración del proceso, la temperatura, el pH, la osmolaridad y los constituyentes y aditivos de los medios etc. (por ejemplo, véase el documento WO2002076578y las referencias citadas en el mismo), los inventores han encontrado que la adaptación de codones de los marcos de lectura abiertos que codifican las secuencias de polipéptidos terapéuticos (en el caso de los polipéptidos terapéuticos de anticuerpos) es capaz de disminuir los niveles de glicosilación incompleta y los niveles de ocupación reducida del sitio de forma independiente del subtipo de células CHO, los regímenes de selección y amplificación o condiciones de los medios de cultivo. Esta observación sorprendente es la primera en demostrar que uno puede afectar al perfil de glicosilación de las proteínas a través de la adaptación de codones del marco de lectura abierto. Usando los abordajes de adaptación de codones como se describe en el presente documento, por tanto, se puede asegurar un sólido proceso de fabricación que depende de la secuencia del gen en lugar de las condiciones en las que se ha cultivado la célula huésped. A su vez, esto permite una mayor oportunidad para mejorar las condiciones de cultivo y los regímenes de alimentación a través de los medios tradicionales y repeticiones del desarrollo de la alimentación sin excesivos problemas sobre el impacto resultante sobre el glicoperfil del producto. El grado de adaptación de codones se puede medir usando el procedimiento descrito por primera por Sharp y Li (Nucleic Acid Res 1987 15:1281 - 95). Sharp y Li propusieron la puntuación del índice de adaptación de codones (CAI) que deriva esencialmente de las estadísticas de la preferencia de codones, pero normalizado para cada aminoácido a fin de excluir los efectos de la variación en la composición de aminoácidos entre diferentes genes. Esta métrica del CAI está disponible fácilmente (por ejemplo, a través de EMBOSS La European Molecular Biology Open Software Suite (véase Rice et al 2000: Trends in Genetics 16; pp276 - 277)).

Con el fin de puntuar los marcos de lectura abiertos destinados para uso en la presente invención, se debe usar primero la base de datos de referencia adecuada. En primer lugar se debe considerar la célula huésped que se va a usar, después se deberá identificar la tabla de referencia de uso de codones sinónimos relativos (RSCU) para los genes expresados en dicha célula huésped. Normalmente, las bases de datos RSCU humanos son adecuados para referencia al expresar el marco de lectura abierto en cualquier tipo de células de mamíferos. Un ejemplo de una base de datos es que la proporcionada por EMBOSS, que usa como referencia la tabla de uso de codones Ehum.cut para determinar las preferencias de uso de codones en las células humanas. Una tabla de uso de codones de referencia alternativa es la que describen Massaer et al (ibid) en el que se emplea un número más pequeño de genes humanos altamente expresados para determinar la preferencia de codones. Mientras que estas dos tablas de referencia están de acuerdo en términos generales en el codón más preferido, existe una divergencia notable para un aminoácido (arginina). Por lo tanto, a la hora de diseñar los marcos de lectura abiertos para uso en la presente invención es lógico hacer una referencia cruzada de las mismas tablas de uso de codones para (i) determinar los codones más preferidos para incluir en el marco de lectura abierto y (ii) la puntuación CAI del marco de lectura abierto generado posteriormente para garantizar que la puntuación es suficientemente alta como para ser adecuado para su uso en la presente invención. Por ejemplo, si se usa la base de datos de Massaer et al regularmente para diseñar marcos de lectura abiertos para la expresión en células humanas y de mamíferos y, por tanto, se considera que el codón CGC es el más preferido para codificar arginina, es lógico utilizar también estos datos de referencia de preferencia a la hora de determinar la puntuación de CAI de los marcos de lectura abiertos resultantes generados.

La metodología tal como se describe en el presente documento es particularmente adecuada al expresar los anticuerpos o derivados de los mismos y es particularmente eficaz cuando se combina con casetes de expresión dirigidos por el promotor y los elementos de expresión derivados del gen de alfa EF-1. Los casetes de expresión dirigidos por otros promotores y elementos de expresión (por ejemplo, derivados de la LTR de RSV) también son adecuados. Es bien conocido en la técnica que los elementos de casete de expresión (por ejemplo, promotores, potenciadores, regiones de unión a matriz (MARS), aisladores, regiones no traducidas, secuencias intermedias tales como intrones y sitios de poliadenilación) se pueden combinar en muchas combinaciones diferentes para crear casetes de expresión adecuados para dirigir la expresión de los marcos de lectura abiertos deseados y para dirigir la expresión de los marcadores de selección y de amplificación empleados en la presente invención.

Una vez que los clones en cualquier protocolo de desarrollo de línea celular dado se acercan a una meseta de producción en la producción de lotes sin alimentar extendidos, se observa que las actividades adicionales de laboratorio se enfocan mejor a metodologías tales como (i) clonación de una sola célula de los mejores clones, (ii) desarrollo del proceso por lotes con alimentación, (iii) desarrollos de procesos de estilo de perfusión, (iv) recetas de medios a medida y alimentos, y regímenes y (v) adaptación posterior del cultivo. Por ejemplo, una vez que se alcanza un umbral de producción para un clon individual, sus subclones de una sola célula derivados son normalmente más estables y de alto rendimiento que los clones hija amplificados generados por otros regímenes de selección y

amplificación en niveles más estrictos del agente de selección y amplificación. De hecho, el aumento de la selección y amplificación de los clones finales que ya se acercan a un umbral de producción a menudo conducen a inestabilidad y después de las mejoras iniciales, pueden conducir en última instancia a títulos similares o incluso inferiores en cultivos discontinuos del modelo de producción de alimentos extendidos que el clon parental amplificado. Por lo tanto, mientras que se reconoce que, en ocasiones, un evento de amplificación más raro y fortuito puede aumentar los títulos por encima de 2 veces en algunos casos, una vez que se acerca a un umbral de expresión, hay técnicas más fiables que se pueden emplear en su lugar para aumentar aún más títulos estables.

En el presente documento se describe un procedimiento para producir una línea celular que produzca una proteína terapéutica que comprende las etapas de:

- 5 a) obtener una primera secuencia de polinucleótidos que codifica dicha al menos una proteína terapéutica,
- b) alterar la primera secuencia de polinucleótidos para obtener una segunda secuencia de polinucleótidos, donde el índice de adaptación de codones de la segunda secuencia de polinucleótidos es mayor que el de la primera secuencia de polinucleótidos y el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido codifican la misma proteína terapéutica.
- 15 c) transformar al menos una célula con la segunda secuencia de polinucleótidos de la etapa (b) y una secuencia de polinucleótidos que codifica un marcador de selección que es capaz de proporcionar amplificación de la segunda secuencia de polinucleótidos dentro de dicha célula,
- (d) hacer crecer dicha al menos una célula de la etapa (c) para crear una primera línea celular que comprende una pluralidad de células, en un medio que contiene una concentración de un agente de selección que inhibe el crecimiento de células en dicha línea celular que expresan niveles insuficientes del marcador de selección codificado por el tercer polinucleótido de la etapa (c), de modo que la meseta de producción de la proteína codificada por el segundo polinucleótido se alcanza con menos rondas de amplificación y/o se alcanza a una concentración más baja de agente de selección de lo que sería necesario para alcanzar una meseta equivalente de producción de dicha proteína producida en una línea celular transformada con el primer polinucleótido.

- 25 En el presente documento se describe un procedimiento en el que la primera línea celular se cultiva en biorreactores y la proteína terapéutica producida se purifica. En el presente documento se describe un procedimiento en el que el índice de adaptación de codones de la segunda secuencia de polinucleótidos es superior a 0,9. En el presente documento se describe un procedimiento en el que el nivel de agente de selección se reduce a menos del 50% en comparación con la cantidad de agente de selección utilizado para el mismo método utilizando la primera secuencia de polinucleótidos. En el presente documento se describe un procedimiento en el que el nivel de agente de selección se reduce a menos del 25% en comparación con la cantidad de agente de selección utilizado para el mismo procedimiento utilizando la primera secuencia polinucleotídica. En el presente documento se describe un procedimiento en el que el nivel de agente de selección se reduce a menos del 5% en comparación con la cantidad de agente selectivo utilizado para el mismo procedimiento utilizando la primera secuencia polinucleotídica. En el presente documento se describe un procedimiento en el que el nivel de agente selectivo se reduce a menos del 3% en comparación con la cantidad de agente selectivo utilizada para el mismo procedimiento utilizando la primera secuencia polinucleotídica.

En el presente documento se describe un procedimiento para producir una línea celular que produzca una proteína terapéutica que comprende las etapas de:

- 40 a) obtener una primera secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína terapéutica en la que el índice de adaptación de codones de la secuencia de polinucleótidos es superior a 0,9.
- b) transformar una línea celular con la secuencia polinucleotídica que codifica la proteína terapéutica y una segunda secuencia polinucleotídica que codifica un marcador de selección que es capaz de proporcionar amplificación de la primera secuencia polinucleotídica que codifica la proteína terapéutica dentro de la línea celular,
- 45 (c) hacer crecer la línea celular transformada en un medio que contiene una concentración aumentada o creciente de un agente de selección que inhibe el crecimiento de células que expresan niveles insuficientes del marcador de selección codificado por el polinucleótido de la etapa (b) de manera que la concentración de agente de selección en el medio se reduce en comparación con lo que se requiere para lograr el mismo rendimiento de la proteína terapéutica de una línea celular transformada con una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína terapéutica que posee una puntuación de índice de adaptación de codones de menos de 0,9.

- 55 En el presente documento se describe un procedimiento en el que la proteína terapéutica es un anticuerpo, un derivado del mismo o un fragmento de unión a antígeno. En el presente documento se describe un procedimiento en el que la proteína terapéutica es un anticuerpo monoclonal. En el presente documento se describe un procedimiento en el que la línea celular que se va a transformar es metabólicamente deficiente debido a la interrupción o inhibición de una enzima celular endógena. En el presente documento se describe un procedimiento en el que la línea celular a transformar es deficiente en una ruta de síntesis de nucleósidos. En el presente documento se describe un procedimiento en el que el marcador de selección es un polinucleótido que codifica la dihidrofolato reductasa (DHFR) y el agente de selección es un antifolato. En el presente documento se describe un procedimiento en el que el antifolato es metotrexato. En el presente documento se describe un procedimiento en el que el marcador de selección es un polinucleótido que codifica glutamina sintetasa y el agente de selección es metionina sulfoximina. En el presente documento se describe un procedimiento en el que solo se requiere una ronda de amplificación para lograr una meseta

- de producción de proteínas. En el presente documento se describe un procedimiento en el que el rendimiento final es superior a 0,5 g/l en un lote sin alimentar. En el presente documento se describe un procedimiento en el que la concentración de MTX usada es inferior a 50 nM. En el presente documento se describe un procedimiento en el que la concentración de MTX utilizada es 5 nM. En el presente documento se describe un procedimiento, en el que la línea celular es una línea celular de mamífero. En el presente documento se describe un procedimiento en el que la línea celular es CHO o NS0.
- 5 En el presente documento se describe una segunda línea celular transformada con una segunda secuencia de polinucleótidos que tiene un índice de adaptación de codones que es mayor que una primera secuencia de polinucleótidos en la que el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido codifican la misma proteína terapéutica y que además comprende una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica un marcador de selección. que es capaz de proporcionar amplificación de la primera secuencia polinucleotídica, en la que dicha segunda línea celular produce un mayor rendimiento de dicha proteína terapéutica en comparación con una primera línea celular transformada con dicho primer polinucleótido que codifica dicha proteína terapéutica cuando ambas se cultivan en medio seleccionable.
- 10 En el presente documento se describe una segunda línea celular transformada con una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína terapéutica y tiene un índice de adaptación de codones superior a 0,9 y que comprende además una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica un marcador de selección que es capaz de proporcionar amplificación de la segunda secuencia polinucleotídica, en la que dicha segunda línea celular produce un mayor rendimiento de dicha proteína terapéutica en comparación con una primera línea celular transformada con un primer polinucleótido que codifica dicha proteína terapéutica en la que dicho primer polinucleótido tiene un índice de adaptación de codones menor de 0,9.
- 15 En el presente documento se describe un vector que comprende al menos un casete de expresión que contiene un marco de lectura abierto con una puntuación CAI superior a 0,9, y un segundo casete de expresión que contiene un marcador seleccionable amplificable.
- 20 En el presente documento se describe un casete de expresión amplificado que contiene un marco de lectura abierto con una puntuación CAI superior a 0,9 contenido dentro de una célula huésped donde está operativamente unido a un segundo casete de expresión que contiene un marcador seleccionable amplificable. En el presente documento se describe una línea celular que comprende un vector descrito en el presente documento o un casete de expresión descrito en el presente documento.
- 25 En el presente documento se describe una línea celular o su progenie que se puede obtener mediante el procedimiento descrito en el presente documento.
- 30 En el presente documento se describe una línea celular que contiene un marco de lectura abierto unido operativamente a un marcador seleccionable amplificable por lo que dicho marco de lectura abierto tiene una puntuación CAI superior a 0,9.
- 35 En el presente documento se describe un anticuerpo producido mediante el procedimiento descrito en el presente documento en el que el anticuerpo producido comprende al menos una cadena pesada y tiene menos de o igual al 5% de cadena pesada no glicosilada.
- En el presente documento se describe un anticuerpo producido usando el procedimiento descrito en el presente documento en el que la cadena pesada del anticuerpo está glicosilada en un 95%.
- 40 En el presente documento se describe un anticuerpo producido usando el procedimiento descrito en el presente documento en el que la cadena pesada del anticuerpo está glicosilada en un 96%.
- En el presente documento se describe un anticuerpo producido usando el procedimiento descrito en el presente documento en el que la cadena pesada del anticuerpo está glicosilada en un 97%.
- 45 En el presente documento se describe un anticuerpo producido usando el procedimiento descrito en el presente documento en el que la cadena pesada del anticuerpo está glicosilada en un 98%.
- En el presente documento se describe un anticuerpo, en el que el anticuerpo es monoclonal. En el presente documento se describe un anticuerpo, que es un anticuerpo anti-β-amiloide.
- En el presente documento se describe un anticuerpo que tiene una secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO 18 y una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO 19.
- 50 La presente invención se ilustra a continuación con más detalle con los siguientes ejemplos.

Ejemplos

En el pasado, la metodología de selección de DHFR se ha empleado en más de quince proyectos de anticuerpos. En todos los casos, cuando se utiliza esta metodología han sido necesarias al menos dos rondas de amplificación y un

mínimo de MTX 50 nM como una presión de selección y mantenimiento para generar líneas celulares con rendimientos adecuados. Los resultados típicos generados en este período de tiempo por esta metodología se representan por los anticuerpos 1, 2, 3 y 4 en la Tabla 1. El proyecto 1 del anticuerpo se llevó a cabo utilizando metodologías estándar disponibles en el momento. Los proyectos de anticuerpos 2-9 se llevaron a cabo de acuerdo con los materiales y procedimientos siguientes.

