

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 821 940**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/85** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.05.2015 PCT/EP2015/060880**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2015 WO15177084**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2015 E 15723910 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020 EP 3146057**

54 Título: **Procedimiento para la producción de polipéptidos**

30 Prioridad:

**19.05.2014 EP 14168901**  
**04.11.2014 EP 14191705**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.04.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GOEPFERT, ULRICH y**  
**MORITZ, BENJAMIN**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 821 940 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 para la producción de polipéptidos

- 5 La invención actual está en el campo de la expresión de proteínas. En el presente documento se informa de un promotor con al menos una mutación puntual y un procedimiento que usa este promotor para producir un polipéptido.

**Antecedentes de la invención**

- 10 La expresión de proteínas es un proceso fundamental en las células vivas. Toda la información requerida para la expresión de proteínas se proporciona por un único ácido nucleico. Este ácido nucleico no solo contiene la información de la secuencia de aminoácidos de la proteína, sino que también proporciona la información reguladora requerida (por ejemplo, el sitio de unión al ribosoma, las señales de inicio y finalización para la transcripción, las señales de empalme, los elementos potenciadores, etc.) incluyendo un promotor/secuencia promotora.

- 15 Un promotor es un ácido nucleico que regula la cantidad de transcripción de un ácido nucleico, por ejemplo, que codifica un polipéptido, al que está enlazado de forma funcional, en pre-ARNm. Es un elemento de control de la transcripción, que está localizado alrededor del sitio de inicio de la ARN polimerasa en el extremo 5' de una secuencia codificante enlazada de forma funcional. A partir del análisis del promotor temprano de SV40, es conocido que los sitios de reconocimiento/unión para los activadores de la transcripción están contenidos en los promotores en segmentos que consisten en 7-20 pares de bases. Un segmento es el sitio de inicio para la síntesis de ARN, por ejemplo, la bien conocida caja TATA. Otros segmentos, localizados aproximadamente 30-110 pares de bases hacia 5', es decir, en dirección 5', con respecto al sitio de inicio para la síntesis de ARN, definen la frecuencia del inicio de la transcripción. Un promotor al menos requiere un segmento que inicia la síntesis de ARN en un sitio específico y en una dirección definida, es decir, en la dirección de 5' a 3'.

- 20 La pérdida gradual de productividad en el cultivo a largo plazo es un problema común con el desarrollo de la fabricación de líneas celulares (Barnes, L.M., *et al.* Biotechnol. Bioeng. 81 (2003) 631-639). La disminución de la expresión de proteínas recombinantes se puede deber a una pérdida de copias transgénicas y/o al silenciamiento del promotor transgénico (véanse, por ejemplo, Escher, G., *et al.* J. Lipid Res. 46 (2005) 356-365; Krishnan, M., *et al.*, FASEB J. 20 (2006) 106-108; Yang, Y., *et al.*, J. Biotechnol. 147 (2010) 180-185). El silenciamiento de los promotores se provoca por modificaciones epigenéticas de la cromatina, tal como las modificaciones postraduccionales de las histonas, así como la metilación directa del ADN promotor en los sitios CpG (véanse, por ejemplo, Cedar, H. y Bergman, Y., Nat. Rev. Genet. 10 (2009) 295-304; De Carvalho, D.D. *et al.*, Trends Cell Biol 20 (2010): 609-617; Klose, R.J. y Bird, A.P., Trends Biochem Sci 31 (2006): 89-97). Los promotores metilados son en general inactivos.

- 35 El promotor y potenciador muy fuerte de los principales genes tempranos inmediatos del citomegalovirus humano (hCMV-MIE) se usa para la expresión recombinante de polipéptidos en células de mamífero. Se ha demostrado que el promotor es propenso al silenciamiento por metilación en células de mamífero transfectadas de forma estable así como transitorias (véanse, por ejemplo, Escher, G., *et al.* J. Lipid Res. 46 (2005) 356-365; Krishnan, M., *et al.*, FASEB J. 20 (2006) 106-108; Proesch, S. *et al.*, Biol Chem Heppe Seyler 377 (1996): 195-201; Yang, Y., *et al.*, J. Biotechnol. 147 (2010) 180-185).

- 40 Se ha demostrado previamente en el documento WO 2011/128377 que la metilación directa del promotor de hCMV-MIE se puede usar como marcador temprano para predecir la inestabilidad de la producción de líneas celulares de CHO recombinantes.

- 45 Osterlehner, A., *et al.* informan de que la metilación del promotor y los números de copias del transgén predicen la producción de proteínas inestable en líneas celulares de ovario de hámster chino recombinantes y describen que los diferentes sitios CpG se metilan con diferente frecuencia (Biotechnol. Bioeng. 108 (2011) 2670-2681).

**Sumario de la invención**

- 50 La invención se define por las reivindicaciones.

- 55 Se ha descubierto que una mutación puntual de C a G, es decir, una mutación única de C a G, en el promotor de hCMV-MIE en sitios específicos da como resultado un silenciamiento del promotor reducido y asimismo una estabilidad de producción mejorada. Además, se ha descubierto que se pueden lograr mayores valores del polipéptido producido. La mutación de C a G en la posición -41 y/o en la posición -179 en relación con el sitio de inicio de la transcripción ha demostrado ser, en particular, eficaz.

- 60 En el presente documento se divulga un promotor de CMV humano (en base al promotor de SEQ ID NO: 01) que tiene el nucleótido G en la posición de nucleótido -41 (y/) o -179 en relación con el sitio de inicio de la transcripción.

- 65 Se descubrió que un promotor de CMV humano tiene una estabilidad de producción mejorada y/o un valor de producto mejorado (en comparación con los promotores de CMV humano sin mutaciones puntuales de C a G en la posición -

41 y/o -179 en relación con el sitio de inicio de las transcripciones).

Un aspecto como se informa en el presente documento es un promotor que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 02.

5 Un aspecto como se informa en el presente documento es un ácido nucleico caracterizado por que consiste en el ácido nucleico de SEQ ID NO: 02 y tiene una fuerza de promotor de al menos un 80 % del principal promotor temprano inmediato del CMV humano de SEQ ID NO: 01 cuando está enlazado de forma funcional al ácido nucleico de SEQ ID NO: 04 que codifica la proteína fluorescente verde potenciada (eGFP).

10 Un aspecto como se informa en el presente documento es un procedimiento para la producción de un polipéptido, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

15 a) transfectar una célula eucariota con un ácido nucleico que comprende un casete de expresión que comprende un primer ácido nucleico de SEQ ID NO: 02 enlazado de forma funcional a un segundo ácido nucleico que codifica el polipéptido,

b) seleccionar una célula transfectada en la etapa a),

20 c) cultivar la célula seleccionada de la etapa b) (en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido),

d) recuperar el polipéptido de la célula o del medio de cultivo,

y producir de este modo el polipéptido.

25 En un modo de realización de este aspecto, la producción es una producción a gran escala. En un modo de realización, la producción está en un volumen de cultivo final de 500 l o más, en un modo de realización de 500 l a 10.000 l.

30 En un modo de realización de este aspecto, dicho polipéptido es una inmunoglobulina, o un fragmento de inmunoglobulina, o un conjugado de inmunoglobulina.

En un modo de realización de este aspecto, el polipéptido es una cadena ligera de inmunoglobulina o una cadena pesada de inmunoglobulina o una variante de la misma o un fragmento de la misma o una fusión de la misma.

35 En un modo de realización de este aspecto, el ácido nucleico comprende un casete de expresión adicional que codifica un marcador de selección. En un modo de realización de este aspecto, el ácido nucleico comprende un casete de expresión adicional que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina o una cadena pesada de inmunoglobulina.

En un modo de realización de este aspecto, dicha célula eucariota es una célula de mamífero.

40 En un modo de realización de este aspecto, dicha célula de mamífero es una célula CHO, una célula BHK, una célula HEK, una célula Sp2/0 o una célula Per.C6®.

En un modo de realización de este aspecto, dicha célula de mamífero es una célula CHO o una célula HEK.

45 En un modo de realización de este aspecto, dicho marcador de selección es una dihidrofolato reductasa, una aminoglicósido fosfotransferasa o una higromicina-fosfotransferasa.

50 Un aspecto, como se informa en el presente documento, es el uso de un promotor que consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 02 para la producción de un polipéptido.

Un aspecto como se informa en el presente documento es una célula que comprende el promotor como se informa en el presente documento o el ácido nucleico como se informa en el presente documento.

55 En el presente documento se divulga un promotor que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 03

60 En el presente documento se divulga un ácido nucleico caracterizado por que consiste en el ácido nucleico de SEQ ID NO: 03 y tiene una fuerza de promotor de al menos un 80 % del principal promotor temprano inmediato del CMV humano de SEQ ID NO: 01 cuando está enlazado de forma funcional al ácido nucleico de SEQ ID NO: 04 que codifica la proteína fluorescente verde potenciada (eGFP).

En el presente documento se divulga un procedimiento para la producción de un polipéptido, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

65 a) transfectar una célula eucariota con un ácido nucleico que comprende un casete de expresión que comprende un primer ácido nucleico de SEQ ID NO: 03 enlazado de forma funcional a un segundo ácido nucleico que codifica el

polipéptido,

b) seleccionar una célula transfectada en la etapa a),

5 c) cultivar la célula seleccionada de la etapa b) (en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido),

d) recuperar el polipéptido de la célula o del medio de cultivo,

y producir de este modo el polipéptido.

10 En el presente documento se divulga el uso de un promotor de SEQ ID NO: 03 para la producción de un polipéptido.

En el presente documento se divulga una célula que comprende el promotor como se informa en el presente documento o el ácido nucleico como se informa en el presente documento.

15 En el presente documento se divulga un promotor de CMV humano que tiene el nucleótido G en la posición de nucleótido -41 en relación con el sitio de inicio de la transcripción.

20 En el presente documento se divulga un promotor de CMV humano que tiene el nucleótido G en la posición de nucleótido -179 en relación con el sitio de inicio de la transcripción.

### **Descripción detallada de la invención**

25 Cuando se usan líneas celulares eucariotas transfectadas de forma estable para la producción/expresión de polipéptidos recombinantes, como proteínas secretadas, una proteína indicadora intracelular o un marcador de superficie celular, la pérdida gradual de productividad en el cultivo a largo plazo es un problema común con el desarrollo de fabricación de líneas celulares (Barnes, L.M., *et al.* Biotechnol. Bioeng. 81 (2003) 631-639). Para la producción de líneas celulares/clones celulares, es decir, clones celulares/líneas celulares que se van a usar para la producción recombinante a gran escala de un polipéptido, tal como por ejemplo un anticuerpo, la estabilidad de producción, es decir, la pérdida de productividad de generación a generación, del clon celular/línea celular es importante. Por tanto, las líneas celulares de mamífero para la producción de proteínas recombinantes necesitan mantener la productividad durante tiempos de cultivo prolongados. En general, la estabilidad de producción de un clon celular/línea celular se determina cultivando el clon celular/línea celular durante un largo periodo de tiempo. A intervalos regulares, el medio se diluye con medio recién preparado y la productividad específica por célula se determina en base al valor del producto y la densidad de células viables. El cambio (normalmente una reducción) de la productividad específica es indicativo de la estabilidad de producción a largo plazo del clon celular/línea celular.

35 La disminución de la expresión de proteínas recombinantes se puede deber a una pérdida de copias transgénicas y/o al silenciamiento del promotor transgénico (véanse, por ejemplo, Escher, G., *et al.* J. Lipid Res. 46 (2005) 356-365; Krishnan, M., *et al.*, FASEB J. 20 (2006) 106-108; Yang, Y., *et al.*, J. Biotechnol. 147 (2010) 180-185). El silenciamiento de los promotores se provoca por modificaciones epigenéticas de la cromatina, tal como las modificaciones postraduccionales de las histonas, así como la metilación directa del ADN promotor en los sitios CpG (véanse, por ejemplo, Cedar, H. y Bergman, Y., Nat. Rev. Genet. 10 (2009) 295-304; De Carvalho, D.D. *et al.*, Trends Cell Biol 20 (2010): 609-617; Klose, R.J. y Bird, A.P., Trends Biochem Sci 31 (2006): 89-97). Los promotores metilados son en general inactivos.

40 Se ha demostrado anteriormente por Osterlechner, A., *et al.*, que la metilación del promotor y los números de copias del transgén predicen la producción de proteínas inestable en líneas celulares de ovario de hámster chino recombinantes y describen que los diferentes sitios CpG se metilan con diferente frecuencia (Biotechnol. Bioeng 108 (2011) 2670-2681).

45 En el presente documento se investigaron diferentes sitios CpG solos o en combinación. Diversas líneas celulares que contenían mutaciones puntuales de CpG dentro del principal promotor/potenciador temprano inmediato del CMV humano se generaron y se sometieron a prueba para determinar la productividad a largo plazo.

50 Es importante que las mutaciones en los promotores no influyan significativamente en su potencia de expresión génica, es decir, la fuerza de promotor no se debe ver influenciada.

