

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 413 379**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2009** **E 09778177 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013** **EP 2329020**

54 Título: **Presentación en la superficie celular de isoformas polipeptídicas mediante ultralectura de codón de terminación**

30 Prioridad:

28.08.2008 EP 08163161

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

16.07.2013

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**JOSTOCK, THOMAS;
KNOPF, HANS-PETER;
WILMS, BURKHARD y
NOMMAY, AUDREY JOSIANE**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 413 379 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

Presentación en la superficie celular de isoformas polipeptídicas mediante ultralectura de codón de terminación

5 La presente invención se refiere a un método para seleccionar células huésped de mamífero de alta producción así como a vectores y a células huésped adecuados para su uso en un método respectivo. Además, la presente invención se refiere a un método para producir eficazmente polipéptidos con un alto rendimiento.

10 La selección de líneas celulares de alta producción es una primera etapa importante en el desarrollo de cualquier bioprocedimiento y es uno de los mayores desafíos en la biotecnología. Un problema es que tales clones de alta producción son raros, pueden gastar mucha de su energía en la producción de polipéptidos y por tanto tener tasas de crecimiento reducidas. Esto conduce a sobrecrecimiento y células no productoras o de baja producción. Sin embargo, en la producción de polipéptidos es deseable obtener líneas celulares que produzcan el polipéptido de interés con un alto rendimiento. Tradicionalmente, se seleccionaban líneas celulares de alta producción mediante rondas de clonación por dilución limitante seguido por análisis de productos. Sin embargo, esta ruta tradicional tiene varias desventajas ya que es tanto laboriosa como costosa. Más allá de eso, el procedimiento completo requiere mucho tiempo y puede tardar varios meses en completarse e incluso entonces no hay ninguna garantía de que la línea celular clónica sea estable y por tanto útil para el bioprocesamiento industrial. Además, la selección de los mayores productores puede verse comprometida por limitaciones prácticas en el número de células que pueden examinarse reduciéndose posiblemente de ese modo la eficacia de selección de células de alta productividad, de baja abundancia.

20 Por tanto, ha habido muchos esfuerzos para proporcionar métodos alternativos para seleccionar clones de alta producción. Por ejemplo, la citometría de flujo ha hecho que sea más fácil monitorizar la productividad y aislar células con características específicas. Las ventajas importantes de la citometría de flujo incluyen la capacidad para examinar rápidamente grandes números de células, con la capacidad para distinguir subpoblaciones de células y la capacidad para seleccionar eficazmente células de baja abundancia que demuestran las características deseadas. La mayoría de los enfoques tradicionales para seleccionar células de alta productividad utilizando citometría de flujo se establecieron para la selección de células de hibridoma.

25 Un enfoque se basa en el contenido en anticuerpos en la superficie celular de células de hibridoma que presentan una cantidad aumentada de anticuerpos en la superficie celular que pueden identificarse y recuperarse a través del uso de anticuerpos marcados con fluorescencia. Sin embargo, se no se ha documentado ampliamente una correlación cuantitativa.

30 El documento US 2005/0059082 describe bibliotecas de células a base de hibridomas que expresan anticuerpos en una forma unida a la membrana y en una forma secretada. El sistema descrito se basa en un mecanismo de corte y empalme alternativo usando intrones específicos.

35 Se desarrollaron enfoques adicionales para seleccionar células basándose en anticuerpo secretado como estrategia alternativa para sortear algunas de las limitaciones de la selección de anticuerpos en la superficie celular. Un enfoque aplica una matriz de afinidad; el otro usa una tecnología de microgotitas de gel. El primer método se basa en la creación de una matriz de afinidad artificial, específica para el producto de interés secretado. Las moléculas secretadas se unen a la matriz de afinidad sobre la superficie de la célula secretora y se marcan posteriormente con reactivos fluorescentes específicos para análisis por citometría de flujo y clasificación celular.

40 La encapsulación en microgotitas implica una encapsulación completa de células individuales en perlas de agarosa. Estas perlas contienen anticuerpos de captura específicos y de ese modo capturan simultáneamente el producto secretado e impiden la alimentación cruzada de producto entre células.

45 Otros métodos se basan en la coexpresión de genes de marcadores, que pueden detectarse mediante citometría de flujo. Las desventajas son una vinculación débil de la expresión del gen de marcador (por ejemplo proteína verde fluorescente) con la expresión del gen de interés. Además, la expresión del gen de marcador supone para las células un coste de energía adicional y puede inducir estrés.

50 Un método alternativo se basa en una coexpresión inducible de proteínas de captura unidas a la membrana. Las proteínas de captura unidas a la membrana se anclan a la superficie celular y capturan el polipéptido secretado en cuanto se liberan de las células. Esas moléculas capturadas pueden detectarse entonces sobre la superficie de la célula. Sin embargo, se necesitan células huésped modificadas por ingeniería genética y además puede producirse alimentación cruzada de células no productoras.

El documento WO 2005/07337 describe un sistema de selección para examinar y seleccionar células que expresan un alto nivel de polipéptido usando FACS. Para permitir la clasificación FACS, se usa un casete de expresión, en el que el gen que codifica para la proteína de interés está separado de la secuencia de anclaje a la membrana celular

por un codón de terminación. Si la traducción realiza la ultralectura del codón de terminación, se expresa una proteína de fusión en la que el anclaje a la membrana celular une la proteína de fusión a la membrana celular. Esta proteína de fusión puede detectarse mediante FACS. La tasa de ultralectura del codón de terminación se potencia añadiendo un agente de supresión de la terminación. El anclaje a la membrana celular preferido es el anclaje GPI. Adicionalmente, se describe el anclaje PDGFR.

También se han usado productos secretados asociados de manera transitoria a la membrana celular con el fin de seleccionar células productoras. Sin embargo, se produce alimentación cruzada de células no productoras y este método tiene una actividad de fondo bastante alta. Además, se encontró que no es posible realizar varias rondas de enriquecimiento y selección.

Por tanto, hay una necesidad de desarrollar una tecnología para selección células huésped de alta producción. Por tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar un método para detectar células huésped recombinantes de alta producción dentro de una población grande de células de producción baja, media y/o no productoras y proporcionar un método para producir polipéptidos con un alto rendimiento.

La presente invención soluciona este problema proporcionando un método para enriquecer o seleccionar al menos una célula huésped eucariota que expresa un nivel deseado de un polipéptido de interés, que comprende:

a) proporcionar una pluralidad de células huésped eucariotas que comprenden un ácido nucleico heterólogo que comprende al menos un casete (Cas-POI) que comprende al menos un primer polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés, al menos un codón de terminación en el sentido de 3' del primer polinucleótido y un segundo polinucleótido en el sentido de 3' del codón de terminación que codifica para un anclaje transmembrana de inmunoglobulina;

b) cultivar las células huésped eucariotas para permitir la expresión del polipéptido de interés de manea que al menos una parte del polipéptido de interés se expresa como un polipéptido de fusión que comprende el anclaje transmembrana de inmunoglobulina, en el que dicho polipéptido de fusión está presentándose sobre la superficie de dicha célula huésped;

c) seleccionar al menos una célula huésped eucariota basándose en la presencia o cantidad del polipéptido de fusión presentado sobre la superficie celular.

Un "ácido nucleico heterólogo" se refiere a una secuencia de polinucleótido que se ha introducido en una célula huésped por ejemplo mediante el uso de técnicas recombinantes tales como transfección. La célula huésped puede comprender o no un polinucleótido endógeno correspondiente, respectivamente idéntico, al polinucleótido heterólogo. Sin embargo, en particular, el término "ácido nucleico heterólogo" se refiere a un polinucleótido foráneo introducido en la célula huésped. La introducción puede lograrse, por ejemplo, transfectando un vector adecuado que puede integrarse en el genoma de la célula huésped (transfección estable). En el caso de que el ácido nucleico heterólogo no se inserte en el genoma, el ácido nucleico heterólogo puede perderse en la fase posterior, por ejemplo cuando las células experimentan mitosis (transfección transitoria). Ambas variantes son adecuadas, sin embargo, se prefiere la transfección estable. También pueden mantenerse vectores adecuados en la célula huésped sin integrarse en el genoma, por ejemplo mediante replicación episomal. Sin embargo, también se conocen otras técnicas en la técnica anterior para introducir un ácido nucleico heterólogo en una célula huésped que también se describen en detalle adicional a continuación.

Un "polinucleótido" es un polímero de nucleótidos que se unen habitualmente de una desoxirribosa o ribosa a otra y se refiere a ADN así como a ARN, dependiendo del contexto. El término "polinucleótido" no comprende ninguna restricción de tamaño.

Un "casete" describe un grupo de elementos de polinucleótido, operativamente unidos entre sí, que comprende por ejemplo un polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés, un polinucleótido que codifica para un anclaje transmembrana de inmunoglobulina, un polinucleótido que codifica para un marcador, elementos reguladores y/u otros polinucleótidos descritos en el presente documento. Un "casete" tal como se usa en el presente documento comprende al menos dos elementos de polinucleótido. Un casete puede comprender o no elementos reguladores como polinucleótidos tales como, por ejemplo, un promotor, un potenciador y/o un sitio de poliA. Según una realización, el casete es un "casete de expresión" adecuado para expresar un polipéptido. Un casete de expresión comprende al menos un elemento de iniciación de la transcripción, por ejemplo un promotor, como elemento regulador operativamente unido a una región codificante, por ejemplo un polinucleótido (Pn-POI) que codifica para un polipéptido de interés, que está entonces por consiguiente bajo el control transcripcional de dicho elemento de iniciación de la transcripción. Un casete de expresión también puede comprender elementos reguladores adecuados para la terminación de la transcripción, tal como por ejemplo un sitio de poliA.

El "casete (Cas-POI)" comprende al menos un primer polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de

interés, al menos un codón de terminación en el sentido de 3' del primer polinucleótido y un segundo polinucleótido en el sentido de 3' del codón de terminación que codifica para un anclaje transmembrana de inmunoglobulina. Preferiblemente, el casete (Cas-POI) es un casete de expresión (Exp-POI).