Se ha estudiado el impacto de la mejora del índice de adaptación de codones (CAI) de los marcos de lectura abiertos.

El primero elegido para la investigación fue el anticuerpo 5. Este estudio involucró a expresar el producto de anticuerpo de los marcos de lectura abiertos de las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos tipo salvaje (es decir, no adaptados por codones) (registrados como anticuerpo 5 (a)), marcos de lectura abiertos de las cadenas pesadas y ligeras con adaptación de codones ampliamente de las secuencias de codificación del dominio variable únicamente (registradas como anticuerpo 5 (b) o 5 (c)) o adaptación de codones de los marcos de lectura abiertos de la cadena pesada y ligera (registrado como anticuerpo 5 (d))(d)). Los resultados de este estudio se presentan en las Tablas 1-5.

Ejemplo 1. Materiales y procedimientos

1.1 Clonación de ADN y Construcción de vectores.

Toda la clonación del ADN se realizó mediante subclonación basada en enzimas de restricción establecida y metodologías de ensamblaje de PCR (véase, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Tercera Edición: Sambrook et al (CSH Laboratory Press)). Se muestran las representaciones esquemáticas de los vectores de expresión y selección (véase la Figura 1). Los vectores mostrados ejemplifican el promotor del RSV, no obstante, se usaron diferentes promotores de acuerdo con la tabla 1. A todos los demás respectos, los vectores permanecieron sin modificar.

1.2 Adaptación de codones

En los proyectos en los que se investigaron las secuencias de ORF adaptadas, estas se generaron usando oligonucleótidos solapantes deseados combinados con la ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de fusión antes de la clonación y la confirmación de la secuencia; todo mediante metodología estándar (véase: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Tercera Edición: Sambrook et al (CSH Laboratory Press) and Stemmer et al., *Gene*. 164(1):49 - 53, 1995). Las secuencias de las regiones adaptadas de los ORF del proyecto 5 (b) y 5 (c) se diseñaron utilizando la preferencia de uso de codones de Massaer para células humanas / de mamíferos (véase la Figura 11).

Para el proyecto del anticuerpo 5 (d), las secuencias del ORF adaptadas por codones se diseñaron y generaron por el proveedor de servicios de contrato 1. Los ORF resultantes poseían una puntuación CAI >0,9. Las secuencias de adaptadas de codones que codifican los dominios variables de anticuerpos para el proyecto del anticuerpo 6 fueron diseñados y generados por el proveedor de servicios de contrato 2. Estos dominios variables se combinaron a continuación con las secuencias que codifican los dominios constantes adaptadas por codones del proyecto 5 (d) mediante subclonación estándar con la ayuda de sitios únicos de clonación situados entre las regiones constantes y variables (usando Spel para la cadena pesada, BsiWI para la cadena ligera) (proyectos 6 (b) y 6 (d)). Los ORF resultantes que codifican el anticuerpo de longitud completa para el proyecto 6 (b) y 6 (d) poseían cada uno una puntuación CAI > 0,9. Todos los ORF adaptados por codones del proyecto del anticuerpo 7 fueron diseñados y fabricados por el proveedor de servicios contrato 2 y los ORF resultantes poseían una puntuación CAI > 0,9. Los ORFs de los proyectos 8 y 9 emplearon el algoritmo de software Leto para diseñar la secuencia del dominio variable. Los marcos de lectura abiertos de longitud completa en el marco se generaron después mediante la combinación de estas secuencias con las secuencias de codificación del dominio constante adecuadas (de nuevo, utilizando los sitios Spel y BsiWI como anteriormente): para el anticuerpo 8, las secuencias que codifican los dominios variables se fusionaron con las respectivas secuencias de codificación de dominio constante de proyecto 7. Para el anticuerpo 9, las secuencias de codificación del dominio variable generadas se fusionaron con las respectivas secuencias de codificación del dominio constante del proyecto 6 (d). Una vez más los ORF resultantes que codifican la totalidad de las cadenas pesadas y ligeras para el proyecto de 8 y 9 poseían cada uno puntuaciones CAI > 0,9.

En la figura 11 (A), la secuencia de la cadena ligera que codifica la CDR1 de proyecto del anticuerpo 5 se muestra como una secuencia de muestra representativa. Se muestra la secuencia de aminoácidos de esta CDR. Se muestra un potencial elemento rico en AU de inestabilidad auuuu (ARE) en recuadro y en negrita (véase también Akashi et al *Blood* 83:pp3182 - 3187). También se destaca el codón de arginina. En primer lugar, el procedimiento de adaptación codones aumentado tuvo como resultado un aumento de la puntuación de CAI a través del ORF. Este anticuerpo se empleó en proyecto 5 (b). Como se muestra este procedimiento incluye la mayoría de los codones preferidos (por ejemplo, para Tyr), pero no en todas las ocasiones (por ejemplo, Leu). En segundo lugar, la puntuación máxima CAI empleó los codones más preferidos de acuerdo con Massaer et al. Esta secuencia se empleó en el proyecto de anticuerpo 5 (c). La secuencia final proporcionada empleó los codones más preferidos de acuerdo con una base de datos más grande, como la disponible en el sitio web de base de datos de uso de codones. Esta secuencia de anticuerpos se empleó en el proyecto 5 (d). En la figura 11 (B), las tablas de preferencia de codones de genes altamente expresados en los seres humanos adaptados de Massaer et al. En la figura 11 (C) La tabla de preferencia de codones de genes humanos adaptados de la base de datos de uso de codones (www.kazusa.org.jp/codón) para Homo sapiens (que comprenden 89.533 CD (38691091 codones)).

Obsérvese que para los ORF de las cadenas pesada y ligera se usaron de forma rutinaria los sitios Hind III (5 ') y EcoR1 (3') para lanzar los marcos de lectura abiertos en los vectores de expresión. Todas las secuencias se confirmaron antes de su uso en la transfección.

- 5 Por ejemplo, secuencias, véanse las figuras 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, que registran las secuencias del marco de lectura abierto originales y adaptadas del 5. Obsérvese que en el proyecto 5 solo 5 (d) fue suficientemente adaptado por codones en las regiones de los marcos de lectura abiertos para que la puntuación CAI resultante aumente por encima de 0,9.

Para todas las puntuaciones CAI registradas en el presente documento, se usó la tabla de uso de codones Ehum.cut como referencia (disponible a través de EMBOSS).

- 10 Estas puntuaciones se calculan utilizando la aplicación del Índice de Adaptación de Codones que emplea la metodología descrita por primera vez por Sharp y Li (ibid). Esta aplicación es parte de la suite EMBOSS. Versión 2.8.0 archivos de uso de codones Ehum.cut y los ajustes de los parámetros por defecto se usaron para determinar las puntuaciones de CAI de las secuencias.

Tabla 6

- 15 Tabla de uso de codones Ehum.cut derivada de **EMBOSS**. Columna A: Secuencia de codones; Columna B: aminoácido codificado; Columna C: Proporción de uso de un codón dado entre su conjunto redundante; Columna D: Número de codones por 1.000 codones; Columna E: Número de veces que se observó el codón en el conjunto de datos utilizado para derivar la tabla.

(A)	(B)	(C)	(D)	(E)
GCG	A	0,100	6,950	10994
GCA	A	0,220	15,370	24296
GCT	A	0,270	18,750	29645
GCC	A	0,410	28,340	44818
TGT	C	0,440	9,970	15764
TGC	C	0,560	12,630	19971
GAT	D	0,460	22,530	35629
GAC	D	0,540	26,940	42601
GAA	E	0,420	29,040	45923
GAG	E	0,580	40,670	64302
TTT	F	0,450	16,640	26304
TTC	F	0,550	20,620	32611
GGT	G	0,170	11,880	18792
GGG	G	0,240	16,520	26128
GGA	G	0,250	17,710	28000
GGC	G	0,340	23,940	37852
CAT	H	0,400	9,660	15276
CAC	H	0,600	14,350	22687
ATA	I	0,150	6,920	10941
ATT	I	0,350	16,280	25738

(continuación)

(A)	(B)	(C)	(D)	(E)
ATC	I	0,500	23,380	36976
AAA	K	0,410	24,120	38145
AAG	K	0,590	34,370	54344
CTA	L	0,070	6,320	9990
TTA	L	0,070	6,400	10123
TTG	L	0,120	11,520	18218
CTT	L	0,130	11,740	18564
CTC	L	0,200	18,690	29552
CTG	L	0,420	38,790	61342
ATG	M	1,000	22,230	35143
AAT	N	0,450	17,340	27422
AAC	N	0,550	21,190	33512
CCG	P	0,110	6,700	10588
CCA	P	0,280	16,810	26574
CCT	P	0,280	16,970	26837
CCC	P	0,330	19,900	31463
CAA	Q	0,260	11,930	18863
CAG	Q	0,740	33,220	52535
CGT	R	0,090	4,770	7535
CGA	R	0,110	6,040	9547
CGC	R	0,200	10,750	17002
AGG	R	0,200	10,780	17049
AGA	R	0,200	10,820	17104
CGG	R	0,200	10,830	17126
TCG	S	0,060	4,390	6942
TCA	S	0,140	11,070	17497
AGT	S	0,150	11,180	17681
TCT	S	0,180	14,120	22320
TCC	S	0,230	17,320	27389
AGC	S	0,250	18,890	29874
ACG	T	0,120	6,550	10364
ACT	T	0,240	13,250	20954
ACA	T	0,270	15,220	24071
ACC	T	0,370	20,980	33176
GTA	V	0,110	6,920	10939
GTT	V	0,170	10,880	17196
GTC	V	0,250	15,440	24415
GTG	V	0,470	29,080	45989
TGG	W	1,000	12,430	19658
TAT	Y	0,430	12,320	19479
TAC	Y	0,570	16,510	26110

1.3 Cultivo celular.

5 Las células CHO DG44 adaptadas a suspensión se pasaron rutinariamente en medios con componentes derivados de animales a los que se habían adaptados previamente. Este medio consistía en una formulación basal que contenía aminoácidos, oligoelementos, vitaminas, glucosa, e hidrolizado de levadura. Este medio también se suplementó con insulina recombinante, lípidos y nucleósidos. Como también se añadió bicarbonato sódico a los medios. En la técnica se conocen muchas recetas de medios sin componentes derivados de animales. La selección inicial de células transformadas con vector se sometió a retirada de nucleósidos (selección con DHFR) y adición de G418 (para selección con neomicina fosfotransferasa). Para la clasificación del título, los títulos de ensayo de 96 pocillos eran

propensos a la variación inducida por el crecimiento celular, los números de siembra, los volúmenes de dispensación de medios de comunicación y la cinética de evaporación a través de una placa. Como consecuencia, los títulos que se generan en los modelos de producción en matraces de agitación fueron más indicativos del orden de clasificación de la línea celular en líneas celulares de alto rendimiento, amplificadas. Para este tipo de modelos, todas las células se sembraron a la misma densidad inicial. En tales modelos, también se monitorizaron la viabilidad y el crecimiento.

1.4 Preparación de ADN antes de la transfección

Cantidades iguales (15 µg) del vector de expresión de la cadena pesada y la expresión de la cadena ligera se linealizaron hasta su finalización (con Not I) en una reacción de Eppendorf con volumen 200 µl y después se precipitó en etanol / acetato de sodio. El sedimento se lavó después en etanol al 70%, se secó al aire y se resuspendió en 50 µl de agua de calidad para biología molecular.

1.5 Preparación de células CHO DG44 antes de la transfección

1,2 x 10⁷ células (por transfección) de las células en crecimiento sanas se centrifugaron (1.000 rpm durante 2-10 minutos) en un tubo de 15 o 50 ml, se lavaron en 15 ml de PBS enfriado con hielo / sacarosa, se centrifugaron de nuevo y después se resuspendieron en 800 µl de PBS enfriado con hielo / sacarosa. A continuación, esta suspensión celular se añadió al ADN preparado anteriormente y se dejó en hielo durante 15 minutos antes de ser transferido a una cubeta de electroporación enfriada.

1.6 Electroporación

La cubeta que contenía el ADN preparado y las células se sometió a electroporación en un Gene Pulser fijado a 25µF y 0,38 kV y luego de devolvió al hielo durante 10 minutos. Después se extrajeron las células y se añadieron a 240-mls de medio no selectivo y a continuación se introdujeron en placas en medio no selectivo en 40 x placas de 96 pocillos a 2-5x10³ células por pocillo (es decir, 50 µl por pocillo). Las placas se envolvieron después n papel de aluminio y se incubaron a 37 ° C y 5% de CO₂ durante 48 horas.

1.7 Selección, amplificación e identificación del clon

48 horas después de la electroporación, se añadieron 150 µl de medios selectivos a cada pocillo. Este medio selectivo contiene G418 y ningún nucleósido. Una vez a la semana a partir de entonces, 140 µl de medio se intercambiaron cuidadosamente por medio selectivo fresco sin alterar la capa de células sedimentadas y después de 3-4 semanas, todos los clones en crecimiento (normalmente un crecimiento del 0,1 colonias por pocillo, es decir, el crecimiento en 10 pocillos por placa de 96 pocillos) se titularon para la producción de anticuerpos. Los clones de clasificación superior (normalmente 20-100) identificados se escalaron en el mismo medio selectivo a través de placas de 24 pocillos y a placas de 6 pocillos. Estos clones se sembraron después a 1.000 células / por pocillo en una placa de 96 pocillos (96 pocillos por clon) y a continuación se seleccionan en medios selectivos que también contenían metotrexato 5 nM en un volumen de 200 µl por pocillo. Después de dos a tres semanas de incubación adicional, los mejores clones se escalaron de nuevo y se volvieron a sembrar a 1.000 células por pocillo, pero en MTX 50 nM. Estos clones también se sometieron a detección selectiva en placas de 96 pocillos después de 2-3 semanas de crecimiento y el mejor ampliado y después se sembraron en placas a 1.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos pero con MTX 150 nM. Con el fin de evaluar los clones finales para el potencial de producción, los mejores clones en MTX 150 nM se ampliaron y evaluaron en modelos de producción en matraz de agitación para titulación y calidad del producto generado. El mejor clon para el proyecto 5 (a) era un clon marcado 17-9-6-1. Esto generó 0,3 g por litro de título final en los modelos de producción sin alimentar.

NB. Los niveles de metotrexato y el número de rondas de amplificación necesarios en la etapa 1.7 variaba en función del proyecto y de si las secuencias estaban adaptadas por codones.