55 Se ha descubierto en la invención actual que la fuerza de promotor no se ve influenciada en el promotor de hCMV-MIE con las mutaciones puntuales realizadas como se informa en el presente documento. No se pudieron detectar diferencias significativas entre los plásmidos con mutación puntual en el fragmento del principal promotor/potenciador temprano inmediato del CMV humano y el plásmido de control no mutado.

60 La invención se basa, al menos en parte, en el hallazgo de que el silenciamiento de los promotores se puede reducir por mutaciones puntuales de C a G en sitios CpG específicos del principal promotor/potenciador temprano inmediato del CMV humano. De este modo, se puede mejorar la estabilidad de producción a largo plazo de las líneas celulares

y se pueden producir polipéptidos recombinantes durante un largo periodo de tiempo con altos/mayores rendimientos.

5 Las células CHO ejemplares se transfectaron de forma estable con el plásmido 16107 (con una mutación puntual de C-179 a G) o el plásmido 16109 (con una mutación puntual de C-41 a G) y se cultivaron. Las intensidades de eGFP de 8-10 agrupaciones de células transfectadas de forma estable independientes por plásmido se determinaron durante un tiempo de cultivo prolongado.

10 Se detectó una diferencia estadísticamente significativa en la productividad a largo plazo de las células transfectadas entre las células que se habían transfectado con el plásmido 16109 o bien el plásmido de control 16111 (valores de  $p < 0,05$ ; véase la tabla a continuación).

15 Se ha descubierto que se puede lograr un efecto positivo sobre la estabilidad de la expresión del gen indicador cuando se introduce una mutación puntual de C a G en la posición -41 en relación con el sitio de inicio de la transcripción, es decir, se elimina el sitio de metilación.

Tabla: valores de  $p$  de medias geométricas de fluorescencia de agrupaciones de células CHO transfectadas con el plásmido 16107, 16109 o 16111 para la diferencia mínima significativa (LSD)

Valores de $p$ para LSD del procedimiento de Dunnett a la fecha (día de transfección 28 de enero de 2014):						
plásmido	Mar 03	Mar 07	Mar 14	Mar 25	Abr 07	Abr 25
16109	0,0524	0,0244*	0,0273*	0,0448*	0,0812	0,1044
16107	0,8759	0,8006	0,8739	0,9792	1,0	0,9965
16111	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

20 Por tanto, en el presente documento se divulga un promotor que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 02, es decir, un promotor de hCMV-MIE con mutación puntual de C-41 a G. En un modo de realización, el promotor tiene al menos una mutación puntual de C a G. En un modo de realización, el promotor tiene dos mutaciones puntuales de C a G. En un modo de realización, el promotor tiene tres mutaciones puntuales de C a G. En un modo de realización preferente el promotor tiene una única mutación puntual de C a G. En un modo de realización preferente, el promotor tiene una única mutación puntual de C a G en la posición -41 en relación con el sitio de inicio de la transcripción. En un modo de realización preferente, el promotor tiene una única mutación puntual de C a G en la posición -179 en relación con el sitio de inicio de la transcripción.

30 Otro aspecto como se informa en el presente documento es un ácido nucleico caracterizado por que consiste en el ácido nucleico de SEQ ID NO: 02 y tiene una fuerza de promotor de al menos un 80 % del principal promotor temprano inmediato del CMV humano de SEQ ID NO: 01 cuando está enlazado de forma funcional al ácido nucleico de SEQ ID NO: 04 que codifica la proteína fluorescente verde potenciada (eGFP).

35 Un aspecto como se informa en el presente documento es un procedimiento para la producción de un polipéptido, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

40 a) transfectar una célula eucariota con un ácido nucleico que comprende un casete de expresión que comprende un primer ácido nucleico de SEQ ID NO: 02 (es decir, un promotor de hCMV-MIE con mutación puntual de C-41 a G) enlazado de forma funcional a un segundo ácido nucleico que codifica el polipéptido,

b) seleccionar una célula transfectada en la etapa a),

c) cultivar la célula seleccionada de la etapa b) (en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido),

45 d) recuperar el polipéptido de la célula o del medio de cultivo,

y producir de este modo el polipéptido.

50 En un modo de realización de este aspecto, la producción es una producción a gran escala. En un modo de realización, la producción está en un volumen de cultivo final de 500 l o más, en un modo de realización de 500 l a 10.000 l.

En un modo de realización de este aspecto, dicho polipéptido es una inmunoglobulina, o un fragmento de inmunoglobulina, o un conjugado de inmunoglobulina.

55 En un modo de realización de este aspecto, el polipéptido es una cadena ligera de inmunoglobulina o una cadena pesada de inmunoglobulina o una variante de la misma o un fragmento de la misma o una fusión de la misma. Se entiende que es necesario incluir un casete de expresión adicional con un ácido nucleico que codifique la otra cadena de inmunoglobulina respectiva si se va a producir una molécula de inmunoglobulina completa. Por ejemplo, si el

polipéptido es una cadena ligera de inmunoglobulina, se introduce un casete de expresión adicional con un ácido nucleico que codifique una cadena pesada de inmunoglobulina. En un modo de realización de este aspecto, el ácido nucleico comprende un casete de expresión adicional que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina o una cadena pesada de inmunoglobulina.

En un modo de realización de este aspecto, el ácido nucleico comprende un casete de expresión adicional que codifica un marcador de selección. En un modo de realización de este aspecto, dicho marcador de selección es una dihidrofolato reductasa, una aminoglucósido fosfotransferasa o una higromicina-fosfotransferasa. Otro aspecto como se informa en el presente documento es el uso que consiste en un promotor de la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 02 para la producción de un polipéptido.

En un modo de realización de este aspecto, dicha célula eucariota es una célula de mamífero. En un modo de realización de este aspecto, dicha célula de mamífero es una célula CHO, una célula BHK, una célula HEK, una célula Sp2/0 o una célula Per.C6®. En un modo de realización de este aspecto, dicha célula de mamífero es una célula CHO o una célula HEK.

Adicionalmente, las líneas celulares 16107 y 16111 se compararon directamente. La tendencia de la línea celular 16107 para una mayor expresión de eGFP en comparación con la línea celular de control 16111 muestra un efecto positivo de la mutación puntual de C a G en la posición C-179 en relación con el sitio de inicio de la transcripción sobre la estabilidad del gen de expresión de eGFP.

La posición -41 en relación con el sitio de inicio de la transcripción corresponde a la posición 561 de la SEQ ID NO: 01. La posición -179 en relación con el sitio de inicio de la transcripción corresponde a la posición 423 de la SEQ ID NO: 01.

En el presente documento se divulga un promotor que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 03, es decir, un promotor de hCMV-MIE con mutación puntual de C-179 a G.

En el presente documento se divulga un ácido nucleico caracterizado por que consiste en el ácido nucleico de SEQ ID NO: 03 y tiene una fuerza de promotor de al menos un 80 % del principal promotor temprano inmediato del CMV humano de SEQ ID NO: 01 cuando está enlazado de forma funcional al ácido nucleico de SEQ ID NO: 04 que codifica la proteína fluorescente verde potenciada (eGFP).

En el presente documento se divulga un procedimiento para la producción de un polipéptido, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

a) transfectar una célula eucariota con un ácido nucleico que comprende un casete de expresión que comprende un primer ácido nucleico de SEQ ID NO: 03 enlazado de forma funcional a un segundo ácido nucleico que codifica el polipéptido,

b) seleccionar una célula transfectada en la etapa a),

c) cultivar la célula seleccionada de la etapa b) (en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido),

d) recuperar el polipéptido de la célula o del medio de cultivo,

y producir de este modo el polipéptido.

En el presente documento se divulga el uso de un promotor de SEQ ID NO: 03 para la producción de un polipéptido.

#### Definiciones

Un "promotor" se refiere a un ácido nucleico, es decir, una secuencia de polinucleótidos, que controla la transcripción de un ácido nucleico al que está enlazado de forma funcional. Un promotor puede incluir señales para la unión a ARN polimerasa y el inicio de la transcripción. El/los promotor(es) usado(s) podrá(n) ser funcional(es) en el tipo de célula de la célula huésped en la que se contempla la expresión del ácido nucleico enlazado de forma funcional. Una gran cantidad de promotores que incluyen promotores constitutivos, inducibles y reprimibles de una variedad de fuentes diferentes son bien conocidos en la técnica (e identificados en bases de datos tales como GenBank). Están disponibles como o dentro de polinucleótidos clonados (de, por ejemplo, depósitos tales como ATCC, así como otras fuentes comerciales o individuales). Un "promotor" comprende una secuencia de nucleótidos que dirige la transcripción de, por ejemplo, un gen estructural enlazado de forma funcional. Típicamente, un promotor se localiza en la región no codificante 5' o no traducida 5' (5' UTR) de un gen, próxima al sitio de inicio transcripcional de un gen estructural. Los elementos de secuencia dentro de promotores que funcionan en el inicio de la transcripción a menudo se caracterizan por secuencias de nucleótidos consenso. Estos elementos de secuencia incluyen sitios de unión a ARN polimerasa, secuencias TATA, secuencias CAAT, elementos específicos de diferenciación (DSE; McGehee, R.E., *et al.*, Mol. Endocrinol. 7 (1993) 551), elementos de respuesta al AMP cíclico (CRE), elementos de respuesta al suero (SRE;

Treisman, R., *Seminars in Cancer Biol.* 1 (1990) 47), elementos de respuesta a los glucocorticoides (GRE) y sitios de unión para otros factores de transcripción, tales como CRE/ATF (O'Reilly, M.A., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 19938), AP2 (Ye, J., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 25728), SP1, proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB; Loeken, M.R., *Gene Expr.* 3 (1993) 253-264) y factores de octámeros (véanse, en general, Watson *et al.*, eds., *Molecular Biology of the Gene*, 4.<sup>a</sup> ed., The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1987 y Lemaigre, F.P. y Rousseau, G.G., *Biochem. J.* 303 (1994) 1-14). Si un promotor es un promotor inducible, entonces la tasa de transcripción se incrementa en respuesta a un agente inductor. Por el contrario, la tasa de transcripción no se regula por un agente inductor si el promotor es un promotor constitutivo. Los promotores reprimibles también son conocidos. Por ejemplo, el promotor de c-fos se activa específicamente tras la unión de la hormona del crecimiento a su receptor en la superficie celular. La expresión regulada por tetraciclina (tet) se puede lograr por promotores híbridos artificiales que consisten, por ejemplo, en un promotor de CMV seguido de dos sitios operadores de Tet. El represor de Tet se une a los dos sitios operadores de Tet y bloquea la transcripción. Tras la adición de la tetraciclina inductora, el represor de Tet se libera de los sitios operadores de Tet y prosigue la transcripción (Gossen, M. y Bujard, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 5547-5551). Para otros promotores inducibles que incluyen metalotioneína y promotores de choque térmico, véanse, por ejemplo, Sambrook, *et al. (supra)* y Gossen, M. *et al.*, *Curr. Opin. Biotech.* 5 (1994) 516-520. Entre los promotores eucariotas que se han identificado como fuertes promotores para expresión de alto nivel están el promotor temprano de SV40, principal promotor tardío de adenovirus, promotor de metalotioneína I de ratón, repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, factor de alargamiento de hámster chino 1 alfa (CHEF-1, véase, por ejemplo, el documento US 5.888.809), EF-1 alfa humano, ubicuitina y principal promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMV-MIE). Un "potenciador" (es decir, un elemento de ADN de acción en cis que actúa sobre un promotor para incrementar la transcripción) puede ser necesario para funcionar conjuntamente con el promotor para incrementar el nivel de expresión obtenido con un promotor solo, y se puede incluir como elemento regulador transcripcional. A menudo, el segmento polinucleotídico que contiene el promotor incluirá también secuencias potenciadoras (por ejemplo, CMV o SV40).

La expresión "sitio CpG" indica el dinucleótido CG dentro de un ácido nucleico que se puede reconocer por las enzimas metilantes de una célula y en el que la citosina se puede convertir en 5-metilcitosina. En un modo de realización, el sitio CpG está dentro de un ácido nucleico promotor.

El término "ácido nucleico" como se usa en el presente documento, es un polímero que consiste en nucleótidos individuales, es decir, un polinucleótido. Se refiere a un ácido nucleico natural o parcial o totalmente no natural, que codifica, por ejemplo, un polipéptido que se puede producir de forma recombinante. El ácido nucleico puede estar formado por fragmentos de ADN que se aíslan o bien se sintetizan por medios químicos. El ácido nucleico se puede integrar en otro ácido nucleico, por ejemplo, en un plásmido de expresión o el genoma/cromosoma de una célula huésped. El plásmido incluye vectores lanzadera y de expresión. Típicamente, el plásmido también comprenderá una unidad de propagación procarionota que comprende un origen de replicación (por ejemplo, el origen de replicación ColE1) y un marcador de selección (por ejemplo, gen de resistencia a ampicilina o tetraciclina), para la replicación y selección, respectivamente, del vector en bacterias.

