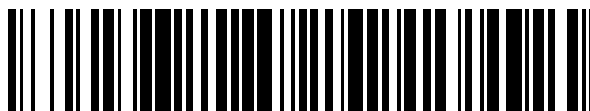


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 003**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/10** (2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07838397 .3**
- 96 Fecha de presentación: **18.09.2007**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2064337**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.06.2009**

54 Título: **Un sistema basado en FACS y en la proteína indicadora para un desarrollo de alto rendimiento de proteínas terapéuticas**

30 Prioridad:  
**20.09.2006 US 846223 P**  
**27.09.2006 US 847705 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.10.2012**

73 Titular/es:  
**GENZYME CORPORATION**  
**500 KENDALL STREET**  
**CAMBRIDGE, MA 02142, US**

72 Inventor/es:  
**DEMARIA, Christine;**  
**ESTES, Scott;**  
**KAREY, Kenneth P. y**  
**CAIRNS, Victor**

74 Agente/Representante:  
**Ponti Sales, Adelaida**

**ES 2 388 003 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

Un sistema basado en FACS y en la proteína indicadora para un desarrollo de alto rendimiento de proteínas terapéuticas

5

**Notas:**

El archivo contiene información técnica enviada tras la presentación de esta solicitud y no se ha incluido en esta memoria descriptiva.

10

## SOLICITUDES RELACIONADAS

**[0001]** Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos N° 60/847.705, presentada el 27 de septiembre de 2006 y la Solicitud Provisional de los Estados Unidos N° 60/846.223, presentada el 20 de septiembre de 2006. Las enseñanzas completas de las anteriores solicitudes se incorporan en la presente memoria descriptiva por referencia.

15

## CAMPO DE LA INVENCION

**[0002]** Esta divulgación se refiere en general a sistemas de alto rendimiento para identificar clones de elevada producción útiles para la producción de proteínas terapéuticas y diagnósticas.

20

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

**[0003]** La producción comercial de una proteína terapéutica requiere una línea celular estable de elevada expresión recombinante. Los procedimientos de la técnica anterior se han basado en líneas de células de Ovario de Hámster Chino (CHO) deficientes en dihidrofolato reductasa (DHFR) para fabricar líneas de células clonales que producen la (s) proteína (s). Se obtuvieron clones de elevada producción después de selección repetida basándose en la amplificación de combinados de células transfectadas utilizando tales agentes como metotrexato (MTX). Este procedimiento lleva tiempo y necesita mucha mano de obra y no identifica específicamente los clones que producirán proteínas a elevados niveles.

30

**[0004]** Se han utilizado la citometría de flujo o las FACS para mejorar el desarrollo y la selección de líneas de células CHO de elevada producción. Esta tecnología ha permitido la rápida identificación y aislamiento de clones de elevada producción a partir de una población heterogénea de células transfectadas disminuyendo por tanto el trabajo y el tiempo asociados con los procedimientos de clonación aleatorios. Pueden identificarse las células deseadas sin necesidad de la amplificación de MTX repetida de los combinados.

35

**[0005]** Una vez que se han aislado los clones de células individuales mediante un procedimiento de clasificación basado en FACS, sin embargo, seleccionar un número adecuado de clones para aislar una línea de células estables de elevada producción sigue siendo un procedimiento que lleva tiempo. De este modo, un procedimiento de selección muy eficaz y preciso es extremadamente ventajoso en esta etapa de desarrollo de la línea celular. Además de implementar una selección en la etapa de desarrollo del clon en la placa de 96 pocillos, es deseable, por ejemplo que se centre adicionalmente en la expansión solo de los clones con elevada productividad. El análisis de la cosecha de los medios de cultivo celular se utiliza comúnmente para identificar los clones que secretan elevados niveles de una proteína terapéutica. Sin embargo, este procedimiento no es óptimo y no tiene en cuenta las diferencias tanto en la densidad celular como en el volumen de los medios entre pocillos. Como tal, puede no predecir de manera precisa los clones con elevada productividad específica y elevada titulación. También, debe emplearse esfuerzo más a menudo para desarrollar y optimizar un nuevo ensayo por cada proteína terapéutica de interés.

40

45

50

**[0006]** De esta manera, existe una necesidad en la técnica de composiciones y procedimientos para cribar poblaciones clonales para seleccionar líneas de células recombinantes que produzcan de manera estable elevados niveles de la proteína de interés. Esta invención satisface esta necesidad y proporciona también ventajas relacionadas.

55

**[0007]** El documento WO 01/57212 da a conocer un procedimiento para identificar una célula hospedadora que presenta una expresión regulada de un gen de prueba proporcionando una pluralidad de células hospedadoras, comprendiendo cada célula hospedadora un polinucleótido, comprendiendo el polinucleótido en orden un promotor regulable; un gen de prueba; una secuencia IRES; y una secuencia de codificación de un marcador superficial, en la que el marcador superficial comprende una secuencia señal de secreción una proteína con etiqueta detectable, y un anclaje de la membrana, en el que la expresión de dicho gen de prueba da como resultado también la expresión de dicho marcador superficial; induciendo dicho promotor; y seleccionando una célula hospedadora que expresa dicho marcador superficial sobre su superficie..

60

65

**[0008]** GAINS P y col: "pIRES-CD4t, a dicistronic expression vector for MACS- or FACS-based selection of transfected cells" BIOTECHNIQUES, Vol. 26, no.4, Abril de 1999, páginas 683 – 688, da a conocer un vector plásmido que dirige la expresión simultánea de los ADNc heterólogos, y un casete situado en 3' que codifica un marcador CD4 truncado. Un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del virus de la encefalomiocarditis media en el inicio de la traducción desde este casete 3', y un promotor del citomegalovirus impulsa la expresión del transcrito dicistónico. MEDIN J A y col: "A bicistronic therapeutic retroviral vector enables sorting of transduced CD34 + cells and corrects the enzyme deficiency in cells from Gaucher patients" BLOOD, vol.87, no. 5, 1 de marzo de 1996, páginas 1754 – 1762, da a conocer un retrovirus recombinante bicistónico que libera un ADNc de una glucocerebrosidasa terapéutica (GC) para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher, y un pequeño antígeno superficial celular de murino (antígeno térmicamente estable [HSA]) como un marcador seleccionable.

#### RESUMEN DE LA INVENCIÓN

**[0009]** La presente invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

**[0010]** Se dan a conocer los procedimientos para identificar, seleccionar y producir una población de células hospedadoras eucariotas recombinantes que expresan de manera estable un polipéptido de interés ("polipéptido diana") a elevados niveles, adecuado para la producción a gran escala del polipéptido diana. La célula hospedadora eucariota utilizada en estos procedimientos contiene o comprende un polinucleótido recombinante, en el que el polinucleótido recombinante comprende un elemento promotor; un polipéptido que codifica un polipéptido marcador superficial celular; un polinucleótido que codifica un polipéptido diana; y un polipéptido que tiene la actividad biológica de un polinucleótido de un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), y en el que el polinucleótido IRES se localiza dentro de polinucleótido recombinante de tal manera que el polinucleótido marcador superficial celular y el polinucleótido diana se transcriben en el mismo ARNm. En una realización alternativa, el polinucleótido recombinante incluye un codón de inicio alternativo para el inicio de la traducción. El codón de inicio alternativo puede estar en adición al elemento IRES o alternativamente, se puede sustituir por el elemento IRES. Las células hospedadoras recombinantes se unen mediante un agente que se une, directa o indirectamente al marcador superficial celular, y a continuación dichas células se seleccionan y aíslan. Las células seleccionadas y aisladas se preparan a continuación en una o más poblaciones clonales y se cultivan durante un periodo de tiempo. A continuación se analizan las poblaciones clonales detectando el nivel de expresión del marcador superficial celular de dicha población clonal y se seleccionan una o más poblaciones clonales con elevados niveles de expresión del marcador superficial celular. Las poblaciones clonales seleccionadas con elevados niveles de expresión del marcador superficial celular indican poblaciones clonales con niveles de expresión estables y elevados del polipéptido diana. Las células seleccionadas mediante estos procedimientos se pueden cultivar adicionalmente en condiciones que permitan la producción del polipéptido diana que también está presente en la célula hospedadora. El polipéptido diana puede aislarse adicionalmente de las células o medios de cultivos de células según sea adecuado.

**[0011]** Se dan a conocer también en la presente memoria descriptiva los productos producidos por los procedimientos anteriormente señalados y los ensamblajes de componentes necesarios para llevar a cabo los procedimientos.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**[0012]** La **Figura 1** es un diagrama del casete de expresión génica. En una realización de esta invención, los ADN que codifican el polipéptido terapéutico y el polipéptido CD20 se unieron mediante un IRES, de tal manera que se transcribieron en el mismo ARNm pero se tradujeron de manera independiente.

**[0013]** Las **Figuras 2A y 2B** muestran que la selección mediante FACS basada en CD20 identificó de manera precisa clones con títulos de receptor muy solubles. Se sembraron las células en placas de 6 pocillos a  $5 \times 10^5$  células/ml, y se ensayaron en el día 3 mediante análisis FACS (**Figura 2A**) de la expresión de CD20 superficial celular y el análisis de la proteína A mediante HPLC (**Figura 2B**) de los medios acondicionados (barras abiertas en cada gráfica). Los clones se ponderaron en matraces de 125 ml con agitación y se ensayaron para el título de proteína (barras rayadas en cada gráfica). Para los resultados de la FACS, cada barra representó una medida de la media geométrica de la intensidad de la fluorescencia, cuantificada en unidades relativas de fluorescencia (RFU).

**[0014]** Las **Figuras 3A y 3B** muestran que la selección mediante FACS basada en CD20 identifica de manera precisa clones con elevados títulos de anticuerpos. Tras alcanzar un 80 – 90 % de confluencia en una placa de 96 pocillos, se sembraron las células totales de cada pocillo en un pocillo de una placa de 6 pocillos. Después de 7 días, se ensayaron las células mediante el análisis FACS (**Figura 3A**) de expresión de CD20 superficial celular y un análisis de la proteína A mediante HPLC (**Figura 3B**) de los medios acondicionados (barras abiertas en cada gráfica). Los clones se ponderaron en matraces de 125 ml con agitación y se ensayaron para el título del anticuerpo (barras rayadas en cada gráfica). En estos clones, CD20 se expresó simultáneamente con la cadena pesada del anticuerpo, mientras que la cadena ligera se expresó por separado. Para los resultados de la FACS, cada barra representó una medida de la media geométrica de la intensidad de la fluorescencia, cuantificada en unidades relativas de

fluorescencia (RFU).

**[0015]** Las **Figuras 4A a 4C** muestran la selección mediante FACS cuantitativa y cualitativa de clones en la etapa de 96 pocillos. En la Figura 4A, los clones CHO que expresaban un receptor soluble se cribaron mediante FACS por etapas en una placa de 96 pocillos y en una placa de 6 pocillos. La selección de clones en la criba de 96 pocillos mediante FACS (barras rayadas) fue muy similar a la de la criba en una placa de 6 pocillos mediante FACS (barras abiertas). Cada barra representó una medida de la media geométrica de la intensidad de la fluorescencia, cuantificada en unidades relativas de fluorescencia (RFU). En la Figura 4B, los perfiles FACS de la placa de 96 pocillos de dos clones representativos que expresaban un receptor soluble mostraron la correlación entre los datos de FACS y los títulos de la proteína final en cultivos de matraces sin agitación de lotes sin alimentar. En la Figura 4C, para que las células expresaran una IgG, los perfiles de la FACS de dos pocillos de una placa de 96 pocillos se revistieron para ilustrar la diferencia cualitativa entre poblaciones celulares con intensidades de fluorescencia casi idénticas (127,5 y 127,1 RFU para los pocillos 4G2 y 7G4, respectivamente).

**[0016]** La **Figura 5** muestra que la disminución clonal en la productividad de la proteína terapéutica disminuye en paralelo con la expresión de CD20. Se tiñeron los clones con anticuerpo dirigido contra CD20 conjugado con PE en la etapa de la placa de 96 pocillos; estos resultados se clasificaron en orden descendente (barras abiertas). A continuación los clones se ponderaron en matraces de 125 ml con agitación y se ensayaron para la productividad específica (SPR) a las 24 horas (barras rayadas). A las 24 horas de cultivo del matraz con agitación, se analizaron también las células mediante FACS tras teñirlas con anticuerpo dirigido contra CD20 conjugado con FITC (barras punteadas). Para los resultados de la FACS, cada barra representó una medida de la media geométrica de la intensidad de la fluorescencia, cuantificada en unidades relativas de fluorescencia (RFU).

**[0017]** Las **Figuras 6A a 6C** muestran que la criba de clones mediante FACS basada en CD20 identificaron clones inestables durante la ponderación. Se muestran la criba mediante FACS representativa y el título de IgG de dos clones que se seleccionaron para desarrollo adicional por criba mediante FACS de placas de 96 pocillos. La Figura 6A muestra los resultados de criba mediante FACS de placas de 96 pocillos y los títulos iniciales de matraces con agitación sin alimentar. La Figura 6B muestra los resultados de la FACS de matraces con agitación (día 3) y los títulos de IgG (día 14) después de 3 semanas adicionales en cultivo. La Figura 6C muestra los resultados de la FACS de matraces con agitación (día 3) y los títulos de IgG (día 14) después de otras 3 semanas en cultivo.

**[0018]** La **Figura 7** es un diagrama de un casete de expresión génica que utiliza un codón de inicio alternativo. En un ejemplo del vector de expresión de mamífero utilizado, el ADN que codifica el polipéptido CD59 contenía el codón GTG de inicio alternativo para el inicio de la traducción. El ADN que codificaba el polipéptido terapéutico contenía en el codón ATG de inicio para el inicio de la traducción y se localizó en la dirección 3' del ADN que codificaba la proteína CD59. Las secuencias de ADN que codificaban cada polipéptido se transcribieron en el mismo ARNm, y la traducción mediada por 5'-cap se inició tanto en el codón de inicio GTG como en el codón de inicio ATG, siendo el primero menos eficaz y por tanto menos probable de haberse producido.

**[0019]** La **Figura 8** ilustra que alterar el codón de inicio ATG dio como resultado la disminución de la expresión en el polipéptido CD59. Se transfectaron células CHO con vectores de expresión que codificaban tanto un codón de inicio ATG como un codón de inicio GTG. Para ambas secuencias de ADN, se cambiaron los tripletes interno ATG para evitar el inicio interno de la traducción. Las células transfectadas se hicieron crecer como combinados y se analizaron para la expresión de CD59 mediante incubación con un anticuerpo dirigido contra CD59 conjugado con FITC. Se llevó a cabo el análisis mediante FACS de los dos combinados representativos que expresaban CD59. Para un combinado que expresa CD59 con un codón de inicio sin alterar (ATG), el 99 % de la población fue positivo para la expresión de CD59. En contraste, para un combinado que expresa CD59 con un codón de inicio alterado (GTG), solo fue positivo un 4 % de la población para la expresión de CD59. Se cuantificó el porcentaje de células CD59 positivas como el del antecedente anterior (células sin transfectar).

#### DESCRIPCION DETALLADA

**[0020]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, algunos términos tienen los siguientes significados definidos.

#### *Definiciones*

**[0021]** La práctica de la presente divulgación empleará, a no ser que se indique otra cosa, técnicas convencionales de inmunología biología molecular, microbiología, biología celular y ADN recombinante, que se encuentran comprendidas dentro del alcance de los conocimientos del experto en la técnica. Véanse, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª edición (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, y col. eds., (1987)); la serie METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE (R.I. Freshney, ed. (1987)).

**[0022]** Tal como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las formas singulares “uno”, “una” y “el/la” incluyen las referencias plurales a no ser que el contexto dicte claramente otra cosa. Por ejemplo, el término “una célula” incluye una pluralidad de células, incluyendo sus mezclas.

5

**[0023]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “que comprende”, se pretende que signifique que las composiciones y procedimientos incluyen los elementos enumerados, pero no excluyen otros. “Que consiste esencialmente de” cuando se usa para definir composiciones y procedimientos, significará que excluye otros elementos de cualquier significación esencial para la combinación. De esta manera, una composición que consiste esencialmente de los elementos tal como se define en la presente memoria descriptiva no excluiría contaminantes traza procedentes del procedimiento de aislamiento y purificación y vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina tamponada con fosfato, conservantes, y similares. “Que consiste de” significará que excluye más que los elementos traza de otros ingredientes y etapas del procedimiento sustancial para administrar las composiciones de esta invención. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición se encuentran comprendidas dentro del alcance de esta divulgación.

**[0024]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “polinucleótido” se dirige a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a un gen o un fragmento génico, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácidos nucleicos, y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos.