5 El "casete de expresión (Exp-POI)" define un casete de expresión adecuado para expresar un polipéptido de interés (POI). Como casete de expresión, comprende al menos un elemento de iniciación de la transcripción. Dicho casete de expresión (Exp-POI) o bien comprende el polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés como parte de la región codificante o bien comprende un sitio adecuado para insertar un polinucleótido respectivo (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés, dependiendo de la realización usada de la presente invención que se describen en detalle adicional a continuación.

10 El concepto general de la presente invención es colocar un codón de terminación entre el polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés y el polinucleótido que codifica para el anclaje transmembrana de inmunoglobulina que permite el anclaje del polipéptido a la superficie celular. Los términos "anclaje transmembrana de inmunoglobulina" y "dominio transmembrana de inmunoglobulina" se usan como sinónimos en el presente documento. El codón de terminación constituye, o es parte de, una señal de terminación de la traducción y puede ser el codón de terminación natural del polinucleótido que codifica para el polinucleótido de interés y por tanto el
15 codón de terminación que se usa de manera natural para terminar la traducción. El diseño del casete (Cas-POI) da como resultado tras la expresión la generación de dos polipéptidos diferentes cuando los polinucleótidos primero y segundo se transcriben para dar un transcrito, que opcionalmente se procesa, y posteriormente se traduce. Según una variante de la traducción, la traducción del transcrito se aborta en el (al menos uno) codón de terminación ubicado entre el polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés y el polinucleótido que codifica para un anclaje transmembrana de inmunoglobulina. La terminación de la traducción en dicho codón de terminación da como resultado un producto de polipéptido, que no comprende el anclaje transmembrana. Según la segunda variante de la traducción, la traducción realiza la ultralectura de dicho al menos un codón de terminación, produciendo de ese modo un producto de traducción que comprende el polipéptido de interés y fusionado al mismo
20 el anclaje transmembrana de inmunoglobulina que puede anclar el polipéptido de fusión a la membrana celular. Tal polipéptido de fusión se transfiere y se fija a la superficie celular mediante el anclaje transmembrana de inmunoglobulina comprendido. Una característica importante de la presente invención es que tras la expresión del casete (Cas-POI), la terminación de la traducción en dicho codón de terminación en marco es en cierto grado "rezumante", ya que se produce ultralectura traduccional, produciendo de ese modo el polipéptido de fusión descrito. Ya que esta ultralectura traduccional se produce en una proporción definida, que también puede verse influida por la elección y el número del/de los codón/codones de terminación y las regiones adyacentes al codón de terminación, en particular el nucleótido que sigue al codón de terminación así como por las condiciones de cultivo, el nivel de polipéptido de fusión unido a la superficie se correlaciona directamente con el nivel de expresión del polipéptido de interés. La cantidad de polipéptido de fusión presente sobre la superficie de la célula es por tanto en un cierto grado
25 proporcional al nivel de expresión global del polipéptido de interés por la célula respectiva, ya que hay un fuerte vínculo entre la expresión en superficie del polipéptido de fusión y la productividad de la célula huésped en la expresión del polipéptido de interés. Por tanto, el nivel de polipéptido de fusión unido a la superficie es representativo de la productividad global de la célula individual y permite la selección de al menos una célula huésped eucariota basándose en la presencia o cantidad del polipéptido de fusión presentado sobre la superficie celular. Un ciclo de selección que comprende las etapas a), b) y c) permite la identificación y el aislamiento reproducibles y eficaces de células huésped eucariotas de alta producción.

Métodos de detección/selección adecuados como inmunotinción, citometría de flujo, microscopía fluorescente, MACS, métodos basados en afinidad tales como perlas magnéticas y técnicas similares permiten la identificación,
30 selección y/o enriquecimiento de células de alta producción basándose en la presencia y el nivel de polipéptido de fusión unido a la superficie. Por tanto, la presente invención conduce a una reducción drástica en los esfuerzos de examen permitiendo la selección y también el enriquecimiento de al menos una célula de alta producción o una población de células de alta producción a partir de una población de células de producción baja, media y/o no productoras. También es posible realizar varias rondas de selección y/o enriquecimiento, preferiblemente dos o tres. Por ejemplo, puede seleccionarse una célula huésped eucariota o población de células huésped de expresión
35 suficiente o incluso alta usando un compuesto de detección tal como por ejemplo un anticuerpo o fragmento del mismo que reconoce el polipéptido de fusión anclado a la membrana. Dicho compuesto de detección puede portar un marcador y por tanto puede detectarse mediante métodos de detección comunes.

Según las enseñanzas de la presente invención, se usa al menos un fragmento de un anclaje/dominio transmembrana de inmunoglobulina con el fin de anclar el polipéptido de interés a la superficie celular. En el caso de
40 que se use un fragmento en lugar de un anclaje transmembrana de inmunoglobulina de longitud completa, el fragmento respectivo debe permitir el anclaje del polipéptido de fusión a la superficie celular. El anclaje/dominio transmembrana de inmunoglobulina o fragmento funcional del mismo se incrusta en, y de ese modo se ancla fuertemente a, la membrana celular. Este anclaje fuerte distingue los anclajes de la presente invención de, por ejemplo, un anclaje GPI. El anclaje transmembrana de inmunoglobulina usado según la presente invención proporciona un anclaje muy robusto y por tanto duradero del polipéptido de fusión a la superficie celular que
45 tampoco es susceptible o al menos es menos susceptible al desprendimiento proteolítico. Esto se confirma mediante

5 el análisis de producto realizado tras la purificación. No se encuentra ningún anclaje transmembrana de inmunoglobulina (o fragmento de anclaje transmembrana de inmunoglobulina) que contenga especies de cadena pesada en el análisis de espectrometría de masas realizado. Esto es una importante ventaja con respecto a la técnica anterior ya que también se reduce el riesgo de contaminaciones del polipéptido de interés soluble secretado por polipéptidos de fusión desprendidos. Además, según las características analizadas de los polipéptidos de interés expresados, tampoco se encuentran diferencias significativas con respecto a material de sistemas de expresión/clones convencionales.

10 Las células obtenidas mediante el método de la presente invención tienen un nivel de expresión promedio superior a células clonadas por dilución limitada o métodos similares. También tienen un nivel de expresión promedio superior a células clonadas por ejemplo mediante citometría de flujo tras la transfección de un vector convencional que no comprende el dominio/anclaje transmembrana específico según la presente invención.

15 Generalmente se aislarán células que se identifican como resultado del procedimiento de examen/selección de la presente invención y pueden enriquecerse con respecto a células no seleccionadas de la población celular original. Pueden aislarse y cultivarse como células individuales. También pueden usarse en una o más rondas de selección adicionales, opcionalmente para análisis cuantitativo o cualitativo adicional, o pueden usarse, por ejemplo, en el desarrollo de una línea celular para la producción de proteínas. Según una realización, se usa directamente una población enriquecida de células de alta producción seleccionadas tal como se describió anteriormente como población para la producción del polipéptido de interés con alto rendimiento.

20 Ventajosamente, la productividad y el comportamiento de crecimiento observados de clones que coexpresan la variante transmembrana del polipéptido de interés, en particular anticuerpos y clones derivados de una configuración de vector clásico que no coexpresa la variante transmembrana del polipéptido de interés, parecen ser iguales. Además, también la estabilidad de producción clonal parece ser igualmente buena.

También se proporciona un método para producir un polipéptido de interés con alto rendimiento, comprendiendo el método:

25 a) proporcionar una pluralidad de células huésped eucariotas que comprenden un ácido nucleico heterólogo que comprende al menos un casete (Cas-POI) que comprende un primer polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés, al menos un codón de terminación en el sentido de 3' del primer polinucleótido y un segundo polinucleótido en el sentido de 3' del codón de terminación que codifica para un anclaje transmembrana de inmunoglobulina;

30 b) cultivar las células huésped eucariotas para permitir la expresión del polipéptido de interés de manera que al menos una parte del polipéptido de interés se expresa como un polipéptido de fusión que comprende el anclaje transmembrana de inmunoglobulina, en el que dicho polipéptido de fusión está presentándose sobre la superficie de dicha célula huésped;

35 c) seleccionar al menos una célula huésped eucariota basándose en la presencia o cantidad del polipéptido de fusión presentado sobre la superficie celular;

d) cultivar la célula huésped eucariota seleccionada en medio de cultivo en condiciones que permiten la expresión del polipéptido de interés.

40 El polipéptido de interés expresado puede obtenerse rompiendo las células huésped. Los polipéptidos también pueden expresarse, por ejemplo secretarse al medio de cultivo y pueden obtenerse a partir del mismo. También son posibles combinaciones del método respectivo. De ese modo, pueden producirse polipéptidos y obtenerse/aislarse eficazmente con alto rendimiento. Los polipéptidos obtenidos también pueden someterse a etapas de procesamiento adicionales tales como, por ejemplo, etapas de purificación y/o modificación con el fin de producir el polipéptido de interés con la calidad deseada. Según una realización, dichas células huésped se cultivan en condiciones libres de suero. Tal como se expuso anteriormente, mediante la inserción de al menos un codón de terminación entre el polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés y el segundo polinucleótido que codifica para un anclaje transmembrana de inmunoglobulina o fragmento funcional del mismo, es posible la selección de células huésped de alta expresión, permitiendo de ese modo la producción del polipéptido de interés con alto rendimiento. La etapa de selección/enriquecimiento de la presente invención es por tanto un componente importante e integral del procedimiento de producción global.