El término "fuerza de promotor" y los equivalentes gramaticales del mismo, como se usa en la invención actual, indican la eficacia de un promotor en la transcripción de un ácido nucleico enlazado de forma funcional. La fuerza de promotor de un promotor puede ser alta, es decir, puede ser de desde un 75 % a más de un 100 %, o media, es decir, puede ser de desde un 40 % a menos de un 75 %, o baja, es decir, puede ser hasta menos de un 40 %, si se compara con la fuerza de promotor del promotor de hCMV-MIE natural de SEQ ID NO: 01. Este valor se puede determinar comparando la cantidad de expresión de un polipéptido heterólogo enlazado de forma funcional al promotor en cuestión con la cantidad de expresión del polipéptido heterólogo enlazado de forma funcional al promotor de SV40 natural en el mismo tipo de célula. Esto se puede hacer, por ejemplo, determinando la cantidad de expresión del polipéptido heterólogo en una célula CHO o HEK transfectada con un casete de expresión que consiste en el promotor en cuestión enlazado de forma funcional a un ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo por un ensayo ELISA. Comparando esta cantidad con la cantidad de expresión del mismo polipéptido heterólogo en la misma línea celular transfectada con un casete de expresión que consiste en el promotor de SV40 natural enlazado de forma funcional a un ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo determinado con el mismo ensayo ELISA, es decir, comparando la cantidad de polipéptido heterólogo en la misma célula con el mismo plásmido de expresión en el que solo se cambia el promotor, se puede determinar la fuerza de promotor relativa.

"Enlazado de forma funcional" se refiere a una yuxtaposición de dos o más componentes, en la que los componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar de su manera pretendida. Por ejemplo, un promotor y/o potenciador están enlazados de forma funcional a una secuencia codificante si este actúa en cis para controlar o modular la transcripción de la secuencia codificante enlazada. En general, pero no necesariamente, las secuencias de ADN que están "enlazadas de forma funcional" son contiguas y, si fuera necesario para unir dos regiones codificantes de proteínas tales como una secuencia líder/señal secretora y un polipéptido, contiguas y en marco de lectura. Sin embargo, aunque un promotor enlazado de forma funcional se localiza en general en dirección 5' de la secuencia codificante, no es necesariamente contiguo a ella. Los potenciadores no tienen que ser contiguos. Un potenciador se enlaza de forma funcional a una secuencia codificante si el potenciador incrementa la transcripción de la secuencia codificante. Los potenciadores enlazados de forma funcional se pueden localizar en dirección 5', dentro o en dirección 3' de las secuencias codificantes y a distancia considerable del promotor. Un sitio de poliadenilación

está enlazado de forma funcional a una secuencia codificante si está localizado en el extremo hacia 3' de la secuencia codificante de tal manera que la transcripción progresa a través de la secuencia codificante en la secuencia de poliadenilación. El enlace se logra por procedimientos recombinantes conocidos en la técnica, por ejemplo, usando metodología de PCR y/o por fijación en sitios de restricción convenientes. Si no existen sitios de restricción convenientes, entonces se usan adaptadores o conectores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

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

El término "célula" o "célula huésped" se refiere a una célula en la que un ácido nucleico, por ejemplo, que codifica un polipéptido heterólogo o que constituye un ARNhc, se puede introducir/transfectar o se introduce/transfecta. Las células huésped incluyen tanto células procariontas, que se usan para la propagación de vectores/plásmidos, como células eucariotas, que se usan para la expresión del ácido nucleico. En un modo de realización, las células eucariotas son células de mamífero. En otro modo de realización, la célula huésped de mamífero se selecciona de las células de mamífero que comprenden células CHO (por ejemplo, CHO K1 o CHO DG44), células BHK, células NS0, células SP2/0, células HEK 293, células EBNA HEK 293, células PER.C6 y células COS. En otro modo de realización, la célula de mamífero se selecciona del grupo que comprende hibridoma, mieloma y células de roedor. Las células de mieloma comprenden células de mieloma de rata (por ejemplo, YB2) y células de mieloma de ratón (por ejemplo, NS0, SP2/0). Los polipéptidos para uso en aplicaciones farmacéuticas se producen en un modo de realización en células de mamífero tales como células CHO, células NS0, células Sp2/0, células COS, células HEK, células BHK, células PER.C6® o similares. Para la fermentación de la célula huésped y, por tanto, para la expresión del polipéptido de interés, se usa un medio de cultivo. En la actualidad, las células CHO se usan ampliamente para la expresión de polipéptidos farmacéuticos, a pequeña escala en el laboratorio o bien a gran escala en los procedimientos de producción. Debido a su amplia distribución y uso, las propiedades características y el acervo genético de las células CHO son bien conocidos. Por lo tanto, las células CHO están aprobadas por las autoridades sanitarias para la producción de proteínas terapéuticas para la aplicación en seres humanos. En un modo de realización, la célula de mamífero es una célula CHO.

Un "casete de expresión" se refiere a un ácido nucleico que contiene los elementos necesarios para la expresión y secreción de al menos el gen estructural contenido en una célula huésped. Asimismo, un ácido nucleico se caracteriza por su secuencia que consiste en nucleótidos individuales o por la secuencia de aminoácidos codificada por la molécula de ácido nucleico.

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

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

El término "expresión" como se usa en el presente documento se refiere a la transcripción y/o traducción que se produce dentro de una célula. El nivel de transcripción de un producto deseado en una célula huésped se puede determinar en función de la cantidad de ARNm correspondiente que está presente en la célula. Por ejemplo, el ARNm transcrito de un ácido nucleico seleccionado se puede cuantificar por PCR o por hibridación Northern (véase Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). La proteína codificada por un ácido nucleico seleccionado se puede cuantificar por diversos procedimientos, por ejemplo, por ELISA, sometiendo a ensayo la actividad biológica de la proteína o empleando ensayos que son independientes de dicha actividad, tales como inmunoelectrotransferencia o radioinmunoanálisis, usando anticuerpos que reconocen y se unen a la proteína (véase Sambrook, *et al.*, 1989, *supra*).

Un "polipéptido" es un polímero de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, ya sean producidos natural o sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 20 residuos de aminoácidos se pueden denominar "péptidos". Los polipéptidos que comprenden dos o más cadenas de aminoácidos o que comprenden una cadena de aminoácidos de una longitud de 100 aminoácidos o más se pueden denominar "proteínas". Un polipéptido o proteína también puede comprender componentes no peptídicos, tales como grupos de carbohidratos o iones metálicos. Los carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos se pueden añadir a una proteína por la célula en la que se produce la proteína, y pueden variar con el tipo de célula. Las proteínas y polipéptidos se definen en el presente documento en términos de su estructura de cadena principal de aminoácidos; adiciones tales como grupos de carbohidratos, en general, no se especifican, pero pueden estar presentes no obstante. En un modo de realización, el polipéptido es una inmunoglobulina, o un fragmento de inmunoglobulina, o un conjugado de inmunoglobulina. En un modo de realización,

el polipéptido es una cadena pesada de inmunoglobulina o una cadena ligera de inmunoglobulina o un fragmento, fusión o conjugado de la misma.

El término "marcador de selección" indica un ácido nucleico que permite que las células que llevan este ácido nucleico se seleccionen específicamente a favor o en contra, en presencia de un "agente de selección" correspondiente. Un marcador de selección positivo útil es, por ejemplo, un gen de resistencia a los antibióticos. El marcador de selección permite que se seleccione una célula que se transforma con el mismo en presencia del agente de selección correspondiente; una célula no transformada no puede crecer ni sobrevivir en condiciones de cultivo selectivo, es decir, en presencia del agente de selección. Los marcadores de selección pueden ser positivos, negativos o bifuncionales. Los marcadores de selección positivos permiten la selección de células que llevan el marcador, mientras que los marcadores de selección negativos permiten que las células que llevan el marcador se eliminen selectivamente. Típicamente, un marcador de selección conferirá resistencia a un fármaco o compensará un defecto metabólico o catabólico en la célula. Los marcadores de selección útiles con células eucariotas incluyen, por ejemplo, los genes para aminoglucósido fosfotransferasa (APH), tales como la higromicina fosfotransferasa (HYG), neomicina y G418 APH, dihidrofolato reductasa (DHFR), timidina cinasa (TK), glutamina sintetasa (GS), asparagina sintetasa, triptófano sintetasa (agente de selección indol), histidinol deshidrogenasa (agente de selección histidinol D) y genes que proporcionan resistencia a puromicina, bleomicina, fleomicina, cloranfenicol, zeocina y ácido micofenólico. Se informa de marcadores de selección adicionales en los documentos WO92/08796 y WO94/28143.

El término "en condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido" indica las condiciones que se usan para el cultivo de una célula de mamífero que expresa un polipéptido heterólogo y que son conocidas o se pueden determinar fácilmente por un experto en la técnica. También es conocido por un experto en la técnica que estas condiciones pueden variar dependiendo del tipo de célula de mamífero cultivada y del tipo de proteína expresada. En general, la célula de mamífero se cultiva a una temperatura, por ejemplo, entre 20 °C y 40 °C, y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la producción de proteínas eficaz, por ejemplo, durante de 4 a 28 días, en un volumen de desde 0,1 litros a 10<sup>7</sup> litros.

El término "recuperación del polipéptido" como se usa en la solicitud actual indica precipitación, precipitación por adición de sal, ultrafiltración, diafiltración, liofilización, reducción de volumen de disolvente para obtener una solución concentrada, o cromatografía. En general, se usan los procedimientos cromatográficos para la separación y purificación de polipéptidos. Diferentes procedimientos están bien establecidos y se usan ampliamente para la recuperación y purificación de proteínas, tales como cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo, cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, intercambio catiónico (resinas de carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de aminoetilo) e intercambio en modo mixto), adsorción tiofílica (por ejemplo, con beta-mercaptoetanol y otros ligandos SH), cromatografía de interacción hidrófoba o adsorción aromática (por ejemplo, con fenil-Sepharose, resinas aza-arenófilas o ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad por quelatos metálicos (por ejemplo, con material de afinidad por Ni(II) y Cu(II)), cromatografía de exclusión por tamaño y procedimientos electroforéticos (tales como electroforesis en gel, electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102).

El término "inmunoglobulina" indica una molécula que comprende al menos dos de los llamados polipéptidos de cadena ligera (cadena ligera) y dos de los llamados polipéptidos de cadena pesada (cadena pesada). Cada uno de los polipéptidos de la cadena pesada y ligera comprende un dominio variable (región variable) (en general, la porción aminoterminal de la cadena polipeptídica) que comprende regiones de unión que pueden interactuar con un antígeno. Cada uno de los polipéptidos de la cadena pesada y ligera también comprende una región constante (en general, la porción carboxiterminal). La región constante de la cadena pesada media en la unión de la inmunoglobulina i) a las células que tienen un receptor Fc gamma (FcγR), tal como las células fagocíticas, o ii) a las células que tienen el receptor Fc neonatal (FcRn), también conocido como el receptor Brambell. También media en la unión a algunos factores, incluyendo los factores del sistema del complemento clásico, tales como el componente (C1q).

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

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de las cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se dividen en diferentes clases: clase IgA, clase IgD, clase IgE, clase IgG y clase IgM. Algunas de estas clases se dividen además en subclases (isotipos), es decir, IgG en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, o IgA en IgA1 e IgA2. De acuerdo con la clase a la que pertenece una inmunoglobulina, las regiones constantes de la cadena pesada se denominan α (IgA), δ (IgD), ε (IgE), γ (IgG) y μ (IgM), respectivamente. En un modo de realización, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de la clase IgG. En otro modo de realización, la inmunoglobulina tiene una región constante humana o una región constante derivada de origen humano. En otro modo de realización, la inmunoglobulina es de la subclase IgG4 o la subclase IgG1, IgG2 o IgG3, que se modifica de tal manera que no se puede detectar la unión al receptor Fcγ (por ejemplo, FcγRIIIa) y/o la unión a C1q. En un modo de realización, la inmunoglobulina es de la subclase IgG4 humana o una subclase IgG1 humana mutada. En un modo de realización, la inmunoglobulina es de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A y L235A. En otro modo de realización, la inmunoglobulina es, respecto a la unión

al receptor Fc $\gamma$ , de la subclase IgG4 o de la subclase IgG1 o IgG2, con una mutación en L234, L235 y/o D265, y/o contiene la mutación PVA236. En otro modo de realización, la inmunoglobulina tiene una mutación seleccionada de S228P, L234A, L235A, L235E, SPLE (S228P y L235E) y/o PVA236 (PVA236 significa que la secuencia de aminoácidos ELLG (dada en el código de aminoácidos de una letra) desde la posición de los aminoácidos 233 a 236 de IgG1 o EFLG de IgG4 se reemplaza por PVA). En un modo de realización, la inmunoglobulina es de la subclase IgG4 y tiene la mutación S228P de IgG4, o la inmunoglobulina es de la subclase IgG1 y tiene las mutaciones L234A y L235A.