**[0025]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “IRES” o “un polinucleótido que tiene la actividad biológica de IRES” se pretende que incluya cualquier molécula tal como un polinucleótido o su transcrito inverso que sea capaz de iniciar la traducción del polinucleótido unido de manera operativa al IRES sin el beneficio de un sitio caperuza en una célula eucariota. Un IRES o un polinucleótido que tiene la actividad biológica de IRES puede ser idéntico a las secuencias que se encuentran en la naturaleza, tales como el IRES de picornavirus, o pueden ser secuencias no naturales o no nativas que llevan a cabo la misma función cuando se introducen en una célula hospedadora adecuada.

**[0026]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva “codón de inicio alternativo” se pretende que incluya cualquier polinucleótido no ATG (normalmente un triplete) que funciona como un sitio de entrada para el inicio de la traducción con eficacia reducida con respecto a la de un codón de inicio ATG. Véase, por ejemplo, la Figura 8. Se conoce en la técnica la utilización del codón de inicio alternativo que se produce naturalmente descrita por ejemplo en Kozak (1991) J. Cell Biol. 115 (4): 887-903; Mehdi y col. (1990) Gene 91: 173 – 178; Kozak (1989) Mol. Cell. Biol. 9 (11): 5073 – 5080. En general, los codones de inicio alternativos tienen disminuidas las eficacias de traducción en comparación con las de un ATG; por ejemplo, el codón de inicio alternativo GTG puede tener una eficacia de traducción del 3 – 5 % en comparación con la de un ATG (100 %). La eficacia de traducción de un codón de inicio alternativo puede estar afectada también por su contexto de secuencia; por ejemplo, una secuencia consenso Kozak óptima se informa que tiene un efecto positivo sobre el inicio de la traducción en codones de inicio alternativos (Mehdi y col. (1990) Gene 91: 173 – 178; Kozak (1989) Mol. Cell. Biol. 9 (11): 5073 – 5080). La secuencia consenso Kozak completa es GCCRCCATGG en la que el codón de inicio ATG está subrayado. La A del codón de inicio ATG se designa como en la posición + 1, y “R” en la posición -3 es una purina (A o G). Las dos posiciones más altamente conservadas son una purina, preferiblemente una A, en -3 y una G en + 4 (Kozak (1991) J Cell Biol 115 (4): 887 – 903). Se describe la utilización del codón de inicio alternativo para la expresión atenuada de un marcador seleccionable en la Publicación de Patente de los Estados Unidos 2006/0172382 y en la Publicación de Patente de los Estados Unidos 2006/0141577. Un experto en la técnica reconocerá que las secuencias descritas en la presente memoria descriptiva como ADN tendrán secuencias correlativas como moléculas de ARN, por ejemplo, el ATG de una secuencia de ADN, por ejemplo, correspondería a el AUG de una secuencia de ARN.

**[0027]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, un “elevado nivel de expresión” se refiere a un nivel de expresión que es mayor que el nivel de expresión de al menos 50, 70, 80, 90, 95 o 99 % de las células totales analizadas.

55

*Ensamblajes, células y procedimientos*

**[0028]** Para mejorar la fiabilidad y el rendimiento de la selección de clones y para identificar las células que expresan de manera estable un polipéptido diana a elevados niveles, la divulgación proporciona procedimientos que comprenden:

60

(a) poner en contacto al menos una célula hospedadora eucariota recombinante que contiene un polinucleótido recombinante, en la que el polinucleótido recombinante comprende un elemento promotor; un polinucleótido que codifica un polipéptido marcador superficial celular; un polinucleótido que codifica un polipéptido diana; y un polinucleótido que tiene la actividad biológica de un polinucleótido de un sitio

65

- interno de entrada al ribosoma (IRES) o un codón de inicio alternativo, y en el que el polinucleótido IRES o el codón de inicio alternativo está localizado en el interior del polinucleótido recombinante de tal manera que el polinucleótido marcador superficial celular y el polinucleótido diana se transcriben sobre el mismo ARNm, y en el que el cultivo es en condiciones tales que el polipéptido marcador superficial celular se expresa sobre la superficie de la célula hospedadora, con un agente detectable que reconoce y se une directa o indirectamente al marcador superficial celular, si se encuentra presente, sobre la superficie de la célula hospedadora, estableciéndose dicho contacto en condiciones que favorezcan la unión del agente con el marcador superficial celular;
- 5 (b) seleccionar cualquier célula hospedadora que se una directa o indirectamente al agente;
- 10 (c) preparar una o más poblaciones locales de las células hospedadoras de la etapa (b); y
- (d) analizar una o más poblaciones clonales de la etapa (c) detectando el nivel de expresión del marcador superficial celular sobre dicha población clonal y seleccionar una o más poblaciones locales de forma que expresen de manera estable el polipéptido diana.
- 15 **[0029]** En una realización, la etapa (b) y/o (d) se lleva a cabo mediante clasificación celular activada por fluorescencia.
- [0030]** En una realización, la etapa (d) se lleva a cabo mediante clasificación celular activada por fluorescencia y el perfil de clasificación celular activada por fluorescencia de la población clonal seleccionada en la etapa (d) indica una
- 20 distribución cercana alrededor del promedio, indicando por tanto una población clonal que expresa de manera estable el polipéptido diana
- [0031]** En otra realización, la etapa (d) se lleva a cabo 7 – 28 días después de la etapa (c), o alternativamente, después de 7 días, o alternativamente después de 10 días, o alternativamente, después de 15 días, o
- 25 alternativamente, después de 20 días, o alternativamente, después de 25 días, o más adicionalmente después de 28 días, tras la etapa (c).
- [0032]** En algunas realizaciones un elevado nivel de expresión se refiere al nivel de expresión del marcador superficial celular que es mayor que el nivel de expresión del marcador superficial celular en al menos 50, 70, 80, 90,
- 30 95 o 99 % de las células analizadas en la etapa (b) y/o la etapa (d) .
- [0033]** En otra realización, la citometría de flujo se combina con un marcador superficial celular no fluorescente para uso en los procedimientos de la invención.
- 35 **[0034]** Los procedimientos de la divulgación identifican células recombinantes que mantienen la producción de proteínas o los niveles de expresión de un polipéptido diana a + / - 10 % , o alternativamente + / - 15 % , o alternativamente + / - 20 % , o alternativamente + / - 25 % , o alternativamente + / - 30 % , o alternativamente + / - 35 % , o alternativamente + / - 40 % , o más adicionalmente a + / - 50 % , en comparación con la producción de
- 40 proteínas dada en un periodo de tiempo, medida, por ejemplo, por 5 o más, o alternativamente 10 o más, o alternativamente 15 o más, o alternativamente 20 o más, o alternativamente 25 o más, o alternativamente 30 o más, o alternativamente 35 o más, o alternativamente 40 o alternativamente, 45 o más, o alternativamente 50 o más, o alternativamente 55 o más o alternativamente 60 o más generaciones celulares.
- [0035]** De esta manera, en un aspecto, esta divulgación proporciona procedimientos para seleccionar y ponderar
- 45 una población clonal de células eucariotas recombinantes que expresan de manera estable un polipéptido diana a un elevado nivel de expresión, adecuados para la producción, por ejemplo, comercial, a gran escala, del polipéptido diana.
- [0036]** Los procedimientos hacen uso de una célula hospedadora eucariota recombinante, tal como la dada a
- 50 conocer en la presente memoria descriptiva. La célula hospedadora eucariota recombinante contiene o comprende un polinucleótido recombinante, en el que el polinucleótido recombinante comprende un elemento promotor; un polinucleótido que codifica un polipéptido marcador superficial celular; un polipéptido que codifica un polipéptido diana; y un polinucleótido que tiene la actividad biológica de un polinucleótido de un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) , y en el que el polinucleótido IRES se localiza en el interior del polinucleótido recombinante de tal
- 55 manera que el polinucleótido marcador superficial celular y el polinucleótido diana se transcriben en el mismo ARNm. En una realización alternativa el polinucleótido marcador superficial celular incluye un codón de inicio alternativo para el inicio de la traducción. Las células hospedadoras recombinantes se unen mediante un agente que se une directa o indirectamente al marcador superficial celular y a continuación se seleccionan y aíslan dichas células. Las células seleccionadas y aisladas se preparan a continuación en una o más poblaciones locales y se cultivan durante
- 60 un periodo de tiempo. A continuación se analizan las poblaciones clonales detectando el nivel de expresión del marcador superficial celular sobre dicha población clonal y a continuación se seleccionan una o más poblaciones clonales con elevados niveles de expresión del marcador superficial celular. Las poblaciones clonales seleccionadas con elevados niveles de expresión del marcador superficial celular indican poblaciones clonales con niveles de expresión estables y elevados del polipéptido diana. Las células seleccionadas mediante estos procedimientos se
- 65 pueden cultivar adicionalmente en condiciones que permitan la producción del polipéptido diana que también está

presente en la célula hospedadora. El polipéptido diana puede aislarse adicionalmente de las células o de los medios de cultivo según sea adecuado.

**[0037]** Se proporciona también mediante esta divulgación un ensamblaje para llevar a cabo los procedimientos, discutidos en más detalle a continuación. En un aspecto, el ensamblaje comprende i) una célula hospedadora eucariota recombinante que contiene un polinucleótido que produce, en el mismo ARNm, un polinucleótido que codifica un polipéptido marcador superficial celular y un polipéptido diana; ii) un agente que reconozca a través de la unión directa o indirecta con el producto de expresión del polinucleótido que codifica el marcador superficial celular y unos medios para identificar células hospedadoras que tienen complejos agente: marcador tras ponerse en proximidad entre sí de tal manera que el agente puede unirse al marcador si este está presente en la célula hospedadora recombinante. Por ejemplo, el ensamblaje puede incluir además una placa multipocillo para la selección de múltiples cribas o selecciones concurrentes, por ejemplo, una placa de microtitulación de 6 pocillos, una de 12 pocillos, una de 24 pocillos, una de 48 pocillos, una de 96 pocillos o alternativamente, una placa de microtitulación de 384 pocillos y por tanto, no se pretende que el procedimiento de esta invención esté limitado a las placas de cultivos de microtitulación de 6 o 96 pocillos.

**[0038]** La divulgación proporciona también una célula hospedadora eucariota que contiene el polinucleótido recombinante que comprende: un elemento promotor; un polinucleótido que codifica un polipéptido marcador superficial celular; un polinucleótido que codifica el polipéptido diana; y un polinucleótido que tiene la actividad biológica de un polinucleótido de un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) en el que el polinucleótido IRES está localizado en el interior del polinucleótido recombinante de tal manera que el polinucleótido que codifica el polipéptido marcador superficial celular y el polinucleótido que codifica el polipéptido diana se transcriben en el mismo ARNm. En una realización alternativa, el polinucleótido que codifica el polipéptido marcador superficial celular contiene además un codón de inicio alternativo para el inicio de la traducción, en adición a, o en lugar de, el elemento IRES. En esta realización, el polinucleótido que codifica el polipéptido diana se localiza en la dirección 3' a partir del polinucleótido que codifica el polipéptido marcador.

#### *Células hospedadoras*

**[0039]** Los ejemplos de células eucariotas adecuadas para contener el polinucleótido recombinante incluyen, pero no se limitan a, la línea de células de Ovario de Hámster Chino ejemplificada, que incluye aquellas designadas CHO-K1, DG44, DUKX (también denominada DXB11), and CHO-S (comercialmente disponible de Invitrogen), y la línea de células de hámster BHK-21, las líneas de células de murino designadas NIH3T3, NS0, C127, las líneas de células de Simios COS, Vero; y las líneas de células humanas HeLa, HEK293 (también denominada 293), PER.C6 (comercialmente disponible de Crucell) U-937 y Hep G2. Los ejemplos adicionales incluyen células de levaduras, células de insectos, células vegetales, células de aves, células fúngicas y células de bovino. Los ejemplos de levaduras útiles para la expresión incluyen, pero no se limitan a *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Torulopsis*, *Yarrowia*, o *Pichia*. Véanse por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N<sup>os</sup> 4.812.405; 4.818.700; 4.929.555; 5.736.383; 5.955.349; 5.888.768 y 6.258.559. Las células eucariotas pueden adquirirse de un vendedor comercial tal como la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville Maryland, EE.UU.) o cultivarse a partir de un aislado utilizando los procedimientos conocidos en la técnica.

**[0040]** En un aspecto, las células hospedadoras se han preseleccionado y seleccionado para la producción estable de la proteína o el péptido de interés los solicitantes han usado la selección química con metotrexato pero se conocen en la técnica otros procedimientos de selección con algunos ejemplos descritos en Liu y col. (2000) *Anal. Biochem.* 280: 20 – 28; Barnes y col. (2003) *Biotechnol. Bioeng.* 81: 631 – 639; Sautter y Enenkel (2005) *Biotechnol. Bioeng.* 89: 530 – 538. En una realización alternativa, las células no se han preseleccionado para la producción estable de la proteína o el polipéptido diana.

**[0041]** Las células hospedadoras eucariotas de la invención contiene un polinucleótido recombinante que puede ser una molécula de ARNm o de ADNc recombinante a partir de la cual, los polipéptidos diana y marcador se traducen por separado. Esto se lleva a cabo mediante el uso de un polinucleótido que tiene la actividad biológica de un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) localizado en el mismo polinucleótido que codifica los polipéptidos marcador y diana. En un aspecto, el elemento IRES está localizado en la dirección 5' a partir del nucleótido que codifica el polipéptido diana y en la dirección 3' a partir del polinucleótido que codifica el marcador superficial celular. En otro aspecto, el elemento IRES está localizado en la dirección 5' a partir del polinucleótido que codifica el marcador superficial celular y en la dirección 3' a partir del polinucleótido que codifica el polipéptido diana.

**[0042]** En una realización alternativa, el polipéptido diana y el polipéptido marcador están codificados en el mismo ARNm pero solo uno u el otro polipéptido se traduce a partir de una molécula de ARNm dada. Esto se lleva a cabo mediante el uso de un codón de inicio alternativo (es decir, no ATG) para el inicio de la traducción del polipéptido marcador y el uso de un codón de inicio ATG para el inicio de la traducción del polipéptido diana. En esta realización, el polinucleótido que codifica el polipéptido diana se localiza en la dirección 3' a partir del polinucleótido que codifica el polipéptido marcador (Véase, por ejemplo, la Figura 7).

65

**[0043]** Para preparar la célula hospedadora eucariota recombinante, el (los) polinucleótido (s) recombinante (s) se puede (n) insertar directamente en la célula hospedadora utilizando cualquier técnica de transferencia génica adecuada. Alternativamente, se puede utilizar un vector para la inserción del (de los) polinucleótido (s) en la célula hospedadora. Los vectores adecuados incluyen, pero no se limitan a vectores víricos, vectores y plásmidos asociados a virus. Los ejemplos de vectores víricos de ADN adecuados incluyen adenovirus (Ad) o virus adenoasociados (VAA). Se conocen en la técnica vectores basados en adenovirus para la liberación de polinucleótidos y se pueden obtener comercialmente o construirse mediante procedimientos biológicos moleculares normalizados. Los adenovirus (Ad) son un grupo de virus, que incluye alrededor de 50 serotipos. Véase, por ejemplo, la Solicitud de PCT Internacional N° WO 95/27071. Los Ad no requieren integración en el genoma de la célula hospedadora. Se han construido también vectores derivados de Ad recombinantes, particularmente aquellos que reducen el potencial para la recombinación y la generación de virus naturales. Véase, las Solicitudes de PCT Internacionales N°s WO 95/00655 y WO 95/11984. En general, los vectores adenovíricos recombinantes derivados de adenovirus de tipo 2 (Ad2) y adenovirus de tipo 5 (Ad5). Pueden derivarse también de otros serotipos no oncogénicos. Véase, por ejemplo, Horowitz, "Adenoviridae and their Replication" en VIROLOGY, 2ª ed., Fields y col. Eds., Raven Press Ltd., Nueva York, 1990.

**[0044]** Otros vectores víricos para uso en la presente divulgación incluyen vectores derivados de vaccinia, herpesvirus, y retrovirus. En particular, herpesvirus, especialmente el virus del herpes simple (VHS), tal como los dados a conocer en la Patente de los Estados Unidos N° 5.672.344.

**[0045]** Se conocen en la técnica vectores que contienen un promotor y un sitio de clonación en dicho polinucleótido que se pueden vincular operativamente y están disponibles a partir de vendedores comerciales. Dichos vectores son capaces de transcribir el ARN *in vitro* o *in vivo*, y están comercialmente disponibles en fuentes tales como Stratagene (La Jolla, CA) y Promega Biotech (Madison, WI). A fin de optimizar la expresión y/o la transcripción *in vitro*, puede ser necesario retirar, añadir o alterar las porciones 5' y/o 3' no traducidas de los clones para eliminar los codones de inicio de la traducción alternativos potencialmente no adecuados, extra u otras secuencias que puedan interferir con o reducir la expresión, tanto al nivel de la transcripción o de la traducción. Alternativamente, se pueden insertar sitios consenso de unión al ribosoma inmediatamente 5' del codón de inicio para aumentar la expresión.