1.8 Análisis de titulación.

Para las muestras de los medios obtenidas de placas de 96 pocillos, se determinó el título de anticuerpos mediante metodología de estilo ELISA de tipo sándwich automatizado en placa de 96 pocillos en un analizador IGEN M-Series M8/384 (BioVeris, Maryland, EE.UU.) con las recomendaciones del fabricante y las metodologías estándar. El sándwich consistió en fragmentos F(ab)₂ marcados con perlas recubiertas magnéticas revestidas con estreptavidina, proteína A biotinilada y rutenio. A continuación, la señal generada por la muestra de ensayo se comparó con una dilución en serie del patrón de referencia del anticuerpo. Mientras que un ensayo altamente sensible, debido a variaciones en el ensayo combinado con variables de crecimiento de células en cultivos de 96 pocillos, la precisión intermedia y la reproducibilidad del ensayo son relativamente bajos para este ensayo de líneas celulares de alto rendimiento, amplificadas. Para las muestras de los medios obtenidas durante la producción en matraz de agitación y biorreactor, el título de anticuerpos se midió con la ayuda de un método nefelométrico en el que una señal de luz se dispersa por la inmuno-precipitina insoluble en la solución de reacción utilizando un sistema de imagen de Beckman Coulter (Buckinghamshire, Inglaterra) y de las recomendaciones y metodologías estándar del fabricante. A continuación, la señal generada por la muestra de ensayo se comparó de nuevo con una dilución en serie del patrón de referencia del anticuerpo. Todos los títulos indicados son aproximados.

1.9 Modelos en matraz de agitación con biorreactor (modelos de producción por lotes sin alimentar extendidos).

Típicamente, las células se sembraron en cultivo tisular de 250 ml estándar en matraces de agitación a 800.000 células por ml con tapas ventiladas que contienen medios sin componentes derivados de animales y hasta un volumen total de 120 ml. Estos matraces se incubaron después con agitación en aire enriquecido con dióxido de carbono y se establecieron temperaturas para alentar y sostener el crecimiento celular. Varias condiciones se analizaron para cada clon, por ejemplo en varias condiciones de temperatura. En los resultados presentados en el presente documento se ejemplifica el título más alto para cada clon (mediante condiciones estándar) analizado. Normalmente los títulos del punto final del modelo de producción como se indican en el presente documento se registraron en el punto en el que la viabilidad celular se reduce a aproximadamente el 50% según se determinó mediante el ensayo de exclusión con de azul tripán de en un Vi-Cell (Beckman) usando los ajustes de parámetros estándar Vi-celulares CHO y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Normalmente esta variable título se genera después de 10-20 días de incubación.

1.10 Metodología del cultivo en biorreactor.

En todo momento se usaron metodologías de cultivo del biorreactor estándar y equipos. Típicamente, para generar un tren de semillas, las células se ampliaron en volúmenes más grandes y se pasaron dos veces a la semana en un régimen de 3 días repetido, después de 4 días. Para el trabajo que se muestra en la Figura 13, las células de semillas se utilizaron después para inocular en biorreactores de mesa de 3 litros Applikon (volumen de trabajo de 2 litros) se sometieron a las siguientes condiciones de proceso: Temperatura de 34 ° C, el punto de pH es 6,95, punto fijado de DO 30%. Al igual que con los modelos de frasco en agitación, los cultivos se extendieron hasta que la viabilidad celular se redujo a aproximadamente el 50%. Estos biorreactores imitan ampliamente el título del punto final del matraz en agitación, así como biorreactores de mayor tamaño que se utilizan para suministrar material de ensayo clínico, etc.

1.11 Análisis 1RT-QPCR (para los resultados, véase la Figura 10).

Las extracciones de ARN de CHO y las reacciones de RT-cPCR se llevaron a cabo mediante extracción de sílice automatizada utilizando el kit de aislamiento de ARN de alto rendimiento y ARN y MagNA Pure (Roche) y los protocolos. Después de la transcripción inversa usando hexámeros aleatorios, la reacción de PCR se llevó a cabo usando un ABI-7700 (Applied Biosystems) y se analizaron mediante el algoritmo de cuantificación relativa $\Delta\Delta CT$ utilizando metodología estándar. Las reacciones se multiplexaron (18S + gen diana [cadena pesada / cadena ligera]), siendo 18S la diana más abundante como cebador limitado para evitar la inhibición de las reacciones de destino. Las sondas y los pares de cebadores flanqueantes empleadas para Q-PCR se utilizaron de acuerdo con las SEQ ID. N° 1-9.

Obsérvese que las sondas/cebadores de la cadena pesada y la cadena ligera anteriores no eran adecuadas para su uso con el proyecto 5 (d) debido al aumento de la adaptación de codones del ORF llevado a cabo en este proyecto, por tanto, su exclusión de la Figura 10 (A).

1.12 Análisis de transferencia de tipo Western (para los resultados, véase la Figura 10).

Se usó metodología estándar y se describe en detalle en otra parte (por ejemplo, véase Sambrook et al ibid). En resumen, los extractos de células equivalentes policlonales se realizaron usando el tampón de extracción de proteínas y lisis celular. Cantidades iguales de cada extracto se incubaron después con calor. Se usó tampón de carga de Laemmli y después se cargó y se pasó por geles de SDS-PAGE con tampón de carrera de Tris-glicina para separar las fracciones de proteína. Una vez separadas, las proteínas se sometieron después a electrotransferencia sobre membranas de nitrocelulosa y después se sondaron con una IgG anti-humana entera (HRP conjugado). Se generó una señal mediante incubación con un sustrato de HRP y se registró con una película de rayos X. Una exposición adicional se requirió para detectar el producto de la cadena ligera de anticuerpos para el proyecto 5 (a).

1.13 Tinción con metotrexato fluorescente para determinar los niveles de DHFR en los clones que producen la proteína recombinante deseada

Cada clon se cultivó sin metotrexato durante 4-5 días antes de la adición de Alexa-Fluor 488 10 μ M - Metotrexato (Molecular Probes / Invitrogen, Paisley) durante 18 – 22 horas a 37 ° C con 5% de CO₂ a 700.000 de células vivas. Las células teñidas se recogieron a continuación y se lavaron con medios y se incubaron a 37 ° C, 5% de CO₂ durante 30 minutos. Las células cosechadas se lavaron de nuevo con los medios de comunicación y a continuación se volvieron a suspender en los medios, se filtraron y se añadió el colorante de exclusión de vivas/muertas yoduro de propidio (Sigma, St Louis) antes de analizar en BD FACS ARIA. Los datos mostrados en la Figura 14 (A) son sólo del conjunto de células vivas.

1.14 Análisis qPCR del ADN genómico para determinar los niveles de DHFR y Neo.

La extracción de ADN genómico de CHO se realizó usando kits estándar de Qiagen. Después de la cuantificación y normalización del ADN usando una lectura en espectrofotómetro, la reacción de PCR se llevó a cabo usando un ABI-7700 (Applied Biosystems) y se analizaron mediante el algoritmo de cuantificación relativa $\Delta\Delta CT$ utilizando metodología estándar. Las sondas y los pares de cebadores flanqueantes empleadas para Q-PCR se utilizaron de

acuerdo con las SEQ ID. N° 20 – 25 se muestran en la Figura 14 (B).

Ejemplo 2. Expresión de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo monoclonal en células CHO

Sorprendentemente, mientras que la alta puntuación CAI de los ORF, pero aún así puntuación natural (es decir, puntuación inferior a la de los ORF humanos naturales más alta observada, tal como la cubierta cornificada tardía aLCE1A; NM 1783480) de proyecto 5 (c) generó un título más alto que la puntuación CAI artificialmente alta de los marcos de lectura abiertos del proyecto 5 (d), mejoró la amplitud (número) de los altos productores en 5 (d) (véase la Tabla 5). Los mejores clones de 5 (a), (c) y (d) se amplificaron después y se evaluaron adicionalmente. Para esta nueva evaluación, los clones 5 (a) progresaron como el control y para representar los títulos del proyecto típico observado antes de los resultados descritos en el presente documento. Los resultados de este trabajo generaron una alta producción, clon estable (título y el crecimiento observado durante 40 pases) del proyecto 5 (d) en un tiempo inesperadamente rápido y con niveles reducidos de amplificación. De hecho, los niveles de metotrexato requeridos para generar la línea celular final de 5 (d) fueron significativamente menores (97% menos de metotrexato) con respecto a los requeridos para generar líneas celulares equivalentes que expresan niveles equivalentes similares o inferiores de la misma proteína producto de los marcos de lectura abiertos no adaptados por codones del proyecto 5 (a) (véase la Tabla 1). Un análisis más detallado se llevó a cabo - Véanse las Tablas 2-4.

Para investigar si las propiedades de unión de las proteínas recombinantes resultantes generadas por ORF puntuados con CAI modificado se vieron afectados por la adaptación de codones, las características de unión se compararon y analizaron para el anticuerpo de proyecto 5 codificado por cualquier ORF de la puntuación CAI 0,809 (HC) / 0,761 (LC) o ORF de la puntuación CAI 0,982 (HC) / 0,976 (LC). Ambos materiales se generaron en biorreactores y después se purificaron mediante regímenes de purificación equivalentes. Mediante esta comparación se demostró que las características de unión del anticuerpo no se vieron afectados por las alteraciones del CAI a los ORF que codifican este anticuerpo.

Del proyecto 5 (d), el clon más productor 097-7, como se muestra en la Tabla 1, se clonó en una sola célula para asegurar la clonalidad de la línea celular, con el título resultante del mejor subclon que genera un incremento cercano a por 2 veces en cultivos discontinuos extendidos sin alimentar respecto al parental no clonado. Los títulos mostrados en la Figura 13 se generan a partir de cultivos por lotes sin alimentar en dos biorreactores de mesa de 3-litros Applikon como se describe en 1.10.

Tabla 1.

Para cada proyecto, se presenta el clon final elegida para el posterior desarrollo e introducción en el banco. También se destacan los títulos de 96 pocillos (ng / ml) generados para cada clon final en cada etapa de este desarrollo de líneas celulares. Los datos típicos generados con anterioridad a los resultados como se describe en el presente documento se representan como proyectos de anticuerpos 1, 2, 3 y 4. Obsérvese que el proyecto 2 y el proyecto 4 expresan el mismo producto. Para los proyectos 2 y 4 todas las actividades se llevaron a cabo en dos laboratorios independientes que usan los mismos vectores, células huésped y protocolos, pero operadores de laboratorio y equipos diferentes. Todos los títulos mostrados a continuación a MTX 0, 5, 50 y 150 nM son los generados en la etapa de 96 pocillos. Titulaciones más altas no mostraron una mejor significativa en los modelos de producción por lotes y, por tanto, progresó el clon de MTX menor (véase la Tabla 2). FIO = solo a título indicativo, no necesario. El proyecto 6 (a) se interrumpió antes de llegar a la meseta debido a que se alcanzaron mejores títulos de los proyectos 6 (b) -6 (d).

Tabla 1

Anticuerpo	1	2	3	4	5 (a)	5 (d)	6 (a)	6 (b)	6 (c)	Md)	7 (a)	7 (b)	8	9
Mejor clon final	ACC522(L4)	15-27-4	C9-13-9	129-1-3-1 (DRC349)	17-9-6-1	097-7	141-6-4 (mejor título A2 de 96 pocillos)	2S0-9-6	58-3-3	P100-1	C65-5	74-3	454-6	390-8
MTX 0nM	120	110	20	41	12	540	16	78	76	2350	64	2054	1280	2055
MTX 5nM	520	180	150	920	32	880	72	1140	1160	2025	5700	2125	1690	14055
MTX 50nM	1720	1240	490	5231	310	6700 (FIO)	438	4170	5775	No necesario	No necesario	No necesario	No necesario	No necesario
MTX 150nM	No necesario	No necesario	1910	23000	1670	No necesario	No realizado- requerido	No necesario	No necesario	No necesario	No necesario	No necesario	No necesario	No necesario
¿Optimizado por codones?	No	No	No	No	Sí	Sí	No	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Promotor	CMV	RSV	RSV	RSV	RSV	RSV	RSV	RSV	EF 1a	EF-1a	RSV	EF-1a	EF-1a	EF-1A
CAI (Cadena pesada)	0,679	0,811	0,814	0,811	0,809	0,982	0,818	0,976	0,818	0,976	0,977	0,977	0,954	0,975
CAI (Cadena ligera)	0,674	0,767	0,763	0,767	0,761	0,976	0,755	0,978	0,755	0,978	0,973	0,973	0,919	0,973
Anticuerpo	1	2	3	4	5 (a)	5 (d)	6 (a)	6 (b)	6 (c)	6 (d)	7 (a)	7 (b)	8	9
Semanas para generar la última línea en 96 pocillos	-15	12	19.5	18	19	7	> 15	14	~ 15	10	8.5	8.5	7.5	8
Modelo de biorreactor de producción sin alimentar (% MTX)	0,3 g (100%)	0,3 g (100%)	0,52 (300 %)	0,9 g (300 %)	0,2 g (300 %)	0,7 (10 %)	No determinado- estimado a <0,1 s (100%)	0,5 g (100 %)	0,9 g (100%)	0,9 g (10%)	0,4 g (10%)	0,5 g (10%)	0,6 g (10%)	2,2 g (10 %)

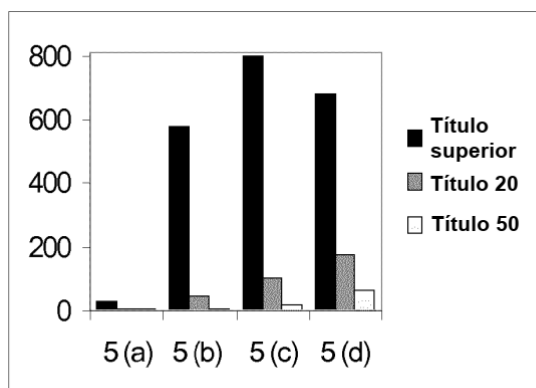
Tabla 5

5 Comparación de títulos de los clones no amplificados generados mediante protocolo de transfección y selección estándar y después seleccionados con retirada de nucleósidos y adición de G418. Todas las líneas celulares contienen los mismos vectores que expresan el mismo anticuerpo (del proyecto 5), pero de los marcos de lectura abiertos que codifican con diferentes puntuaciones del CAI. Para el proyecto 5 (a) (no optimizado) se realizaron tres transfecciones adicionales, pero no se muestran ya que los resultados eran esencialmente los iniciales. En la Figura (A), “% título > 5 ng” hace referencia al % de los pocillos tras el registro de detección selectiva por encima de 5 ng/ml. El “% título > 50 ng” hace referencia al % de los pocillos tras el registro de detección selectiva por encima de 50 ng/ml. “Título superior” se refiere a la puntuación más alta de todos los sometidos a selección. “Valor 50^a” se refiere al 50^a mejor título sometido a selección. “Valor 20^a” se refiere al 20^a mejor título sometido a selección. En (B), los resultados promedio para los títulos superiores, 20^a y 50^a indicados en (A) se representan en formato de histograma.