El dominio variable de la cadena ligera o pesada de una inmunoglobulina comprende, a su vez, segmentos diferentes, es decir, cuatro regiones estructurales (FR) y tres regiones hipervariables (CDR).

Un "fragmento de inmunoglobulina" indica un polipéptido que comprende al menos un dominio del grupo de dominios que comprende el dominio variable, el dominio C<sub>H1</sub>, la región bisagra, el dominio C<sub>H2</sub>, el dominio C<sub>H3</sub>, el dominio C<sub>H4</sub> de una cadena pesada de una inmunoglobulina o el dominio variable o el dominio C<sub>L</sub> de una cadena ligera de una inmunoglobulina. También están comprendidos derivados y variantes de los mismos. Adicionalmente, puede estar presente un dominio variable, en el que se delecionan uno o más aminoácidos o regiones de aminoácidos.

El término "conjugado de inmunoglobulina" indica un polipéptido que comprende al menos un dominio de la cadena pesada o ligera de una inmunoglobulina conjugada por medio de un enlace peptídico a otro polipéptido. El otro polipéptido es un péptido no inmunoglobulínico, tal como una hormona, receptor de crecimiento, péptido antifusógeno o similares.

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

#### **Descripción del listado de secuencias**

**SEQ ID NO: 01** Secuencia de nucleótidos del principal promotor/potenciador temprano inmediato del CMV humano (hCMV-MIE)

**SEQ ID NO: 02** Secuencia de nucleótidos del promotor/potenciador de hCMV-MIE con mutación puntual de C a G en la posición -41 en relación con el sitio de inicio de la transcripción

**SEQ ID NO: 03** Secuencia de nucleótidos del promotor/potenciador de hCMV-MIE con mutación puntual de C a G en la posición -179 en relación con el sitio de inicio de la transcripción

**SEQ ID NO: 04** Secuencia de nucleótidos de la proteína fluorescente verde potenciada (eGFP) que incluye una secuencia PEST desestabilizadora

**SEQ ID NO: 05** Secuencia de nucleótidos de la fosfatasa alcalina secretada (SEAP) que incluye un péptido señal.

**SEQ ID NO: 06** Secuencia de nucleótidos del promotor/potenciador de hCMV-MIE con mutación puntual de C a G en la posición -41 y -179 en relación con el sitio de inicio de la transcripción

#### **Descripción de las figuras**

**Figura 1** Mapa plasmídico de la fosfatasa alcalina secretada (SEAP) que expresa el plásmido p5532

**Figura 2** Mapa plasmídico de la proteína fluorescente verde potenciada (eGFP) que expresa el plásmido p16111

**Figura 3** Procedimiento de dilución del sobrenadante de cultivo celular

**Figura 4** Niveles de expresión de SEAP normalizados de suspensiones de células CHO transfectadas de forma transitoria sin (columnas sombreadas diagonalmente) o con tratamiento con DAC (columnas sombreadas verticalmente). Se indican los plásmidos que se usaron para la transfección. Las barras de error representan las desviaciones estándar de ocho (sin DAC) o 4 (con DAC) réplicas biológicas. También se muestra la señal de fondo de células CHO-K1 transfectadas de forma simulada (dos réplicas biológicas).

**Figura 5** Ventana de adquisición de células vivas de células CHO-K1 no transfectadas en el gráfico de puntos de dispersión frontal (FSC)/dispersión lateral (SSC). Se aplicó la misma ventana de adquisición a todas las muestras del mismo ensayo FACS.

**Figura 6** Histograma de ventana de adquisición de células vivas de fluorescencia de eGFP por un cultivo de células CHO transfectadas de forma estable. Se midió la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 488 nm con el canal Alexa Fluor 488. Se pueden distinguir dos picos que representan las dos subpoblaciones principales de los expresadores distintos de eGFP (pico izquierdo) y los expresadores de eGFP altos (pico derecho).

**Figura 7** Niveles de expresión de eGFP de agrupaciones independientes de células CHO seis semanas después de la transfección estable con el plásmido 16107, 16109 o bien 16111. Los puntos representan medias geométricas de intensidades de fluorescencia de agrupaciones de CHO individuales.

**Figura 8** Niveles de expresión de eGFP de agrupaciones independientes de células CHO seis semanas después de la transfección estable con el plásmido 16107 o bien 16111. Los puntos representan medias geométricas de intensidades de fluorescencia de agrupaciones de CHO individuales.

**Figura 9** Mapa plasmídico del anticuerpo de clase IgG que expresa el plásmido p21504

**Figura 10** Valor de anticuerpo ( $\mu\text{g/ml}$ ) de agrupaciones de células CHO transfectadas estables 68 días después de la transfección (A) o 134 días después de la transfección (B) con el plásmido 16134 (CGG), 16135 (CGC) o 16136 (CCG) o bien 21504 (CCC). Los puntos representan medias geométricas del valor de anticuerpo de agrupaciones de CHO individuales.

**Figura 11** Productividad específica (qP) de agrupaciones de células CHO transfectadas estables 68 días después de la transfección (A) o 131 días después de la transfección (B) con el plásmido 16134 (CGG), 16135 (CGC) o 16136 (CCG) o bien 21504 (CCC). Los puntos representan medias geométricas de productividad específica de agrupaciones de CHO individuales.

**Figura 12** Comparación de la media con la prueba HSD de Tukey (promedios de  $\Delta\text{qP}$ ) de los mutantes con respecto al control.

## **Ejemplo 1**

### **Técnicas generales**

#### Técnicas de ADN recombinante

Se usaron procedimientos estándares para manipular ADN como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). Los reactivos biológicos moleculares se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### Determinación de la secuencia de ADN

La secuenciación del ADN se realizó en SequiServe GmbH (Vaterstetten, Alemania).

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

El paquete de programas informáticos EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite) y Vector NTI versión 9.1 de Invitrogen se usaron para la creación, cartografiado, análisis, anotación e ilustración de la secuencia.

#### Preparación de muestras para análisis de anticuerpos:

Se calculó la concentración celular y se centrifugaron 2 ml por muestra (500 g, 5 minutos a 20-30 °C). El sobrenadante se transfirió a nuevas placas de 96 pocillos profundos y se almacenó a -20 °C hasta su uso. El sobrenadante congelado se descongeló durante la noche a 4 °C, se invirtió 6 veces y se centrifugó (4000 rpm, 30 minutos a 20-30 °C). Se filtraron 310  $\mu\text{l}$  con una placa Millipore de múltiples filtros sobre una placa redonda de 96 pocillos con código de barras por centrifugación (1200 rpm, 3 minutos a 20-30 °C).

## **Ejemplo 2**

### **Generación de líneas celulares de CHO recombinantes**

Las células en suspensión CHO-K1 se transfectaron, de forma transitoria o bien estable, con un vector que llevaba un gen indicador, fosfatasa alcalina secretada (SEAP: figura 1; SEQ ID NO: 05) o proteína de fluorescencia verde potenciada (eGFP: figura 2) o bien construcciones de anticuerpos humanos de clase IgG (proteína de fusión citocina (IL2)-IgG como se informa en el documento WO2014023752; figura 9) bajo el control de un fragmento del principal promotor/potenciador temprano inmediato del CMV humano, natural (SEQ ID NO: 01) o bien que comprende mutaciones puntuales de C a G. Las mutaciones de C a G C-508, C-179 y C-41 de los dinucleótidos CpG dentro del fragmento de hCMV-MIE se insertaron solas o en diversas combinaciones para incrementar la estabilidad a largo plazo (tabla 1). Las mutaciones de C a G se identifican por su distancia al sitio de inicio de la transcripción (TSS). Las mutaciones se insertaron con el kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios QuikChange (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). El vector comprendía además una secuencia de ácido nucleico que codifica la dihidrofolato reductasa (DHFR) murina (figura 1, 2 y 9). La transfección de células se realizó por el sistema de nucleofección Amaxa

(Lonza Cologne GmbH, Colonia, Alemania).

**Tabla 1:** Combinaciones de mutaciones puntuales de C a G de dinucleótidos CpG dentro del fragmento del principal promotor/potenciador temprano inmediato del CMV humano

5

Mutaciones puntuales de C a G en fragmentos del principal promotor/potenciador temprano inmediato del CMV humano de plásmidos que expresan SEAP				
N.º de plásmido:	Código de mutaciones puntuales	Nombre de mutaciones puntuales	Posición en dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción	
16100	GGG	C-508, C-179, C-41	508, 179, 41	
16101	GCG	C-508, C-41	508,41	
16102	CGC	C-179	179	
16103	GCC	C-508	508	
16104	CCG	C-41	41	
5532	CCC	Sin mutación		
Mutaciones puntuales de C a G en fragmentos del principal promotor/potenciador temprano inmediato del CMV humano de plásmidos que expresan eGFP				
N.º de plásmido:	Código de mutaciones puntuales	Nombre de mutaciones puntuales	Posición en dirección 5' de TSS	Rasgo característico
16105	GGG	C-508, C-179, C-41	508, 179, 41	UAS de secuencia de unión a Gal4-BD en dirección 5' de hCMV-MIE
16106	GCG	C-508, C-41	508,41	
16107	CGC	C-179	179	
16108	GCC	C-508	508	
16109	CCG	C-41	41	
16111	CCC	Sin mutación		
16110	CCC	Sin mutación		
Mutaciones puntuales de C a G en el fragmento del principal promotor/potenciador temprano inmediato del CMV humano del anticuerpo humano de clase IgG que expresa plásmidos				
N.º de plásmido:	Código de mutaciones puntuales	Nombre de mutaciones puntuales	Posición en dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción	
16134	CGG	C-179, C-41	179,41	
16135	CGC	C-179	179	
16136	CCG	C-41	41	
21504	CCC	Sin mutación		

Por ejemplo, las células CHO-K1 se transfectaron con ADN plasmídico circular para la expresión transitoria de SEAP o con ADN plasmídico linealizado para la expresión estable de eGFP o con el plásmido apropiado para la expresión estable de la proteína de fusión de anticuerpos de clase IgG, usando el dispositivo Nucleofector en combinación con el kit Nucleofector Kit V (Lonza Cologne GmbH, Colonia, Alemania) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Se sembraron las suspensiones de células transfectadas de forma transitoria en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 5 días. Se examinó la concentración de SEAP en un lector SPECTRAFluor Plus de Tecan (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Alemania) por cambio de color de una reacción química.

10

Se sembraron las suspensiones de células transfectadas de forma estable en placas de 384 o 6 pocillos que contenían medio libre de timidina con metotrexato (MTX) de 250 a 1600 nM como agente de selección. Después de tres a cuatro semanas, se examinaron las agrupaciones de células que expresan eGFP o las agrupaciones de células que expresan anticuerpos para determinar la estabilidad a largo plazo durante un periodo de 1-3 meses. Se examinó la intensidad de la expresión de eGFP por citometría de flujo. Se sembraron los clones de una única célula que expresaban anticuerpos en placas de 384 y 96 pocillos. Después de tres semanas, se identificaron las líneas celulares que expresaban anticuerpos midiendo los valores de anticuerpo en el medio de cultivo por ELISA. Los pocillos con crecimiento se seleccionaron al azar y, en interés del ensayo de estabilidad a largo plazo, los clones celulares se expandieron en volúmenes mayores (3 ml por pocillo en placas de 6 pocillos) y la concentración de anticuerpo se determinó por HPLC de proteína A y ELISA al final de cada pase.

20

25

Las células se propagaron en matraces de agitación con ventilación de 125 ml desechables en condiciones humidificadas estándar (95 % de HR, 37 °C y CO<sub>2</sub> a de 5 % a 8 %) a una tasa de agitación constante de 120 rpm/min a 150 rpm/min. Cada 3-4 días las células se dividieron en medio recién preparado. La densidad y la viabilidad de los cultivos se determinaron usando la cámara de recuento Cedex HiRes (Roche Innovates AG, Bielefeld, Alemania). Además, se aplicaron técnicas estándares de cultivo celular como se describe, por ejemplo, en Current Protocols in Cell Biology, Bonifacino, J.S. *et al.* (eds), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (2000).

**Ejemplo 3**

**Cultivo y producción a largo plazo**

Se investigaron diversas agrupaciones de células CHO que contenían mutaciones puntuales de CpG dentro del fragmento del principal promotor/potenciador temprano inmediato del CMV humano (tabla 1) obtenido de acuerdo con el ejemplo 2 para determinar la productividad a largo plazo.

Se sometieron a prueba las células para determinar la estabilidad de producción durante de 2 a 3 meses después de la transfección en presencia del agente de selección MTX. Las células se cultivaron de forma continua en matraces de agitación de 125 ml con ventilación que contenían 20-40 ml de medio sin agente de selección y se diluyeron dos veces a la semana con medio recién preparado. La densidad de siembra fue de 2 a 3 x 10<sup>5</sup> células/ml. Antes del pase, se determinaron la densidad de células viables y la viabilidad.