**[0046]** Los vehículos de liberación génica incluyen también algunos vectores no víricos, incluyendo complejos de ADN / liposoma, y complejos dirigidos de proteína vírica-ADN. Los liposomas que también comprenden un anticuerpo diana o su fragmento se pueden utilizar en los procedimientos de esta invención. Para aumentar la liberación a una célula, el ácido nucleico o las proteínas de esta invención se pueden conjugar con anticuerpos o sus fragmentos de unión que se unen a los antígenos superficiales celulares, por ejemplo, TCR o CD3.

**[0047]** Más adicionalmente se dan a conocer células hospedadoras recombinantes que tienen una cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria descriptiva y que contienen además un segundo polinucleótido recombinante que codifica una segunda proteína o polipéptido diana bajo el control del primero o un segundo elemento promotor.

#### IRES

**[0048]** Un IRES o un polinucleótido que tiene la actividad biológica de IRES puede ser idéntico a las secuencias que se encuentran en la naturaleza, tales como el IRES de picornavirus, o pueden ser secuencias no naturales o no nativas que llevan a cabo la misma función cuando se introducen en una célula hospedadora adecuada. Por ejemplo, se conocen en la técnica vectores de expresión bi y policistrónicos que contienen elementos IRES que se producen naturalmente y se describen por ejemplo en Mosser y col. (1997) BioTechniques 22 (1) : 150 – 161; Pestova y col. (1998) Genes Dev. 12: 67 – 83; Chen y col. (2004) J. Immunol. Methods 295: 49 – 56 y Solicitud Internacional N° WO 01/04306, que a la vez en la página 17, líneas 35 a 38 cita algunas referencias bibliográficas que incluyen, pero no se limitan a Ramesh y col. (1996) Nucl. Acids Res. 24: 2697 – 2700; Pelletier y col. (1988) Nature 334: 320 – 325; Jan y col. (1989) J. Virol. 63: 1651 – 1660; y Davies y col. (1992) J. Virol. 66: 1924 – 1932. Párrafo [0009] de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N°: 2005/0014150 A1 dan a conocer algunas patentes de los Estados Unidos publicadas en las que se usó un elemento IRES derivado víricamente para expresar el (los) gen (es) extraño(s) en los ARNm multicistrónicos, células vegetales y generalmente en células eucariotas. La Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 2004/0082034 A1 da a conocer un elemento IRES activo en células de insectos. Se describen también en la Patente de los Estados Unidos N° 6.833.254 procedimientos para identificar nuevos elementos de tipo IRES: Debido a que el ADN que codifica el polipéptido marcador y el ADN que codifica el polipéptido diana se transcriben en el mismo ARNm, el nivel de expresión del polipéptido marcador puede predecir los niveles relativos del polipéptido diana sobre una base por célula.

**[0049]** En las células hospedadoras ejemplificadas descritas a continuación, el IRES se adquirió de Clontech Laboratories (Vector pIRES) y se proporciona la secuencia del IRES en el sitio web del vendedor. El vendedor ha mutado el IRES utilizado (ATG 11 y 12 eliminados) para una eficacia de la traducción más débil (tal como se describe en Información sobre el Vector pIRES, Clontech Laboratories, Inc. (2005) Protocolo N°. PT3266 – 5,



Versión No. PR59976 y en las referencias del anterior).

**[0050]** También previstas por el uso del término IRES o un polinucleótido que tiene la actividad biológica de IRES son las secuencias similares a las dadas a conocer en la Patente de los Estados Unidos N° 6.653.132. La patente da a conocer elemento de la secuencia (designado SP163) compuesto de secuencias derivadas de 5'-UTR de VEGF (gen del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular), que se generó presumiblemente mediante un modo anteriormente desconocido de corte y empalme alternativo. Los titulares de las patentes informan que una ventaja de SP163 es que es un elemento IRES celular natural con un comportamiento superior como un estimulador de la traducción y como un mediador de la traducción independiente de la caperuza relativo a los elementos IRES celulares conocidos y que estas funciones se mantienen en condiciones de estrés.

**[0051]** Por el uso previsto adicional del término IRES o de un polinucleótido que tiene la actividad biológica de IRES se encuentran otras secuencias que no se producen naturalmente que funcionan como elementos IRES que se describen, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N°: 2005/0059004 A1.

**[0052]** Vinculados operativamente al elemento IRES están los polinucleótidos que codifican el marcador superficial celular y el polipéptido diana. "Vinculado operativamente" significa situado en una disposición que le permite funcionar. Otros elementos que se pueden vincular de manera operable al ensamblaje anterior incluyen, pero no se limitan a un promotor, un potenciador, una secuencia de terminación y una secuencia de poliadenilación. Se conoce en la técnica la construcción y el uso de dichas secuencias y se combinan con elementos IRES y secuencias de proteínas utilizando procedimientos recombinantes.

#### *Codones de inicio alternativos*

**[0053]** En esta invención, en vez de un IRES, se localiza un codón de inicio alternativo en el interior del ADN que codifica el polipéptido marcador de tal manera que la traducción del polipéptido marcador es menos eficaz que la del polipéptido diana. Para conseguir la disminución de la eficacia de la traducción, el codón de inicio del polipéptido marcador se cambia por un codón de inicio alternativo, ejemplos del cual incluyen, pero no se limitan a: CTG, GTG, TTG, ATT, ATA, ACG.

**[0054]** De esta manera, cuando se usa la expresión de un codón de inicio alternativo de un polipéptido o proteína indicadora (o marcadora) que se puede atenuar con respecto a la de un polipéptido de una proteína diana expresada simultáneamente alterando el codón de inicio utilizado para el inicio de la traducción del polipéptido o proteína marcadora. Además de la alteración del codón de inicio, el ADN que codifica el polipéptido marcador está modificado en todos los tripletes ATG internos para evitar el inicio interno de la traducción. En una realización, el polipéptido marcador tiene una secuencia de aminoácidos corta (< 200 aminoácidos) con unos pocos tripletes ATG (< 10). En una realización, todos los tripletes ATG internos del polipéptido marcador no están en marco para la secuencia polipeptídica modificada. En una realización, cada triplete ATG interno que está en marco para la secuencia polipeptídica codificada se cambia a un TTG, que codifica el aminoácido leucina.

**[0055]** Para la traducción del ARNm que codifica el polipéptido marcador y el polipéptido diana los ribosomas inician el barrido en el extremo 5' caperuza del ARNm pasando la mayoría del barrido el codón de inicio alternativo (por ejemplo, GUG) y en vez de iniciar la traducción en el codón de inicio AUG en la dirección 3' (por ejemplo, véase la Figura 7). Sin embargo, el inicio de la traducción puede producirse en el codón de inicio alternativo con una frecuencia muy baja de tal manera que se expresa un nivel bajo del polipéptido indicador (por ejemplo, véase la figura 8). En este aspecto de la invención, el polipéptido marcador superficial celular y el polipéptido diana se transcriben en el mismo ARNm, de tal manera que el nivel de expresión del polipéptido indicador se puede utilizar para predecir el nivel de expresión relativa del polipéptido diana sobre una base por célula.

**[0056]** De esta manera, en este aspecto de la invención, se seleccionaron poblaciones clonales mediante la detección de un polipéptido marcador que se expresaba utilizando un codón de inicio alternativo. Se seleccionan poblaciones clonales con elevados niveles de expresión del polipéptido marcador como poblaciones clonales que tendrán una elevada expresión del polipéptido diana expresado simultáneamente.

**[0057]** En un aspecto adicional de esta invención, se utiliza un codón de inicio alternativo para el inicio de la traducción del polipéptido marcador a fin de obtener un nivel más bajo de expresión del polipéptido marcador con respecto al del polipéptido diana. En esta realización, el polipéptido que codifica el polipéptido diana se localiza en la dirección 3' a partir del polinucleótido que codifica el polipéptido marcador (véase, por ejemplo, la Figura 79. En este aspecto de la invención, el uso de un codón de inicio alternativo para expresar un polipéptido marcador que, a la vez, se detecta en las células con un rendimiento elevado en la criba de clones, tal como se muestra en los procedimientos de la invención, es un uso previsto de un codón de inicio alternativo.

#### *Promotores*

**[0058]** Los promotores son secuencias que impulsan la transcripción del marcador o la proteína diana. Se pueden

seleccionar para el uso en una célula hospedadora concreta, es decir, mamífero, insecto o planta. Los promotores víricos o de mamíferos funcionarán en células de mamíferos. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles, ejemplos de los cuales se conocen y describen en la técnica y se pueden localizar en la dirección 5' del polinucleótido que codifica el polipéptido marcador superficial celular y en la dirección 5' a partir del polinucleótido que codifica el polipéptido diana. En otro aspecto, el promotor se vincula operativamente al polinucleótido que codifica el polipéptido marcador superficial celular. En una realización alternativa, el promotor se vincula operativamente al polinucleótido que codifica el polipéptido diana.

**[0059]** Los promotores a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a promotores víricos, de mamíferos o levaduras que proporcionan mayores niveles de expresión, por ejemplo, beta actina, un promotor de CMV de mamífero, una alcohol oxidasa de levadura, un promotor de la fosfoglicerocinasa, unos promotores inducibles por lactosa, un promotor de la galactosidasa, un promotor vírico adenoasociado, un promotor de baculovirus, un promotor del virus de la viruela, un promotor retrovírico, unos promotores de adenovirus, un promotor de SV40, un promotor de TK (timidina cinasa) , un promotor del virus de la viruela 7.5K p H5R, un promotor tardío de MPC de adenovirus de tipo 2, un promotor de la alfa-antripsina, un promotor del factor IX, un promotor de la inmunoglobulina, un promotor del tensorio activo CFTR, un promotor de la albúmina o un promotor de la transferrina.

**[0060]** Se dan a conocer además células hospedadoras recombinantes que tienen una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente y que contienen además, en el polinucleótido recombinante, un polinucleótido que aumenta o potencia la transcripción, es decir, un elemento potenciador.

#### *Marcadores superficiales celulares*

**[0061]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "polipéptido marcador superficial celular" o "polipéptido marcador" se usa ampliamente y se pretende que incluya cualquier polipéptido expresado por la célula que sirva para identificar y seleccionar opcionalmente células. Los ejemplos de polipéptidos marcadores superficiales celulares incluyen, pero no se limitan a polipéptidos de receptores superficiales celulares, por ejemplo, CD2, CD20, CD52 o CD59. En una realización por separado, el polipéptido marcador superficial celular no es un polipéptido CD4 o un polinucleótido que codifica un polipéptido CD4. Los polipéptidos marcadores superficiales a modo de ejemplo adicionales se identifican en la dirección web < [ebioscience.com/ebioscience/whatsnew/humancdchart.htm](http://ebioscience.com/ebioscience/whatsnew/humancdchart.htm) > con la fecha de presentación de esta solicitud.

**[0062]** En otro aspecto, el polinucleótido que codifica el polipéptido marcador superficial celular contenido en la célula hospedadora es un polinucleótido que codifica un polipéptido que es exógeno a la célula hospedadora eucariota. En otros aspecto, un polinucleótido que codifica un polipéptido marcador superficial celular que está presente de manera endógena en la célula hospedadora pero se expresa a niveles bajos en la célula hospedadora sin transfectar.

**[0063]** En un aspecto particular de esta divulgación, el polinucleótido codifica CD20. Se conocen en la técnica marcadores de las secuencias que codifican CD20 y se pueden encontrar bajo los siguientes números de Acceso del GenBank: NM\_152866; NM\_152867; NM\_021950; NM\_007641 y NM\_001009388. En algunos aspectos de esta invención, puede ser deseable utilizar genes no humanos, las secuencias de polinucleótidos de los cuales se conocen en la técnica. Véase por ejemplo, números de Acceso al GenBank NM\_007641, NM\_001009388, y XM\_542548.

**[0064]** El polipéptido marcador superficial celular se utiliza para identificar aquellas células que expresan de manera estable el polipéptido diana a elevados niveles y son por tanto clones candidatos para la producción a gran escala.

#### *Polipéptidos diana*

**[0065]** El polipéptido diana puede ser cualquier proteína o polipéptido que se puede producir en las células hospedadoras y en los aspectos ejemplificados en la presente memoria descriptiva, el polipéptido diana se selecciona debido a su potencial como agente o fármaco terapéutico, por ejemplo, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, o enzima. Sin embargo, los ensamblajes y sus usos no se limitan a la selección y ponderación de las proteínas terapéuticas. Por ejemplo, se puede identificar para la ponderación el diagnóstico de proteínas para uso en el entorno, utilizando los procedimientos y ensamblajes dados a conocer en la presente memoria descriptiva.

**[0066]** En un aspecto, el polipéptido diana es la hormona estimuladora del tiroides. En aspectos alternativos, el polipéptido diana comprende una proteína o polipéptido del trastorno lisosómico de almacenamiento (LSD), que puede incluir, pero no limitarse a las identificadas en la siguiente tabla.

**[0067]** Ejemplos de LSD y enzimas defectivas o deficientes correspondientes

Trastorno lisosómico de almacenamiento	Enzima defectiva o deficiente (Hidrolasa lisosómica)
Fabry	$\alpha$ -Galactosidasa A
Farber	Ceramidasa ácida
Fucosidosis	$\alpha$ -L-fucosidasa ácida
Gaucher tipos 1, 2 y 3	$\beta$ glucocerebrosidasa ácida (GCR)
Gangliosidosis G <sub>MI</sub>	$\beta$ galactosidasa ácida
Hunter	Iduronato-2-sulfatasa
Hunter-Scheie	$\alpha$ -L-Iduronidasa
Krabbe	Galactocerebrosidasa
$\alpha$ -Mannosidosis	$\alpha$ -Mannosidosis
$\beta$ -Mannosidosis	$\beta$ -Mannosidosis
Marateaux-Lamy	Arilsulfatasa B
Leucodistrofia metacromática	Arilsulfatasa A
Morquio A	N-Acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa
Morquio B	$\beta$ galactosidasa ácida
Niemann-Pick	Esfingomielinasa ácida
Pompe	$\alpha$ glucosidasa ácida
Sandhoff	$\beta$ -Hexosaminidasa B
Sanfilippo A	Heparan N-sulfatasa
Sanfilippo B	$\alpha$ -N-Acetilglucosaminidasa
Sanfilippo C	Acetil CoA: $\alpha$ -glucosaminido N-acetil transferasa
Sanfilippo D	N-Acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa
Schindler-Kanzaki	$\alpha$ -N-Acetilgalactosaminidasa
Sialidosis	Sialidasa
Sly	$\beta$ Glucuronidasa
Tay-Sachs	$\beta$ -Hexosaminidasa A

**[0068]** Los trastornos lisosómicos de almacenamiento son un tipo de enfermedades genéticas, que comprenden 5 aproximadamente cuarenta trastornos que se refieren a una deficiencia en la actividad lisosómica de la hidrolasa. El lisosoma sirve como compartimento degradativo principal de la célula y contiene múltiples enzimas necesarias para llevar a cabo esta función. Una característica distintiva de los LSD es la acumulación anormal de metabolitos en los lisosomas que conduce a la formación de grandes cantidades de lisosomas distendidos. De acuerdo con esto, se puede tratar un LSD con la administración de una terapéutica de sustitución de enzimas que corresponde a la 10 hidrolasa lisosómica defectiva o deficiente correlacionada con el LSD particular.

**[0069]** En un aspecto, el polipéptido diana es la hormona estimuladora del tiroides. En aspectos alternativos, el polipéptido diana comprende una proteína o polipéptido de un trastorno lisosómico de almacenamiento (LSD), que puede incluir, pero no limitarse a las identificadas en la tabla anterior.

15 **[0070]** En un aspecto, se transcribe y traduce un polipéptido adicional a partir de un polinucleótido recombinante separado y se combina en una proteína funcional en la célula hospedadora. Este polinucleótido recombinante no requiere el elemento IRES o la proteína marcadora aunque en un aspecto, puede estar presente.

20 **[0071]** Un aspecto en la técnica comprenderá que los polinucleótidos y las células hospedadoras que los contienen deben producirse antes de practicar los procedimientos dados a conocer. Dependiendo de los componentes particulares, un experto en la técnica puede adquirir los componentes y/o los elementos de los componentes procedentes de vendedores comerciales.