(A)

Transfección	PUNTUACIÓN HCCAI	PUNTUACIÓN LHCCAI	% con título > 5 ng/ml	% con título > 50 ng/ml	Título superior	Valor 50 ^a	Valor 20 ^a
1	0,809	0,761	23	0	43	6	8
2	0,809	0,761	26	0	16	5	6
3	0,809	0,761	26	0	23	6	7
4	0,847	0,833	43	7	376	2	17
5	0,847	0,833	62	24	778	9	76
6	0,872	0,894	47	20	674	23	105
7	0,872	0,894	63	30	923	12	103
8	0,982	0,976	57	25	706	46	178
9	0,982	0,976	82	61	653	80	171

(B)



15

Tabla 3

Análisis detallado del título en placas de 96 pocillos de los proyectos que se muestran en la Tabla 1. Título del menor clon y del clon 50 se muestra después de la selección con adición de G418 y retirada nucleósido pero sin adición de metotrexato.				
Proyecto	¿Adaptación de codones?	Promotor usado para dirigir la expresión de los ORF de anticuerpos	Título superior (ng/ml)	Título 50 (ng/ml)
2	No	RSV	130	2 (22nd)
3	No	RSV	71	12
4	No	RSV	152	22
5 (a)	No	RSV	43	6
5 (d)	Sí	RSV	653	80

(continuación)

Análisis detallado del título en placas de 96 pocillos de los proyectos que se muestran en la Tabla 1. Título del menor clon y del clon 50 se muestra después de la selección con adición de G418 y retirada nucleósido pero sin adición de metotrexato.				
Proyecto	¿Adaptación de codones?	Promotor usado para dirigir la expresión de los ORF de anticuerpos	Título superior (ng/ml)	Título 50 (ng/ml)
6 (a)	No	RSV	116	14
6 (b)	Sí	RSV	840	89
6 (c)	No	EF-1a	1153	87
6 (d)	Sí	EF-1a	2499	1426
7 (a)	Sí	RSV	830	50
7 (b)	Sí	EF-1a	3467	528
8	Sí	EF-1a	4090	739
9	Sí	EF-1a	3108	573

Tabla 4

Los mejores 20-100 clones como se observa en los proyectos 5 y 6 se escalaron a las placas de 6 pocillos antes de volver a sembrarse en placas de 96 pocillos en medios que contienen metotrexato 5nM. La media y los títulos altos de los clones en crecimiento observados en los experimentos 5 y 6 a las concentraciones 5nM (A1) y 50nM (A2) del metotrexato antifolato en placas de 96 pocillos se muestran a continuación.				
	A1 MTX 5nm		A2 MTX 50nm	
Proyecto	Título medio	Título máximo	Título medio	Max Titre
5 (a)	42	253	137	452
5 (d)	626	1760	1130	9500
6 (a)	134	316	129	809
6 (b)	761	6340	2525	15030
6 (c)	593	2592	949	3884
6 (d)	1012	5075	3017	12360

5 Tabla 2

Ejemplos de mesetas de producción; Ejemplo (A), el clon elegido final para el proyecto 5 (d) se amplificó adicionalmente en MTX 50nM. Se muestran los títulos de los modelos de producción sin alimentar (sombreado) y el título más alto resultante de los clones hija “amplificados”. También se muestran ejemplos similares (8, C, O, E, F, G). Para cada ejemplo se registra el título más alto del clon hija y su amplificación posterior. Esto demuestra que alcanzar títulos más altos es más beneficioso que intentar alcanzar títulos más altos mediante rondas de amplificación.

10

Ejemplo	Línea celular	Niveles de MTX	Títulos en 96 pocillos (ng/ml)	Títulos finales del modelo de producción (mg/l)	% cambios en los títulos finales del modelo de producción tras la amplificación adicional
Ejemplo A: Clon elegido del proyecto 5 (d)	097-7	5 nM	880	690	
	097-7-1	50 nM	6700	550	-20 %
	097-7-3	50 nM	3300	216	-69 %
	097-7-5	50 nM	3100	615	-11 %
	097-7-6	50 nM	1900	566	-18 %

(continuación)

Ejemplo	Línea celular	Niveles de MTX	Títulos en 96 pocillos (ng/ml)	Títulos finales del modelo de producción (mg/l)	% cambios en los títulos finales del modelo de producción tras la amplificación adicional
Ejemplo B: Clon elegido del proyecto 6 (d)	P100-1	5 nM	2025	901	
	P100-1-8	50 nM	4570	499	-45 %
Ejemplo C: Clon no elegido del proyecto 6 (d)	P100-6	5 nM	1435	468	
	P100-6-8	50 nM	5650	125	-73 %
Ejemplo D: Clon no elegido del proyecto 6 (d)	P634-2	5 nM	3205	692	
	P634-2-4	50 nM	3685	369	-47 %
Ejemplo E: Clon no elegido del proyecto 6 (d)	P502-1	5 nM	2385	357	
	P502-1-4	50 nM	5325	157	-56 %
Ejemplo F: Clon elegido del proyecto 7 (a)	O65-5	5 nM	5700	400	
	O65-5-7	50 nM	4515	168	-58 %
Ejemplo G: Clon elegido del proyecto 7 (b)	74-3	5 nM	2125	488	
	74-3-3	50 nM	820	239	-51 %

Ejemplo 3. Anticuerpos 6 y 7 y el promotor de EF-1a

La adaptación de codones de los marcos de lectura abiertos de las cadenas pesada y ligera para el anticuerpo 6 se llevó a cabo, de nuevo para generar puntuaciones finales CAI a través de los ORF > 0,9. (véase la Tabla 1.). Los marcos de lectura abiertos adaptados por codones y de partida/silvestre se expresaron en vectores de expresión del promotor basado en RSV así como un vector de expresión en base al promotor del factor de elongación humano 1 (EF-1a) en la que el aislante de acción en cis, el potenciado y los elementos de expresión del promotor se suministran en su lugar de una fuente de promotor no viral. Los resultados de este trabajo de nuevo demostraron que era necesario significativamente menos metotrexato para generar una línea celular final de alta producción cuando el marco de lectura abierto de la proteína deseada se adaptó por codones primero. De hecho, la transfección 6 (a) en la que el anticuerpo 6 estaba codificada por ORF no adaptados (es decir, con una puntuación CAI < 0,9) se abandonó en la etapa de MTX 5 nM antes de la generación de las células que se acercan a una meseta de producción. El régimen de la amplificación no se persiguió adicionalmente en la transfección 6 (a), ya que era evidente que se habrán necesitado significativamente más recursos y tiempo para generar líneas celulares capaces de producir rendimientos equivalentes de proteínas en relación a los rendimientos ya obtenidos de las líneas celulares en las que se habían empleado ORF > 0,9 (es decir, las transfecciones 6 (b) y 6 (d)). Por otra parte, al comparar de igual a igual vectores más o menos adaptación por codones, se observó que la adaptación por codones siempre reducía los niveles antifolato requeridos. Una vez más, para el proyecto 7, la adaptación por codones se llevó a cabo de una manera similar al proyecto 6 (véase la Tabla 1) y los ORF adaptados por codones (CA > 0,9) se expresaron en un RSV así como en un vector de expresión basado en el promotor de EF-1a. Una vez más, y con independencia del promotor, se generaron líneas celulares de alto rendimiento equivalentes en un tiempo más rápido y con menos metotrexato de los ORF adaptados por CAI en comparación con todos los proyectos anteriores en los que se emplearon los ORF no adaptados para codificar los productos recombinantes (que se resumen en la Tabla 1).

Ejemplo 4. Niveles de mRNA

Para investigar más a fondo esta metodología, el impacto de la adaptación por codones a los niveles de ARNm generados se investigaron en las poblaciones de células policlonales de igual a igual que expresan el mismo producto (el anticuerpo de proyecto 5) a partir de los mismos vectores pero a partir de marcos de lectura abiertos que indican diferentes puntuaciones de CAI.

Las células CHO se cotransfectaron con vectores de expresión que codifican la cadena pesada (HC) y la cadena que codifican el mismo producto de proteína (anticuerpo del proyecto 5). Cada población transfectada se mantuvo como conjuntos policlonales. Cada par de vectores codifica la misma cadena pesada (HC) y cadena ligera (LC) del

anticuerpo pero a partir de marcos de lectura abiertos con diferentes puntuaciones de CAI.

Los resultados de este experimento se capturan en la figura 10 y revelan que se observa un aumento significativo de los niveles de ARNm cuando la puntuación de CAI se eleva para el mensaje de la cadena pesada y ligera respecto a los controles no adaptados. Un aumento equivalente en los niveles de ARN (respecto a la secuencia no adaptada) se produjo en todas las secuencias adaptadas analizadas. Del mismo modo, y dentro de los límites del ensayo de transferencia de tipo Western, se observó un aumento equivalente en los niveles de proteínas intracelulares para todas las secuencias adaptadas. Sin embargo, mientras que dicha equivalencia se observó en los niveles de proteínas intracelulares, no había diferencia en los niveles secretados. Se observó que las células que contienen los marcos de lectura abiertos de puntuación CAI anormalmente alta generaron títulos policlonales más altos. Esto apoya adicionalmente la conclusión de que la amplitud de los clones de producción alta se mejora cuando se usan marcos de lectura abiertos de puntuación CAI anormalmente alta en los protocolos de desarrollo de líneas celulares.

Figura 10

(A): Niveles de ARN intracelulares del mensaje de HC y LC medido mediante RT Q-PCR: Todas las señales normalizadas con respecto al ARN ribosómico y aumentadas son en relación a las señales generadas para el inicio de los vectores de HC y LC codificados por los marcos de lectura abiertos no adaptados por codones. Eje Y: Los valores aumentan de 0 a 50 veces en la señal de ARN. Eje X: a (h) representa la señal HC del control negativo generada a partir de extractos de ARN extraídos de las células no transfectadas (por duplicado); b (h) representa la señal HC generada a partir de extractos de ARN derivados de las células transfectadas con vectores de expresión de HC y LC no adaptados por codones, tal como se utiliza para el proyecto 5 (a) (las puntuaciones CAI de 0,809 para HC y 0,761 para LC); c (h) representa la señal HC generada a partir de extractos de ARN derivados de las células transfectadas con vectores de expresión de HC y CL adaptados por codones, tal como se utiliza para el proyecto 5 (b) (puntuaciones de CAI de 0,847 para HC y 0,833 para LC); d (h) representa la señal HC generada a partir de extractos de ARN derivados de las células transfectadas con otros vectores de expresión de HC y CL adaptados por codones, como se usa para el proyecto 5 (c) (puntuaciones CAI de 0,872 para la HC y 0,894 para el LC). Las señales de la cadena ligera generadas a partir de los mismos extractos de ARN como se describe anteriormente se muestran como a(l), b(l), c(l) y d(l) respectivamente.

(B): Análisis de transferencia de tipo Western; los extractos de células equivalentes se separaron mediante SDS-PAGE, se transfirieron e interrogaron con anticuerpos anti-producto (conjugados con HRP). El control de las células no transfectadas se muestra en el carril 1. Las células policlonales que expresan los marcos de lectura abiertos de la cadena pesada y ligera del siguiente modo; Carril 2 y 3; HC con una puntuación CAI 0,809 y LC con una puntuación de CAI 0,761 (proteína expresada a partir experimento b (h) y b (i) anterior, los vectores equivalentes a los usados en el proyecto 5 (a).; Carril 4 y 5; HC con una puntuación de CAI de 0,847 y LC con una puntuación de CAI de 0,833 (proteína expresada a partir del experimento c (h) y c (i) anterior, los vectores equivalentes a los utilizados en el proyecto 5 (b); los carriles 6 y 7; HC con una puntuación de CAI de 0,872 CAI y LC con una puntuación de CAI 0,894 (proteína expresada a partir del experimento d (h) y d (l) anterior, los vectores equivalentes a los utilizados en el proyecto 5 (c); carriles 8 y 9; HC con una puntuación de CAI de 0,982 y LC con una puntuación de CAI de 0,976 (proteína expresada por los vectores equivalentes a los utilizados en el proyecto 5 (d).

(C) Títulos del producto a 24 horas indicados en ng/ml para las células policlonales descritas en la Figura 10 (B).

Ejemplo 5. Diferentes procedimientos para alcanzar un CAI elevado. Ejemplo (a) Proyecto 8 y ejemplo (b) Proyecto 9.

a) Para el proyecto 8 se utilizó el software Leto para diseñar los dominios variables. Estos se condensaron después a los dominios constantes idénticos previamente generados para el proyecto 7 con ayuda de digestión con enzimas de restricción estándar y metodología de ligación. Los ORF de la cadena pesada y la cadena ligera resultantes tuvieron una puntuación de 0,954 y 0,919 respectivamente. Estos datos se usaron después en un proyecto de desarrollo de línea celular y una vez más se generaron líneas celulares de alto rendimiento en un marco de tiempo más rápido y con menos metotrexato que lo empleado anteriormente antes de la adaptación de codones (véase la Tabla 1)

a) Para el proyecto 9 se utilizó de nuevo el software Leto para diseñar los dominios variables. Estos se condensaron después a los dominios constantes idénticos previamente generados para el proyecto 6 (d) con ayuda de digestión con enzimas de restricción estándar y metodología de ligación. Los ORF de la cadena pesada y la cadena ligera resultantes tuvieron una puntuación de 0,975 y 0,973 respectivamente. Estos datos se usaron después en un proyecto de desarrollo de línea celular y una vez más se generaron líneas celulares de alto rendimiento en un marco de tiempo más rápido y con menos metotrexato que lo empleado anteriormente antes de la adaptación de codones (véase la Tabla 1)

Ejemplo 6 Impacto sobre la glicosilación

Se observó que los niveles de la cadena pesada no glicosilada (NGHC) fueron significativamente más bajos cuando se expresaron a partir de marcos de lectura abiertos adaptados por codones respecto a los niveles generados cuando se expresaron a partir de marcos de lectura abiertos no adaptados a pesar de que se usó el mismo huésped, medios de cultivo y sistema de selección con DHFR y amplificación para la expresión en ambas situaciones. Aún más interesante, también se observaron niveles altos similares de NGHC cuando los mismos marcos de lectura abiertos

no adaptados se expresaron lugar en diferentes células huésped que se emplean en diferentes condiciones de cultivo y vectores de diferentes y distintivos regímenes de selección y amplificación (glutamina sintetasa / MSX) (véase la Figura 12). Esta correlación entre la adaptación de codones del marco de lectura abierto y los niveles reducidos de la cadena pesada no glicosilada revela que a través del aumento de la puntuación CAI de un marco de lectura abierto también se puede mejorar la calidad general del producto.