La concentración de anticuerpo del sobrenadante (valor de anticuerpo) se determinó por HPLC de proteína A y ELISA al final de cada pase. A partir de estos datos, se calculó la productividad específica (qP) de célula para cada pase usando la siguiente fórmula:

$$qP = \frac{P_2 - P_1}{(D_2 - D_1) / 2 * \Delta t}$$

qP [pg/célula/d]: productividad específica de célula,

P<sub>1</sub> [µg/ml]: valor de anticuerpo al comienzo del pase,

P<sub>2</sub> [µg/ml]: valor de anticuerpo al final del pase,

D<sub>1</sub> [células/ml]: densidad de células viables al comienzo del pase,

D<sub>2</sub> [células/ml]: densidad de células viables al final del pase,

Δt [d]: duración del pase.

Se representaron los valores de qP frente a la edad de cultivo al final del pase respectivo en generaciones. Se calculó una línea de tendencia lineal sobre todos los puntos de datos de qP y la alteración relativa de la qP (en porcentaje) durante el periodo se calculó internamente, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\Delta qP = \frac{m * a}{qP_0 * 100}$$

ΔqP [%]: porcentaje de alteración de qP,

m [pg/célula/d/generación]: pendiente de la línea de tendencia lineal,

a [n.º de generaciones]: edad del cultivo,

qP<sub>0</sub>: intersección con el eje y de la línea de tendencia lineal.

Con respecto al número menor de puntos de datos obtenidos en el ensayo de estabilidad de las variantes del promotor de hCMV-MIE, para cada muestra, el promedio de los últimos tres valores de qP se dividió por el promedio de los dos primeros valores de Qp y se presentó en porcentaje para obtener ΔqP.

$$\Delta qP = \frac{\text{promedio de } qP \text{ EOS}}{\text{promedio de } qP \text{ PSB}} * 100$$

Promedio de qP EOS: promedio de los últimos tres valores de qP

5 Promedio de qP PSB: promedio de los dos primeros valores de qP

#### **Ejemplo 4**

10 **Cuantificación de la expresión del gen indicador bajo el control de diferentes fragmentos del principal promotor/potenciador temprano inmediato del CMV humano.**

**a) Cuantificación de la expresión de SEAP bajo el control de diferentes fragmentos del principal promotor/potenciador temprano inmediato del CMV humano**

15 Las células CHO-K1 se transfectaron con ADN plasmídico circular para la expresión transitoria de SEAP, usando el dispositivo Nucleofector en combinación con el kit Nucleofector Kit V (Lonza Cologne GmbH, Colonia, Alemania) en la placa de 96 pocillos Amaxa Shuttle de acuerdo con los protocolos del fabricante. Se sembraron 12 suspensiones de células transfectadas transitorias por plásmido en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 5 días. El día 2, se añadió 5'-aza-2'-desoxicitidina (DAC) en 4 réplicas por plásmido hasta una concentración final de 1  $\mu$ M para desmetilar el ADN. Se examinó la concentración de SEAP en el lector SPECTRAFluor Plus de Tecan (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Alemania).

20 Se examinó la concentración relativa de SEAP por la tasa metabólica de pNPP (*para*-nitrofenilfosfato) con respecto a pNP (*para*-nitrofenol) de acuerdo con el siguiente protocolo:

25 **Tabla 2:** Soluciones para el ensayo con SEAP:

<b>Diluyente</b>	
<b>MgCl<sub>2</sub>*6H<sub>2</sub>O</b> (Sigma, n.º de cat. HM2670-500 g PM=203,31 g/mol)	100 $\mu$ l de MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O 1 M
<b>L-homoarginina-HCl</b> (Sigma, n.º de cat. H1007-5G, PM 224,69 g/mol)	224,69 mg
<b>Dietanolamina</b> (Sigma, n.º de cat. D-8885, mín. 98 %, PM 105,1 g/mol, conc. 1,1 g/ml)	9,75 ml de dietanolamina
	ajustar a pH 9,8 con HCl concentrado y añadir H <sub>2</sub> O hasta un volumen final de 100 ml
<b>Solución de sustrato</b>	
<b>pNPP</b> (4-nitrofenilfosfato, Roche, n.º de cat. 107905, n.º de lote 10030536)	74,2 mg en 10 ml de H <sub>2</sub> O

30 Se diluyeron 150  $\mu$ l de sobrenadante de cultivo celular centrifugado 1:3 en múltiples etapas (figura 3).

Se añadieron diluciones de 50  $\mu$ l en una nueva placa de 96 pocillos y se combinaron con 50  $\mu$ l de solución de sustrato. Después de 5 minutos, se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 405 nm usando un fotómetro SPECTRAFluor Plus (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Alemania).

35 El promedio de 8 réplicas por plásmido sin tratamiento con DAC y el promedio de 4 réplicas por plásmido (tabla 1) con tratamiento con DAC se normalizaron con respecto al plásmido de control (p5532) sin mutaciones puntuales (figura 4).

40 No se detectaron diferencias significativas entre los plásmidos con mutación puntual en el fragmento del principal promotor/potenciador temprano inmediato del CMV humano y el plásmido de control no mutado 5532. Además, no se observaron diferencias significativas entre las muestras con y sin tratamiento con DAC, lo que indica que no se produjo un silenciamiento significativo del promotor dentro de los 5 días después de la transfección. Por lo tanto, se concluye que las mutaciones puntuales que se introdujeron en el fragmento del principal promotor/potenciador temprano inmediato del CMV humano no afectan la fuerza de promotor (las mutaciones puntuales no tienen influencia en la

potencia directa del fragmento del promotor/potenciador temprano inmediato del CMV humano).

**b) Cuantificación de la expresión de eGFP bajo el control de diferentes fragmentos del principal promotor/potenciador temprano inmediato del CMV humano por FACS**

Se cultivaron las suspensiones de células transfectadas de forma estable que expresaban eGFP durante un periodo de 1-3 meses. Se midió la intensidad de la expresión de eGFP usando BD FACS Canto II o BD FACS Calibur (BD, Heidelberg, Alemania). La recopilación de datos se realizó con el programa informático BD FACS Diva v6.12 o el programa informático Cell Quest Pro (BD, Heidelberg, Alemania). El análisis de datos primarios se realizó con el programa informático Flow Jo 7.6.5 EN (TreeStar, Often, Suiza).

Por ejemplo, se examinaron las suspensiones de células CHO 16105, 16106, 16107, 16108, 16109, 16110 y 16111 con BD FACS Calibur en múltiples puntos temporales para detectar la expresión de eGFP. Se examinaron todas las muestras en 3-4 réplicas biológicas. Se midieron 10000 eventos por muestra. La ventana de adquisición para las células vivas se definió con células CHO-K1 no transfectadas y se aplicó a todas las muestras del mismo experimento FACS (figura 8).

Se midió la fluorescencia de eGFP de las células vivas a una longitud de onda de excitación de 488 nm (canal Alexa Fluor 488) y una longitud de onda de emisión de aproximadamente 516 nm. La figura 6 muestra un histograma de intensidades de fluorescencia de eventos de ventana de adquisición de células vivas.

Los datos de fluorescencia se analizaron con el programa informático FlowJo 7.6.5 EN. La media geométrica, la media y la mediana de la expresión de eGEP dentro de la ventana de adquisición de células vivas se calcularon en FlowJo. Se realizó un análisis estadístico adicional con el programa informático JMP versión 10 (SAS, Böblingen, Alemania).

**Ejemplo 5**

**Correlación de la expresión de eGFP y mutaciones puntuales de C a G del fragmento del principal promotor/potenciador temprano inmediato del CMV humano.**

Se generaron y cultivaron 8 (plásmidos 16107) o 10 (plásmidos 16109 o 16111) agrupaciones de células CHO transfectadas de forma estable como se describe en el ejemplo 2. Se midieron las intensidades de eGFP como se describe en el ejemplo 4.

Las medias geométricas para las intensidades de eGEP se usaron para estudios de correlación y se presentan en diagramas (figuras 7 y 8). Para determinar diferencias significativas entre los plásmidos 16107 y 16109 en comparación con el plásmido de control 16111, se usó la prueba de Dunnett.

Se calcularon los valores de *p* de las medias geométricas de las intensidades de eGFP para diferentes puntos temporales durante el cultivo a largo plazo (tabla 3). El límite de diferencia significativa se estableció en *p* < 0,005.

**Tabla 3:** valores de *p* de medias geométricas de agrupaciones de CHO transfectadas con el plásmido 16107, 16109 o bien 16111

	Día de la transfección	valores de <i>p</i> para LSD de la prueba de Dunnett a la fecha:					
plásmido	28-01-2014	03-03	07-03	14-03	25-03	07-04	25-04
16109	28-01-2014	0,0524	0,0244*	0,0273*	0,0448*	0,0812	0,1044
16107	28-01-2014	0,8759	0,8006	0,8739	0,9792	1,0	0,9965
16111	28-01-2014	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Por ejemplo, se detectó una diferencia significativa entre el plásmido 16109 y el plásmido de control 16111 entre 6 semanas y 8 semanas después de la transfección (días de muestreo de 14-03 a 25-03) (véase la tabla 3). Los resultados del ensayo de estabilidad a largo plazo combinados con los resultados del ensayo con SEAP muestran un efecto positivo de la mutación puntual de C a G C-41 sobre la estabilidad de la expresión del gen indicador sin afectar la fuerza de promotor.

Los plásmidos 16107 y 16111 se compararon por pares en un segundo cálculo. Se representaron las medias geométricas de las intensidades de fluorescencia y se calcularon los valores de *p* usando la prueba de Dunnett (véase la tabla 4).

**Tabla 4:** valores de *p* de medias geométricas de líneas celulares de CHO 16107 y 16111

	Día de la transfección	valores de <i>p</i> para LSD de la prueba de Dunnett a la fecha:
--	------------------------	--

plásmido	28-01-2014	03-03	07-03	14-03	25-03	07-04	25-04
16107	28-01-2014	0,3898	0,1168	0,1114	0,3250	0 9603	0,9965
16111	28-01-2014	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

El plásmido 16107 muestra una estabilidad de producción incrementada en comparación con el plásmido de control, es decir, la mutación puntual de C a G C-179 incrementa la estabilidad de la expresión del gen indicador sin afectar la fuerza de promotor.

5

**Ejemplo 6**

**Quantificación de la producción de anticuerpos bajo el control de diferentes fragmentos del principal promotor/potenciador temprano inmediato del CMV humano**

10

**a) Quantificación de la producción de anticuerpos con HPLC:**

Se usó un procedimiento cromatográfico para cuantificar la cantidad de anticuerpo presente en una muestra. Se usó una columna PorosA que se une a la región Fc del anticuerpo. El anticuerpo se une a la columna y se eluye posteriormente en condiciones de pH bajo. La concentración de proteína se estableció determinando la densidad óptica (DO) a 280 nm, con una longitud de onda de referencia de 320 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado sobre la base de la secuencia de aminoácidos.

15

**b) Quantificación de la producción de anticuerpos con ELISA:**

20

La técnica ELISA (ensayo de inmunoabsorción enzimática) se basa en el principio de emparejado de anticuerpos. Un anticuerpo de captura específico para el analito de interés, por ejemplo, la parte Fc de IgG se une a una placa de microvaloración (Maxisorp, Inhouse, Roche) para crear la fase sólida. Seguidamente de las etapas de bloqueo y lavado, las muestras, los patrones (series de dilución del anticuerpo de referencia) y los controles se incuban a continuación con el anticuerpo en fase sólida, que captura el analito. Después de eliminar por lavado el analito no unido, se añade un anticuerpo de detección conjugado (por ejemplo, conjugado con POD). Este anticuerpo de detección se une a un epítipo diferente de la molécula que se mide, completando el emparejado. El POD de sustrato de ELISA de quimioluminiscencia BM (Roche, Penzberg, Alemania) proporciona una solución de sustrato del sistema de detección secundaria basado en peroxidasa (POD, HRP). La tasa de generación de señal en un inmunoensayo es directamente proporcional a la cantidad de enzima marcadora unida a la fase sólida.

25

30

**Ejemplo 7**

**Correlación de la producción/valor de anticuerpos y mutaciones puntuales de C a G del fragmento del principal promotor/potenciador temprano inmediato del CMV humano.**

35

Se examinó la concentración de anticuerpo (proteína de fusión IgG-IL2) usando tecnología ELISA y se calculó el valor de anticuerpo (ug/ml), así como la productividad específica (qP) por célula y día. Las mediciones del comienzo y el final de la fase de cultivo se presentaron para visualizar la diferencia de mutantes con respecto al control y la alteración de la expresión durante el cultivo. De este modo, los valores iniciales y finales de la fase de cultivo muestran una mejora de la producción de anticuerpos en todos los mutantes en comparación con el control (figura 10 A y B).