25 *Detección de los marcadores superficiales*

**[0072]** Tras la inserción del polinucleótido recombinante, la célula hospedadora se cultiva en condiciones que facilitan la expresión del marcador superficial celular en la célula hospedadora. Se puede utilizar cualquier procedimiento conocido en la técnica para detectar el marcador superficial celular junto con los procedimientos de la 30 invención. Por ejemplo, un anticuerpo u otro agente de unión específico del marcador superficial celular se pone en contacto a continuación directa o indirectamente con la célula en condiciones que favorecen la unión del anticuerpo al marcador y por tanto a la célula hospedadora. La selección del agente o el anticuerpo de unión está determinada por: 1) su capacidad para unirse selectivamente al polipéptido marcador superficial celular que se expresa en la célula hospedadora; y 2) su capacidad para etiquetarse con una etiqueta detectable, por ejemplo, para uso en 35 citometría de flujo. Se usa la clasificación celular activada mediante fluorescencia (FACS), denominada también citometría de flujo, para clasificar las células individuales sobre la base de las propiedades ópticas, incluyendo la fluorescencia. Se usa para cribar grandes poblaciones de células en un periodo de tiempo relativamente corto. Otros

procedimientos de selección incluyen MAC, tal como se describe en Gaines (1999) *Biotechniques* 26 (4): 683 – 688.

**[0073]** En un aspecto, el agente que se une al marcador superficial celular es un anticuerpo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal, o pueden ser fragmentos de anticuerpo policlonal o monoclonal. Pueden ser quiméricos, humanizados, biespecíficos, bifuncionales o totalmente humanos. Se puede usar cualquier fragmento o derivado funcional de un anticuerpo tal como Fab, Fab', Fab2, Fab'2, regiones variables de cadena única y variaciones de las mismas.

**[0074]** En una realización alternativa, un primer agente puede ser una proteína o péptido que se une al polipéptido marcador cuyo primer agente se une también a la vez a un segundo agente que es capaz de etiquetarse de manera detectable. Se pretende, aunque no se establece siempre de manera explícita que la unión "indirecta" al marcador incluya el uso de cualquier número de moléculas intermedias. En esta realización, la unión del primer resto etiquetado a los agentes candidatos se llevará a cabo como apreciación generalmente los expertos en la técnica, y puede incluir las técnicas reseñadas anteriormente para la incorporación de una etiqueta colorimétrica, enzimática, fluorescente u otras etiquetas detectables.

**[0075]** En una realización, el agente se une directamente al marcador superficial celular y comprende una etiqueta fluorescente. Las etiquetas fluorescentes adecuadas incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil-cumarinas, pireno, Verde malaquita, estilbeno, Amarillo Lucifer, Azul Cascada. TM. Y Rojo Texas. Se describen otros colorantes ópticos adecuados en el 1996 *Molecular Probes Handbook* por Richard P. Haugland.

**[0076]** En otro aspecto, la etiqueta fluorescente está funcionalizada para facilitar el enlace covalente con el agente. Los grupos funcionales adecuados incluyen, pero no se limitan a, grupos isotiocianato, grupos amino, grupos haloacetilo, maleimidias, ésteres de succinimidilo, y sulfonil haluros, todos los cuales se pueden usar para unir la etiqueta fluorescente con una segunda molécula. La elección del grupo funcional de la etiqueta fluorescente dependerá del sitio de la unión tanto a un enlazador, el agente, el marcador, como a un segundo agente de etiquetado.

**[0077]** La unión de la etiqueta fluorescente puede ser tanto directa como mediante un enlazador con el anticuerpo y/o el agente. En un aspecto, el enlazador es un resto de acoplamiento relativamente corto, que se utiliza generalmente para unirse a las moléculas. En esta realización, la unión del primer resto de etiquetado a los agentes candidatos se llevará a cabo como se aprecia generalmente por los expertos en la técnica, y puede incluir las técnicas reseñadas anteriormente para la incorporación de etiquetas fluorescentes.

**[0078]** Se conocen en la técnica los materiales y las técnicas para el diseño y la construcción de los anticuerpos etiquetados y otros agentes para uso en citometría y se describen por ejemplo, en Bailey y col. (2002) *Biotech. Bioeng.* 80 (6): 670 – 676; Carroll y Al – Rubeai (2004) *Expt. Opin. Biol. Therapy* 4: 1821 – 1829; Yoshikawa y col. (2001) *Biotech. Bioeng.* 74: 435 – 442; Meng y col. (2000) *Gene* 242: 201 – 207; Borth y col. (2001) *Biotechnol. Bioeng.* 71 (4): 266 – 273; Zeyda y col. (1999) *Biotechnol. Prog.* 15: 953 – 957; Klucher y col. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25 (23): 4853 – 4860; y Brezinsky y col. (2003) *J. Immunol. Methods* 277: 141 – 155.

**[0079]** Las parejas de unión adecuadas para uso para unir indirectamente la etiqueta al agente (que a la vez se une al marcador) incluye, pero sin limitarse a, antígenos / anticuerpos, incluyendo digoxigenina / anticuerpo, dinitrofenilo (DNP) / anti-DNP, Dansil-X / antidansilo, fluoresceína / anti-fluoresceína, amarillo Lucifer / antiamarillo Lucifer, rodamina / antirodamina; y biotina / avidina (o biotina / estreptavidina). Las parejas de unión deben tener elevadas afinidades entre sí, suficientes para soportar las fuerzas de cizalladura durante la clasificación mediante FACS u otro sistema de detección usado junto con esta invención.

**[0080]** De esta manera, en algunos aspectos, los primeros restos de marcado (cuando se utilizan los segundos restos de marcado), incluyen, pero no se limitan a, haptenos tales como biotina. Se conoce bien la biotilación de moléculas diana, por ejemplo, se conocen un gran número de agentes de biotilación, incluyendo agentes aminorreactivos y agentes reactivos a tiol, para la biotilación de proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, ácidos carboxílicos. De manera similar, se conocen un gran número de reactivos de haptenilación.

**[0081]** Se pueden producir los anticuerpos usados para el ensamblaje en el cultivo celular, en fagos, o en diversos animales, incluyendo, pero sin limitarse a vacas, conejos, cabras, ratones, ratas, hámster, cobayas, ovejas, perros, gatos, monos, chimpancés, simios, etc., siempre que el fragmento o derivado retenga la especificidad de la unión para la proteína o el fragmento. Se pueden ensayar los anticuerpos para la especificidad de la unión comparando la unión con un antígeno adecuado a la unión con un antígeno irrelevante o una mezcla de antígenos bajo un conjunto dado de condiciones.

**[0082]** En las realizaciones en las que el anticuerpo o el agente contra el marcador superficial celular no se etiqueta directamente, el anticuerpo o el agente contiene y retiene también preferiblemente la capacidad de unirse a un agente secundario que es detectable después de la unión a la célula hospedadora mediante el polipéptido

marcador superficial adecuado. Las propias etiquetas deben ser capaces de detección, por ejemplo, mediante citometría de flujo utilizando etiquetas fluorescentes, o MACS que son etiquetas adecuadas a modo de ejemplo para uso en la invención.

5 **[0083]** En una realización particular, cuando el marcador superficial celular es CD20, el anticuerpo del ensamblaje es un anticuerpo dirigido contra CD20. "Anticuerpo dirigido contra CD20" se refiere a un anticuerpo que reconoce y se une específicamente al polipéptido o la proteína CD20. Los anticuerpos dirigidos contra CD20 se pueden generar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Véase por ejemplo, Harlow y Lane, eds. (1988) más arriba y Freshney, ed. (1987) más arriba. Adicionalmente, están comercialmente disponibles algunos anticuerpos dirigidos  
10 contra CD20 a partir de vendedores tales como BD Pharmingen; Beckman Coulter, Inc. (Fullerton, CA, numerosos clones incluyendo el N° de Catálogo 6604106 Clon H299 (B1) ; Isotipo IgG2a y N° de Catálogo IM1565 Clon L26, Isotipo IgG2a) ; Invitrogen (Carlsbad, CA, Clon: BH-20, Isotipo: IgG2a y Clon: B-H20, Isotipo: IgG2a) ; BioLegend (San Diego, CA, N° de Catálogo 302301, Clon: 2H7, Isotipo: IgG2b, è) ; EMD Biosciences, Inc., CALBIOCHEM® Brand (San Diego, CA, N° de Catálogo 217670 Clon 2H7, Isotipo: IgG2b) ; y Anaspec (San Jose, CA, N° de  
15 catálogo. 29587) .

**[0084]** Para practicar el procedimiento, al menos una célula hospedadora eucariota recombinante tal como se describe en la presente memoria descriptiva se pone en contacto con un agente que reconoce y se une directa o indirectamente con el marcador superficial celular, si está presente, sobre la superficie de la célula hospedadora. El  
20 contacto se lleva a cabo en condiciones que favorecen o son adecuadas para la unión específica (directa o indirectamente) del agente o anticuerpo con el marcador y a continuación seleccionando cualquier célula hospedadora que se une directa o indirectamente al agente o el anticuerpo que se une al polipéptido marcador superficial celular. El procedimiento incluye seleccionar y aislar una o más células hospedadoras que se unen al agente y preparar poblaciones clonales usando dichas células seleccionadas. La preparación de una población  
25 clonal se puede llevar a cabo mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, en una realización, las células seleccionadas pueden plaquearse en placas de 96 pocillos (u otro tamaño) a una densidad de una célula por pocillo y permitirse crecer durante un periodo de tiempo (por ejemplo, normalmente 7-28 días) que permita a la célula individual crecer en una colonia multicélulas de células hijas (es decir, una población clonal) : El siguientes procedimiento comprende analizar una o más de las poblaciones clonales detectando el nivel de  
30 expresión del marcador superficial celular, seleccionando por tanto una o más poblaciones clonales que expresan de manera estable el polipéptido diana. En algunas realizaciones, la población clonal se cultiva durante 7 – 28 días tras plaquear a una densidad de célula individual antes de que se analicen las poblaciones clonales. El procedimiento incluye además poner en contacto la población clonal con un agente detectable que reconozca y se una directa o indirectamente al marcador superficial celular, si está presente, sobre la superficie de la célula hospedadora en  
35 condiciones que favorezcan la unión del agente con el marcador; y seleccionar una o más células hospedadoras que se unen directa o indirectamente al anticuerpo agente que se une al polipéptido marcador superficial celular. Estas células así seleccionadas también pueden aislarse y cultivarse. El elevado nivel de expresión de la población clonal de células se denomina "células productoras".

40 **[0085]** Las células productoras se pueden usar para producir un polipéptido diana que se puede aislar además a partir de la célula y/o el cultivo celular.

**[0086]** La selección de las células productoras o células se puede llevar a cabo tal como se ha ejemplificado en la presente memoria descriptiva utilizando un clasificador de células activado por fluorescencia o un clasificador de  
45 células activado magnéticamente (MACS) , o mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica.

**[0087]** Se proporciona también el ensamblaje para llevar a cabo los procedimientos dados a conocer en la presente memoria descriptiva. En estos aspectos, el ensamblaje contiene al menos una célula hospedadora eucariota tal como se describe en la presente memoria descriptiva, un agente que se une directa o indirectamente al  
50 polipéptido marcador superficial celular; y un medio para detectar el agente cuando se une directa o indirectamente al polipéptido marcador superficial celular. Se han descrito anteriormente las células hospedadoras, agentes y medios de detección y selección adecuados, y se conocen también en la técnica.

**[0088]** Se pretende que los siguientes ejemplos experimentales ilustren, y no limiten la invención.

55 EJEMPLOS

### Material y Procedimientos

60 **[0089] Construcción de vectores de expresión de ADN.** Para polipéptidos expresados simultáneamente con CD20 [receptor soluble, cadena pesada de anticuerpo (Hc), y hormona estimuladora del tiroides (TSH) (subunidad β), se insertaron marcos de lectura abiertos en un vector de expresión de mamíferos en la dirección 3' del promotor de la β actina de hámster y en la dirección 5' del IRES, que se continuó por un ADNc de CD20 humano, y Poli (A) de SV40. En la secuencia IRES (pIRES, Clontech Laboratories, Mountain View, CA), Se eliminaron los AUG 11 y 12,  
65 disminuyendo la eficacia del inicio de la traducción del sitio (Davies and Kaufman (1992) J. Virol. 66: 1924 – 1932 y

pIRES Vector Information, Clontech Laboratories, Inc. (2005) Protocolo N° PT3266-5, Versión N° PR59976). Para los polipéptidos no expresados simultáneamente con CD20 [cadena ligera de anticuerpo (Lc) y subunidad  $\alpha$  de TSH], los marcos de lectura abiertos se insertaron en un vector de expresión de mamífero en la dirección 3' del promotor de la  $\beta$  actina de hámster y en la dirección 5' de Poli (A) de SV40. Todos los esqueletos de vectores se contuvieron también en un casete de expresión DHFR para permitir la selección de MTX en un medio deficiente en nucleótidos.

**[0090] Cultivo celular y transfección.** A no ser que se señale otra cosa, todos los medios y suplementos fueron de Invitrogen (Carlsbad, CA). La línea celular CHO DXB11 (Urlaub y Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (7): 4216 – 422) se adaptó a condiciones de crecimiento exentas de un componente derivado de animal (ADC) usando procedimientos y materiales conocidos en la técnica. La línea celular de CHO SF-DG44 se obtuvo de Invitrogen. Se hicieron crecer las células en suspensión usando matraces agitados con caperuza de ventilación (Coming, Corning, NY) en una incubadora Multitron (Infors HT, Bottmingen, Suiza) a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, 70 % de humedad, y agitando a 125 rpm. El medio de crecimiento fue CD DG44 suplementado con L glutamina 4 mM y Pluronic F-68 al 0,01 %. Se transfectaron las células mediante electroporación usando un GenePulser Xcell™ (BioRad Laboratories, Hercules, CA) tanto con un único plásmido (receptor soluble) como con cantidades equimolares de dos plásmidos (anticuerpo Lc + anticuerpo Hc; TSH  $\alpha$  + TSH  $\beta$ ) Todos los ADN plásmidos se linealizaron y se precipitaron con EtOH antes de la transfección. Tras un periodo de recuperación de 48 – 72 horas, las células transfectadas se volvieron a sembrar en medios CD CHO deficiente en nucleótidos suplementado con L-glutamina 4 mM. Los combinados estables se sometieron posteriormente a tanto una única etapa de selección con MTX (Calbiochem / EMD Biosciences, San Diego, CA) (100 nM) o a un procedimiento de selección con MTX en dos etapas (20 nM / 100 nM o 20 nM / 200 nM). Inmediatamente después de la clasificación, se sembraron las células en placas de 96 pocillos a 1 célula / pocillo en medio exento de MTX, y se inspeccionaron visualmente los pocillos a los 4 a 7 días después de la clasificación para la identificación de clones celulares individuales. Los clones se mantuvieron en CD CHO exento de MTX a partir de este punto.

**[0091] Clasificación mediante citometría de flujo y selección de clones.** Siete a diez días antes de la clasificación, los combinados transfectados de manera estable se sembraron en medio CD CHO exento de NTX suplementado con L-glutamina 4 mM, y se volvieron a sembrar en este medio según fue necesario hasta el día de la clasificación. Todas las etapas en el procedimiento de clasificación y recuperación utilizaron reactivos estériles y se llevaron a cabo en condiciones estériles. Todos los lavados se llevaron a cabo en solución salina PBS tamponada con fosfato fría (Invitrogen) En la preparación para la clasificación, se incubaron las células con anticuerpo dirigido contra CD20 humana conjugado con FITC (BD Pharmingen, San Diego, CA) durante 30 minutos en hielo, con lavados antes y después de la incubación del anticuerpo. Se volvieron a suspender las células en PBS frío a una concentración de  $1 \times 10^6$  células viables/ml y se clasificaron en un citómetro de flujo FACStar<sup>PLUS</sup> (BD Biosciences, San Jose, CA) utilizando un láser de argón emitiendo a 488 nm y detectando la emisión FITC con un filtro 530/30 de paso de banda. La criba de clasificación fue una combinación de la criba de células vivas (comparando la representación gráfica de puntos de FSC-H frente a SSC-H) y los acontecimiento en la fluorescencia superior a 0,1-1,0 % (a partir del histograma de FL-1). Para la selección de clones e la placa de 6 pocillos y las etapas de matraz con agitación, se recogieron  $1 \times 10^6$  a  $2 \times 10^6$  células viables en los puntos temporales especificados. Se prepararon las células exactamente tal como se ha descrito anteriormente para la clasificación, se volvieron a suspender en PBS frío a aproximadamente  $1 \times 10^6$  células viables/ml, y se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) usando un láser de argón que emitía a 488 nm y detectando la emisión FITC con un filtro 530/30 de paso de banda. Para la selección de los clones en la etapa de las placas de 96 pocillo, aproximadamente el 50 % de las células en un pocillo con una confluencia del 70 – 90 % se transfirieron a un único pocillo de una placa de fondo en V de polipropileno de 96 pocillo (Corning). Se lavaron las células, se incubaron con anticuerpo dirigido contra CD20 humana conjugado con PE (BD Pharmingen) durante 30 minutos en hielo, se lavaron, y se volvieron a suspender en 100  $\mu$ l de PBS frío por pocillo. Se analizaron las células en un FACSArray™ Bioanalyzer (BD Biosciences) utilizando un láser de argón emitiendo a 532 nm y detectando una emisión de PE con un filtro 585/42 de paso de banda. Para todos los procedimientos de citometría de flujo, se utilizaron los programas informáticos CellQuest y Cell QuestPro (BD Biosciences) para analizar los datos. Los histogramas que se muestran se generaron utilizando los programas informáticos Cell Quest Pro o FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR). Para la selección de los clones mediante FACS, cada resultado es una medida de la media geométrica de intensidad de la fluorescencia (GMFI) cuantificada en unidades de fluorescencia relativas (RFU).