6.1 Desarrollo de la línea celular con el sistema de selección Lonza CHOK1 SV y glutamina sintetasa (Figura 12).

La construcción del vector y el desarrollo de líneas celulares se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos recomendados de Lonza (Slough). Los medios empleados en todo momento fueron CD-CHO (Invitrogen). Los marcos de lectura abiertos usados en el proyecto de anticuerpos 5 (a) que contienen marcos de lectura abiertos no adaptados se subclonaron primero en los vectores pEE14.4 de Lonza (para la cadena ligera) y pEE6.4 (para la cadena pesada). Estos vectores se combinaron a continuación, de acuerdo con el protocolo recomendado de Lonza en un único vector de doble gen que expresa las cadenas pesadas y ligeras. Este vector se liberó después en la cepa CHOK1 de suspensión adaptada de Lonza denominada células huésped CHOK1SV utilizando electroporación según las instrucciones recomendadas por Lonza y se seleccionaron y amplificaron con la retirada de glutamina y con la adición de MSX también como se recomienda. Los clones resultantes se titularon en 96 pocillos y los mejores se pasaron a matraces de agitación y se evaluaron adicionalmente. El mejor clon se seleccionó para hacer el producto en biorreactores a gran escala. Para más detalles generales sobre este enfoque, véase La Cruz Edmonds et al 2006 *Biotecnología Molecular* 34:179-190).

6.2 Análisis del producto NGHC

La proteína se purificó a partir del sobrenadante del cultivo con la ayuda de las columnas de proteína A. El producto se analizó posteriormente con electroforesis capilar SDS Bioanalyzer, equipo de laboratorio en un chip (Agilent Technologies, Cheshire UK) en condiciones reductoras y de acuerdo con el protocolo del fabricante. La cadena pesada no glicosilada se observa como una especie de migración ligeramente más rápida con respecto a la especie de cadena pesada principal glicosilada (véase la Figura 12B).

Figura 12 - Tabla (A) que muestra los datos representativos de todos los análisis. También se incluye el trabajo adicional realizado para expresar los marcos de lectura abierta no adaptados en un protocolo de selección y amplificación diferente (glutamina sintetasa / metotrexato) empleando una célula huésped, vector, medios y regímenes de cultivo diferentes (véase el ejemplo 6.1 anterior). (B) Trazas del Ejemplo NGHC observados a partir de los ORF no adaptados de partida frente a los ORF de codones adaptados. Este análisis se llevó a cabo en el producto purificado a partir de biorreactores (1.000 litros) de tamaño equivalente. En estas superposiciones de trazas representativas, la cosecha de los cultivos de células biorreactores que expresan el producto de los ORF no adaptados (CAI: HC 0,809, LC 0,761) generaron la cadena pesada con la ocupación del sitio reducida (10% de la cadena pesada no glicosilada) en relación con el producto producido a partir de ORF adaptados (CAI: HC 0,982, LC 0,976) que contenía sólo el 1,5% de la cadena pesada no glicosilada.

Ejemplo 7. Impacto sobre los niveles de agentes de selección y amplificación en las líneas celulares finales+

La adición o ajuste gradual de cantidades crecientes del agente de selección y amplificación MTX en los respectivos sistemas de selección con DHFR se realiza con el fin de aumentar la expresión mediante el aumento de número de copias del gen. Para investigar el impacto de la adaptación de codones sobre el número de copias del ADN plasmídico transfectado, se emplearon dos metodologías semicuantitativas diferentes (véanse las secciones 1.13 y 1.14 para la descripción de los experimentos).

En primer lugar se utilizó el análisis FACS. Para este fin, las líneas celulares finales o clones de células individuales de los mismos para los proyectos de 2, 3, 4, 5 (d), 6 (d) y 7 (b) se tiñeron con metotrexato fluorescente y se analizaron por FACS. Los resultados (mostrados en la Figura 14A) demuestran que los niveles de metotrexato, como se indica por la intensidad de fluorescencia media, y, por lo tanto, los niveles de DHFR, se correlacionan con el nivel de amplificación de la línea celular, es decir, las líneas celulares finales seleccionadas en MTX 5 nM (proyectos 5 (d), 6 (d) y 7 (b)) tienen las líneas celulares más bajas y finales seleccionadas en MTX 150 nM (proyecto 3) tienen los niveles más altos de DHFR. Además, la qPCR para la DHFR y Neo se llevó a cabo sobre el ADN genómico extraído de las líneas celulares finales o de clones de células individuales de los mismos para los proyectos de 3, 4, 5 (a), 5 (d), 7 (b) y 9. Los resultados (mostrados en la Figura 14B) demostrar que las líneas seleccionadas en MTX 5 nM (proyectos 5 (d), 7 (b) y 9) tienen niveles significativamente más bajos de ADN de la DHFR y Neo y, por lo tanto, el número de copias inferior, que las líneas seleccionadas en MTX 150 nM (proyectos 3, 4 y 5 (a)).

Los resultados discutidos anteriormente demuestran que las líneas celulares derivadas de los ORF adaptados por codones (proyectos 5 (d), 6 (d), 7 (b) y 9 para este ejemplo) tienen un menor número de copias del gen en comparación con líneas derivadas de los ORF no adaptados (proyectos 2, 3, 4, 5 (a) para este ejemplo). El uso de codón de ORF adaptados por codones (CA >0,9), por lo tanto, resulta en la generación de líneas celulares (en comparación con líneas celulares derivadas de los ORF no adaptados) con títulos iguales o mayores, con niveles más bajos de la amplificación y un número de copias menor del ADN transfectado. La generación de clones que hacen los niveles de anticuerpo equivalentes o superiores con respecto al menor número de copias, son deseables vectores de expresión

menos amplificadas. Por ejemplo, se ha demostrado que el silenciamiento génico inducido de repetición (RIGS) se puede inducir cuando se aumenta el número de copias de un vector de expresión integrado y que dicho RIGS puede resultar en los niveles de expresión reducida de dichos vectores en células de mamífero (por ejemplo, véase McBurney MW et al Exp. Cell Res. 2002 274:1-8).

- 5 Figura 14 (A). Gráfico de la fluorescencia media observada para la línea celular final para cada uno de los proyectos 2, 3, 4, 5 (d), 6 (d) y 7 (b). Se llevó a cabo la tinción de las células para DHFR como se describe en Materiales y Procedimientos, Ejemplo 1. (B) Niveles de ADN de DHFR y Neo mediante qPCR con el ADN genómico de las líneas celulares finales para los proyectos de 3, 4, 5 (a), 5 (d), 7 (b) y 9. La cPCR se realizó como se describe en Materiales y Procedimientos, Ejemplo 1. Para los niveles de referencia observados, los valores más bajos (vistos en el Proyecto 7 (b)) para la DHFR y Neo se fijaron en 1, después se representaron todos los demás valores con respecto al incremento por encima de éstos. A continuación también se indica cada valor si la proteína expresada por la línea celular analizada procede de un ORF con CA > 0.9 (S = Sí y N = No) y los niveles de MTX requeridos para generar la línea celular (en nM de MTX).

Listado de secuencias

SEQ ID NO	DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA
1	Sonda de ARN 18S - nucleótidos
2	Cebador 1
3	Cebador 2:
4	Sonda de cadena pesada:
5	Cebador 1:
6	Cebador 2:
7	Sonda de cadena ligera:
8	Cebador 1:
9	Cebador 2:
10	Cadena pesada no adaptada del proyecto 5 con una puntuación CAI de 0,809 CAI y empleado en el proyecto 5 (a)
11	Cadena ligera no adaptada del proyecto 5 con una puntuación CAI de 0,761 CAI y empleado en el proyecto 5 (a)
12	ORF de la cadena pesada del proyecto 5 con una puntuación del CAI mayor (0,847): Véase la Tabla 5 y la Figura 6. Esta secuencia se usó en el Proyecto 5 (b)
13	ORF de la cadena ligera del proyecto 5 con una puntuación del CAI mayor (0,833): Véase la Tabla 5 y la Figura 6. Esta secuencia se usó en el Proyecto 5 (b)
14	ORF de la cadena pesada del proyecto 5 con una puntuación del CAI mayor (0,872). Esta secuencia se empleó en el proyecto de anticuerpo 5 (c).
15	ORF de la cadena ligera del proyecto 5 con una puntuación del CAI mayor (0,894). Esta secuencia se empleó en el proyecto de anticuerpo 5 (c).
16	ORF de la cadena pesada del proyecto 5 con una puntuación del CAI mayor (0,982). Esta secuencia se empleó en el proyecto de anticuerpo 5 (d).
17	ORF de la cadena ligera del proyecto 5 con una puntuación del CAI mayor (0,976). Esta secuencia se empleó en el proyecto de anticuerpo 5 (d).
18	candidato (H2L1) de la cadena pesada
19	candidato (H2L1) de la cadena ligera
20	Cebador 1:
21	Cebador 2:
22	Sonda de DHFR:
23	Cebador 1:
24	Cebador 2
25	Sonda de Neo:

15

SEQ ID NO. 1
 5-VIC-tggctgaacgccactgtccctctaaa-TAMRA-3'.
 SEQ ID NO. 2
 5'-aggattgacggaagggcac-3'.
 SEQ ID NO.3

20

ES 2 840 725 T3

5'-ggacatctaagggcatcaca-3'

SEQ ID NO. 4

5'-FAM-ctccggctgccattgctctcc-TAMRA-3'.

SEQ ID NO. 5 5'-ggaggcgtggctttagttg-3'.

5 SEQ ID NO.6

5'-ggcttctatcccagcgacatc-3'.

SEQ ID NO. 7

5'-FAM-tctcgtagtctgcttggctcagcgtca-TAMRA-3'.

SEQ ID NO.8 5'-cttcgcaggcgtagacttgt-3'.

10 SEQ ID NO. 9 5'-gccctccaatcgggtaactc-3

SEQ ID NO. 10

ATGGAGTTGGGGCTGTGCTGGGTTTTCTTGTTGCTATTTTAGAAGGTGTCCAG
TGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGT
CCCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGATTCACCTTCAGTGACAACGGAATGG
CGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATTATTAGT
AATTTGGCATATAGTATCGACTACGCAGACACTGTGACGGGCCGATTCACCATC
TCCAGAGACAATGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTCAGCGGGACCTGGTTTGCTTACTGGGG
CCAGGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT
TCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG
CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCGTGGAACTCAG
GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGA
CTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA
GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA
AAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCAC
CTGAACTCGCGGGGGCACCGTCACTTCTTCCCCCAAACCCAAGGAC
ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG
CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC
ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG
GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA
GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCCG
GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT
CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC
ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCA
AGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC
GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT
CCGGGTAAA

SEQ ID NO. 11

ES 2 840 725 T3

ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGGTCTCTGGATC
CAGTGGGGATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGG
AGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGAGTTAGTCAGAGCCTTTTACACAGTAATGG
ATACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCT
GATCTATAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAG
TGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGT

TGGGGTTTATTACTGCTCTCAAACCTAGACATGTTCCGTACACGTTCCGGCGGAGG
GACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC
GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAA
TAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTCCA
ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT
ACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAA
GTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG
CTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO.12

ES 2 840 725 T3

ATGGAGCTCGGGCTGTGCTGGGTGTTCTCGTGGCCATCCTGGAGGGAGTGCA
GTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGTGGGGGCGGCCTGGTGCAGCCCGGCGG
CAGCCTGCGGCTGTCTGTGCGCCGTGAGCGGCTTCACCTTCAGTGACAACGGCA
TGGCTTGGGTGAGGCAGGCCCGGAAAGGGGCTCGAGTGGGTGAGCTTCAT
CAGTAACCTGGCCTACAGTATCGACTATGCTGACACCGTGACCGGCCGCTTCAC
TATCTCTCGGGATAATGCTAAGAACAGCCTGTACCTCCAGATGAACAGCCTGCG
CGCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGTGTCTGGAACCTGGTTCGCCTACT
GGGGCCAGGGTACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCG
GTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCT
GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCT
CAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC
CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA
AGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAG
CACCTGAACTCGCGGGGGCACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAG
GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT
GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG
TGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT
GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA
CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTC
CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCC
GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC
TATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA
ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACA
GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC

TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
GTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO. 13

ATGCGCCTGCCTGCCAGCTGCTCGGCCTGCTGATGCTGTGGGTGTCGGGCA
GCTCCGGCGACATCGTCATGACCCAGAGCCCCCTGAGTCTCCCCGTACCCCC
GGCGAACCTGCCAGCATCAGCTGCAGGGTGTCCCAGTCGCTGCTCCATTCCAA
CGGGTACACGTACCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCCCGGGCAATCCCCTCAGC
TGCTGATCTACAAGGTGAGCAACCGCTTCTCCGGCGTCCCGGACCGGTTCACT
GGCAGCGGCTCTGGAACCGACTTCACCCTGAAAATCAGCCGCGTGGAAGCTGA
GGACGTGGGCGTCTACTACTGCAGCCAGACCCGGCATGTGCCCTACACCTTCG
GCGGCGGCACAAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTC
ATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGC
CTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGACAAC
GCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGA
CAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGA
AACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTC
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO. 14

ATGGAGCTGGGCCTGTGCTGGGTGTTCTGGTGGCCATCCTGGAGGGCGTGC
AGTGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCCGGCG
GCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGTGAGCGGCTTACCTTCAGCGACAACGG
CATGGCCTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCTTC
ATCAGCAACCTGGCCTACAGCATCGACTACGCCGACACCGTGACCGGCCGCTT
CACCATCAGCCGCGACAACGCCAAGAAGCAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCC
TGCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTAATACTGCGTGAGCGGCACCTGGTTTCGC
CTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCC
CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG
GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTG
GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGT
CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG
GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT
GGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTG
CCCAGCACCTGAACTCGCGGGGGCACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAC

CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG
GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT
GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT
ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG
GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAAC
CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC
CATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
AGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC
TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO. 15

ATGCGCCTGCCCCGCCAGCTGCTGGGCCTGCTGATGCTGTGGGTGAGCGGCA
GCAGCGGCGACATCGTGATGACCCAGAGCCCCCTGAGCCTGCCCGTGACCCC
CGGCGAGCCCGCCAGCATCAGCTGCCGCGTGAGCCAGAGCCTGCTGCACAGC
AACGGCTACACCTACCTGCACTGGTACCTGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCCA
GCTGCTGATCTACAAGGTGAGCAACCGCTTCAGCGGCGTGCCCCACCGCTTCA
GCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCCGCGTGGAGGC
CGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCAGCCAGACCCGCCACGTGCCCTACACCT
TCGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTC
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGT
GCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGACA
ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG
GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGA
GAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCG
TCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO. 16