50 El uso de un anclaje transmembrana de inmunoglobulina o fragmento funcional del mismo según las enseñanzas de la presente invención es particularmente ventajoso cuando se producen moléculas de inmunoglobulinas, ya que dicho anclaje transmembrana de inmunoglobulina es adecuado de manera natural para fijar moléculas de inmunoglobulina a la superficie celular. Sorprendentemente, se encuentra que el anclaje transmembrana de inmunoglobulina puede usarse cuando se expresan moléculas de inmunoglobulinas en células huésped de mamífero

tales como células CHO. Esto es sorprendente, ya que la técnica anterior asumía que se necesita la coexpresión de las cadenas de receptor de Ig alfa e Ig beta en dichas células con el fin de lograr la expresión en superficie, y por consiguiente anclada a la membrana celular, de anticuerpos cuando se usa el dominio transmembrana de Ig como anclaje. Estos correceptores se expresan por ejemplo de manera natural en células B y derivados de células B tales como células de hibridoma o mieloma (por ejemplo células SP2/0) pero no se espera que se expresen en células distintas de células B tales como células CHO. Sin embargo, se encuentra que a pesar de la falta de expresión de los correceptores, la presentación en superficie de los polipéptidos de interés y en particular de moléculas de inmunoglobulina funcionaba bien en derivados de células distintas de células B tales como células CHO cuando se usa el anclaje/dominio transmembrana de Ig. Por tanto, según una realización, se usa una célula huésped eucariota que no es una célula B ni un derivado de célula B. Por consiguiente, se usa una célula huésped eucariota, preferiblemente de mamífero, que no expresa de manera natural las cadenas de receptor de Ig alfa e Ig beta. Por tanto, preferiblemente, la célula huésped es una célula CHO. Además, según una realización, no se produce coexpresión artificial de la cadena de receptor de Ig alfa e Ig beta en dicha célula huésped eucariota.

Puede usarse cualquier anclaje transmembrana de inmunoglobulina o fragmento funcional del mismo según las enseñanzas de la presente invención. En particular, el anclaje transmembrana de inmunoglobulina se selecciona del grupo que consiste en anclajes transmembrana de inmunoglobulina derivados de IgM, IgA, IgE, IgG y/o IgD o variantes funcionales de los mismos. Preferiblemente, el anclaje transmembrana de inmunoglobulina se deriva de IgG1, IgG2, IgG3 y/o IgG4. Es particularmente adecuado un anclaje transmembrana de inmunoglobulina IgG1 o una variante funcional del mismo. Se muestran ejemplos preferidos de un anclaje transmembrana derivado de IgG en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 7.

Según una realización, el anclaje transmembrana de inmunoglobulina comprende un dominio citoplasmático. Se prefiere el uso de un anclaje transmembrana de inmunoglobulina que comprende un dominio citoplasmático ya que proporciona un anclaje muy fuerte del polipéptido de fusión a la superficie celular. Es particularmente adecuado el uso de un dominio citoplasmático de inmunoglobulina. Según una realización, el dominio citoplasmático de inmunoglobulina se deriva de IgG, IgA e IgE o variantes funcionales de los anteriores. Estos dominios citoplasmáticos de inmunoglobulina son más grandes que los derivados de IgD e IgM. SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6 muestran secuencias de aminoácidos adecuadas de dominios citoplasmáticos derivados de IgG que pueden usarse como dominio citoplasmático. En SEQ ID NO: 3 se muestra un ejemplo preferido de un anclaje transmembrana derivado de IgG que comprende un dominio citoplasmático derivado de IgG.

Por tanto, el anclaje transmembrana de inmunoglobulina puede comprender una secuencia de polipéptido tal como se muestra SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 3, que permite el anclaje del polipéptido de fusión a la superficie de la célula huésped.

La secuencia de nucleótidos de una sección de un casete adecuado (Cas-POI) se muestra como SEQ ID NO: 1. El detalle mostrado comprende un codón de terminación en marco adecuado para la ultralectura traduccional y un polinucleótido que codifica para un dominio transmembrana de inmunoglobulina (Ig) particularmente adecuado que puede usarse según las enseñanzas de la presente invención. El codón de terminación está ubicado en el sentido de 3' del polinucleótido que codifica para el polipéptido de interés y por tanto la secuencia de polinucleótido que se transcribe y procesa para dar una secuencia de aminoácidos. La secuencia codificante se refiere a la secuencia que se traduce para dar aminoácidos. Por tanto, el codón de terminación no pertenece a la secuencia codificante y por consiguiente al polinucleótido que codifica para el polipéptido de interés. El codón de terminación puede ser el codón de terminación natural del polinucleótido que codifica para el polipéptido de interés. En este caso, no es necesario que esté presente ningún codón de terminación adicional pero puede estar presente (véase anteriormente).

El segundo polinucleótido del casete (Cas-POI) puede codificar para un anclaje transmembrana de inmunoglobulina, que comprende una secuencia de polipéptido mostrada como SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 3 muestra una variante adicional de un dominio transmembrana de inmunoglobulina adecuado, que también comprende un dominio citoplasmático (también se muestra el dominio citoplasmático solo como SEQ ID NO: 4), los supuestos aminoácidos correspondientes al codón de terminación rezumante y el codón adicional (WL) y una región de conexión (también se muestra la región de conexión sola como SEQ ID NO: 5). También pueden estar presentes otros aminoácidos en la posición correspondiente al al menos un codón de terminación y el codón adyacente, dependiendo del codón de terminación elegido y/o el número de codones de terminación y el/los codón/codones adyacente(s) usado(s). Ya que estos aminoácidos sólo están presentes en el polipéptido de fusión, no alteran la secuencia de aminoácidos del polipéptido de interés. Por consiguiente, puede usarse un dominio transmembrana de inmunoglobulina que comprende una secuencia de polipéptido tal como se muestra como SEQ ID NO: 2 ó 3 como anclaje transmembrana según las enseñanzas de la presente invención y por tanto en los métodos descritos, así como en las células huésped y los vectores descritos.

Como señal de terminación de la traducción y por tanto codón de terminación, puede usarse uno cualquiera de los tres codones de terminación que señalan la terminación de síntesis de proteínas (TAA (UAA), TAG (UAG) y TGA (UGA), también en diversos contextos de tetranucleótido, véase a continuación) entre el polinucleótido (Pn-POI) que

- codifica para el polipéptido de interés y el polinucleótido que codifica para el anclaje transmembrana de inmunoglobulina, dependiendo del nivel deseado de supresión (ultralectura). Tal como se expuso anteriormente, el codón de terminación también puede ser el codón de terminación natural del polinucleótido que codifica para el polipéptido de interés. Preferiblemente, dicha señal de terminación de la traducción tiene una eficacia de terminación incompleta con el fin de promover la ultralectura traduccional. La “característica rezumante” del codón de terminación también se ve influida por el/los codón/codones adyacente(s) y por tanto en el sentido de 3’ del al menos un codón de terminación, en particular el primer nucleótido puede influir en la ultralectura transcripcional (véase a continuación).
- El casete (Cas-POI) necesita transcribirse con el fin de permitir la expresión del polipéptido de interés. Según una realización, el casete (Cas-POI) es por tanto un casete de expresión. Según una realización adicional, el casete (Cas-POI) se integra en el genoma de la célula huésped de manera que el casete (Cas-POI) está bajo el control transcripcional de un elemento de iniciación de la transcripción de la célula huésped, tal como un promotor.
- La transcripción del ácido nucleico comprendido en el casete (Cas-POI) da como resultado un transcrito que comprende al menos
- un primer polinucleótido, dando como resultado la traducción de dicho primer polinucleótido el polipéptido de interés;
 - al menos un codón de terminación en el sentido de 3’ de dicho primer polinucleótido;
 - un segundo polinucleótido en el sentido de 3’ de dicho codón de terminación, dando como resultado la traducción de dicho segundo polinucleótido el anclaje transmembrana de inmunoglobulina.
- Al menos una parte del transcrito se traduce para dar un polipéptido de fusión que comprende el polipéptido de interés y el anclaje transmembrana de inmunoglobulina mediante ultralectura traduccional del al menos un codón de terminación. Puede producirse ultralectura traduccional de manera natural debido a la elección del codón de terminación/diseño de la señal de terminación de la traducción o puede inducirse adaptando las condiciones de cultivo, por ejemplo usando un agente de supresión de la terminación (véase a continuación).
- El casete (Cas-POI) usado en el método de la invención puede comprender sólo un único codón de terminación en el sentido de 5’ de la secuencia codificante para el anclaje transmembrana de inmunoglobulina o fragmento del mismo. Sin embargo, también es posible usar una serie de dos o más codones de terminación, por ejemplo dos o tres, o cuatro codones de terminación, que pueden ser iguales o diferentes. Además, el contexto del codón de terminación, es decir, el propio codón de terminación de trinucleótido así como el/los nucleótido(s), respectivamente el codón, inmediatamente en el sentido de 3’ del codón de terminación, tiene una influencia sobre los niveles de ultralectura. Sin embargo, es necesario garantizar que todavía se produzca un cierto nivel de ultralectura traduccional para permitir la producción del polipéptido de fusión que puede lograrse según una realización ajustando las condiciones de cultivo.
- El transcrito primario puede ser un pre-ARNm que comprende intrones. Un pre-ARNm respectivo se procesará (se someterá a corte y empalme) para dar ARNm. Alternativamente, la transcripción puede dar directamente como resultado ARNm. Durante la traducción del transcrito de ARNm, hay habitualmente un nivel natural de ultralectura de fondo del/de los codón/codones de terminación o puede inducirse un nivel de ultralectura respectivo adaptando las condiciones de cultivo. Este nivel de ultralectura da como resultado una cierta proporción de polipéptidos de fusión que también depende del número y la naturaleza del/de los codón/codones de terminación usado(s), el codón de terminación en el sentido de 3’ y en particular el contexto de tetranucleótido del/de los codón/codones de terminación y las condiciones de cultivo. Por consiguiente, se produce una cierta proporción de polipéptido de fusión según las enseñanzas de la presente invención a pesar de la presencia del codón de terminación. Estos polipéptidos de fusión comprenden el anclaje transmembrana de inmunoglobulina, que ancla fuertemente los polipéptidos de fusión a la superficie celular. Como resultado, los polipéptidos de fusión se presentan en la superficie de las células huésped, y pueden seleccionarse células que presentan altos niveles de polipéptidos de fusión recombinantes anclados a la membrana (lo que indica un alto nivel de polipéptido secretado) por ejemplo mediante citometría de flujo, en particular mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) cuando se ponen en contacto con un compuesto de detección marcado apropiadamente.
- Pueden diseñarse señales de terminación de la traducción adecuadas y por tanto codones de terminación y entornos de codones de terminación con eficacia de terminación de la traducción incompleta tal como se describe en la técnica anterior (véase por ejemplo Li *et al.* 1993, *Journal of Virology* 67 (8), 5062-5067; McCughan *et al.* 1995 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 5431-5435; Brown *et al.* 1990, *Nucleic Acids Research* 18 (21) 6339-6345, incorporados en el presente documento como referencia).