**[0092] Análisis de los títulos de proteínas.** Para el análisis de placas de 6 pocillos, se sembraron las células e pocillos tal como se describe en la descripción de las figuras, y se recogieron los medios acondicionados a partir de los pocillos tanto en el día 3 como en el día 7 posteriores a la siembra, según se ha especificado. Para el análisis del cultivo del lote sin alimentar, se sembraron las células en matraces de 125 ml con agitación en 20 ml de CD CHO / L-glutamina 4 mM y se incubaron e una incubadora Multitron tal como se ha descrito anteriormente Se sembraron células productoras de receptores solubles o proteínas de anticuerpo (como polipéptidos diana) a  $3 \times 10^5$  células viables/ml y se recogieron los medios acondicionados a las 24 horas. Las muestras de los medios acondicionados se centrifugaron para eliminar células y desechos, a continuación se almacenaron a -80 °C. Para la determinación de los títulos de proteína del receptor soluble (una F<sub>c</sub> de fusión) y el anticuerpo (IgG<sub>4</sub>), se analizaron los medios acondicionados mediante HPLC de Proteína A. Para las muestras de TSH, se determinó el número total de células para el cálculo de la productividad celular y se determinaron los títulos de TSH mediante ELISA.

## Resultados

- [0093]** Predicción fiable de los títulos de proteínas terapéuticas clonales mediante la selección mediante FACS basada en CD20. Se desarrolló inicialmente un procedimiento FACS basado en indicador para clasificar las células con elevados niveles de expresión de proteínas diana. El gen que codifica la proteína de interés (proteína diana) se expresó simultáneamente a partir de un vector de expresión de mamífero con la proteína CD20 indicadora superficial celular (polipéptido marcador superficial celular), no se expresó normalmente en células CHO (Figura 1). En este sistema, los niveles de expresión de la proteína CD20 se usaron para predecir de manera fiable los niveles de expresión relativa de la proteína diana terapéutica sobre una base por célula. Tras la transfección estable de células CHO, los combinados seleccionados con MTX se evaluaron para la expresión de CD20 superficial celular mediante citometría de flujo. Los combinados con elevados niveles de fluorescencia se clasificaron para recoger células individuales con elevados niveles de expresión de CD20.
- [0094]** Tras la clasificación, se sembraron las células en placas de 96 pocillos para obtener clones de células individuales (para la preparación de una población clonal). Normalmente, se seleccionaron clones en placas de 96 pocillo mediante el análisis de los medios acondicionados a partir de pocillos a una confluencia de aproximadamente 80-90 %. Basándose en esta criba, se seleccionaron 50 – 100 clones de la parte superior y se ponderaron y se cribaron posteriormente mediante el análisis de los medios acondicionados a partir de placas de 6 pocillo para predecir que clones tendrían elevados títulos de proteínas a gran escala. Debido a que una meta del estudio inicial era reducir el tiempo de respuesta de la siembra de las placas de 6 pocillos para identificar el nivel de expresión estable y elevado de los clones, un punto temporal inicial analítico, tal como el día 3 o 4, era más deseable que un punto temporal terminal de 10-14 días. De manera sorprendente, durante el desarrollo inicial de los clones CHO que expresaban un receptor soluble recombinante, se observó que el análisis FACS basado en CD20 a los 3 días de la siembra de placas de 6 pocillos era muy predictivo del título de la proteína del receptor soluble en una última etapa (matraz de 125 ml con agitación) . De hecho, esta correlación fue mejor que la del título de proteína de los medios acondicionados de entre las placas de 6 pocillos y del título de proteína del matraz con agitación (Figura 2). Se observó una correlación similar para los clones CHO que expresaban una IgG<sub>4</sub>. En este caso, incluso un punto temporal posterior (día 7) para el análisis de los medios acondicionados de las placas de 6 pocillos fue incapaz de predecir de manera fiable los clones con elevados niveles de expresión mientras que el análisis FACS del día 7 lo hizo satisfactoriamente (Figura 3) . Esta figura demuestra también la utilidad del procedimiento FACS cuando el polipéptido diana se expresó como dos polipéptidos, uno solo de los cuales se expresó simultáneamente con CD20.
- [0095] Evaluación cuantitativa y cualitativa de los clones mediante la selección mediante FACS de placas de 96 pocillos.** Debido a que la selección mediante FACS basada en CD20 fue más predictiva que el análisis de los medios acondicionados en la etapa de las placas de 6 pocillos, se teorizó que esta selección mediante FACS tendría también valor en la etapa de las placas de 96 pocillos. La implementación más inicial en el desarrollo del procedimiento amplificaría los esfuerzos permitiendo centrarse solo en los clones con niveles de expresión estables y elevados, sin extender el tiempo en la ponderación y el análisis de los clones indeseables (es decir, aquellos con un nivel de expresión inestable o bajo, o las poblaciones no clonales). Para evaluar la selección mediante FACS en la etapa de las placas de 96 pocillos, se cribaron 34 clones CHO que expresaban el receptor soluble recombinante para la expresión de CD20 en las etapas de las placas de 96 pocillos y 6 pocillos. Tal como se muestra en la Figura 4A, las selecciones mediante FACS de 96 pocillos y 6 pocillos produjeron el mismo orden de jerarquía de los clones con respecto al nivel de expresión de CD20, medido en unidades relativas de fluorescencia (RFU). En la Figura 4B, los perfiles representativos de FACS muestran la relación de la intensidad de fluorescencia basada en CD20 de las células en una placa de 96 pocillos con el título de la proteína del receptor soluble en medios acondicionados a partir de un matraz de 125 ml con agitación sembrado aproximadamente tres semanas después de la selección de placas de 96 pocillos.
- [0096]** Además de la selección cuantitativa en la etapa de placas de 96 pocillos, el procedimiento FACS permitió la evaluación cualitativa de clones para simplificar adicionalmente el procedimiento de desarrollo de la línea celular. En la etapa de las placas de 96 pocillos, se utilizó el perfil de FACS para identificar los clones indeseables, incluso aquellos con una evaluación cuantitativa favorable, visualizando cualquier heterogeneidad que pudiera estar asociada con poblaciones inestable. En un ejemplo, para las células que expresan un anticuerpo IgG<sub>4</sub>, se observaron diferencias cualitativas entre pocillos con la misma fluorescencia basada en CD20 (Figura 4C). En esta selección de placas de 96 pocillos, la intensidad de la fluorescencia basada en CD20 de los pocillos 4G2 y 7G4 fue de 127,5 y 127,1 RFU, respectivamente. Aunque las células del pocillo 7G4 se expandieron basándose en la estrecha distribución de la población celular [alrededor del promedio], las del pocillo 4g2 se eliminaron del desarrollo adicional, ya que esta población tenía un mayor grado de heterogeneidad, indicando una inestabilidad de los clones o quizá una población no clonal. De esta manera, la selección de esta invención se puede usar inicialmente en el procedimiento de desarrollo de la línea celular para seleccionar los clones adecuados para las células productoras basándose en los atributos cuantitativos y cualitativos.
- [0097] Eliminación de clones inestables inicialmente en el orden cronológico de desarrollo mediante la selección de esta invención.** Hubo ocasionalmente un análisis para el cual un pequeño porcentaje de clones tuvo

menores títulos en los matraces con agitación de lote sin alimentar que los esperados basándose en la selección de 96 pocillos de esta invención. Dichos clones pueden tener una expresión inestable de la proteína, disminuyendo la expresión detectable durante la ponderación tras la selección de las placas de 96 pocillos (Bames y col. (2003) *Biotech. Bioeng.* 81: 631 – 639 y Kim y col. (1998) *Biotech. Bioeng.* 60: 679 – 688). Volver a seleccionar estos clones mediante FACS en la etapa del matraz con agitación no mostró, de hecho, una disminución en la fluorescencia basada en CD20 consistente con el menor nivel de producción de proteína terapéutica; se muestra un ejemplo representativo en la Figura 5. Para los clones CHO productores de TSH, la selección mediante FACS de 96 pocillos jerarquizó de manera fiable los clones de acuerdo a la productividad específica en cultivos de matraces con agitación, con dos excepciones, los clones 11B3 y 1E7. Para estos dos clones que tenían menor productividad que la prevista por la selección de 96 pocillos, el análisis mediante FACS de los matraces con agitación mostró una disminución en la fluorescencia basada en CD20 que estaba correlacionada con los niveles inferiores de producción de proteínas, indicando la inestabilidad de la expresión del transgén.

**[0098]** Por tanto, la selección de esta invención se puede usar no solo para identificar satisfactoriamente clones de elevada producción (es decir, poblaciones clonales de elevado nivel de expresión) en la etapa de placas multipocillos, sino también para vigilar los clones que expresan la parte superior tras una ponderación para identificar adecuadamente (y eliminar) cualquier expresión con proteína inestable. Para demostrar esto, los clones seleccionados como elevados productores mediante la selección de 96 pocillos se ponderaron en matraces con agitación y se sembraron en cultivos de lotes sin alimentar para determinar los títulos de IgG. El tiempo de selección de las placas de 96 pocillos para sembrar el cultivo del lote inicial sin alimentar fue de 10 días, evaluándose el título de IgG después de 14 días de cultivo del lote. Las células se pasaron continuamente durante 6 semanas más con cultivos de lote sin alimentar sembrados cada 3 semanas. Estos cultivos de lote sin alimentar se evaluaron mediante FACS en el día 3, y se determinaron los títulos de IgG en el día 14. Tal como se muestra en la Figura 6, el clon 14A10 mostró una disminución en la fluorescencia basada en CD20 en comparación con la observada en la selección de las placas de 96 pocillos en las 3 primeras semanas de la ponderación. Esta disminución en la expresión de CD20 se hizo en paralelo mediante una disminución en el título de IgG, mostrando que la selección durante la ponderación del clon fue un indicador fiable de la inestabilidad del clon. En comparación, el clon 29H6 mantuvo un título de IgG estable, imitado por la fluorescencia estable basada en CD20, durante el mismo marco de tiempo. Estos datos ilustran la utilidad de la selección de esta invención para eliminar los clones inestables en cualquier punto en el orden cronológico de desarrollo de la línea celular. Aquí, una ventaja principal de la selección de esta invención sobre el análisis de medios tradicional es el análisis del punto temporal inicial (día 3) acoplado con la visualización inmediata de los resultados, más bien que el último análisis del punto temporal (día 14) con el posterior procesamiento de los datos analíticos para determinar los títulos.

### 35 **Discusión**

**[0099]** Se ha descrito el uso de la citometría de flujo para aislar las células que expresan los niveles deseados de un gen recombinante de interés (Liu y col. (2000) *Anal. Biochem.* 280: 20 – 28; Klucher y col. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25 (23): 4858 – 4860; Mosser y col. (1997) *BioTechniques* 22 (1): 150 – 161; Gaines y col. (1999) *BioTechniques* 26 (4): 683 – 688; Choe y col. (2005) *Nucleic Acids Res.* 33: 1 – 7 y Zeyda y col. (1999) *Biotechnol. Prog.* 15: 953 – 957). Más específicamente, para el aislamiento de células CHO que secretan elevados niveles de proteínas, la citometría de flujo ha emergido como una herramienta útil para aumentar la eficacia de los procedimientos de desarrollo de líneas celulares. En algunos casos, se han aislado células CHO productoras de proteínas de interés mediante la detección directa de la proteína de interés tanto durante su asociación con la matriz celular durante la secreción (Brezinsky y col. (2003) *J. Immunol. Methods* 277: 141 – 155) como mediante una tecnología de captura de la proteína de la matriz de afinidad (Borth y col. (2001) *Biotechnol. Bioeng.* 71 (4): 266 – 273). Sin embargo, la detección directa está limitada por la disponibilidad de un anticuerpo específico para la proteína terapéutica que se está expresando, y por muchas proteínas terapéuticas recombinantes, se desarrolla una línea celular de producción antes de tener dicho anticuerpo disponible. La detección basada en FACS de una proteína indicadora, tal como GFP (Bailey y col. (2002) *Biotechnol. Bioeng.* 80 (6): 670 – 676) o una enzima mutante (Sautter y Enenkel (2005) *Biotech. Bioeng.* 89: 530 – 538 y Chen (2004) *J. Immunol. Meth.* 295: 49 – 56), se ha informado también de la expresión simultánea con la proteína de interés para las células CHO. Para los procedimientos de detección directa e indirecta, el foco ha estado en la clasificación de las poblaciones de células para aislar los clones de elevada producción. Los estudios previos describen el enriquecimiento de combinados heterogéneos para las células de elevada producción (subpoblaciones o clones individuales) o el enriquecimiento de una población clonal de subclones con una expresión de la proteína potencialmente mayor. Mientras que estos procedimientos previos han ayudado a mejorar la eficacia de aislamiento de las células deseadas a partir de combinados transfectados, la selección fiable de elevado rendimiento de los clones resultantes permanece en un área para la mejora.

**[0100]** A este fin, esta invención proporciona una selección de clones mediante FACS, basada en indicadores, para identificar rápidamente los clones con nivel de expresión estable y elevada en la etapa de las placas de 96 pocillos del desarrollo de la línea celular. Esta selección identifica de manera fiable los clones basados en atributos cuantitativos y cualitativos, dejando tiempo y recursos para centrarse solo en los mejores clones para el desarrollo adicional. Esta selección es más eficaz que los procedimientos de selección de clones tradicionales de dos maneras.



En primer lugar, es un mejor predictor, en una etapa inicial, de los clones que tendrán elevados títulos de proteínas posteriormente en el orden cronológico de desarrollo. En segundo lugar, esto permite la evaluación visual de la calidad de los clones, una característica que no es posible cuando se evalúa el medio acondicionado para el título de proteínas. Se pueden identificar fácilmente clones inestables en la selección mediante FACS tanto como una población con un gran grado de heterogeneidad en su intensidad de la fluorescencia como en dos poblaciones discretas. Dos poblaciones distintas podrían ser también indicadoras de una población no clonal. Mientras que este procedimiento de plaqueo de 96 pocillos tiene una elevada probabilidad de generar menos de o igual a una (1) célula / pocillo, existe aún la posibilidad para un pocillo de contener una población derivada de más de una célula (es decir, una población no clonal). Utilizando la selección mediante FACS de esta invención, se pueden distinguir fácilmente clones con diferentes perfiles de expresión que se derivaron de una única célula, evitando el esfuerzo adicional de expandirse en su expansión y evaluación continuada.

**[0101]** Además de ser una selección de clones más eficaz, el procedimiento de la invención proporciona otros beneficios que son instrumentales para desarrollar la producción de líneas celulares para una variedad de proteínas de polipéptidos diana. En primer lugar, debido a que este sistema se basa en la detección de una proteína indicadora expresada simultáneamente, elimina la necesidad de un anticuerpo específico para el polipéptido diana. Esto permite una fácil implementación del procedimiento de la invención en cualquier proceso de desarrollo de una nueva línea celular en la etapa más inicial de desarrollo. Además, el indicador CD20 (polipéptido marcador) se expresa sobre la superficie celular de tal manera que las diferencias de clones en el grado de retención de la proteína y/o la velocidad de disociación de la matriz extracelular no son un factor en la detección y lectura mediante FACS. De manera interesante, cuando se compara el procedimiento de esta invención con el que la proteína diana (una IgG) se detecta directamente mediante un anticuerpo (tanto dirigido contra Fc como contra IgG), esta invención predice con más fiabilidad que los clones producirían elevados, medios o bajos niveles de la proteína (polipéptido diana). Esto indica que, al menos para algunas proteínas diana, la detección directa de la proteína secretada puede generar un mayor porcentaje de resultados falsos positivos o falsos negativos, no identificando a la vez los clones con una producción con un nivel de expresión estable y elevado del polipéptido diana. Por ejemplo, si una célula produce elevados niveles de una proteína diana de interés, pero la proteína no permanece asociada con la matriz extracelular durante el tiempo suficiente para la detección mediante un anticuerpo la célula podría pasarse por alto en la selección mediante detección directa debido a una lectura baja.