ATGGAGCTGGGCCTGTGCTGGGTGTTCCCTGGTGGCCATCCTGGAGGGCGTGC
AGTGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGG
CAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGTGTCCGGCTTACCTTCAGCGACAACGGCA
TGGCCTGGGTGAGGCAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCTTCAT
CAGCAACCTGGCCTACAGCATCGACTACGCCGACACCGTGACCGGCAGATTCA

CCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTG
AGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGAGCGGCACCTGGTTCGCCTA
CTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCC
AGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCG
CCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGG
AACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGA
GCAGCGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCT
GGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGG
TGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCC
TGCCCTGCCCCGAGCTGGCCGGAGCCCCCAGCGTGTTCTGTTCCCCCCAA
GCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGG
TGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
GTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGC
AAGGAGTACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCGAGAA
AACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGC
CCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTG
AAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGC
CCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTC
TTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGT
GTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCAGAAGA
GCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO. 17

ATGAGACTGCCCCGCCAGCTGCTGGGCCTGCTGATGCTGTGGGTGTCCGGCA
GCAGCGGCGACATCGTGATGACCCAGAGCCCCCTGAGCCTGCCCGTGACCCC
TGGCGAGCCCGCCAGCATCAGCTGTAGAGTGAGCCAGAGCCTGCTGCACAGCA
ACGGCTACACCTACCTGCACTGGTATCTGCAGAAGCCTGGCCAGAGCCCTCAG
CTGCTGATCTACAAGGTGTCCAACCGGTTTACGCGGCCTGCCTGATAGATTCAGC
GGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCCG
AGGATGTGGGCGTGTACTACTGCTCCCAGACCAGACACGTGCCTTACACCTTTG
GCGGCGGAACAAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCAGCGTGTT
CATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGT
GTCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGAC
AATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCA
AGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTAC

GAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCC
CGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO 18

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSDNGMAWVRQAPGKGLEWVSFISNL
AYSIDYADTVTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGTWFAFWGQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO 19

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRVSQSLLSNGYTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVS
NRFSGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQTRHVPYTFGGGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5

SEQ ID NO 20

GAGGCAGTTCTGTTTACCAGGAA

SEQ ID NO 21

CCTGCATGATCCTTGTCACAA

10

SEQ ID NO 22

Cy5-CCATGAATCAACCAGGCCACCTCAG-BBq

SEQ ID NO 23

GCCCGTTCTTTTTGTCAAG

SEQ ID NO 24

CTGCCTCGTCCTGCAGTTC
SEQ ID NO 25

Cy5-CCGACCTGTCCGGTGCCCTG-BBq

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> UDEN Mark KOTSOPOULOU, Ekaterina
<120> Procedimiento de producción
<130> PB62449
<150> US60/956772
<151> 20-08-2007

10 <160> 25
<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
<210> 1
<211> 27
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador/Sonda
<400> 1
tggtgaacg ccaactgtcc ctctaaa 27

20 <210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
25 <223> Cebador/Sonda
<400> 2
aggaattgac ggaaggcac 20
<210> 3
<211> 20
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador/Sonda
<400> 3
35 ggacatctaa gggcatcaca 20
<210> 4
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
40 <220>
<223> Cebador/Sonda
<400> 4
ctccggctgc ccattgctct cc 22
<210> 5
45 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

	<223> Cebador/Sonda	
	<400> 5	
	ggaggcgtgg tcttgtagt g	21
5	<210> 6	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	
10	<400> 6	
	ggcttctatc ccagcgacat c	21
	<210> 7	
	<211> 27	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	
	<400> 7	
	tctcgtagtc tgcttgctc agcgta	27
20	<210> 8	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador/Sonda	
	<400> 8	
	cttcgcaggc gtagacttg t	21
	<210> 9	
	<211> 20	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	
	<400> 9	
35	gccctcaat cggtaactc	20
	<210> 10	
	<211> 1392	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cadena pesada	
	<400> 10	

ES 2 840 725 T3

```

atggagttgg ggctgtgctg ggttttcctt gttgctatth tagaagggtg ccagtgtgag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gggggtcctt gagactctcc 120
tgtgcagctct ctggattcac cttcagtgac aacggaatgg cgtgggtccg ccaggctcca 180
gggaagggggc tggagtgggt ttcatctatt agtaatttgg catatagtat cgactacgca 240
gacactgtga cgggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaactc actgtatctg 300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgtcag cgggacctgg 360
tttgcttact gggggccaggg cacactagtc acagtctcct cagcctccac caagggccca 420
tcggctctcc ccctggcacc ctctccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc 480
tgctgtgca aggactactt cccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc aggcgcctg 540
accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct caggactcta ctccctcagc 600
agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg ggcaccaga cctacatctg caacgtgaat 660
cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag aaagttgagc ccaaactctg tgacaaaact 720
cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa ctgcggggg caccgtcagt ctctctctc 780
ccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggacc ctgaggtcac atgcgtggtg 840
gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagtcaact ggtacgtgga cggcgtggag 900
gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 960
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtaca gtgcaaggctc 1020
tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1080
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1140
agcctgacct gcctggtcaa aggttctat ccaagagaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200
aatgggcagc gggagaacaa ctacaagacc acgcctccc tgctggactc cgacggctcc 1260
ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtctc 1320
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1380
tctccgggta aa 1392

```

<210> 11
 <211> 717
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Cadena ligera

<400> 11

```

atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct gggctctctg atccagtggg 60
gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgccctca cccctggaga gccggcctcc 120
atctcctgca gagttagtca gagcctttha cacagtaatg gatacaccta ttacattgg 180
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct ataaagtth caaccgattt 240
tctggggctc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 300
agcagagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgct ctcaaactag acatgttccg 360
tacacgttcg gcggagggac caagggtgaa atcaaacgta cgggtggctgc accatctgtc 420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgctg 480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggacaa cgcctccaa 540
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600
agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 660
gtcaccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaagagct tcaacagggg agagtgt 717

```

<210> 12
 <211> 1392
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Cadena pesada con codones adaptados

15

<400> 12

ES 2 840 725 T3

atggagctcg ggctgtgctg ggtgttcctc gtggccatcc tggagggagt gcagtgtgag 60
 gtgcagctgg tggagagtgg gggcggcctg gtgcagcccg gcggcagcct gcggctgtcg 120
 tgcgccgtga gcggcttcac cttcagtgac aacggcatgg cttgggtcag gcaggccccc 180
 ggaaaggggc tcgagtgggt gagcttcac agtaacctgg cctacagtat cgactatgct 240
 gacaccgtga ccggccgctt cactatctct cgggataatg ctaagaacag cctgtacctc 300
 cagatgaaca gcctgcgcgc tgaggacacc gccgtgtact actgogtgtc tggaaacctg 360
 ttcgcctact ggggccaggg tacactagt c acagtctcct cagcctccac caagggccca 420

tgggtcttcc ccctggcacc ctccctccaag agcacctctg ggggcacagc ggcctggggc 480
 tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg 540
 accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct caggactcta ctccctcagc 600
 agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg ggcaccaga cctacatctg caacgtgaat 660
 cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag aaagttgagc ccaaactctg tgacaaaact 720
 cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa ctgcgggggg caccgtcagt ctccctcttc 780
 cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggacc ctgaggtcac atgctggtg 840
 gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 900
 gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 960
 agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtaca gtgcaaggtc 1020
 tccaacaaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1080
 cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1140
 agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200
 aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctccc tgctggactc cgacggctcc 1260
 ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1320
 tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgagaagag cctctccctg 1380
 tctccgggta aa 1392

<210> 13

<211> 717

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera con codones adaptados

<400> 13

atgcgcctgc ctgccagct gctcggcctg ctgatgctgt ggggtgtcggg cagctccggc 60
 gacatcgtca tgaccagag ccccctgagt ctccccgtca ccccggcga acctgccagc 120
 atcagctgca ggggtgtcca gtcgctgtc cattccaacg ggtacacgta cctgcattgg 180
 tacctgcaga agcccgggca atcccctcag ctgctgatct acaaggtgag caaccgcttc 240
 tccggcgtcc cggaccggtt cagtggcagc ggctctggaa ccgacttcac cctgaaaatc 300
 agccgcgtgg aagctgagga cgtgggcgtc tactactgca gccagaccgg gatgtgccc 360
 tacaccttcg gcggcggcac aaaggtggag atcaagcgtc cgggtggctgc accatctgtc 420
 ttcattctcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgacctg 480
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggacaa cgccctccaa 540
 tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600
 agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa 660
 gtcacccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 717

10 <210> 14

<211> 1392

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cadena pesada con codones adaptados

<400> 14

ES 2 840 725 T3

atggagctgg gcctgtgctg ggtgttcctg gtggccatcc tggagggcgt gcagtgcgag 60
 gtgcagctgg tggagagcgg cggcggcctg gtgcagcccg gcggcagcct gcgcctgagc 120
 tgcgcccgtga gcggcttcac cttcagcgac aacggcatgg cctgggtgcg ccaggccccc 180
 ggcaagggcc tggagtgggt gagcttcatc agcaacctgg cctacagcat cgactacgcc 240
 gacaccgtga ccggccgctt caccatcagc cgcgacaacg ccaagaacag cctgtacctg 300
 cagatgaaca gcctgcgcgc cgaggacacc gccgtgtact actgcgtgag cggcacctgg 360
 ttcgcctact gggggccaggg cacactagtc acagtctcct cagcctccac caagggccca 420
 tcggtcttcc ccctggcacc ctccctcaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc 480
 tgccctggtca aggactactt ccccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg 540
 accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct caggactcta ctccctcagc 600
 agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg ggcaccaga cctacatctg caacgtgaat 660
 cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag aaagttgagc ccaaatcttg tgacaaaact 720
 cacacatgcc caccgtgcc cagcacctgaa ctgcgggggg caccgtcagt cttcctcttc 780
 cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggacc ctagagtcac atgcgtggtg 840

gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 900
 gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 960
 agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1020
 tccaacaaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1080
 cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1140
 agcctgacct gcctggtcaa aggtttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200
 aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1260
 ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1320
 tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1380
 tctccgggta aa 1392

<210> 15

<211> 717

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera con codones adaptados

<400> 15

atgcgcctgc ccgcccagct gctgggcctg ctgatgctgt gggtgagcgg cagcagcggc 60
 gacatcgtga tgaccagag cccctgagc ctgccctgga ccccggcga gcccgccagc 120
 atcagctgcc gcgtgagcca gagcctgctg cacagcaacg gctacaccta cctgactgg 180
 tacctgcaga agcccggcca gagccccag ctgctgatct acaaggtgag caaccgcttc 240
 agcggcgtgc ccgaccgctt cagcggcagc ggcagcggca ccgacttcac cctgaagatc 300
 agccgcgtgg aggccgagga cgtgggcgtg tactactgca gccagaccgg ccacgtgccc 360
 tacaccttcg gcggcggcac caaggtggag atcaagcgtg cgggtggctgc accatctgtc 420
 ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aatctggaa ctgcctctgt tgtgtgctg 480
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggacaa cgccctccaa 540
 tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600
 agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaac acaaagtcta cgctgcgaa 660
 gtcacccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 717

10 <210> 16

<211> 1392

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cadena pesada con codones adaptados

<400> 16

ES 2 840 725 T3

```

atggagctgg gcctgtgctg ggtgttcctg gtggccatcc tggagggcgt gcagtgcgag 60
gtgcagctgg tggagtctgg cggcggactg gtgcagcctg gcggcagcct gagactgagc 120
tgtgccgtgt ccggcttcac cttcagcgac aacggcatgg cctgggtgag gcaggcccct 180
ggcaagggcc tggagtgggt gtccctcatc agcaacctgg cctacagcat cgactacgcc 240
gacaccgtga ccggcagatt caccatcagc cgggacaacg ccaagaacag cctgtacctg 300
cagatgaaca gcctgagagc cgaggacacc gccgtgtact actgtgtgag cggcacctgg 360
ttcgcctact ggggcccagg caccctggtg accgtgtcca gcgccagcac caagggcccc 420
agcgtgttcc ccctggcccc cagcagcaag agcaccagcg gcggcacagc cgccctgggc 480
tgcctggtga aggactactt ccccgaaccg gtgaccgtgt cctggaacag cggagccctg 540
accagcggcg tgcacacctt ccccgccgtg ctgcagagca gcggcctgta cagcctgagc 600
agcgtggtga ccgtgcccag cagcagcctg ggcaccaga cctacatctg taacgtgaac 660
cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag aaggtggagc ccaagagctg tgacaagacc 720
cacacctagg ccccctgccc tgcccccgag ctggccggag ccccagcgt gtccctgttc 780
cccccaagc ctaaggacac cctgatgatc agcagaacct ccgaggtgac ctgtgtggtg 840
gtggatgtga gccacgagga ccctgaggtg aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 900
gtgcacaatg ccaagaccaa gccagggag gagcagtaca acagcaccta ccgggtggtg 960
tccgtgctga ccgtgctgca ccaggattgg ctgaacggca aggagtaca gtgtaagggtg 1020
tccaacaagg ccctgcctgc ccctatcgag aaaaccatca gcaaggccaa gggccagccc 1080
agagagcccc aggtgtacac cctgccccct agcagagatg agctgaccaa gaaccaggtg 1140
tccctgacct gcctgtgtaa gggcttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200
aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc acccccctg tgctggacag cgatggcagc 1260

```

```

ttcttcctgt acagcaagct gaccgtggac aagagcagat ggcagcaggg caacgtgttc 1320
agctgctccg tgatgcacga ggcctgcac aatcactaca cccagaagag cctgagcctg 1380
tcccctggca ag                                     1392

```

- <210> 17
- <211> 717
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

5

- <220>
- <223> Cadena ligera con codones adaptados
- <400> 17

```

atgagactgc ccgccagct gctgggcctg ctgatgctgt ggggtgtccgg cagcagcggc 60
gacatcgtga tgaccagag ccccctgagc ctgccctgta cccctggcga gcccgccagc 120
atcagctgta gagtgagcca gagcctgctg cacagcaacg gctacacctt cctgcactgg 180
tatctgcaga agcctggcca gagccctcag ctgctgatct acaaggtgtc caaccggttc 240
agcggcgtgc ctgatagatt cagcggcagc ggctccggca ccgacttcac cctgaagatc 300
agcagagtgg aggccgagga tgtgggcgtg tactactgct cccagaccag acacgtgcct 360
tacacctttg gcggcggaac aaaggtggag atcaagcgtg cgggtggcgc ccccagcgtg 420
ttcatcttcc ccccagcga tgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 480
ctgaacaact tctacccccg ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa tgccctgcag 540
agcggcaaca gccaggagag cgtgaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 600
agcagcaccg tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgctgtgag 660
gtgaccacc accggcctgtc cagccccctg accaagagct tcaaccgggg cgagtgc 717