Según una realización, se usa el siguiente entorno de codón de terminación; el codón de terminación se muestra en

negrita y subrayado:

TGACTA secuencia de nucleótidos del entorno de codón de terminación en la hebra codificante y por tanto al nivel del ADN; el codón de terminación se muestra en negrita y subrayado

UGACUA secuencia de nucleótidos del entorno de codón de terminación al nivel del ARN

5 W L supuestos aminoácidos correspondientes al codón de terminación y el codón adyacente si se produce ultralectura traduccional; se muestra por tanto el producto de ultralectura más probable del polinucleótido mostrado

10 Los aminoácidos adicionales que se incorporan al polipéptido de fusión debido a la ultralectura del codón de terminación pueden ser de cualquier clase siempre que la proteína de fusión se presente sobre la superficie celular. Ya que dichos aminoácidos adicionales sólo se incorporan al polipéptido de fusión, el aminoácido del polipéptido de interés permanece sin alterar.

15 Además del posible uso de múltiples codones de terminación tras el polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés, normalmente será ventajoso usar múltiples codones de terminación en el sentido de 3' de la secuencia que codifica para el anclaje transmembrana de inmunoglobulina o fragmento funcional del mismo. El uso de múltiples codones de terminación en esta posición, por ejemplo hasta aproximadamente diez codones de terminación, tal como hasta aproximadamente seis u ocho codones de terminación, tal como aproximadamente dos, tres, cuatro o cinco codones de terminación, garantizará una terminación de la traducción eficaz.

20 La cantidad de polipéptido de fusión presente y por tanto detectable sobre la superficie celular habitualmente aumenta durante la síntesis del polipéptido ya que el polipéptido de fusión permanece anclado a la membrana celular y por tanto se acumula sobre la superficie celular a medida que continúa la expresión. Según una realización, el casete (Cas-POI) se construye de manera que la ultralectura del codón de terminación da como resultado aproximadamente $\leq 50\%$, $\leq 25\%$, $\leq 15\%$, $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 2,5\%$, $\leq 1,5\%$, $\leq 1\%$ o menos de $\leq 0,5\%$ de polipéptido de fusión. La parte restante se produce como la forma de polipéptido que no comprende el anclaje transmembrana de inmunoglobulina. Tal como se describe, el nivel de ultralectura del codón de terminación puede verse influido por la elección y el número de codón/codones de terminación y las regiones adyacentes al codón de terminación, en particular el nucleótido tras el codón de terminación, así como por las condiciones de cultivo usadas durante la etapa b). Dependiendo de factores tales como el nivel natural de ultralectura de fondo para un codón de terminación dado en un constructo dado, puede ser deseable en algunos casos usar más de un codón de terminación entre el polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés y el polinucleótido que codifica para el anclaje transmembrana de inmunoglobulina con el fin de reducir adicionalmente los niveles de ultralectura de fondo (véase anteriormente). La ventaja general de un nivel de ultralectura bastante bajo es una rigurosidad superior en el procedimiento enriquecimiento/selección y clasificación posterior, que se realiza preferiblemente mediante FACS, lo que conduce a una mejor resolución de clones de alta producción frente a los de ultralta producción. Si los niveles de ultralectura son demasiado altos, puede producirse saturación de la capacidad de la superficie celular para polipéptidos unidos a la membrana, lo que puede impedir la discriminación de niveles de expresión, en particular de altos niveles de expresión. Por tanto, un nivel de ultralectura bastante bajo es ventajoso con el fin de seleccionar clones de ultralta expresión. Por consiguiente, preferiblemente sólo se traduce $\leq 5\%$, $\leq 2\%$ o incluso $\leq 1,5\%$ del transcrito para dar un polipéptido de fusión.

40 Sin embargo, también es posible aumentar el nivel de ultralectura si es necesario/se desea, por ejemplo usando un agente de supresión de la terminación durante el cultivo. El uso de un agente de supresión de la terminación en los medios de cultivo durante la etapa b) es un modo de influir en el nivel de ultralectura del codón de terminación mediante las condiciones de cultivo. Un agente de supresión de la terminación es un agente químico que puede suprimir la terminación de la traducción que resulta de la presencia de un codón de terminación. En particular, el agente de supresión de la terminación es un antibiótico que pertenece al grupo de aminoglicósidos. Los antibióticos aminoglicósidos se conocen por su capacidad para permitir la inserción de aminoácidos alternativos en el sitio de un codón de terminación, dando como resultado de ese modo la "ultralectura" de un codón de terminación o entorno de codón de terminación que de lo contrario daría como resultado normalmente la terminación de la traducción. Los antibióticos aminoglicósidos incluyen G-418, gentamicina, paromomicina, higromicina, amikacina, kanamicina, neomicina, netilmicina, estreptomycin y tobramicina. Sin embargo, ya que es ventajoso un nivel de ultralectura bajo, la selección se realiza preferiblemente en ausencia de un agente de supresión de la terminación.

55 La presente invención puede aplicarse a cualquier tipo de célula huésped en la que se produzca ultralectura de codones de terminación de la traducción al menos en un pequeño porcentaje o pueda inducirse mediante la adición de un agente de supresión de la terminación. Ejemplos de células huésped eucariotas adecuadas son células huésped de mamífero que incluyen, por ejemplo, líneas de células de ovario de hámster chino (CHO), líneas de células de mono verde (COS), células de ratón (por ejemplo NS/0), líneas de células de riñón de cría de hámster (BHK) y líneas celulares y células humanas. Preferiblemente, la célula huésped es una línea de células CHO.

5 Aunque un ciclo de selección es suficiente para identificar células huésped de buena producción, según una realización, se realizan dos o más ciclos de selección, seleccionándose en cada ciclo de selección al menos una célula huésped eucariota basándose en la presencia o cantidad del polipéptido de fusión presentado sobre la superficie celular. Los resultados experimentales demuestran que un segundo ciclo de selección conduce habitualmente a resultados mejorados.

Según una realización, la etapa de selección c) comprende poner en contacto la pluralidad de células huésped con un compuesto de detección que se une al polipéptido de fusión y seleccionar al menos una célula huésped basándose en la presencia o cantidad del compuesto de detección unido a la superficie celular.

10 El compuesto de detección usado para unirse al polipéptido de fusión puede tener al menos una de las siguientes características:

- dicho compuesto está marcado;
- dicho compuesto está marcado fluorescentemente;
- dicho compuesto es un antígeno;
- dicho compuesto es una molécula de inmunoglobulina o un fragmento de unión de la misma;

15 - dicho compuesto es proteína A, G y/o L.

20 El compuesto de detección usado para unirse al polipéptido de fusión en la superficie celular puede ser por ejemplo una molécula de inmunoglobulina o un fragmento de la misma tal como un anticuerpo o fragmento anticuerpo, que reconoce el polipéptido de fusión. Básicamente, pueden detectarse todas las partes accesibles del polipéptido de fusión, conforme a lo mismo también la parte correspondiente al polipéptido de interés que se secreta en paralelo al polipéptido de fusión en forma soluble.

Según una realización, el compuesto de detección es un antígeno. Esta realización es adecuada, si el polipéptido de interés expresado es, por ejemplo, una molécula de inmunoglobulina o un fragmento de la misma tal como un anticuerpo, que se une al respectivo antígeno.

25 Con el fin de permitir la detección y selección, dicho compuesto de detección usado para unirse al polipéptido de fusión puede estar marcado. El compuesto de detección marcado que se une al polipéptido de fusión presentado sobre la superficie celular marca, respectivamente tiñe, la superficie celular. Cuanto más alta sea la cantidad de polipéptido de fusión que se expresa por la célula huésped, más compuesto de detección marcado se une. Esto tiene la ventaja de que la selección de las células huésped puede realizarse fácilmente ya que puede determinarse no sólo la presencia sino también la cantidad del compuesto de detección unido debido al marcador. Para seleccionar células huésped de alta producción, se seleccionan aquellas células de la población de células huésped que están marcadas de la manera más eficaz, respectivamente más intensa, por el compuesto de detección. Se prefiere un marcador fluorescente ya que esto permite una fácil detección mediante métodos de detección de la fluorescencia tales como por ejemplo citometría de flujo. El experto conoce marcadores fluorescentes adecuados.

35 Según una realización, pueden realizarse uno o más ciclos de selección, preferiblemente dos o tres, para seleccionar al menos una célula huésped eucariota basándose en el grado de unión del compuesto de detección a la superficie celular. Según esta realización, se selecciona al menos una célula huésped eucariota en cada ciclo de selección basándose en la cantidad de compuesto de detección unido. Por tanto, se seleccionan las células huésped que se marcaron de la manera más eficaz/intensa basándose en el grado, respectivamente la cantidad, de tinción de la superficie celular. Por ejemplo, puede seleccionarse el 5% superior o el 2% superior de las células huésped.