**[0102]** En segundo lugar, el procedimiento de la invención se lleva a cabo igualmente bien para los polipéptidos diana expresados tanto como un polipéptido único como dos polipéptidos codificados mediante marcos de lectura abiertos separados en diferentes plásmidos de expresión. Para las células que expresan tanto un anticuerpo como una hormona estimuladora del tiroides, la proteína indicadora CD20 (polipéptido marcador) se expresó simultáneamente con solo la cadena pesada de la subunidad  $\beta$ , respectivamente, y se usó para identificar satisfactoriamente los clones productores de elevados niveles de proteínas completamente ensambladas. Para la producción de anticuerpos, la expresión simultánea de CD20 con la cadena pesada de CD20 proporcionó una ventaja añadida. Recientes informes demuestran que la máxima expresión de la cadena pesada es necesaria para una mayor producción de un anticuerpo completamente ensamblado (Schlatter y col. (2005) *Biotechnol. Prog.* 21: 122 – 133 y Jiang y col. (2006) *Biotechnol. Prog.* 22: 313 – 318). Por tanto, la unión de los niveles de expresión de CD20 por célula a los niveles de expresión de la cadena pesada permitieron la identificación de los clones con la cadena muy pesada y, a la vez, elevada expresión del anticuerpo ensamblado.

**[0103]** En tercer lugar, el procedimiento de la invención mediante FACS basado en CD20, proporcionó una determinación rápida y cualitativa de la estabilidad de los clones durante la expansión de las placas de 96 pocillos con matraces con agitación esto sirvió como una segunda selección de un escalón de clones que se ponderaron basándose en los resultados iniciales de selección de 96 pocillos. La capacidad para seleccionar células 3 días después de la siembra de un cultivo por lotes en cualquier punto en el procedimiento de ponderación, generó datos más rápidamente que el análisis de los medios acondicionados tradicionales de un cultivo terminal por lotes. Además, la identificación de la inestabilidad de los clones en cualquier punto durante la expansión inicial de los clones evitó el innecesario esfuerzo de agotarse en el desarrollo continuado de clones indeseables. Finalmente, además de su utilidad con células CHO, el procedimiento de la invención es aplicable a otros tipos de células que se pueden usar para expresar las proteínas de interés. Igualmente, podrían usarse proteínas indicadoras superficiales celulares alternativas (es decir, los polipéptidos marcadores), en vez de CD20, para la expresión simultánea con la proteína de interés (es decir, el polipéptido diana).

**[0104]** Este procedimiento proporciona un beneficio sustancial para el desarrollo de la línea celular en su capacidad de seleccionar eficazmente clones en la misma etapa de placas de 96 pocillos para aquellas proteínas de interés estables de elevada expresión. Para los múltiples esfuerzos de desarrollo de la línea celular, la selección mediante FACS de 96 pocillos identificó satisfactoriamente los clones que tendrían un elevado título de proteínas tras la ponderación con una mayor precisión que las medidas de títulos en los medios acondicionados de 96 pocillos. Además, el formato de placas de 96 pocillos permitió un procesamiento de elevado rendimiento de los clones. Utilizando un citómetro de flujo basado en placas, se pueden analizar aproximadamente 1.000 clones en un único día, reduciendo significativamente el tiempo y el esfuerzo requeridos para la selección de los clones. Una ventaja adicional de este procedimiento fue que disminuye la fluorescencia basada en CD20 durante la ponderación

correlacionada directamente con las disminuciones en la producción específica de proteínas observada para los clones inestables, permitiendo una rápida identificación y eliminación de dichos clones. Utilizando este procedimiento se identifican nuevas líneas celulares candidatas terapéuticas más eficazmente y se ponderan para la evaluación adicional de una manera racionalizada, más dirigida, de tal manera que las líneas celulares de producción deseada, se mueven hacia delante, para el procesamiento en la dirección 3' con mayor precisión y menor esfuerzo en la dirección 5'.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para seleccionar una célula hospedadora productora que expresa de manera estable un polipéptido diana a un nivel elevado, comprendiendo el procedimiento:
- 5 (a) poner en contacto al menos una célula hospedadora eucariota recombinante que contiene un polipéptido recombinante, en el que el polipéptido recombinante comprende un elemento promotor; un polinucleótido que codifica un polipéptido marcador superficial celular; y un polinucleótido que codifica un polipéptido diana, en el que el polinucleótido que codifica el polipéptido marcador superficial celular incluye un codón de inicio alternativo, en el que el polinucleótido marcador superficial celular y el polinucleótido diana se transcriben sobre el mismo ARNm, y en el que la célula hospedadora se cultiva en condiciones de tal manera que el polipéptido marcador superficial celular se expresa en la superficie de la célula hospedadora, con un agente detectable que reconoce y se une directa o indirectamente al marcador superficial celular si está presente sobre la superficie de la célula hospedadora, poniéndose en contacto el mencionado en contacto el mencionado en las condiciones que favorecen la unión del agente con el marcador superficial celular;
- 10 (b) seleccionar una o más células hospedadoras que se unen directa o indirectamente al agente;
- (c) preparar una o más poblaciones clonales de las células hospedadoras de la etapa (b) y;
- 15 (d) analizar una o más poblaciones clonales de la etapa (c) detectando el nivel de expresión del marcador superficial celular sobre dichas poblaciones clonales y seleccionando una o más poblaciones clonales con un elevado nivel de expresión del marcador superficial celular, seleccionando por tanto una o más poblaciones clonales que expresen de manera estable el polipéptido diana.
2. Un ensamblaje para seleccionar una célula hospedadora eucariota recombinante que expresa de forma estable y elevada un polipéptido diana, comprendiendo el ensamblaje los siguientes componentes:
- 25 (a) al menos una célula hospedadora eucariota recombinante que contiene un polinucleótido recombinante, en el que el polinucleótido recombinante comprende un elemento promotor; un polinucleótido que codifica un polipéptido marcador superficial celular; y un polinucleótido que codifica un polipéptido diana, en el que el polinucleótido que codifica el polipéptido marcador superficial celular incluye un codón de inicio alternativo, y en el que el polinucleótido que codifica el polipéptido marcador superficial celular y el polinucleótido que codifica el polipéptido diana se transcriben en el mismo ARNm;
- 30 (b) un agente que se une directa o indirectamente al polipéptido marcador superficial celular; y
- (c) un medio para detectar el agente cuando se une directa o indirectamente al polipéptido marcador superficial celular
3. El procedimiento de la Reivindicación 1, en el que la etapa (b) y/o la etapa (d) se lleva a cabo mediante clasificación celular activada por fluorescencia
- 40 4. El procedimiento de la Reivindicación 1, en el que la etapa (d) se lleva a cabo mediante clasificación celular activada por fluorescencia y en el que el perfil de clasificación celular activada por fluorescencia de una población clonal seleccionada en la etapa (d) indica una estrecha distribución alrededor del promedio, indicando por tanto una población clonal que expresa de manera estable el polipéptido diana.
- 45 5. El procedimiento de la Reivindicación 1, en el que la etapa (d) se lleva a cabo 7 – 28 días después de la etapa (c).
6. El procedimiento de la Reivindicación 1, en el que el elevado nivel de expresión es un nivel de expresión del marcador superficial celular que es mayor que el nivel de expresión de al menos un 50, 70, 80, 90, o 50 95 o 99 % de las células analizadas en la etapa (b) y/o la etapa (d).
7. El procedimiento de la Reivindicación 1 o el ensamblaje de la Reivindicación 2, en el que el promotor es un promotor eucariota.
- 55 8. El procedimiento de la Reivindicación 1 o el ensamblaje de la Reivindicación 2, en el que el polinucleótido marcador superficial celular codifica un marcador superficial celular diferente de un polipéptido CD4 o en el que el polinucleótido marcador superficial celular codifica un marcador superficial celular seleccionado entre el grupo que consiste de CD20, CD52 y CD59.
- 60 9. El procedimiento de la Reivindicación 1 o el ensamblaje de la Reivindicación 2, en el que el polipéptido diana comprende un polipéptido terapéutico o una proteína terapéutica.
10. El procedimiento de la Reivindicación 1 o el ensamblaje de la Reivindicación 2, en el que el promotor se localiza en la dirección 5' del polinucleótido que codifica el polipéptido marcador superficial celular, o en la 65 dirección 5' del polinucleótido que codifica el polipéptido diana.

11. El procedimiento de la Reivindicación 1 o el ensamblaje de la Reivindicación 2, en el que el promotor se vincula operativamente al polinucleótido que codifica el polipéptido marcador superficial celular se vincula operativamente al polinucleótido que codifica el polipéptido diana.
- 5
12. El procedimiento de la Reivindicación 1 o el ensamblaje de la Reivindicación 2, en el que el polinucleótido recombinante comprende además un polinucleótido que aumenta o potencia la transcripción.
13. El procedimiento de la Reivindicación 1 o el ensamblaje de la Reivindicación 2, en el que la célula hospedadora eucariota comprende además un segundo polinucleótido recombinante que codifica un segundo polipéptido diana bajo el control de un segundo elemento promotor.
- 10
14. El procedimiento de la Reivindicación 1 o el ensamblaje de la Reivindicación 2, en el que el polipéptido diana se selecciona entre el grupo que comprende un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una hormona, una enzima, una proteína receptora, una proteína de trastorno lisosómico del almacenamiento,  $\alpha$ -galactosidasa A, y una  $\alpha$ -glucosidasa ácida.
- 15
15. El procedimiento de la Reivindicación 1 o el ensamblaje de la Reivindicación 2, en el que la célula hospedadora eucariota es una célula de levadura o una célula de mamífero.
- 20
16. El ensamblaje de la Reivindicación 2, que comprende además:
- (d) un medio para separar al menos una célula recombinante que tiene el agente unido directa o indirectamente al marcador superficial celular.
- 25
17. El ensamblaje de la Reivindicación 16, que comprende además
- (e) un medio para hacer crecer la al menos una célula recombinante separada por el medio de un componente (d).
- 30
18. El ensamblaje de la Reivindicación 2, en el que el agente del componente (b) es un anticuerpo etiquetado de manera detectable que se une directa o indirectamente al polipéptido marcador superficial celular codificado por el polinucleótido.
- 35
19. El ensamblaje de la Reivindicación 2, en el que el medio del componente (c) es un dispositivo para llevar a cabo la citometría de flujo.