```

- <210> 18
- <211> 445
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

10

- <220>
- <223> Cadena pesada H2L1
- <400> 18

15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
 20 25 30
 Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Phe Ile Ser Asn Leu Ala Tyr Ser Ile Asp Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Ser Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 19
 <211> 219

ES 2 840 725 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena ligera H2L1

5 <400> 19

```

    Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
    1           5           10           15
    Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Val Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
           20           25           30
    Asn Gly Tyr Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
           35           40           45
    Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
           50           55           60
    Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
    65           70           75           80
    Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Thr
           85           90           95
    Arg His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
           100          105          110
    Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
           115          120          125
    Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
           130          135          140
    Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
    145          150          155          160
    Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
           165          170          175
    Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
           180          185          190

    Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
           195          200          205
    Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
           210          215
    
```

<210> 20
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador/Sonda

<400> 20
 gaggcagttc tgttaccag gaa 23

15 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador/Sonda

<400> 21
 cctgcatgat cctgtcaca a 21

25 <210> 22
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 840 725 T3

	<220>	
	<223> sonda DHFR	
	<400> 22	
	ccatgaatca accaggccac ctgag	25
5	<210> 23	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	
	<400> 23	
	gcccggttct tttgtcaag	20
15	<210> 24	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	
	<400> 24	
	ctgcctcgtc ctgcagttc	19
25	<210> 25	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador/Sonda	
	<400> 25	
	ccgacctgctc cggcgccctg	20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir una línea celular de mamífero que produce al menos un anticuerpo, un derivado del mismo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende las etapas de:

(a) transformar una célula de mamífero con una secuencia de polinucleótidos que comprende

5 (i) una secuencia que codifica el anticuerpo, un derivado del mismo o el fragmento de unión a antígeno que tiene un índice de adaptación de codones que es igual a o mayor de 0,9; y
 (ii) una secuencia que codifica un marcador de selección que es capaz de proporcionar amplificación de la secuencia de polinucleótidos;

10 (b) proporcionar al menos una ronda de amplificación en presencia de un agente de selección y amplificación; y
 (c) seleccionar la línea celular de mamífero una vez que se ha alcanzado un rendimiento de producción celular de 0,3-1,5 g/l en cultivos de lotes no alimentados prolongados y/o una productividad celular de 10-100 pg/célula/día en cultivos de lotes no alimentados del anticuerpo, un derivado del mismo o el agente de unión a antígeno;

15 en el que la concentración del agente de selección y amplificación es del 50% o menos que la concentración usada para alcanzar un rendimiento de producción equivalente, en comparación con una célula de mamífero de (a) transdormada con dicha secuencia de polinucleótidos que codifica el anticuerpo, un derivado del mismo o el fragmento de unión a antígeno y tiene un índice de adaptación de codones que es menos de 0,9.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la línea celular de mamífero se cultiva en biorreactores y el anticuerpo, un derivado del mismo o el fragmento de unión a antígeno producido se purifica.

20 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende la etapa de cultivar la célula de mamífero en medio de cultivo sin suero.

4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la producción del anticuerpo, un derivado del mismo o el fragmento de unión a antígeno por la línea celular de mamífero seleccionada aumenta en (i) clonación de una sola célula de un mejor clon (ii) desarrollo de procedimiento de alimentación por lotes (iii) desarrollo de procedimientos de estilo de perfusión (iv) uso de medios a medida y recetas y regímenes de alimentación o (v) una mayor adaptación del cultivo.

5. Una línea celular de mamífero obtenible por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la línea celular de mamífero tiene un menor número de copias de ADN transformado en comparación con una misma línea celular de mamífero transformada con dicha secuencia de polinucleótidos que tiene un índice de adaptación de codones que es menos de 0,9 y codifica el anticuerpo, un derivado del mismo o el fragmento de unión a antígeno.

6. La línea celular de mamífero o el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo, un derivado del mismo o el fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo monoclonal.

7. La línea celular de mamífero o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo, un derivado del mismo o el fragmento de unión a antígeno comprende una cadena pesada de anticuerpo y la línea celular produce una composición de anticuerpo que comprende menos de o igual al 5 % de cadena pesada no glicosilada.

8. La línea celular de mamífero o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo, un derivado del mismo o el fragmento de unión a antígeno comprende una cadena pesada de anticuerpo y la línea celular produce una composición de anticuerpo que comprende el 95 % o más de cadena pesada glicosilada.

9. La línea celular de mamífero o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el marcador de selección es dihidrofolato reductasa (DHFR) y el agente de selección y amplificación es metotrexato (MTX).

10. La línea celular de mamífero o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el marcador de selección es glutamina sintetasa (GS) y el agente de selección y amplificación es metionina sulfoximina (MSX).

11. La línea celular de mamífero o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la línea celular de mamífero es CHO o NS0.

12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 6 a 11, en el que la línea celular de mamífero tiene un menor número de copias de ADN en comparación con una misma línea celular de mamífero transformada con dicha secuencia de polinucleótido que codifica el anticuerpo, un derivado del mismo o el fragmento de unión a antígeno y tiene un índice de adaptación de codones que es menos de 0,9.

13. Uso de una secuencia de polinucleótidos que codifica un anticuerpo, un derivado del mismo o un fragmento de

5 unión a antígeno, en el que el índice de adaptación de codones de la secuencia de polinucleótidos es igual o superior a 0,9, para reducir los niveles requeridos de un agente de selección y amplificación titulable que aumenta el número de copias del gen en un procedimiento para producir una línea celular de mamífero que produzca dicho anticuerpo, un derivado del mismo o el fragmento de unión al antígeno, en comparación con una secuencia de polinucleótidos que codifica el anticuerpo, un derivado del mismo o el fragmento de unión a antígeno en el que el índice de adaptación del codón es menos de 0,9.

Figura 1.

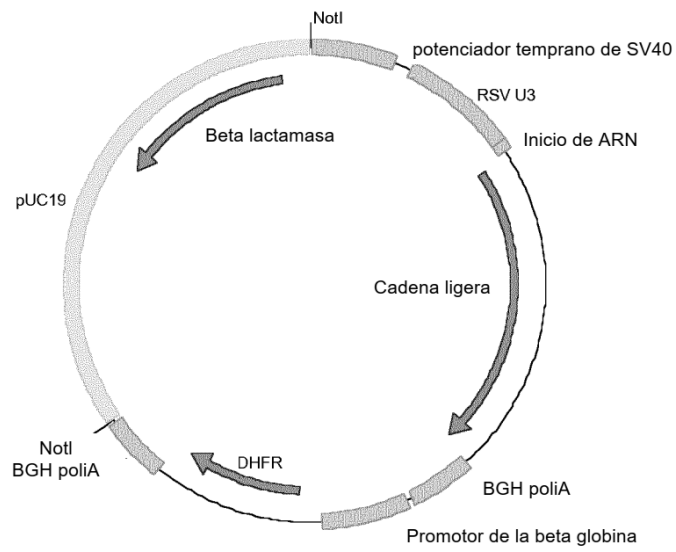
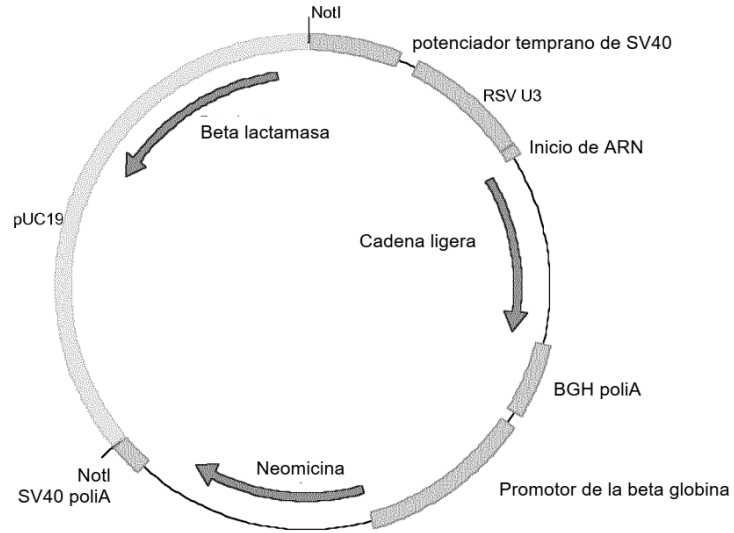


Figura 2.

ATGGAGTTGGGGCTGTGCTGGGTTTTCTTGTTGCTATTTTAGAAGGTGTCCAG
TGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGT
CCCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCTGGATTCACCTTCAGTGACAACGGAATGG
CGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATTCATTAGT
AATTTGGCATATAGTATCGACTACGCAGACACTGTGACGGGCCGATTACCATC
TCCAGAGACAATGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTACAGCGGGACCTGGTTTGCTTACTGGGG
CCAGGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT
TCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG
CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAG
GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGA
CTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA
GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA
AAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCGTGCCAGCAC
CTGAACTCGCGGGGGCACCGTCAGTCTCCTCTTCCCCCAAAACCAAGGAC
ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG
CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC
ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG
GTCAGCGTCTCACCCTGTCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA
GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCCG
GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA
TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC
TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGC
AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
CTCCGGGTAAA

Figura 3.

ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGGTCTCTGGATC
CAGTGGGGATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGG
AGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGAGTTAGTCAGAGCCTTTTACACAGTAATGG
ATACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCT
GATCTATAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAG
TGGATCAGGCACAGATTTTCACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGT
TGGGGTTTATTACTGCTCTCAAACCTAGACATGTTCCGTACACGTTTCGGCGGAGG
GACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC
GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAA
TAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTCC
AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC
TACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA
AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA
GCTTCAACAGGGGAGAGTGT

Figura 4.

ATGGAGCTCGGGCTGTGCTGGGTGTTCCCTCGTGGCCATCCTGGAGGGAGTGCA
 GTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGTGGGGGCGGCCTGGTGCAGCCCGGCGG
 CAGCCTGCGGCTGTCTGTGCGCCGTGAGCGGCTTCACCTTCAGTGACAACGGCA
 TGGCTTGGGTGAGGCAGGCCCGGAAAGGGGCTCGAGTGGGTGAGCTTCAT
 CAGTAACCTGGCCTACAGTATCGACTATGCTGACACCGTGACCGGCCGCTTCA
 CTATCTCTCGGGATAATGCTAAGAACAGCCTGTACCTCCAGATGAACAGCCTGC
 GCGCTGAGGACACCGCCGTGTAATACTGCGTGTCTGGAACCTGGTTCGCCTAC
 TGGGGCCAGGGTACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATC
 GGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC
 CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAA
 CTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCT
 CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC
 ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA
 CAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCC
 AGCACCTGAACTCGCGGGGGCACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCCA
 AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAC
 GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC
 GTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG
 TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATC
 TCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATC
 CCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT
 TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA
 CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTA
 CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
 GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC
 CTGTCTCCGGGTAAA

Figura 5.

ATGCGCCTGCCTGCCCAGCTGCTCGGCCTGCTGATGCTGTGGGTGTCGGGCA
GCTCCGGCGACATCGTCATGACCCAGAGCCCCCTGAGTCTCCCCGTACCCCC
GGCGAACCTGCCAGCATCAGCTGCAGGGTGTCCCAGTCGCTGCTCCATTCCAA
CGGGTACACGTACCTGCATTGGTACCTGCAGAAGCCCGGGCAATCCCCTCAGC
TGCTGATCTACAAGGTGAGCAACCGCTTCTCCGGCGTCCCGGACCGGTTCACT
GGCAGCGGCTCTGGAACCGACTTCACCCTGAAAATCAGCCGCGTGGAAGCTGA
GGACGTGGGCGTCTACTACTGCAGCCAGACCCGGCATGTGCCCTACACCTTCG
GCGGCGGCACAAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTC
ATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGC
CTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGACAAC
GCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGA
CAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGA
AACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

Figura 6.

ATGGAGCTGGGCCTGTGCTGGGTGTTCTTGGTGGCCATCCTGGAGGGCGTGC
 AGTGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCCGGCG
 GCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGTGAGCGGCTTCACCTTCAGCGACAACGG
 CATGGCCTGGGTGCGCCAGGCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCTTC
 ATCAGCAACCTGGCCTACAGCATCGACTACGCCGACACCGTGACCGGCCGCTT
 CACCATCAGCCGCGACAACGCCAAGAAGCAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCC
 TGCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGTGAGCGGCACCTGGTTTCGC
 CTAAGTGGGGCCAGGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCC
 CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG
 GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTG
 GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGT
 CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCTCCAGCAGCTTG
 GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT
 GGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTG
 CCCAGCACCTGAACTCGCGGGGGCACCGTCAAGTCTTCTTCCCCCAAAC
 CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG
 GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT
 GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT
 ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG
 GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAAC
 CATCTCAAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC
 CATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
 GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
 AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
 CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
 CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC
 TCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

Figura 7.

ATGCGCCTGCCCGCCCAGCTGCTGGGCCTGCTGATGCTGTGGGTGAGCGGCA
GCAGCGGCGACATCGTGATGACCCAGAGCCCCCTGAGCCTGCCCGTGACCCC
CGGCGAGCCCGCCAGCATCAGCTGCCGCGTGAGCCAGAGCCTGCTGCACAGC
AACGGCTACACCTACCTGCACTGGTACCTGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCCA
GCTGCTGATCTACAAGGTGAGCAACCGCTTCAGCGGCGTGCCCGACCGCTTCA
GCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCCGCGTGGAGGC
CGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCAGCCAGACCCGCCACGTGCCCTACACCT
TCGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGT
CTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGT
GTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG
ACAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTA
CGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC
CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

Figura 8.

ATGGAGCTGGGCCTGTGCTGGGTGTTCCCTGGTGGCCATCCTGGAGGGCGTGC
 AGTGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGG
 CAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGTGTCCGGCTTCACCTTCAGCGACAACGGCA
 TGGCCTGGGTGAGGCAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCTTCAT
 CAGCAACCTGGCCTACAGCATCGACTACGCCGACACCGTGACCGGCAGATTCA
 CCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTG
 AGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGAGCGGCACCTGGTTCGCCTA
 CTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCC
 AGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCCAGCGGCGGCACAGCCG
 CCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCCCTGG
 AACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGA
 GCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCAGCAGCCT
 GGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGG
 TGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCC
 TGCCCTGCCCCCGAGCTGGCCGGAGCCCCAGCGTGTTCCCTGTTCCCCCCCCA
 GCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGG
 TGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
 GTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
 CCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGTCACCAGGATTGGCTGAACGGC
 AAGGAGTACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCGAGAA
 AACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTG
 CCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGT
 GAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAG
 CCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTT
 CTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACG
 TGTTGAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAG
 AGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

Figura 9.