40 En el caso de que se suponga que se seleccionan varias células huésped eucariotas conjuntamente como una combinación (denominado enriquecimiento de combinación), se seleccionan varias células, por ejemplo al menos 10, al menos 50, al menos 500, al menos 1000 o al menos 50.000 y se incluyen en una combinación de células. Esta realización es particularmente ventajosa para obtener rápidamente mayores cantidades del polipéptido de interés ya que la combinación de células que comprende varias células huésped de alta producción seleccionadas según las enseñanzas de la presente invención puede expandirse más rápidamente que, por ejemplo, un clon celular.

45 Por tanto, además de la aplicación para clonación celular selectiva, la presente invención también puede usarse para el enriquecimiento de combinación de células de alta producción mediante lo cual pueden lograrse títulos comparables a líneas celulares clonales.

50 Pueden aislarse células huésped de alta producción y/o puede enriquecerse una población de células de alta producción basándose en el grado de unión del compuesto de detección a la superficie celular, en particular el

polipéptido de fusión. La unión del compuesto de detección al polipéptido de fusión sobre la superficie de la célula huésped puede detectarse mediante citometría de flujo, preferiblemente clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

5 En una realización preferida, se clasifican células huésped que comprenden una alta cantidad de polipéptidos de fusión, que por consiguiente representan una alta señal, usando clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). En el contexto de la presente invención, la clasificación FACS es particularmente ventajosa, puesto que permite un rápido examen de grandes números de células huésped para identificar y enriquecer aquellas células que expresan el polipéptido de interés con un alto rendimiento. Ya que según la realización preferida aproximadamente solo el 5% o menos del polipéptido se produce como polipéptido de fusión, una fluorescencia superior detectada sobre la superficie celular corresponderá a una expresión superior también del polipéptido de interés, que puede secretarse por ejemplo al medio de cultivo. Esas células, que muestran la tasa de fluorescencia más alta, pueden identificarse y aislarse mediante FACS. Se encuentra y se confirma mediante los ejemplos una correlación positiva y estadísticamente significativa entre la fluorescencia, tal como se determina mediante FACS, y la cantidad de polipéptido producido. Por tanto, puede usarse la clasificación FACS no sólo para un análisis cualitativo para identificar células que expresan un polipéptido de interés en general, sino que puede usarse realmente de manera cuantitativa para identificar aquellas células huésped que expresan altos niveles del polipéptido de interés. Por tanto, pueden seleccionarse/enriquecerse células huésped de alta producción basándose en el grado de unión del compuesto de detección marcado al polipéptido de fusión, que se ancla a la superficie celular. De ese modo, pueden seleccionarse/enriquecerse las mejores células productoras. Los resultados experimentales muestran que el uso del procedimiento de selección según la presente invención en combinación con análisis mediante FACS condujo a una reducción significativa de clones no productores en las poblaciones celulares seleccionadas. Además, la productividad promedio altamente aumentada de los clones permite la reducción drástica de los esfuerzos de examen de clones por ejemplo en el procedimiento de desarrollo de líneas celulares para producción biofarmacéutica. Por tanto, pueden desarrollarse líneas celulares para un número mucho más alto de candidatos o proyectos con menos recursos en comparación con enfoques de examen clásicos. Además, este procedimiento permite la evaluación del potencial de productividad y la distribución clonal de combinaciones transfectadas y seleccionadas mediante tinción de superficie y análisis mediante FACS en lugar de ensayos de productividad que requieren mucho tiempo. También puede usarse la tinción de superficie para analizar la estabilidad de producción clonal con respecto a la homogeneidad de la población celular. Podrán detectarse fácilmente subpoblaciones de baja producción o no productoras que puedan surgir.

Según una realización, el casete (Cas-POI) y/o (Cas-POI') comprende además

- un polinucleótido (Pn-TAG) que codifica para una etiqueta de afinidad ubicada en el sentido de 3' del al menos un codón de terminación que está ubicado en el sentido de 3' del primer polinucleótido y en el que dicho polinucleótido (Pn-TAG) está ubicado en el sentido de 5' del segundo polinucleótido que codifica para un anclaje transmembrana de inmunoglobulina y/o

- un polinucleótido (Pn-MARKER) que codifica para un marcador seleccionable.

Proporcionar el polinucleótido (Pn-TAG) tal como se definió anteriormente entre el codón de terminación y el polinucleótido que codifica para el anclaje transmembrana de inmunoglobulina tiene la ventaja de que se incorpora una etiqueta de afinidad en la proteína de fusión. Ya que la etiqueta de afinidad está ubicada en el sentido de 3' del al menos un codón de terminación, sólo se incluye en la variante de fusión del polipéptido de interés. Una "etiqueta de afinidad" se refiere a una secuencia de aminoácidos corta que puede detectarse/unirse por compuestos/agentes de unión tales como anticuerpos. Básicamente, la etiqueta de afinidad sirve como diana para agentes de captura y/o compuestos de detección. Ya que está ubicada entre el polipéptido de interés y el anclaje transmembrana de inmunoglobulina, también se presenta sobre la superficie celular y por consiguiente es accesible por ejemplo para compuestos de detección. Por tanto, la etiqueta de afinidad también puede funcionar como diana para el compuesto de detección con el fin de permitir la selección de células huésped eucariotas adecuadas. Usar por ejemplo una etiqueta de afinidad bien caracterizada como diana para la detección/selección es ventajoso ya que pueden usarse compuestos de detección existentes y bien caracterizados para la detección. Además, puede usarse el mismo compuesto de detección para diferentes clases de polipéptidos de interés que van a expresarse. La generación de compuestos de detección específicos para los diferentes polipéptidos de interés sería obsoleta según esta realización ya que podría usarse el mismo compuesto de detección específico para la etiqueta de afinidad. Ya que la etiqueta de afinidad constituye una parte integral del polipéptido de fusión, también se ancla fuertemente a la superficie de la célula huésped eucariota debido a la presencia del anclaje transmembrana. Los polipéptidos de fusión fuertemente anclados no deben ser susceptibles de desprendimiento (véase anteriormente).

55 El desprendimiento de proteínas de fusión unidas a la membrana puede constituir, dependiendo del uso previsto del polipéptido secretado, un problema de contaminación aunque el desprendimiento sea un acontecimiento poco común cuando se usa un anclaje transmembrana de inmunoglobulina. Por ejemplo, cuando se expresan proteínas/polipéptidos terapéuticos, es deseable obtener el producto secretado tan puro como sea posible. Cuando se usa una etiqueta de afinidad tal como, por ejemplo, una etiqueta de His, dicha etiqueta de afinidad estará

comprendida al menos parcialmente en la proteína desprendida. Debido a la presencia de la etiqueta de afinidad, es posible eliminar polipéptidos de fusión desprendido (si están presentes) de la muestra de polipéptidos secretados usando procedimientos de purificación por afinidad convencionales (por ejemplo Ni - NTA en el caso de una etiqueta de His). Por tanto, la etiqueta de afinidad es útil con el fin de eliminar fácilmente posibles contaminaciones de la muestra.

Además, puede usarse la etiqueta de afinidad con el fin de controlar la pureza del polipéptido expresado/obtenido. Para aplicaciones en las que se necesitan proteínas/polipéptidos altamente puros, puede ser ventajoso/obligatorio proporcionar ensayos adecuados para demostrar que el producto obtenido es puro y que por consiguiente no comprende contaminaciones debido a los polipéptidos de fusión desprendidos. Un ensayo de este tipo podrá basarse en la detección de la etiqueta de afinidad. Ya que la etiqueta de afinidad sólo está presente en el polipéptido de fusión, puede servir como marcador específico para la presencia de polipéptidos de fusión (o versiones degradadas/desprendidas de los mismos) en la muestra. Si todavía puede detectarse la etiqueta de afinidad en el producto obtenido cuando se usa un compuesto de detección específico para la etiqueta de afinidad, todavía hay trazas de polipéptido de fusión desprendido en la muestra y la muestra puede necesitar, dependiendo de la cantidad, purificación adicional. Si no puede detectarse etiqueta de afinidad en la muestra, no deben estar presentes o respectivamente están presentes cantidades muy bajas de polipéptido de fusión desprendido en la muestra analizada, garantizando de ese modo que la muestra es suficientemente pura para la aplicación prevista.

Por consiguiente, cuando se produce el polipéptido de interés, el polipéptido de interés obtenido puede procesarse adicionalmente

- eliminando contaminaciones de polipéptido de fusión desprendido mediante purificación por afinidad que selecciona como diana la etiqueta de afinidad y/o

- detectando la presencia o ausencia de proteína de fusión desprendida seleccionando como diana la etiqueta de afinidad.

Ejemplos adecuados para etiquetas de afinidad son por ejemplo V5, una etiqueta de His, FLAG, Strep, HA, c-Myc o similares. También pueden crearse artificialmente etiquetas de afinidad adecuadas.

Según una realización adicional, el casete (Cas-POI) y/o (Cas-POI') comprende un polinucleótido adicional (Pn-MARKER) que codifica para un marcador seleccionable. Preferiblemente, dicho marcador seleccionable está ubicado en el sentido de 3' del polinucleótido que codifica para el anclaje transmembrana de inmunoglobulina y por tanto está ubicado, tras la expresión del constructo, en el sitio citoplasmático de la membrana celular cuando se presenta el polipéptido de fusión. Según una realización, ningún codón de terminación está ubicado entre el polinucleótido que codifica para el anclaje/dominio transmembrana de inmunoglobulina y el polinucleótido (Pn-MARKER), ya que se supone que se expresan como una fusión. Deben proporcionarse codones de terminación y señales de terminación de la transcripción adecuados en el sentido de 3' de la secuencia codificante del polinucleótido (Pn-MARKER) para garantizar una terminación eficaz de la traducción y la transcripción tras la expresión del polinucleótido (Pn-MARKER). Dicho polinucleótido (Pn-MARKER) puede ser, por ejemplo, un gen de resistencia a fármacos o un gen indicador. Se describen ejemplos adecuados en el presente documento. Según una realización, se usa proteína verde fluorescente (GFP) o luciferasa como indicador. Esto permite la selección de las células huésped eucariotas basándose en dos características de la proteína de fusión.