40

Los valores de las líneas celulares clonales se compararon con la prueba HSD de Tukey (tabla 5). Se calcularon los valores de  $p$  de la diferencia de valor de las variantes del promotor mutado con respecto a no mutado. Los valores se compararon durante la fase de cultivo. El nivel de significancia se estableció en 0,05 (5 %).

45

**Tabla 5**

		<b>Valores de <math>p</math> de la prueba HSD de Tukey, comparando el valor de IgG de mutantes con el control.</b>					
<b>Días después de la transfección:</b>		<b>68</b>	<b>83</b>	<b>97</b>	<b>124</b>	<b>127</b>	<b>131</b>
Código del mutante del promotor	CCG	0,993	0,964	0,936	0,946	0,999	0,986
	CGC	<b>0,002</b>	<b>0,003</b>	<b>0,022</b>	<b>0,094</b>	0,114	<b>0,017</b>
	CGG	0,489	0,506	0,454	0,173	0,343	0,833

Por ejemplo, los mutantes CGC fueron significativamente diferentes al control durante toda la fase de cultivo, excepto el día 127 después de la transfección.

50

La comparación de valores mostró que todas las suspensiones de células mutadas tenían una mayor productividad de anticuerpos por volumen que los controles.

5 Es necesario aclarar si la fuerza de la expresión o la concentración celular es el principal efector de la diferencia de valores.

10 Para este propósito, se compararon las expresiones de anticuerpo por célula y día (qP) de los mutantes y el control durante toda la fase de cultivo. El rendimiento de los valores de qP desde el comienzo (figura 11 A) y el final de la fase de cultivo (figura 11 B) fueron comparables a los valores del valor con una diferencia menos clara con respecto al control.

15 Se obtuvieron mayores valores para el mutante CGC y el CGG al comienzo del cultivo. Al final del cultivo, los mutantes CCG y CGG obtuvieron qP ligeramente mayores que el control. Las células mutadas CGC tenían mayores valores de qP al final de la fase de cultivo.

Las productividades específicas de líneas celulares mutadas y no mutadas se compararon con la prueba HSD de Tukey (tabla 6). De este modo, la diferencia de los mutantes CGC con respecto al control no mutado se incrementa con el tiempo. También para la mutación CCG se obtuvo un incremento de los valores de qP.

20 **Tabla 6** Valores de *p* calculados de la prueba HSD de Tukey de qP de mutantes del promotor de hCMV-MIE en comparación con el control no mutado

			<b>Valores de <i>p</i> de la prueba HSD de Tukey, comparando qP de mutantes con el control.</b>					
Días después de la transfección:			68	83	97	124	127	131
Código del mutante del promotor	CCG		0,999	0,951	0,742	0,909	0 532	1
	CGC		0,260	0,625	0,173	0,061	<b>0,042</b>	<b>&lt;0,0001</b>
	CGG		0,296	0,347	0,772	0,457	0 496	0,913

25 El nivel de significancia se estableció en 0,05 (5 %).

Teniendo en cuenta la diferencia creciente dependiente del tiempo de los valores de qP para líneas celulares mutadas individuales en comparación con las líneas celulares no mutadas, se propuso una mayor estabilidad. Para someter a prueba esta hipótesis, se calculó la alteración relativa de la productividad específica.

30 El primer día y la variación dependiente dividida de la productividad específica se estabilizó promediando los dos primeros valores de qP (PSB = día 68 y 83) y los últimos tres (EOS = día 124, 127 y 131). En una segunda etapa, se definió la alteración de qP como la proporción porcentual de los puntos finales estabilizados con respecto a los iniciales estabilizados.

$$35 \Delta qP \text{ relativo} = \frac{\text{promedio de } qP \text{ EOS}}{\text{promedio de } qP \text{ PSB}} * 100$$

Promedio qP EOS: media de las últimas tres qP  
 Promedio qP PSB: media de las dos primeras qP

40 La estabilidad a largo plazo de las líneas celulares monoclonales, que comprenden los mutantes del promotor CGC y CCG, fue mayor en comparación con el control no mutado (figura 12). El mutante del promotor G-41 fue estable durante toda la fase de cultivo, mientras que la mutación puntual G-179 da como resultado una expresión de IgG incrementada (media del % de ΔqP) con el tiempo. La doble mutación CGG tenía valores de expresión altos al comienzo, pero disminuye con el tiempo.

45 **Tabla 7**

Comparación de los promedios de ΔqP de los mutantes con respecto al control. Valores de <i>p</i> de la prueba HSD de Tukey.			
Código del mutante del promotor	N	Valores de <i>p</i>	promedios de ΔqP [%]
CGG	18	0,9393	71

## ES 2 821 940 T3

CGC	21	<b>0,0007</b>	118
CCG	18	<b>0,0393</b>	101
CCC	22	1	63

El % de los  $\Delta qP$  de líneas celulares clonales se comparó a un nivel de significancia de 0,05 (5 %).

- 5 **Las líneas celulares monoclonales que comprenden las variantes del promotor de hCMV-MIE CGC (16135) y CCG (16136) son significativamente más estables que el control no mutado (21504).**

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> F. Hoffmann-La Roche AG	
5	<120> Procedimiento para la producción de polipéptidos	
	<130> P32141-WO	
	<150> EP14168901.8	
10	<151> 19/05/2014	
	<150> EP14191705.4	
	<151> 04/11/2014	
15	<160> 6	
	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
20	<211> 601	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 1	
	gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata	60
	gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc	120
	ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag	180
	ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgccac ttggcagtac	240
	atcaagtgta tcatatgcc agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggccc	300
	cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg	360
	tattagtcac cgctattagc atgggtgatgc ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat	420
	agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt	480
	tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc	540
	aaatgggccc taggcgtgta cgggtggagg tctatataag cagagctccg tttagtgaac	600
25	g	601
	<210> 2	
	<211> 601	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> mutante de hCMV-MIE	
35	<400> 2	
	gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata	60
	gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc	120
	ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag	180
	ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgccac ttggcagtac	240

ES 2 821 940 T3

atcaagtgta tcatatgccca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccc 300  
 cctggcatta tgcccagtag atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 360  
 tattagtcac cgctattagc atgggtgatgc ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat 420  
 agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt 480  
 tttggcacca aaatcaacg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc 540  
 aaatgggccc taggcgtgta ggggaggagg tctatataag cagagctccg tttagtgaac 600  
 g 601

<210> 3  
 <211> 601  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> mutante de hCMV-MIE

<400> 3  
 gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata 60  
 gccatataat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc 120  
 ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 180  
 ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtag 240  
 atcaagtgta tcatatgccca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccc 300  
 cctggcatta tgcccagtag atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 360  
 tattagtcac cgctattagc atgggtgatgc ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat 420  
 aggggttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt 480  
 tttggcacca aaatcaacg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc 540  
 aaatgggccc taggcgtgta cgggaggagg tctatataag cagagctccg tttagtgaac 600  
 g 601

<210> 4  
 <211> 876  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> eGFP

<400> 4  
 atgggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtgggtgc ccatcctggt cgagctggac 60  
 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120  
 ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180

ES 2 821 940 T3

ctcgtgacca ccctgacctg cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240  
cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300  
ttcaaggacg acggcaacta caagaccgac gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360  
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420  
aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480  
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540  
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600  
tacctgagca cccagtcgac cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660  
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagtcc 720  
ggactcagat ctcgagctca agcttcgaat tctgcagtcg acggtaccgc gggcccggga 780  
tccaccggat ctagacatgg cttcccggcg gaggtggagg agcaggatga tggcacgctg 840  
cccatgtctt gtgcccagga gagcgggatg gaccgt 876

<210> 5  
<211> 1524  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

5

<400> 5

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactccatc 60  
atcccagttg aggaggagaa tccggacttc tggaaccgag aggcagccga ggcctgggt 120  
gccgccaaga agctgcagcc tgcacagaca gccgccaaga acctcatcat cttcctgggc 180  
gatgggatgg ggggtgtctac ggtgacagct gccaggatcc taaaagggca gaagaaggac 240  
aaactggggc ctgagatacc cctggccatg gaccgcttcc catatgtggc tctgtccaag 300  
acatacaatg tagacaaaca tgtgccagac agtggagcca cagccaaggc ctacctgtgc 360  
ggggtcaagg gcaacttcca gaccattggc ttgagtgcag ccgcccgtt taaccagtgc 420  
aacacgacac gcggaacga ggtcatctcc gtgatgaatc gggccaagaa agcagggaag 480  
tcagtgggag tggttaaccac cacacgagtg cagcacgcct cgccagccgg cacctacgcc 540  
cacacggtga accgcaactg gtactcggac gccgacgtgc ctgcctcggc ccgcccaggag 600  
gggtgccagg acatcgctac gcagctcatc tccaacatgg acattgacgt gatcctaggt 660  
ggaggccgaa agtacatgtt tcgcatggga accccagacc ctgagtacc agatgactac 720  
agccaaggtg ggaccaggct ggacgggaag aatctgggtc aggaatggct ggcgaagcgc 780  
caggggtgcc ggtatgtgtg gaaccgcaact gagctcatgc aggttccct ggaccctct 840  
gtgaccatc tcatgggtct ctttgagcct ggagacatga aatacgagat ccaccgagac 900  
tccacactgg acccctccct gatggagatg acagaggctg ccctgcgcct gctgagcagg 960

10

ES 2 821 940 T3

aacccccgcg gcttcttcct cttcgtggag ggtggtcgca tcgacatgg tcatcatgaa 1020  
 agcagggctt accgggact gactgagacg atcatgttcg acgacgccat tgagagggcg 1080  
 ggccagctca ccagcgagga ggacacgctg agcctcgtca ctgccgacca ctcccacgtc 1140  
 ttctccttcg gaggctacct cctgcgaggg agctccatct tcgggctggc ccctggcaag 1200  
 gcccgggaca ggaaggccta cacggcctc ctatacggaa acggccagg ctatgtgctc 1260  
 aaggacggcg cccggccgga tgttaccgag agcgagagcg ggagccccga gtatcggcag 1320  
 cagtcaacag tgcccctgga cgaagagacc cacgcagggc aggacgtggc ggtgttcgcg 1380  
 cgcgccccgc agggcacct gggtcacggc gtgcaggagc agacctcat agcgcacgtc 1440  
 atggccttcg ccgctgcct ggagccctac accgcctgcg acctggcgcc ccccgccggc 1500  
 accaccgacg ccgcgcaccc ggggt 1524

<210> 6  
 <211> 601  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

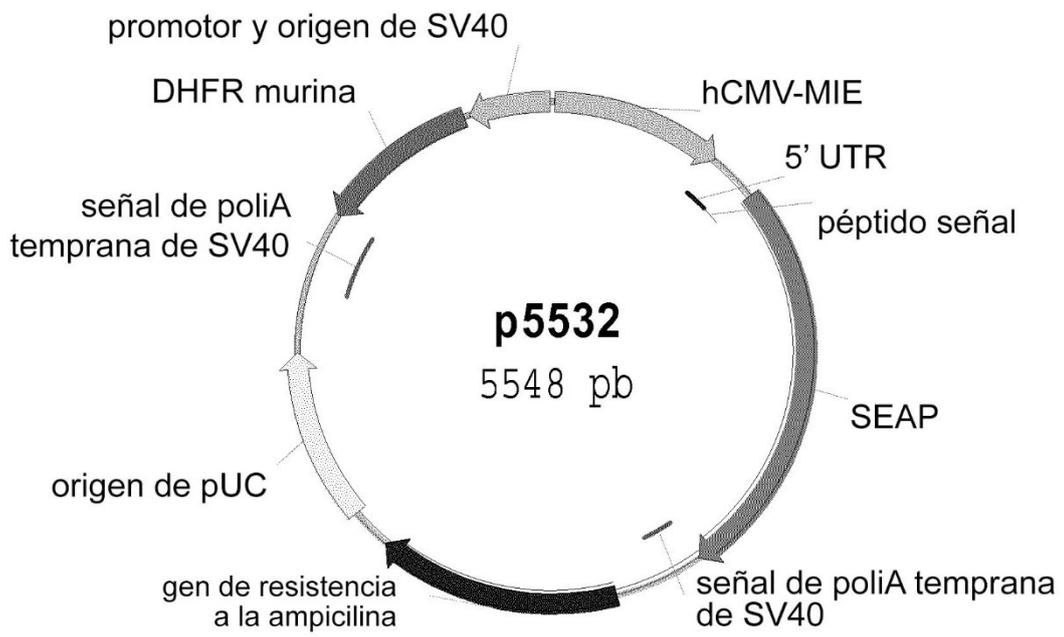
<220>  
 <223> mutante de hCMV-MIE

<400> 6  
 gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacggggtca ttagttcata 60  
 gccatataat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc 120  
 ccaacgacct ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 180  
 ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac 240  
 atcaagtgta tcatatgcc agtacgcccc ctattgacgt caatgacggg aatggccccg 300  
 cctggcatta tgcccagtac atgacottat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 360  
 tattagtcac cgctattagc atggtgatgc ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat 420  
 aggggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt 480  
 tttggcacca aatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc 540  
 aatggggcgg taggcgtgta ggtggggagg tctatataag cagagctccg tttagtgaac 600  
 g 601