Figura 1

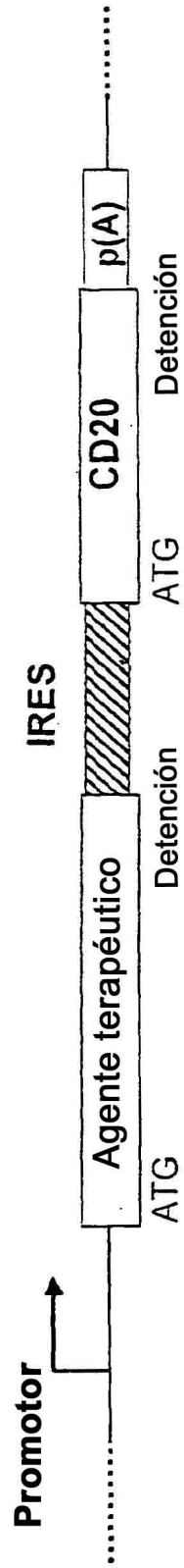


Figura 2A

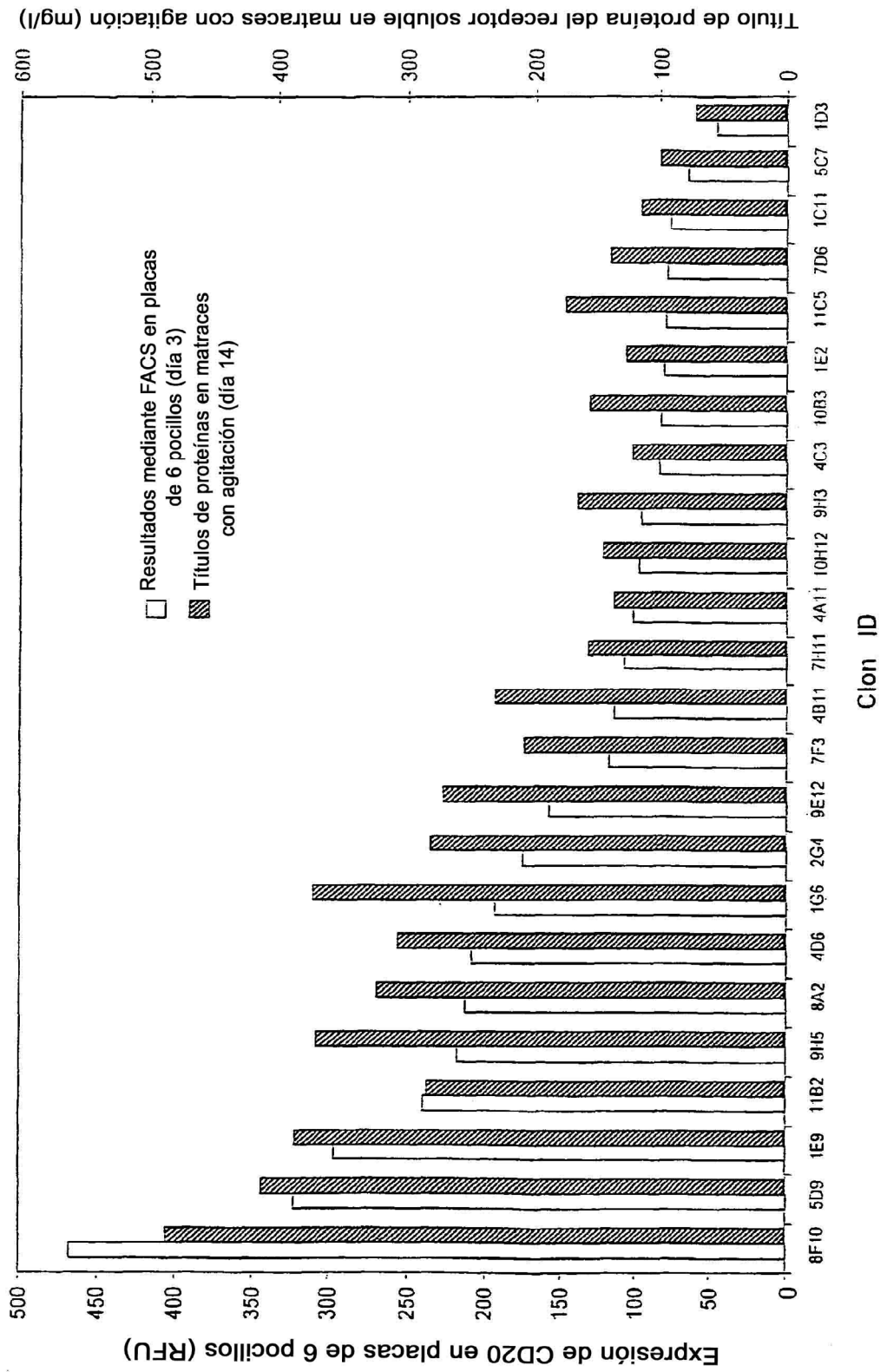


Figura 2B

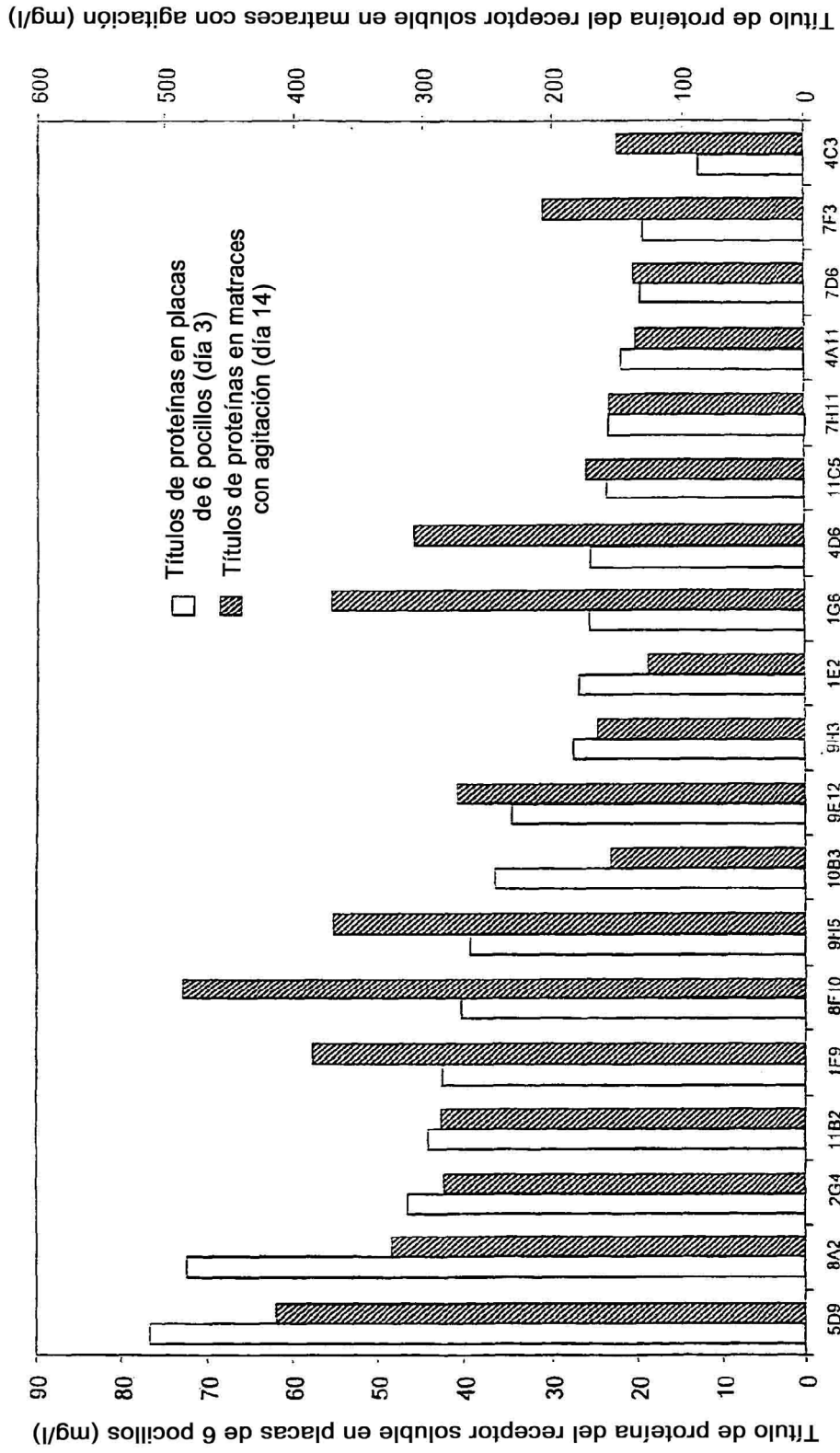


Figura 3A

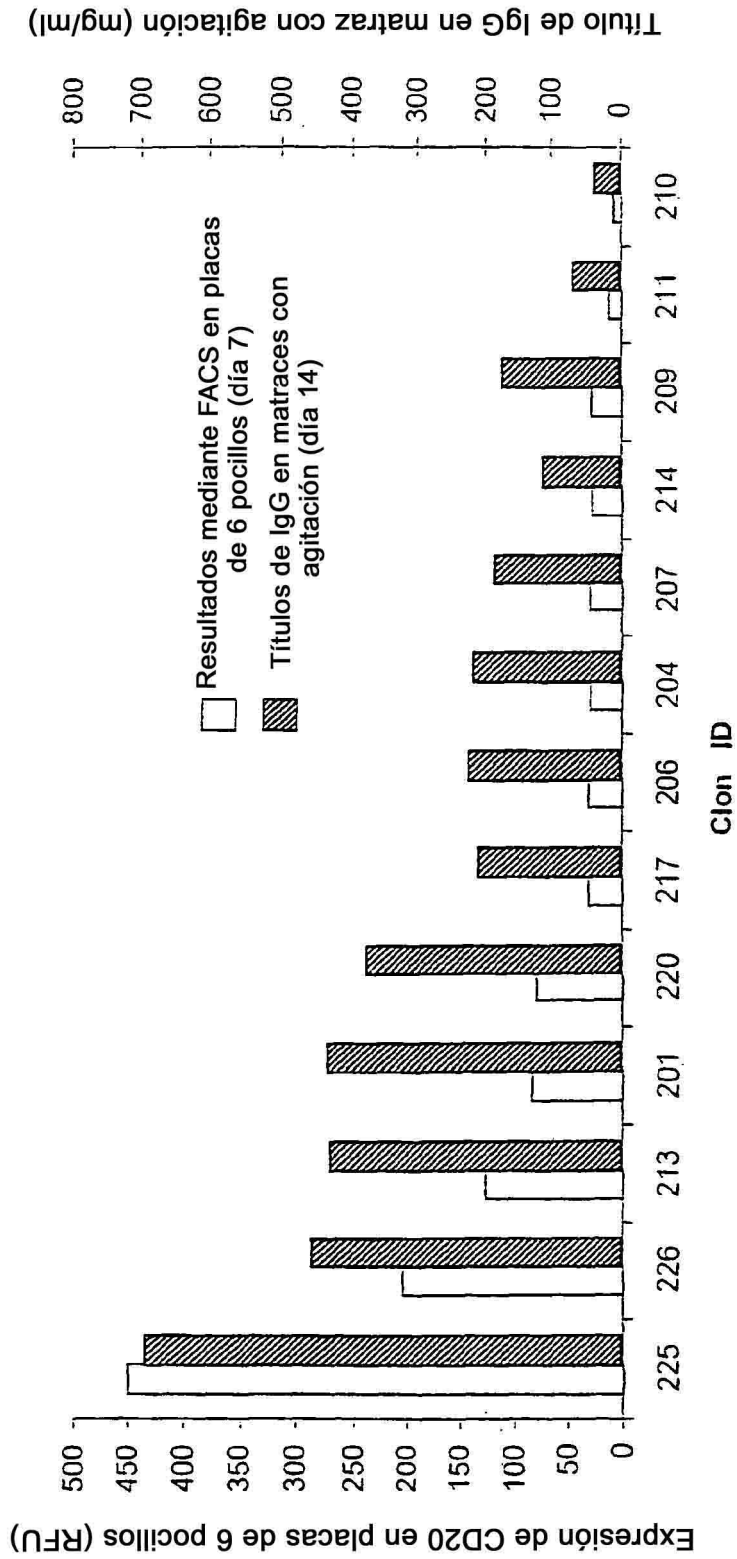




Figura 3B

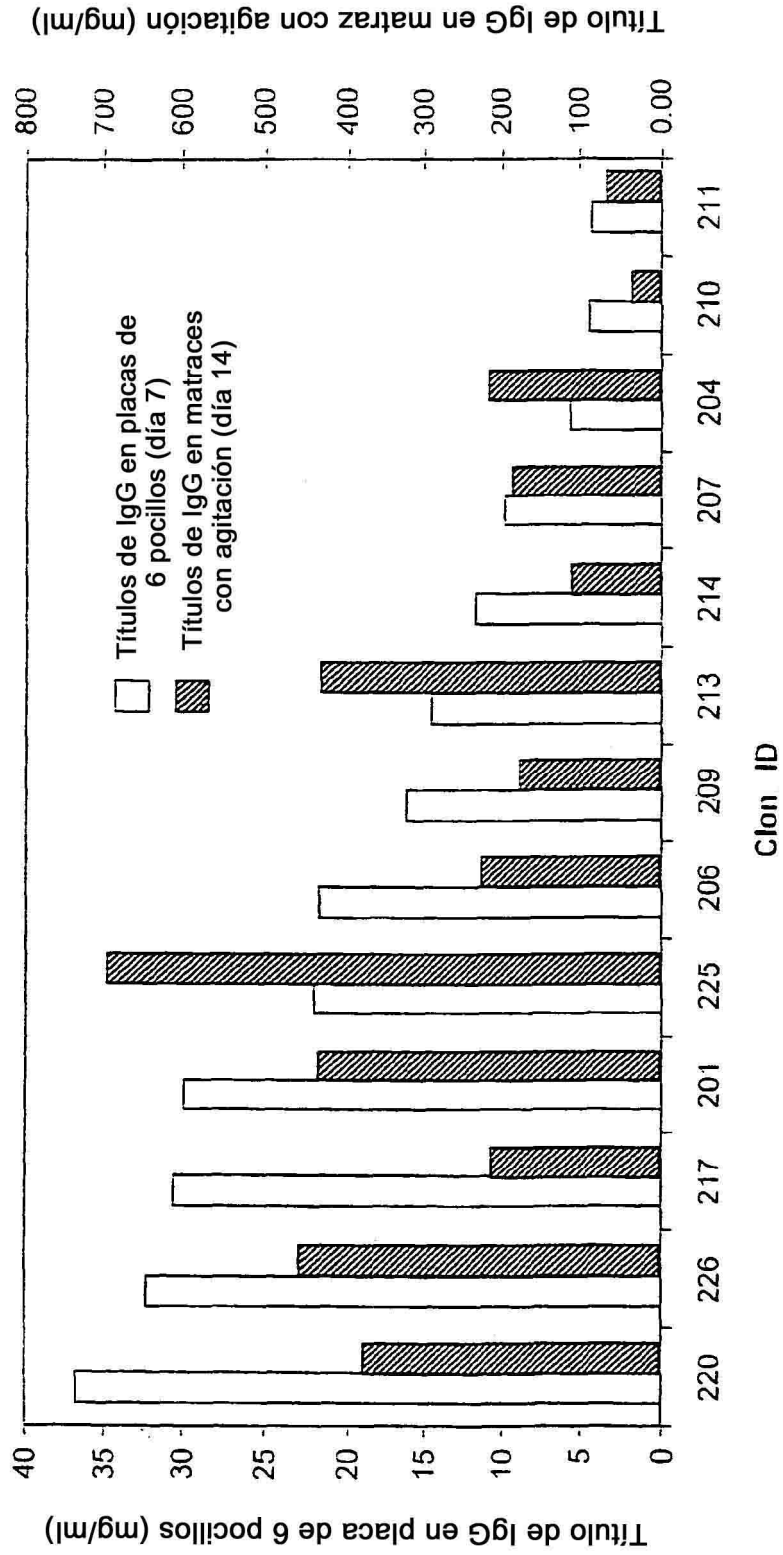


Figura 4A

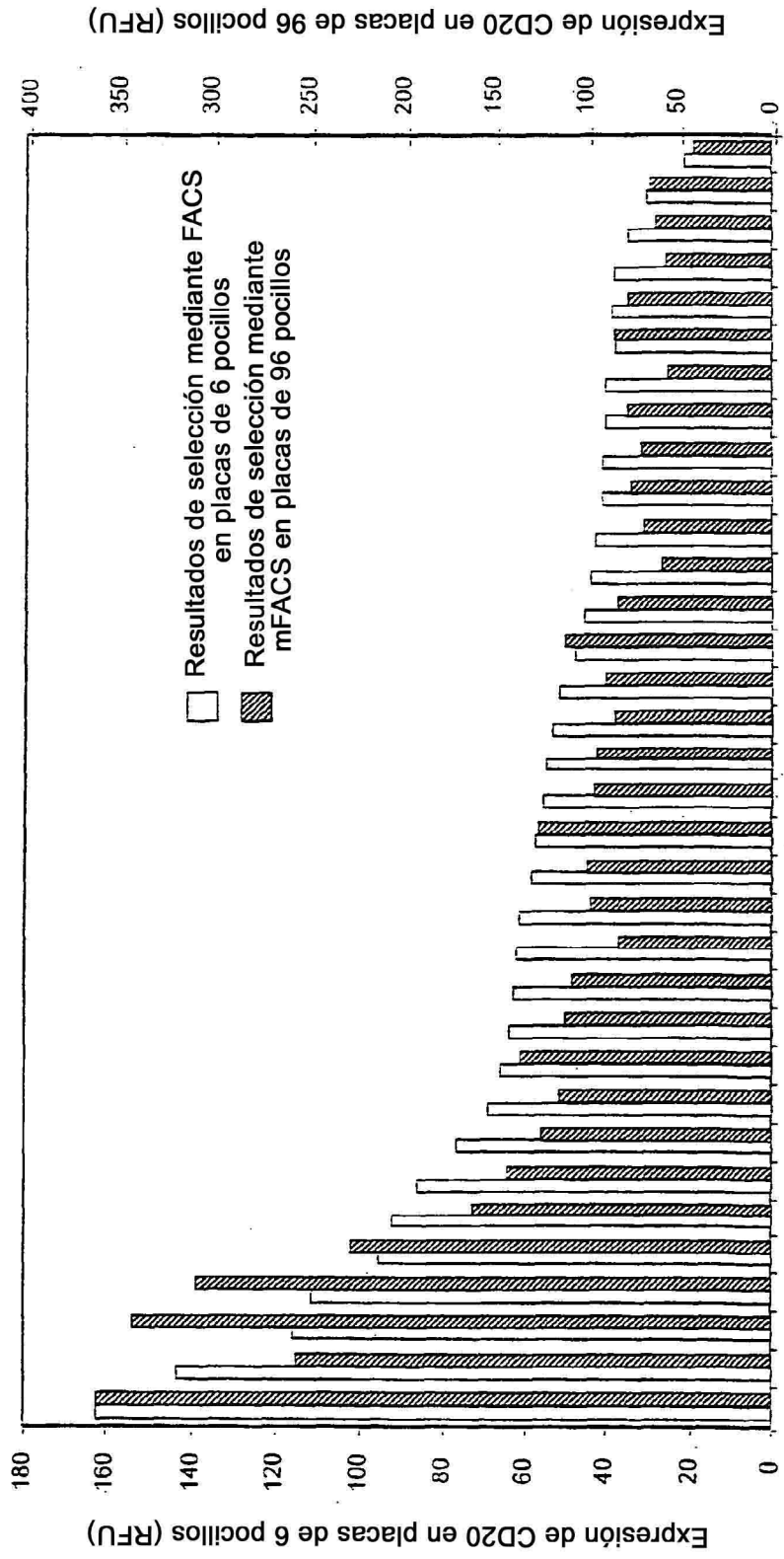
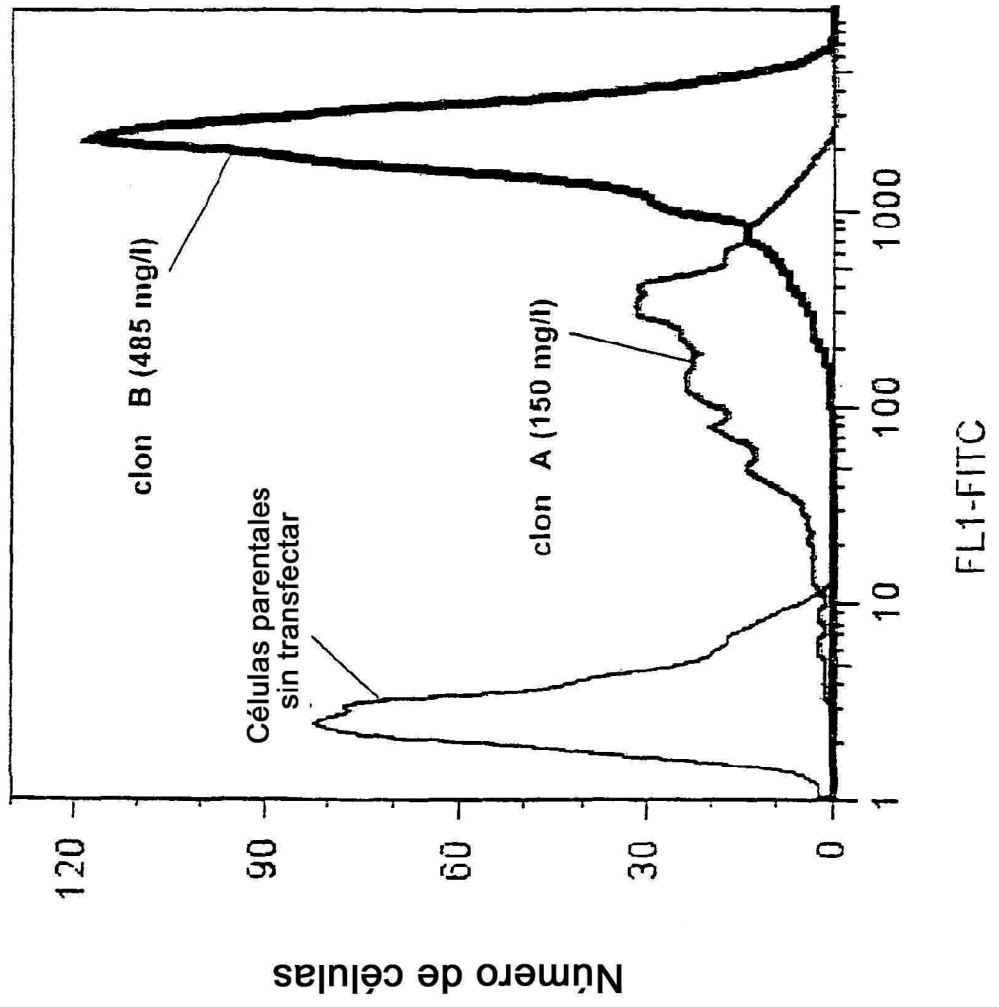