Según una realización, el casete (Cas-POI) y/o (Cas-POI') es un casete de expresión. Los expertos en la técnica podrán seleccionar vectores, secuencias de control de la expresión y huéspedes adecuados para realizar los métodos de la invención. Por ejemplo, al seleccionar un vector, debe considerarse el huésped porque puede ser necesario que el vector pueda replicarse en el mismo y/o pueda integrarse en el cromosoma. También se describen a continuación y en las reivindicaciones vectores adecuados que pueden usarse en los métodos de selección y producción según la presente invención.

Además, se proporciona un ácido nucleico vector adecuado para expresar al menos un polipéptido de interés en una célula huésped eucariota, preferiblemente de mamífero, que comprende al menos un casete (Cas-POI) que comprende un sitio de inserción para un primer polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés y/o un primer polinucleótido (Pn-POI) que codifica para un polipéptido de interés, al menos un codón de terminación en el sentido de 3' del primer polinucleótido y un segundo polinucleótido en el sentido de 3' del codón de terminación que codifica para un anclaje transmembrana de inmunoglobulina.

Un "ácido nucleico vector" según la presente invención es un polinucleótido que puede portar al menos un fragmento de ácido nucleico foráneo. Un ácido nucleico vector funciona como un "portador molecular", que suministra fragmentos de ácidos nucleicos a una célula huésped. Puede comprender al menos un casete de expresión que comprende secuencias reguladoras. Preferiblemente, el ácido nucleico vector comprende al menos un casete de expresión. Pueden insertarse polinucleótidos foráneos en el/los casete(s) de expresión del ácido nucleico vector con

el fin de expresarse a partir del/de los mismo(s). El ácido nucleico vector según la presente invención puede estar presente en forma circular o linealizada. El término "ácido nucleico vector" también comprende cromosomas artificiales o polinucleótidos respectivos similares que permiten la transferencia de fragmentos de ácido nucleico foráneo.

- 5 Puede usarse un vector respectivo como vector de expresión con el fin de realizar los métodos de examen y producción descritos anteriormente. Las ventajas de un ácido nucleico vector respectivo también se describieron anteriormente conjuntamente con el método de examen.

Dicho ácido nucleico vector puede comprender además al menos

- un primer polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés;

- 10 - un casete de expresión (Exp-MSM) que comprende un gen de marcador seleccionable de mamífero; y/o

- un casete de expresión (Exp-MASM) que comprende un gen de marcador seleccionable amplificable de mamífero.

El casete de expresión (Exp-MSM) define el casete de expresión que comprende un gen de marcador seleccionable de mamífero ("mammalian selectable marker gene").

- 15 El casete de expresión (Exp-MASM) define el casete de expresión que comprende un gen de marcador seleccionable amplificable de mamífero ("mammalian amplifiable selectable marker gene").

- 20 Los términos "5'" y "3'" son una convención usada para describir las características de una secuencia de ácido nucleico relacionadas con o bien la posición de elementos genéticos y/o bien la dirección de acontecimientos (de 5' a 3'), tal como por ejemplo la transcripción por ARN polimerasa o la traducción por el ribosoma que avanza en la dirección de 5' a 3'. Son sinónimos en el sentido de 5' (5') y en el sentido de 3' (3'). Convencionalmente, las secuencias de ADN, los mapas génicos, los esquemas de vectores y las secuencias de ARN se dibujan con la dirección de 5' a 3' de izquierda a derecha o se indica la dirección de 5' a 3' con flechas, apuntando las puntas de las flechas en la dirección de 3'. Por consiguiente, 5' (en el sentido de 5') indica elementos genéticos situados hacia la izquierda, y 3' (en el sentido de 3') indica elementos genéticos situados hacia la derecha, cuando se sigue esta convención.

- 25 La disposición y orientación de los casetes de expresión también es un aspecto importante. Según una realización, el casete de expresión (Exp-MASM) está ubicado en 5' y el casete de expresión (Exp-MSM) está ubicado en 3' del casete de expresión (Exp-POI). Pueden insertarse casetes de expresión adicionales entre los casetes de expresión (Exp-POI) y (Exp-MSM), tales como, por ejemplo, un casete de expresión adicional (Exp-POI') para expresar un polipéptido de interés adicional (descrito en detalle adicional a continuación). Los casetes de expresión (Exp-MASM), (Exp-POI) y (Exp-MSM) están dispuestos todos preferiblemente en la misma orientación de 5' a 3'. Los inventores encontraron que esta configuración de ácido nucleico vector particular permite la generación rápida de líneas celulares de alto rendimiento.

- 35 Según una alternativa, el casete de expresión (Exp-POI) no comprende el polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés. Por tanto, se proporciona un vector de expresión "vacío" con un casete de expresión (Exp-POI) que no comprende aún el polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés. Sin embargo, dicho polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés puede incorporarse en el casete de expresión (Exp-POI) usando métodos de clonación apropiados, por ejemplo usando enzimas de restricción con el fin de insertar el polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés en el casete de expresión (Exp-POI). Para este fin, el casete de expresión (Exp-POI) puede comprender por ejemplo un sitio de clonación múltiple (MCS) que puede usarse por ejemplo en todos los marcos de lectura. Por ejemplo, puede proporcionarse un ácido nucleico vector "vacío" respectivo a los clientes, que entonces insertan su polinucleótido de interés específico en el casete de expresión (Exp-POI). El polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés se inserta de manera que está presente un codón de terminación entre el polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés y el polinucleótido que codifica para el anclaje transmembrana. El casete de expresión (Exp-POI) también puede comprender un polinucleótido de reemplazo o una secuencia de ácido nucleico de relleno, que puede escindirse y reemplazarse por el polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés. La presente invención también proporciona un ácido nucleico vector tal como se describió anteriormente, que comprende un casete de expresión (Exp-POI) que comprende un primer polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés, al menos un codón de terminación en el sentido de 3' del primer polinucleótido y un segundo polinucleótido en el sentido de 3' del codón de terminación que codifica para un anclaje transmembrana de inmunoglobulina. Esta realización se refiere básicamente al ácido nucleico vector de expresión final. Básicamente, se aplica lo mismo en el caso de que se use un casete (Cas-POI) en lugar de un casete de expresión (Exp-POI).

Según una realización, el ácido nucleico vector es circular y el casete de expresión (Exp-MSM) se dispone en 3' del

casete de expresión (Exp-POI) y el casete de expresión (Exp-MASM) se dispone en 3' del casete de expresión (Exp-MSM).

5 El vector de expresión según la presente invención puede comprender un casete de expresión adicional (Exp-POI') para expresar un polipéptido de interés. En el ácido nucleico vector final, dicho casete de expresión adicional (Exp-POI') comprende el polinucleótido adicional para expresar el polipéptido de interés adicional. Dependiendo de los polipéptidos que vayan a expresarse, dicho casete de expresión adicional (Exp-POI') puede comprender o no un polinucleótido que codifica para un anclaje de membrana (o un péptido señal para unirse a un anclaje respectivo, tal como un anclaje GPI), que está separado del polinucleótido que codifica para el polipéptido de interés adicional por un codón de terminación. Por tanto, también es posible que varios casetes de expresión para expresar diferentes polipéptidos estén dispuestos en el vector de expresión según la presente invención. Sin embargo, sólo el casete de expresión (Exp-POI) necesita tener el ensamblaje de codón de terminación rezumante y por tanto un codón de terminación en el sentido de 3' del primer polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés y un segundo polinucleótido en el sentido de 3' del codón de terminación que codifica para un anclaje transmembrana de inmunoglobulina, los casetes de expresión adicionales (Exp-POI') pueden tener o no un ensamblaje de codón de terminación respectivo.

Una realización respectiva que usa al menos dos casetes de expresión (Exp-POI) y (Exp-POI') para expresar los polipéptidos de interés es particularmente ventajosa, en el caso de que se exprese una molécula de inmunoglobulina o fragmento funcional de la misma. Por consiguiente, se proporciona un ácido nucleico vector para expresar al menos una molécula de inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma, que comprende

20 - un casete de expresión (Exp-POI) que comprende un primer polinucleótido que codifica para la cadena pesada y/o ligera de la molécula de inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma, al menos un codón de terminación en el sentido de 3' del primer polinucleótido y un segundo polinucleótido en el sentido de 3' del codón de terminación que codifica para al menos un anclaje transmembrana de inmunoglobulina; y/o

25 - un casete de expresión adicional (Exp-POI') que comprende un polinucleótido que codifica para la correspondiente cadena ligera y/o pesada de una molécula de inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma. El casete de expresión (Exp-POI') codifica para la cadena de inmunoglobulina que corresponde a la cadena de inmunoglobulina del casete de expresión (Exp-POI) (es decir, si el casete de expresión (Exp-POI) codifica para la cadena pesada, el casete de expresión (Exp-POI') codifica para la cadena ligera y viceversa). Por tanto, puede expresarse una molécula de inmunoglobulina funcional (o fragmento de la misma) a partir del vector.

30 Se prefiere que la cadena pesada o un fragmento funcional de la misma se exprese a partir del casete de expresión (Exp-POI) y por tanto se exprese según un cierto grado como un polipéptido de fusión. La cadena ligera correspondiente o un fragmento funcional de la misma se expresa según una realización a partir de un casete de expresión (Exp-POI'). Dicho casete de expresión (Exp-POI') puede estar ubicado en el mismo ácido nucleico vector. Sin embargo, también puede estar ubicado en un ácido nucleico vector separado. Sin embargo, se prefiere que los casetes de expresión (Exp-POI) y (Exp-POI') estén ubicados en un ácido nucleico vector. También es posible expresar ambas cadenas (la cadena pesada y la cadena ligera correspondiente) a partir de un casete de expresión. Por ejemplo, pueden expresarse como un polipéptido de fusión que comprende una señal de autocorte y empalme o un sitio sensible a proteasas para obtener dos cadenas separadas. También es posible una configuración bi o multicistrónica, en la que se obtienen dos o más polipéptidos (POI y POI') a partir de un ARNm que puede comprender por ejemplo uno o más sitios internos de entrada al ribosoma.