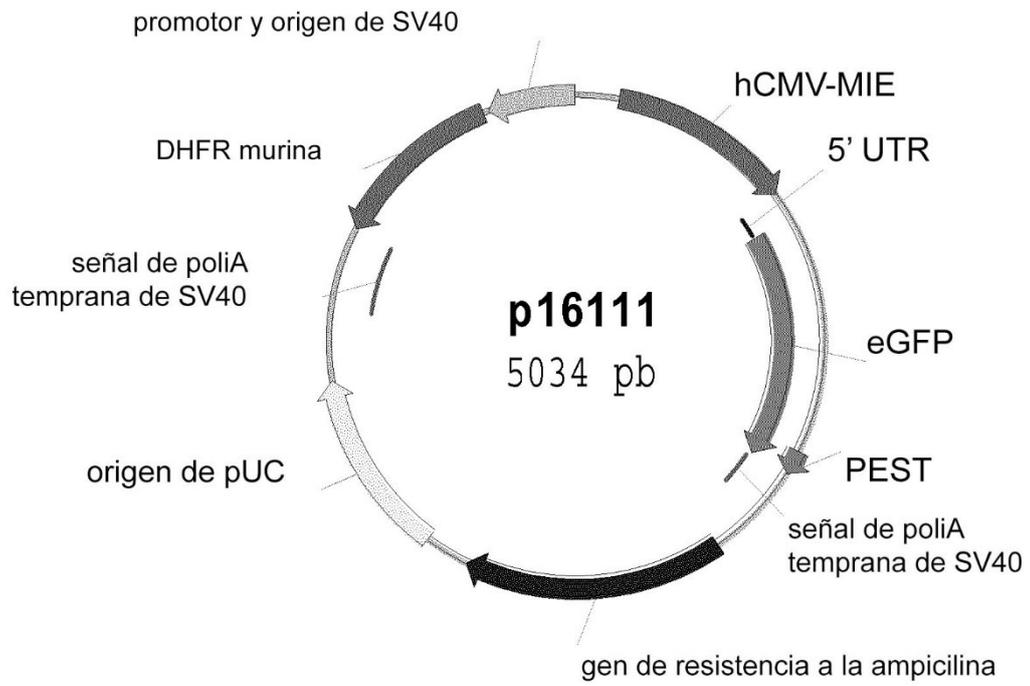
**REIVINDICACIONES**

1. Promotor que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 02.
- 5 2. Un ácido nucleico caracterizado por que consiste en el ácido nucleico de SEQ ID NO: 02 y tiene una fuerza de promotor de al menos un 80 % del principal promotor temprano inmediato del CMV humano de SEQ ID NO: 01 cuando está enlazado de forma funcional al ácido nucleico de SEQ ID NO: 04.
- 10 3. Procedimiento para la producción de un polipéptido, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
  - a) transfectar una célula eucariota con un ácido nucleico que comprende un casete de expresión que comprende un primer ácido nucleico de SEQ ID NO: 02 enlazado de forma funcional a un segundo ácido nucleico que codifica el polipéptido,
  - 15 b) seleccionar una célula transfectada en la etapa a),
  - c) cultivar la célula seleccionada de la etapa b),
  - 20 d) recuperar el polipéptido de la célula o el medio de cultivo, y producir de este modo el polipéptido.
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la producción es una producción a gran escala.
5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, en el que el polipéptido es una cadena ligera de inmunoglobulina o una cadena pesada de inmunoglobulina o una variante de la misma o un fragmento de la misma o una fusión de la misma
- 25 6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, caracterizado por que el ácido nucleico comprende un casete de expresión adicional que codifica un marcador de selección.
- 30 7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, caracterizado por que dicha célula eucariota es una célula de mamífero.
8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por que dicha célula de mamífero es una célula CHO, una célula BHK, una célula HEK, una célula Sp2/0 o una célula Per.C6@.
- 35 9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por que dicha célula de mamífero es una célula CHO o una célula HEK.
- 40 10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, caracterizado por que dicho polipéptido es una inmunoglobulina, o un fragmento de inmunoglobulina, o un conjugado de inmunoglobulina.
11. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, caracterizado por que dicho marcador de selección es una dihidrofolato reductasa, una aminoglucósido fosfotransferasa o una higromicina-fosfotransferasa.
- 45 12. Uso de un promotor que consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 02 para la producción de un polipéptido.
13. Una célula que comprende el promotor de acuerdo con la reivindicación 1 o el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2.

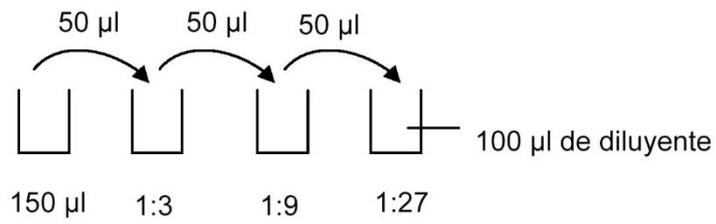
**Fig. 1**



**Fig. 2**

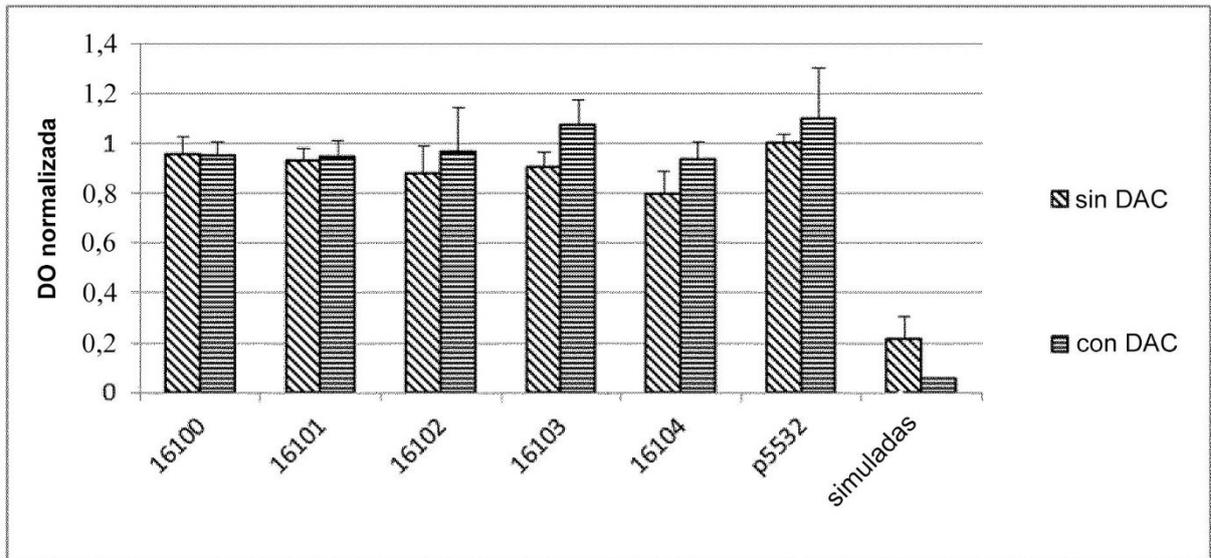


**Fig. 3**

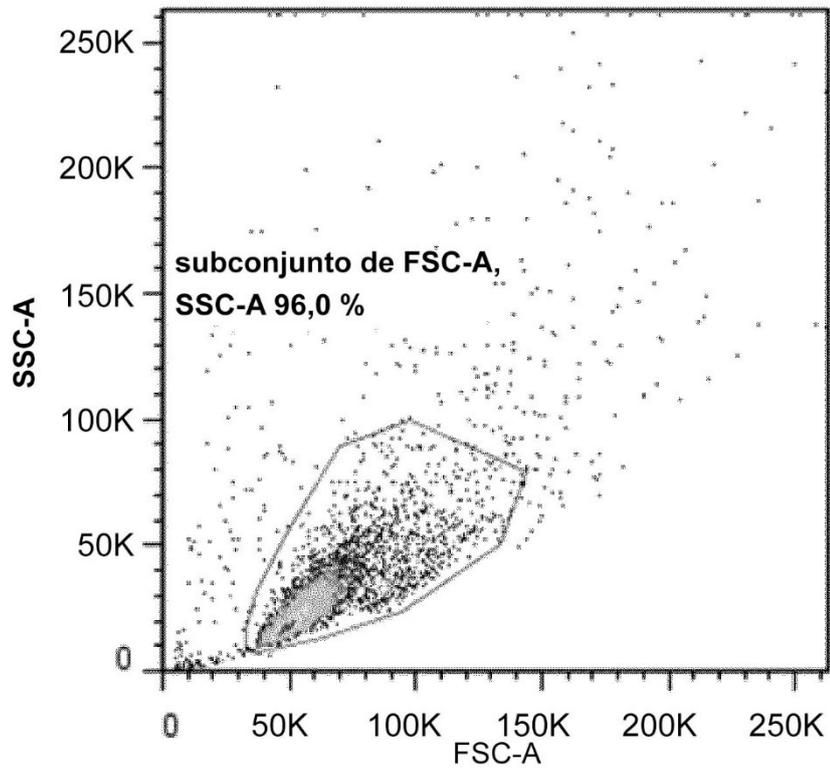


Cultivo celular centrifugado  
sobrenadante (13.000  
rpm, 2 min)