Figura 4B



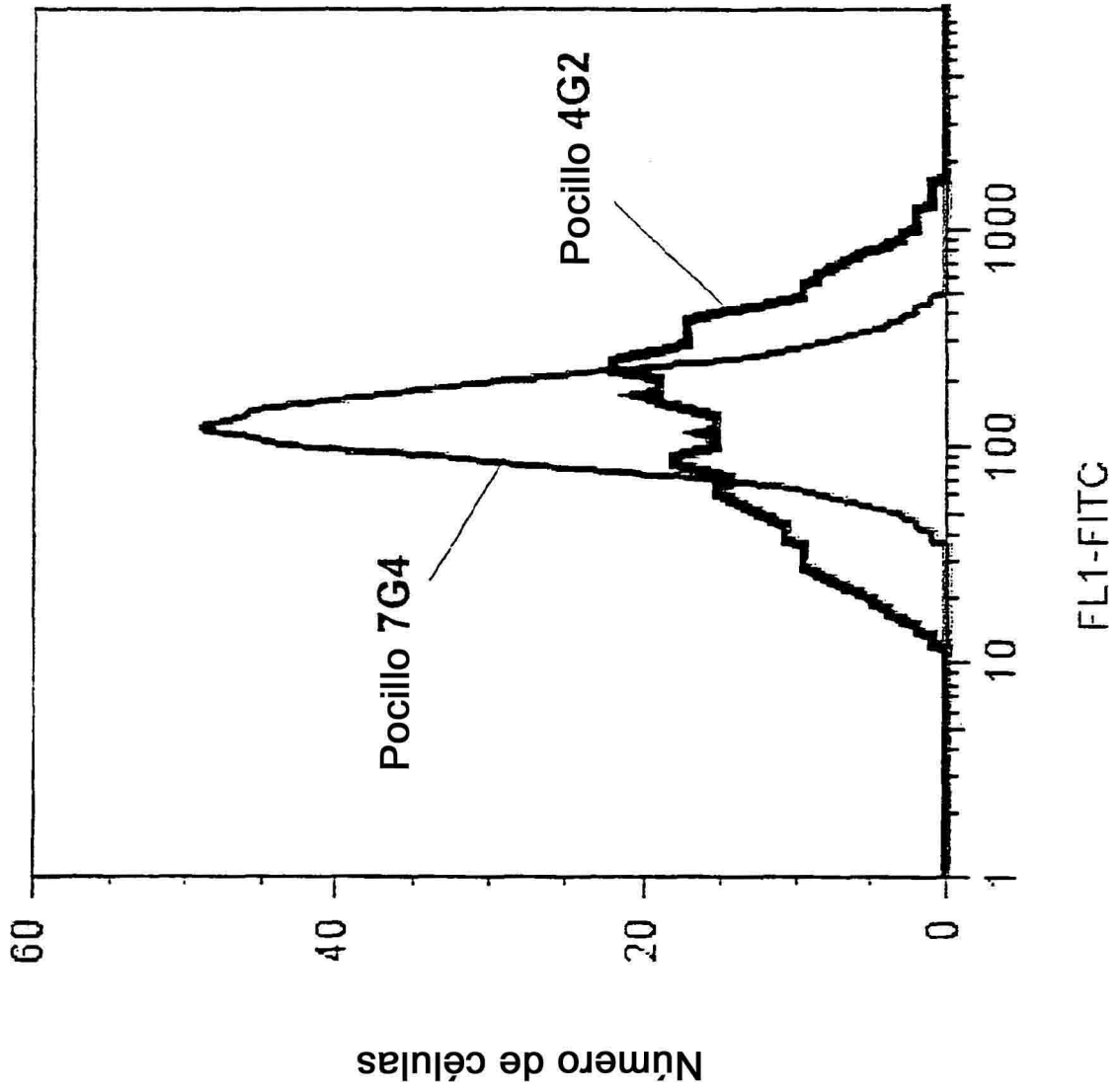
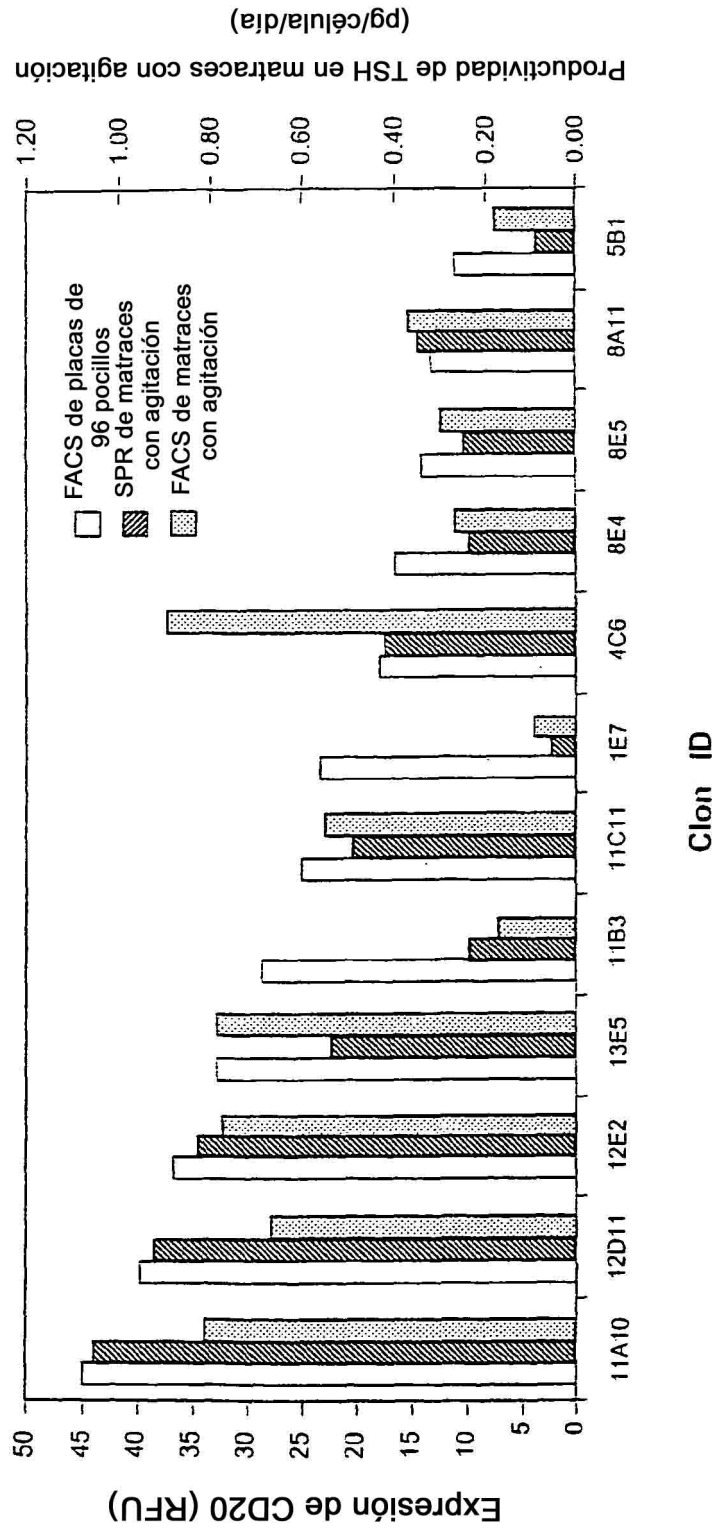
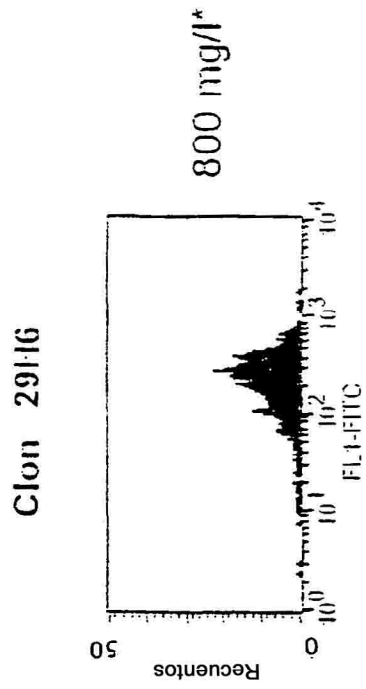
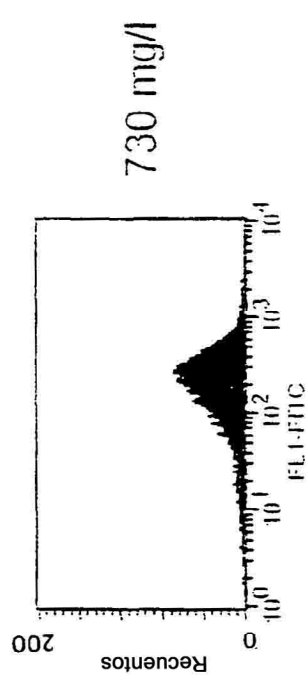


Figura 4C

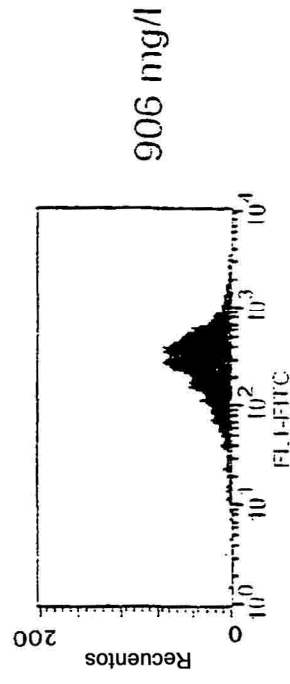




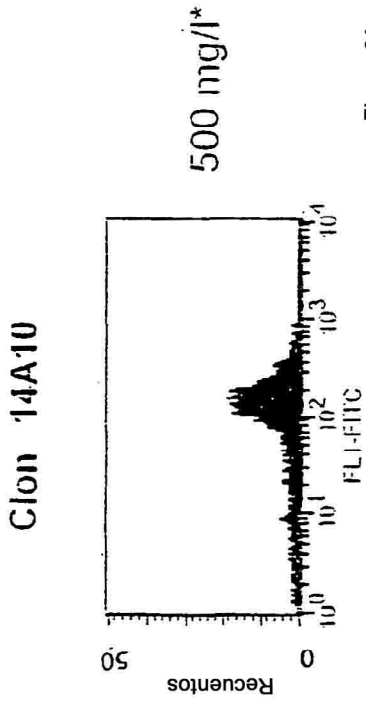
800 mg/l\*



730 mg/l



906 mg/l



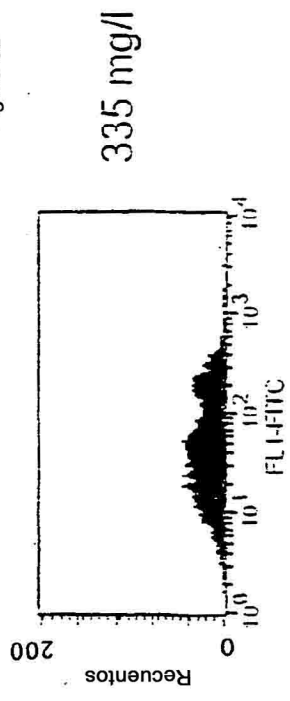
500 mg/l\*

Figura 6A



390 mg/l

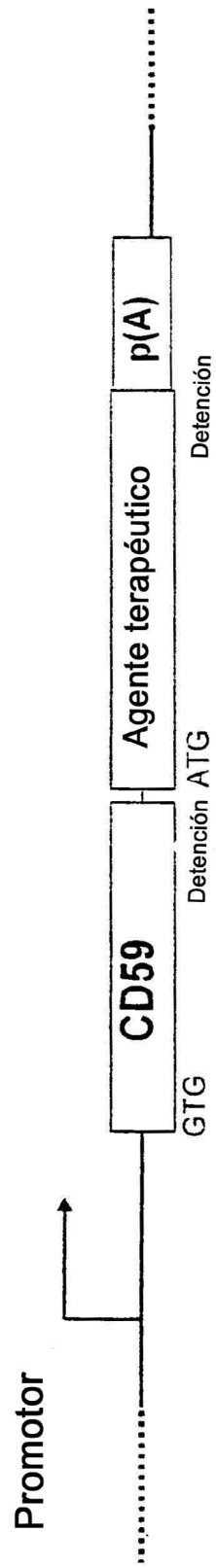
Figura 6B



335 mg/l

Figura 6C

\* Los títulos en el Panel A son para los cultivos en matraz con agitación sembrados diez días después de la selección de 96 pocillos



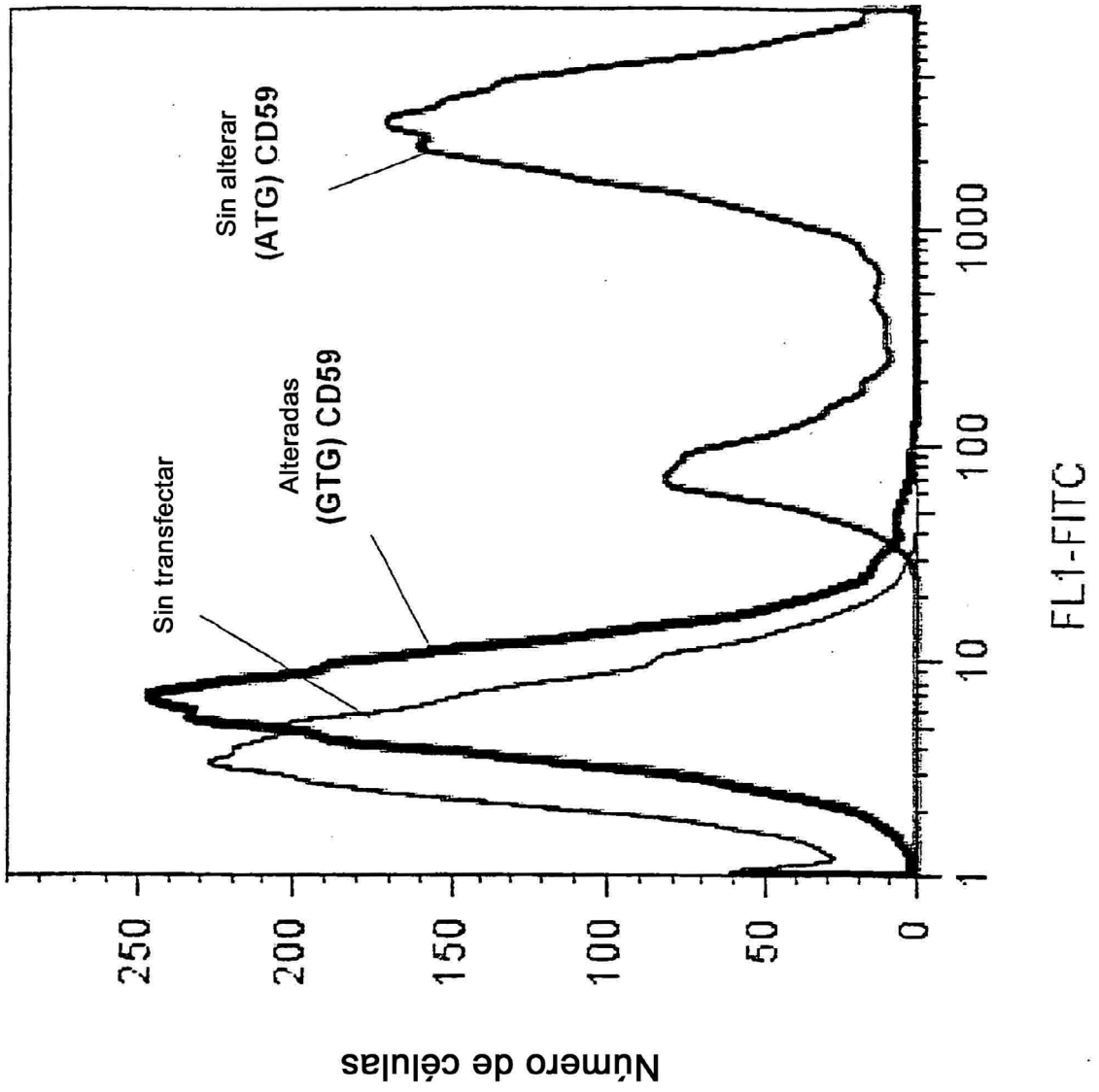


Figura 8