Según una realización, se proporciona un ácido nucleico vector para expresar al menos una molécula de inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma, que comprende

45 - un casete de expresión (Exp-POI) que comprende un primer polinucleótido que codifica para la cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma, al menos un codón de terminación en el sentido de 3' del primer polinucleótido y un segundo polinucleótido en el sentido de 3' del codón de terminación que codifica para un anclaje transmembrana de inmunoglobulina; y

- un casete de expresión adicional (Exp-POI') que comprende a polinucleótido que codifica para la cadena ligera correspondiente de una molécula de inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma.

50 Preferiblemente, el casete de expresión (Exp-POI) comprende la cadena pesada y ambos casetes de expresión (Exp-POI) y (Exp-POI') están dispuestos en la misma orientación. Preferiblemente, el casete de expresión (Exp-POI') está dispuesto en 5' del casete de expresión (Exp-POI). Disponer el casete de expresión para la cadena ligera en 5' con respecto al casete de expresión de la cadena pesada demostró ser beneficioso con respecto a la tasa de expresión de moléculas de inmunoglobulina. Según una realización, también se pretende diseñar el vector de expresión de manera que el/los casete(s) de expresión ya comprendan el anclaje transmembrana de inmunoglobulina y el al menos un codón de terminación rezumante (por ejemplo comprendido en una secuencia de

relleno) y, opcionalmente, al menos parte de las regiones constantes de una molécula de inmunoglobulina. Los fragmentos que codifican para las partes variables de las moléculas de inmunoglobulina pueden insertarse entonces por el usuario/cliente en los casetes de expresión usando estrategias de clonación apropiadas con el fin de obtener el vector de expresión final.

5 Los ejemplos no limitativos para genes de marcador seleccionable de mamífero que pueden estar comprendidos en el casete de expresión (Exp-MSM) incluyen genes de resistencia a antibióticos por ejemplo que confieren resistencia a G418; higromicina (hyg o hph, disponible comercialmente de Life Technologies, Inc. Gaithersboro, Md.); neomicina (neo, disponible comercialmente de Life Technologies, Inc. Gaithersboro, Md.); zeocina (Sh Ble, disponible comercialmente de Pharmingen, San Diego Calif.); puromicina (pac, puromicina-N-acetil-transferasa, disponible de Clontech, Palo Alto Calif.), ouabaina (oua, disponible de Pharmingen) y blasticidina (disponible de Invitrogen). Dichos genes de marcador seleccionable de mamífero permiten la selección de células huésped de mamífero que comprenden dichos genes y por tanto de células huésped que comprenden el vector. El término "gen" tal como se usa en el presente documento no sólo se refiere a la secuencia codificante del gen de tipo natural sino que también se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica para una variante funcional del marcador seleccionable que proporciona la resistencia pretendida. En este caso, versiones truncadas o mutadas de un gen de tipo natural también quedan abarcadas siempre que proporcionen la resistencia pretendida. El gen de marcador seleccionable de mamífero comprende preferiblemente elementos reguladores foráneos tales como por ejemplo un promotor constitutivo fuerte. Según una realización preferida, dicho casete de expresión (Exp-MSM) comprende un gen que codifica para una neomicina fosfotransferasa enzimáticamente funcional (I o II) que comprende preferiblemente elementos reguladores foráneos tales como por ejemplo un promotor constitutivo fuerte tal como el promotor de SV40. Esta realización funciona bien en combinación con el uso de un gen que codifica para una DHFR enzimáticamente funcional como gen de marcador seleccionable amplificable de mamífero.

Los genes de marcador seleccionable amplificable de mamífero incorporados en el casete de expresión (Exp-MASM) permiten la selección de células huésped que contienen vector así como la amplificación génica. Un ejemplo no limitativo de un gen de marcador seleccionable amplificable de mamífero es el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) que codifica para la enzima DHFR. El gen de marcador seleccionable amplificable de mamífero comprende preferiblemente elementos reguladores foráneos tales como por ejemplo un promotor constitutivo fuerte. Otros sistemas actualmente en uso son, entre otros, el sistema de la glutamina sintetasa (gs) (Bebington *et al.*, 1992) y el sistema de selección impulsada por histidinol (Hartmann y Mulligan, 1988). Estos marcadores amplificables también son marcadores seleccionables y por tanto pueden usarse para seleccionar las células que han obtenido el vector. DHFR y glutamina sintetasa proporcionan buenos resultados. En ambos casos, se produce selección en ausencia del metabolito apropiado (hipoxantina y timidina en el caso de DHFR, glutamina en el caso de GS), impidiendo el crecimiento de células no transformadas. Con sistemas amplificables tales como el sistema de DHFR, puede aumentarse la expresión de una proteína recombinante exponiendo las células a determinados agentes que promueven la amplificación génica tales como por ejemplo metotrexato (MTX) en el caso del sistema de DHFR. Por ejemplo puede usarse la secuencia codificante del gen de DHFR de tipo natural o un mutante de DHFR que permite por ejemplo una selección de líneas celulares dhfr+. Un inhibidor adecuado para la amplificación del gen promotor de GS es metionina sulfoximina (MSX). La exposición a MSX también da como resultado la amplificación génica.

Según una realización, dicho casete de expresión (Exp-MASM) comprende un gen que codifica para dihidrofolato reductasa (DHFR) enzimáticamente funcional que se usa preferiblemente conjuntamente con el promotor de SV40.

Por consiguiente, se proporcionan ácidos nucleicos vectores en los que los casetes de expresión comprenden al menos un elemento promotor y/o promotor/potenciador. Aunque los límites físicos entre estos dos elementos de control no siempre están claros, el término "promotor" se refiere habitualmente a un sitio en la molécula de ácido nucleico al que se une una ARN polimerasa y/o cualquier factor asociado y en el que se inicia la transcripción. Los potenciadores potencian la actividad del promotor, temporalmente así como espacialmente. Muchos promotores son transcripcionalmente activos en una amplia gama de tipos celulares. Los promotores pueden dividirse en dos clases, los que funcionan constitutivamente y los que se regulan mediante inducción o desrepresión. Los promotores usados para la producción a alto nivel de proteínas en células de mamífero deben ser fuertes y preferiblemente activos en una amplia gama de tipos celulares. Los promotores constitutivos fuertes que impulsan la expresión en muchos tipos celulares incluyen, pero no se limitan a, el promotor tardío principal de adenovirus, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano, el promotor de SV40 y de virus del sarcoma de Rous, y el promotor de 3-fosfoglicerato cinasa murina, EF1 a. Se logran buenos resultados con el vector de expresión de la presente invención cuando el promotor y/o potenciador se obtiene o bien de CMV y/o bien de SV40.

Según una realización, el/los casete(s) de expresión para expresar el/los polipéptido(s) de interés comprende(n) un promotor y/o potenciador más fuerte que los casetes de expresión para expresar los marcadores seleccionables. Esta disposición tiene el efecto de que se genera más transcrito para el polipéptido de interés que para los marcadores de selección. Es ventajoso que la producción del polipéptido de interés que se secreta sea dominante con respecto a la producción de los marcadores de selección, puesto que la capacidad de células individuales para producir proteínas heterólogas no es ilimitada y por tanto debe centrarse en el polipéptido de interés.

Según una realización, los casetes de expresión (Exp-POI) y (Exp-POI') (si está presente) que se usa(n) para expresar el polipéptido de interés comprende(n) un promotor/potenciador de CMV como elementos reguladores. Los casetes de expresión (Exp-MSM) y (Exp-MASM), que expresan preferiblemente los genes de marcador de DHFR y de neomicina, comprenden un promotor de SV40 o un promotor/potenciador de SV40. Se sabe que el promotor de CMV es uno de los promotores más fuertes disponibles para la expresión en mamíferos y conduce a una tasa de expresión muy buena. Se considera que proporciona significativamente más transcrito que el promotor de SV40.

La mayoría de los ARNm nacientes eucariotas presentan una cola de poliA en su extremo 3' que se añade durante un proceso complejo que implica la escisión del transcrito primario y una reacción de poliadenilación acoplada. La cola de poliA es ventajosa para la estabilidad y capacidad de transferencia del ARNm. Por tanto, los casetes de expresión del vector según la presente invención comprenden habitualmente un sitio de poliadenilación. Hay varias señales de poliA eficaces que pueden usarse en vectores de expresión de mamífero, incluyendo las derivadas de hormona de crecimiento bovina (ghb), beta-globina de ratón, la unidad de transcripción temprana de SV40 y el gen de timidina cinasa del virus del herpes simple. Sin embargo, también se conocen sitios de poliadenilación sintéticos (véase por ejemplo el vector de expresión pCI-neo de Promega que se basa en Levitt *et al.*, 1989, Genes Dev. 3, (7): 1019-1025). El sitio de poliadenilación puede seleccionarse del grupo que consiste en el sitio de poliA de SV40, tal como el sitio de poliA tardío y temprano de SV40 (véase por ejemplo el plásmido pSV2-DHFR tal como se describe en Subramani *et al.*, 1981, Mol. Cell. Biol. 854-864), un sitio de poliA sintético (véase por ejemplo el vector de expresión pCI-neo de Promega que se basa en Levitt *et al.*, 1989, Genes Dev. 3, (7): 1019-1025) y un sitio de poliA de ghb (hormona de crecimiento bovina).

Además, los casetes de expresión pueden comprender un sitio de terminación de la transcripción apropiado. Esto, como la transcripción continuada desde un promotor en el sentido de 5' a través de una segunda unidad de transcripción puede inhibir la función del promotor en el sentido de 3', es un fenómeno conocido como oclusión de promotor o interferencia transcripcional. Este acontecimiento se ha descrito tanto en procariotas como en eucariotas. La colocación apropiada de señales de terminación de la transcripción entre dos unidades de transcripción puede prevenir la oclusión de promotor. Los sitios de terminación de la transcripción están bien caracterizados y se ha mostrado que su incorporación en vectores de expresión tiene múltiples efectos beneficiosos sobre la expresión génica.