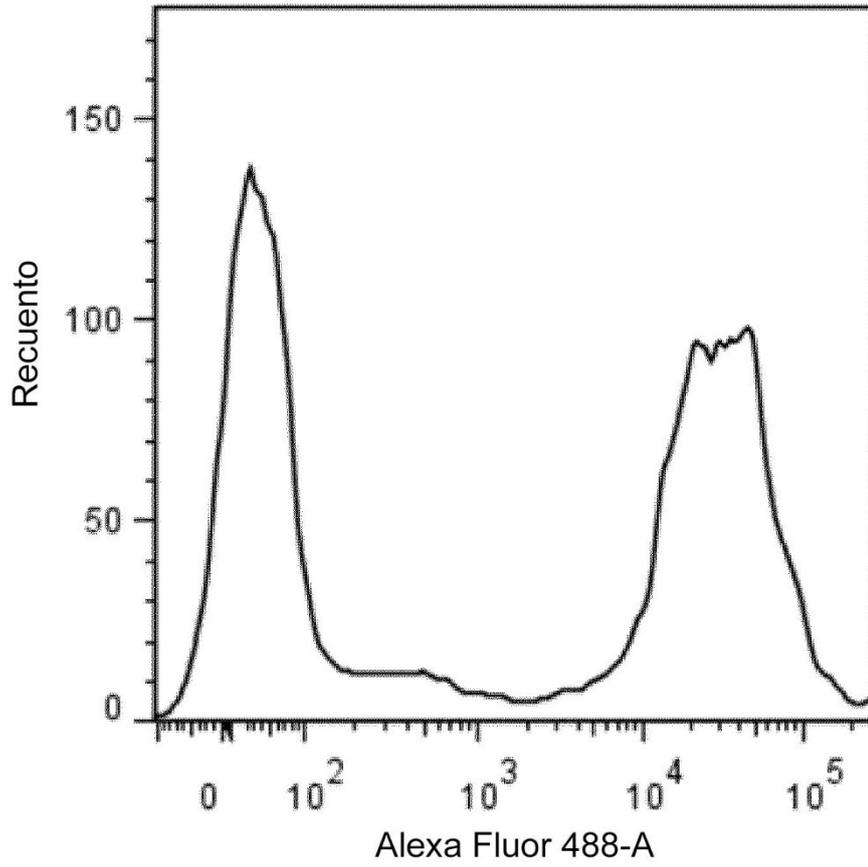
**Fig. 4**



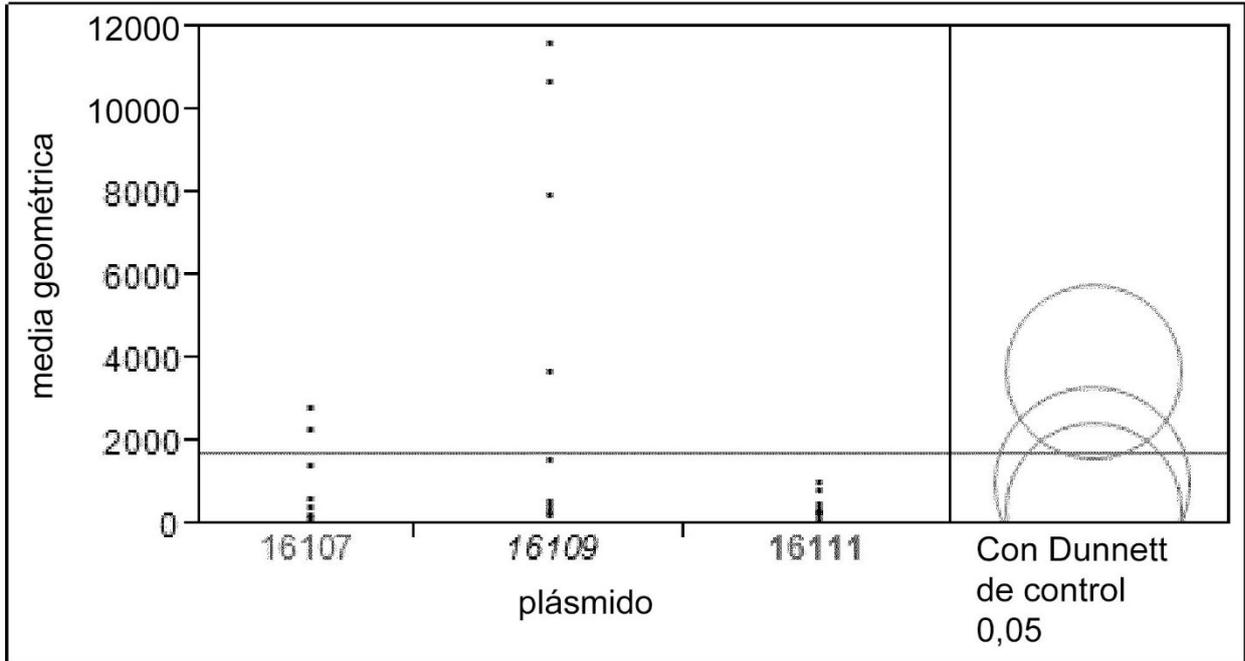
**Fig. 5**



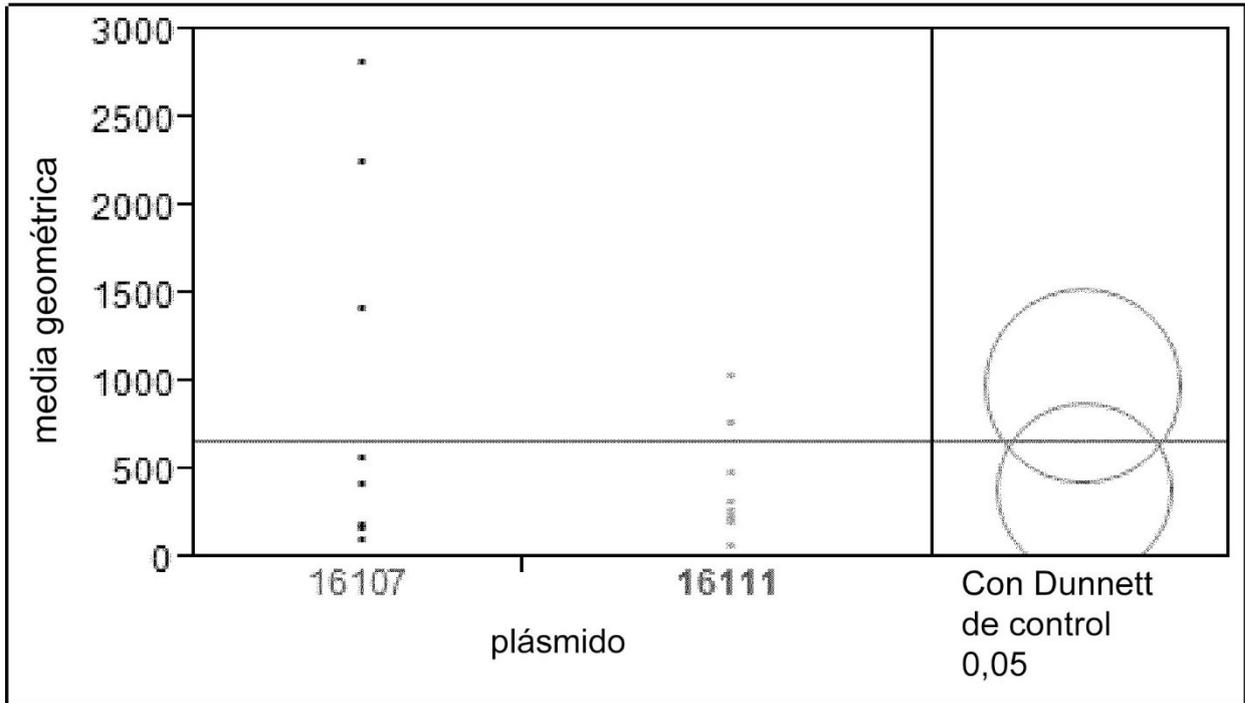
**Fig. 6**



**Fig. 7**



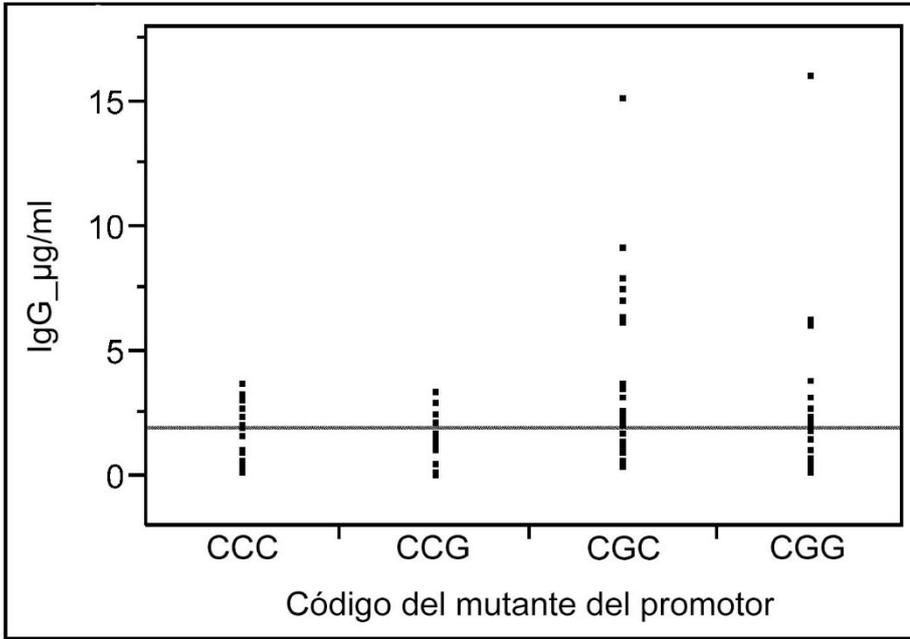
**Fig. 8**



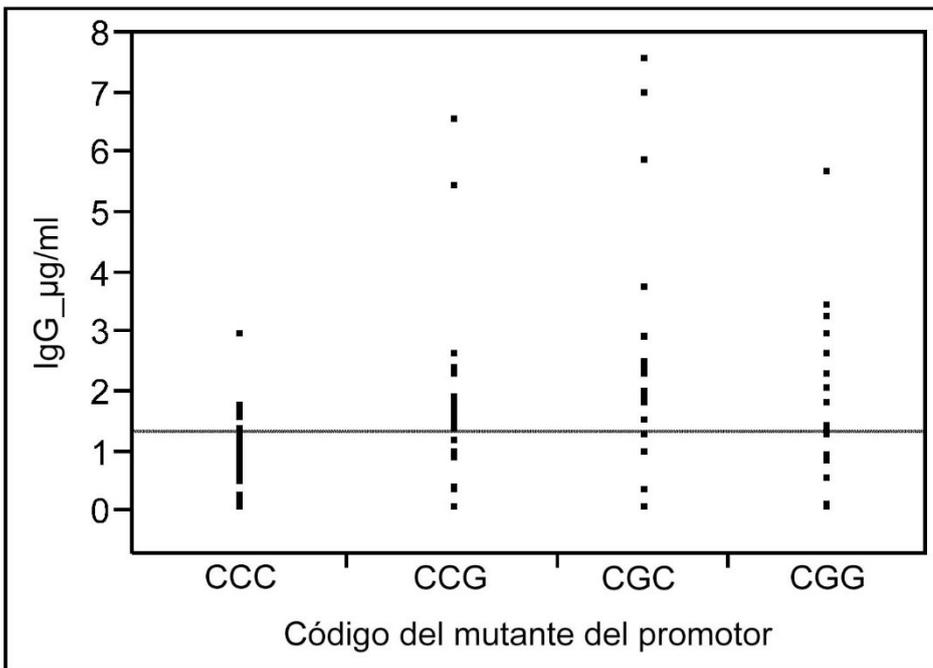


**Fig. 10**

**A)**

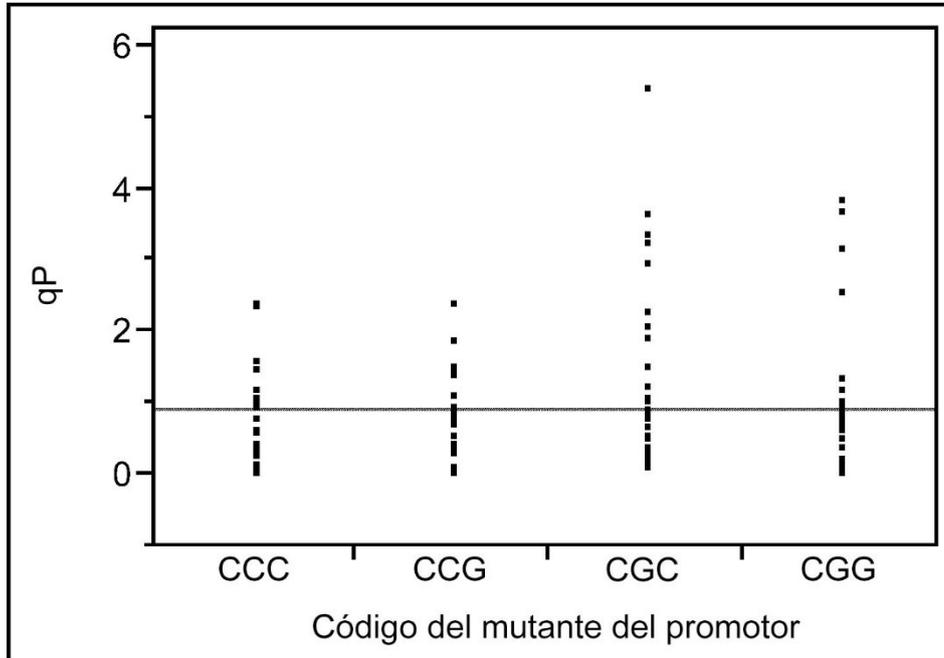


**B)**

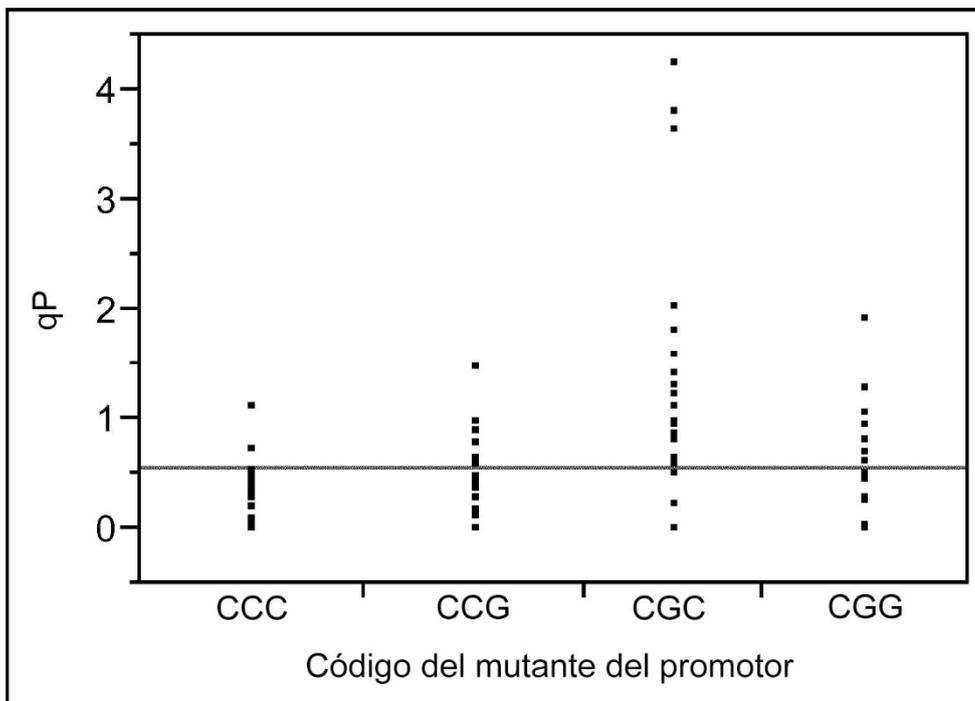


**Fig. 11**

**A)**



**B)**



**Fig. 12**