ATGAGACTGCCCCGCCAGCTGCTGGGCCTGCTGATGCTGTGGGTGTCCGGCA
GCAGCGGCACATCGTGATGACCCAGAGCCCCCTGAGCCTGCCCGTGACCCC
TGCGAGCCCCGCCAGCATCAGCTGTAGAGTGAGCCAGAGCCTGCTGCACAGC
AACGGCTACACCTACCTGCACTGGTATCTGCAGAAGCCTGGCCAGAGCCCTCA
GCTGCTGATCTACAAGGTGTCCAACCGGTTACAGCGGCGTGCCTGATAGATTCA
GCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGC
CGAGGATGTGGGCGTGTACTACTGCTCCCAGACCAGACACGTGCCTTACACCT
TTGGCGGCGGAACAAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGT
GTTTATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGG
TGTGTCTGCTGAACAATTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTG
GACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACA
GCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGAC
TACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAG
CCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

Figura 10.

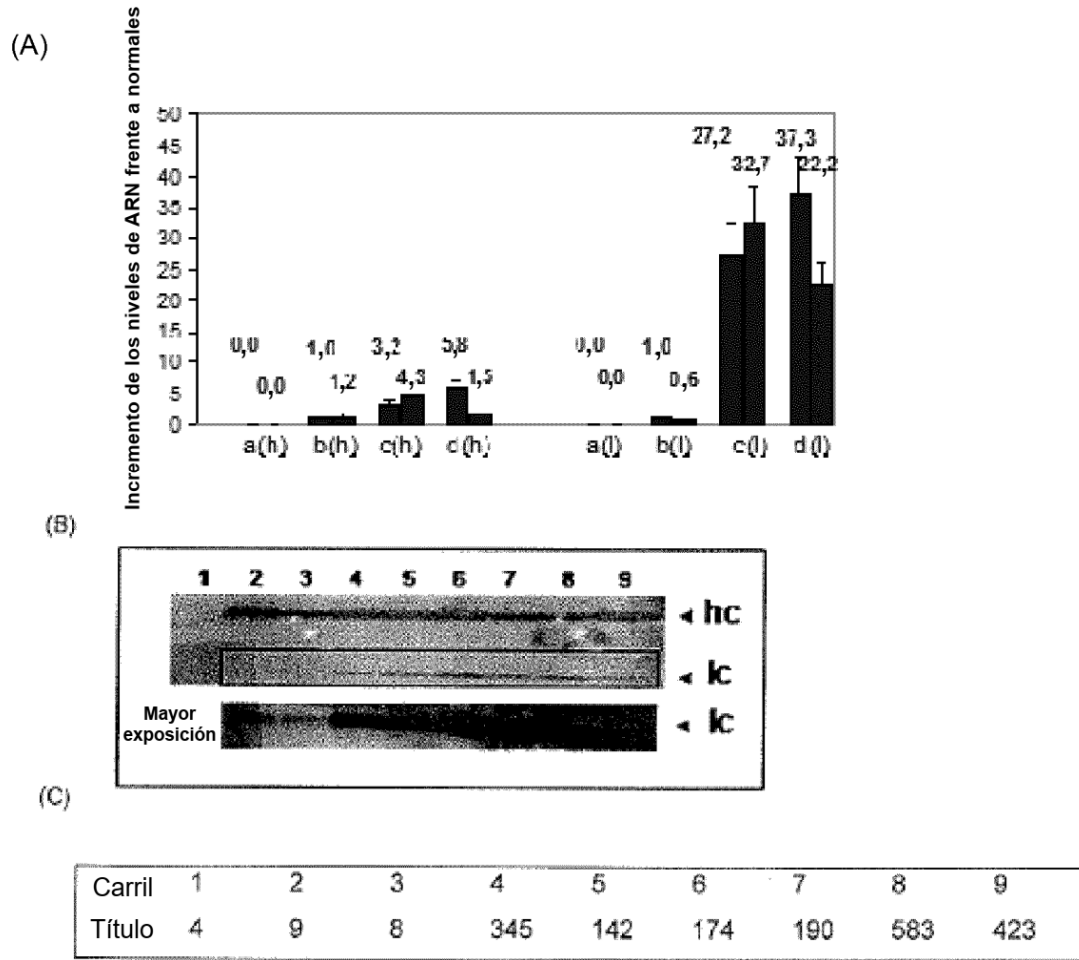


Figura 11.

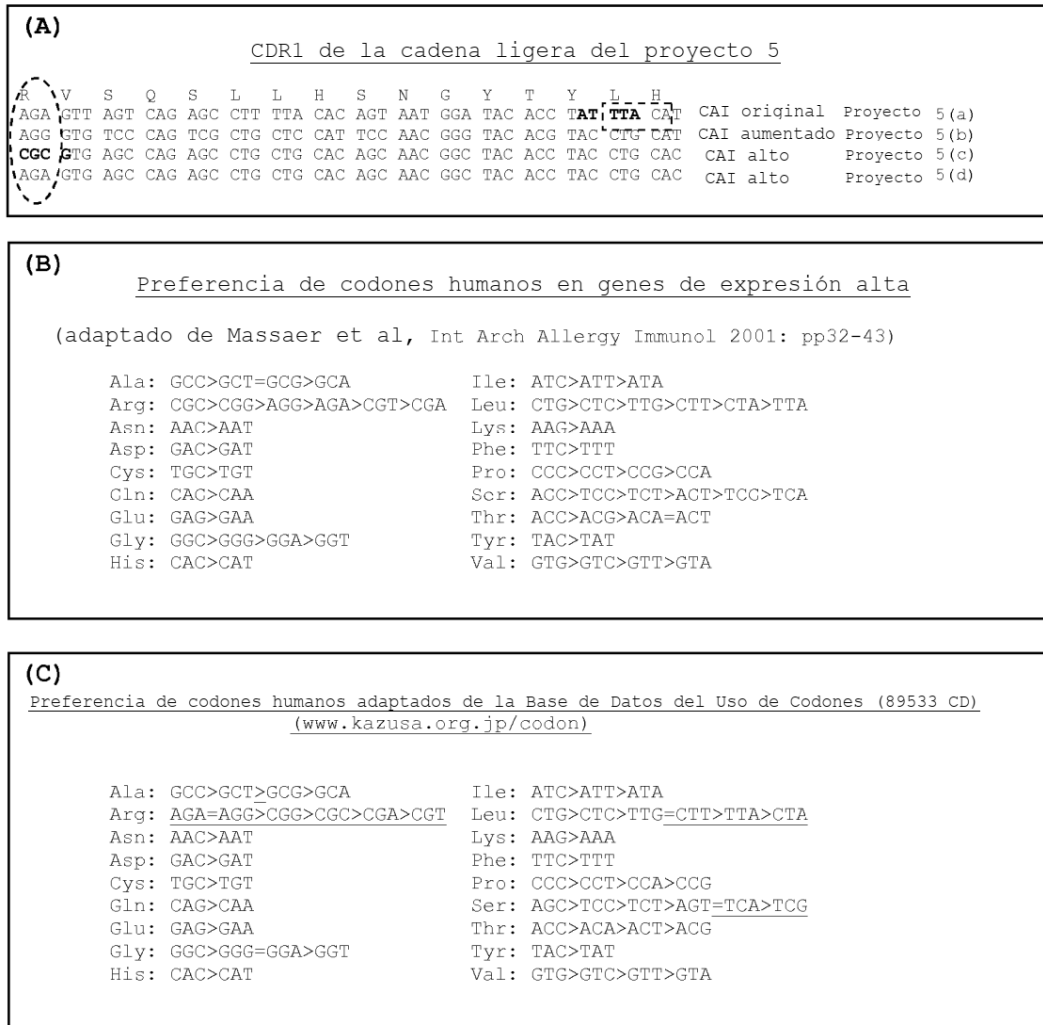


Figura 12.

(A)

	Modelo de producción.	%NGHC	Promedio*
Marcos de lectura abiertos no adaptados (Sec Id 10 y 11; CAI:HC 0,809, LC 0,761) 31) Huésped CHO-K1 Vectores: vectores pEE14.4/6.4 Selección/Mantenimiento/Amplificación: retirada de glutamina más MSX Medios: CD-CHO (Invitrogen) Aliment.: hidrolizado no animal (Día 4) Un clon (elegido en el título) es el único clon para el que se generó datos de NGHC:	Clon 1 Matraz de agitación Clon 1 5- Litros Clon 1 80-Litros (1) Clon 1 80-Litros (2) Clon 1 80-Litros (3) Clon 1 80-Litros (4) Clon 1 1000-Litros (1) Clon 1 1000-Litros (2)	1 2,3 14,5 5,5 6,1 4,6 12,4 8,3	6,8
Proyecto 5(a): marcos de lectura abiertos no adaptados (CAI:HC 0,809, LC 0,761) Huésped CHO-DG44 Vectores RI N/RI D Selección/Mantenimiento/Amplificación: G, retirada de nucleósidos más MTX Medios: G70 (GSK) Aliment.: Ninguna Clon 1, 2, 3 y 4 (elegidos en el título) con los únicos clones para los que se generaron datos de NGCH	Clon 1 Matraz de agitación Clon 2 Matraz de agitación Clon 3 Matraz de agitación Clon 4 Matraz de agitación	4,7 10,9 2,3 7,7	6,4
Proyecto 5(c): Adaptado de los marcos de lectura abiertos (CAI:HC 0,872, CL 0,894) Mismas estructuras de los vectores, protocolos de desarrollo de líneas celulares y medios que el proyecto 5A Clones 1, 2 y 3 (elegidos en el título) son los clones para los que se generaron datos de NGHC	Clon 1 Matraz de agitación Clon 2 Matraz de agitación Clon 3 Matraz de agitación Clon 3 Matraz de agitación (Repetir) Clon. 3 2-Litros Reactor	1,5 0,8 2,3 1,7 1,6	1,6
Proyecto 5(d): Adaptado de los marcos de lectura (CAI:HC 0,982,LC 0,976) Mismas estructuras de os vectores, protocolos de desarrollo de líneas celulares A y medios que el proyecto 5A Clon 1, 2, 3 y 4 (elegidos en el título) con los únicos clones para los que se generaron datos de NGCH Mejor clon (clon 1 (097-7) escalado a 1000 litros para suministrar material de ensayo clínico	Clon 1 Matraz de agitación Clon 1 Shake Flask (Reoeat) Clon 2 Matraz de agitación Clon 3 Matraz de agitación Clon 4 Matraz de agitación Clon 1 2-Litros Clon 1 80-Litros Clon 1 1000-Litros	1,4 1,3 1,1 1,1 1,1 1,8 1,9 1,3	1,4

*Promedio para cada proceso. Obsérvense los diferentes procesos tienen niveles diferentes de clones y/o de datos de escalas.

(B)

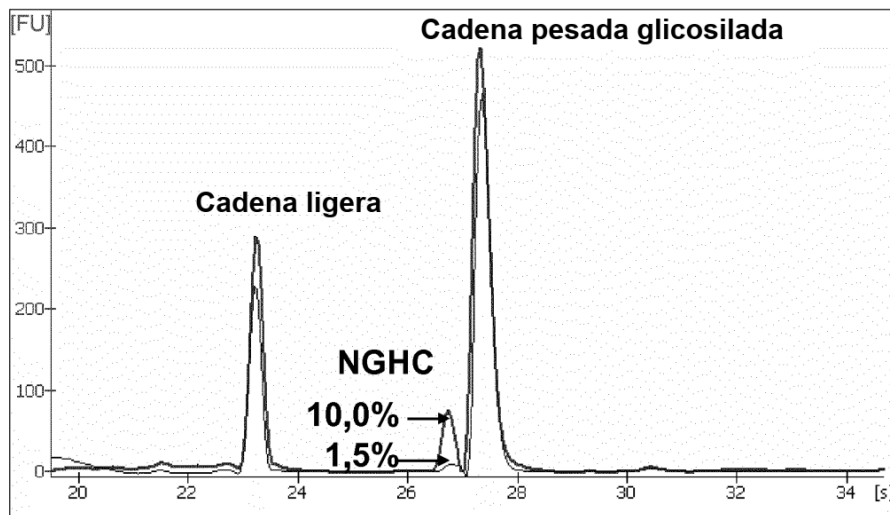


Figura 13.

**Datos del fermentador de 3 litros del clon de una célula O97-7
(sin alimentar)**

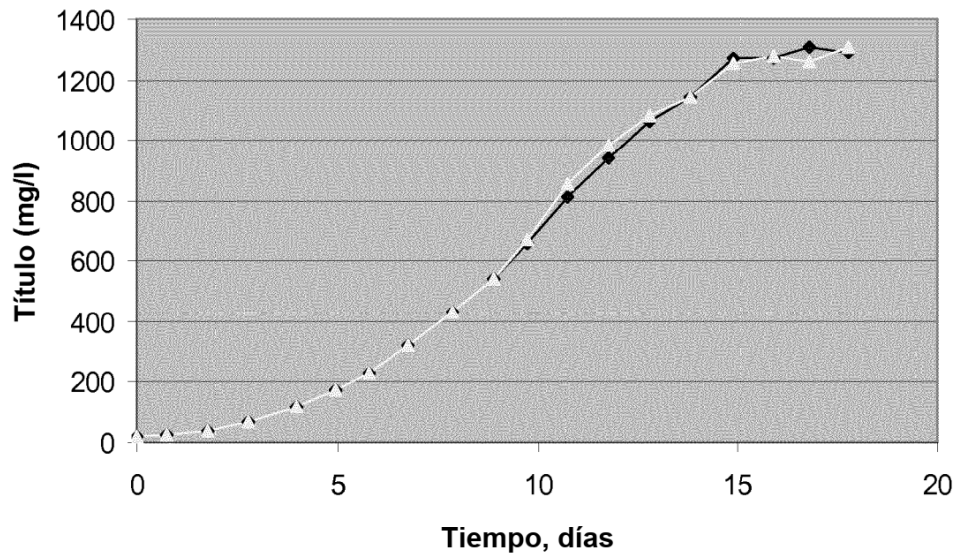
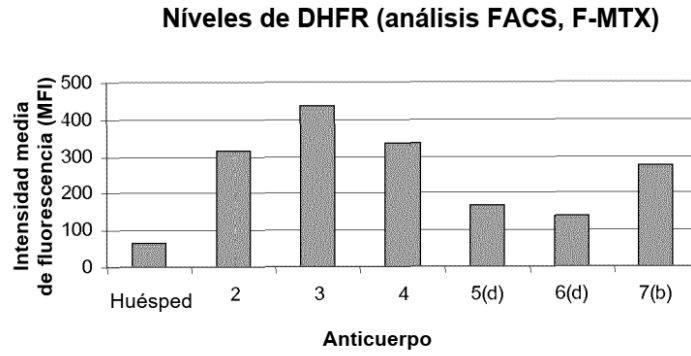


Figura 14.

(A)



(B)