Los casetes de expresión pueden comprender un potenciador (véase anteriormente) y/o un intrón. Según una realización, el/los casete(s) de expresión para expresar el polipéptido de interés comprende(n) un intrón. La mayoría de los genes de eucariotas superiores contienen intrones que se eliminan durante el procesamiento del ARN. Los constructos genómicos se expresan más eficazmente en sistemas transgénicos que constructos idénticos que carecen de intrones. Habitualmente, los intrones se colocan en el extremo 5' del marco de lectura abierto. Por consiguiente, un intrón puede estar comprendido en el/los casete(s) de expresión para expresar el/los polipéptido(s) de interés con el fin de aumentar la tasa de expresión. Dicho intrón puede estar ubicado entre el/los elemento(s) de promotor y/o promotor/potenciador y el extremo 5' del marco de lectura abierto del polipéptido que va a expresarse. Por tanto, se proporciona un ácido nucleico vector, en el que al menos el casete de expresión (Exp-POI) comprende un intrón que está dispuesto entre el promotor y el codón de iniciación del polinucleótido para expresar el polipéptido de interés. En el estado de la técnica se conocen varios intrones adecuados que pueden usarse conjuntamente con la presente invención.

Según una realización, el intrón usado en los casetes de expresión para expresar los polipéptidos de interés es un intrón sintético tal como el intrón SIS o el RK. El intrón RK es un intrón sintético fuerte que se coloca preferiblemente antes del codón de iniciación ATG del gen de interés. El intrón RK consiste en el sitio de corte y empalme donador de intrón del promotor de CMV y el sitio de corte y empalme aceptor de la región variable de cadena pesada de IgG de ratón (véanse por ejemplo Eaton *et al.*, 1986, Biochemistry 25, 8343-8347, Neuberger *et al.*, 1983, EMBO J. 2(8), 1373-1378; puede obtenerse a partir del vector pRK-5 (BD PharMingen)).

Sorprendentemente, la colocación de un intrón en el extremo 3' del marco de lectura abierto del gen de DHFR tiene efectos ventajosos sobre la tasa de expresión/amplificación del constructo. El intrón usado en el casete de expresión de DHFR conduce a una variante no funcional, más pequeña del gen de DHFR (Grillari *et al.*, 2001, J. Biotechnol. 87, 59-65). De ese modo se reduce el nivel de expresión del gen de DHFR. Esto conduce a un aumento de la sensibilidad para MTX y condiciones de selección más rigurosas. Por consiguiente, se proporciona un ácido nucleico vector, en el que el casete de expresión (MASM) comprende un intrón que está ubicado en 3' del gen de marcador seleccionable amplificable. Puede obtenerse un intrón adecuado a partir del vector pSV2-DHFR (véase por ejemplo anteriormente).

Dicho vector puede comprender al menos un casete de expresión adicional (Exp-PSM) que comprende un gen de marcador seleccionable procariota. Dicho casete de expresión (Exp-PSM) puede estar ubicado entre los casetes de expresión (Exp-MSM) y (Exp-MASM). Dicho marcador seleccionable puede proporcionar una resistencia a antibióticos tales como por ejemplo ampicilina, kanamicina, tetraciclina y/o cloranfenicol. Dicho casete de expresión (Exp-PSM) está dispuesto preferiblemente en la misma orientación de 5' a 3' que los otros casetes de expresión (Exp-POI), (Exp-MSM) y (Exp-MASM).

Según una realización, el casete de expresión (Exp-POI) y/o (Exp-POI') comprendido en el vector comprende además

- 5 - un polinucleótido (Pn-TAG) que codifica para una etiqueta de afinidad situada en el sentido de 3' del al menos un codón de terminación que está ubicado en el sentido de 3' del primer polinucleótido y estando ubicado dicho polinucleótido (Pn-TAG) en el sentido de 5' del segundo polinucleótido que codifica para un anclaje transmembrana de inmunoglobulina y/o
- un polinucleótido (Pn-MARKER) que codifica para un marcador seleccionable.

Las ventajas se expusieron anteriormente.

10 El ácido nucleico vector puede transfectarse al interior de la célula huésped en su forma circular. Las moléculas de vector superenrolladas se convertirán habitualmente en moléculas lineales dentro del núcleo debido a la actividad de endo y exonucleasas. Sin embargo, la linealización del ácido nucleico vector antes de la transfección a menudo mejora la eficacia de una transfección estable. Esto también porque puede controlarse el punto de linealización si se linealiza el vector antes de la transfección.

15 Por tanto, según una realización de la presente invención el vector de expresión comprende un sitio de restricción predefinido, que puede usarse para la linealización del ácido nucleico vector antes de la transfección. La colocación inteligente de dicho sitio de restricción de linealización es importante, porque dicho sitio de restricción determina si el ácido nucleico vector se abre/linealiza y por tanto determina el orden/la disposición de los casetes de expresión cuando se integra el constructo en el genoma de la célula eucariota, en particular de mamífero.

20 Por consiguiente, el ácido nucleico vector puede comprender un sitio restricción de linealización para linealizar el vector, en el que dicho sitio de restricción de linealización está ubicado entre los casetes de expresión (Exp-MSM) y (Exp-MASM). Preferiblemente, dicho sitio de restricción de linealización es único y sólo está presente una vez en el ácido nucleico vector de expresión. Por ejemplo, puede usarse un sitio de restricción de linealización que se reconoce por una enzima de restricción que tiene una baja frecuencia de corte con el fin de favorecer que el vector sólo se escinda en el sitio de restricción de linealización pero no (o sólo con muy poca frecuencia) por ejemplo dentro del/de los casete(s) de expresión o la estructura principal del vector. Esto puede fomentarse por ejemplo proporcionando un sitio de restricción para una enzima de restricción que tiene una secuencia de reconocimiento de más de seis pares de bases o que reconoce secuencias que están subrepresentadas en el ADN cromosómico. Un ejemplo adecuado es la enzima Swal y el vector puede incorporar por tanto un sitio de reconocimiento de Swal como único sitio de restricción de linealización. En el caso de que dicho sitio de restricción de linealización esté presente más de una vez en la secuencia de ácido nucleico vector (incluyendo los polinucleótidos que codifican para el polipéptido de interés), o en el caso de que se use una enzima de restricción que corta varias veces en la secuencia de ácido nucleico vector, también está dentro del alcance de la presente invención por ejemplo alterar/mutar los sitios de restricción junto al sitio de restricción de linealización que está ubicado entre los casetes de expresión (Exp-MSM) y (Exp-MASM), con el fin de eliminar esos sitios de restricción adicionales y obtener un sitio de restricción de linealización único o al menos poco frecuente.

35 En el caso de que se use el vector como un vector de expresión convencional previsto por ejemplo como herramienta para la expresión de varios polipéptidos diferentes, resulta ventajoso proporcionar un sitio de restricción de linealización que comprende múltiples sitios de reconocimiento para enzimas que tienen una baja frecuencia de corte. Preferiblemente, las enzimas de restricción elegidas para la linealización no deben cortar dentro de los casetes de expresión para los marcadores seleccionables u otras secuencias de estructura principal de vector con el fin de garantizar que la enzima sólo corta una vez para lograr una linealización apropiada del vector. Proporcionando un sitio de restricción de linealización que comprende múltiples sitios de reconocimiento para enzimas de restricción que tienen una baja frecuencia de corte, el usuario puede elegir una enzima de restricción adecuada para la linealización de las opciones proporcionadas con el fin de evitar de manera segura la restricción dentro del polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés. Sin embargo, tal como se expuso anteriormente, pueden mutarse sitios de restricción adicionales o puede realizarse una digestión de restricción parcial.

40 Colocar el sitio de restricción de linealización entre el casete de expresión (Exp-MSM) y el casete de expresión (Exp-MASM) tiene el efecto de que el casete de expresión (Exp-POI) (y casetes de expresión adicionales para expresar los polipéptidos de interés, si están presentes) está flanqueado en 5' por el casete de expresión (Exp-MASM). El casete de expresión (Exp-MSM) está ubicado en 3' del casete de expresión (Exp-POI) tras la linealización. De ese modo, los casetes de expresión (MSM) y (MASM) se separan tras la linealización del ácido nucleico vector circular. Si está presente un casete de expresión (Exp-PSM) para marcador de selección bacteriano (véase a continuación), el sitio de restricción de linealización se coloca preferiblemente entre los casetes de expresión (Exp-PSM) y (Exp-MASM). Esto tiene el efecto de que el gen de marcador de selección bacteriano está en 3' y por tanto "fuera" de las partes "de mamífero" del ácido nucleico vector linealizado. Esta disposición es favorable puesto que se supone que los genes bacterianos no son ventajosos para la expresión en mamíferos ya que las secuencias bacterianas pueden conducir a metilación aumentada u otros efectos de silenciamiento en las células de mamífero.

El polipéptido de interés no se limita a ninguna proteína o grupo de proteínas particulares, sino que por el contrario puede ser cualquier proteína, de cualquier tamaño, función u origen, que se desee seleccionar y/o expresar mediante los métodos descritos en el presente documento. Por consiguiente, pueden expresarse/producirse varios polipéptidos de interés diferentes. El término polipéptido se refiere a una molécula que comprende un polímero de aminoácidos unidos entre sí mediante enlace(s) peptídico(s). Los polipéptidos incluyen polipéptidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas (por ejemplo que tienen más de 50 aminoácidos) y péptidos (por ejemplo de 2-49 aminoácidos). Los polipéptidos incluyen proteínas y/o péptidos de cualquier actividad o bioactividad, incluyendo por ejemplo polipéptidos bioactivos tales como proteínas o péptidos enzimáticos (por ejemplo proteasas, cinasas, fosfatasas), proteínas o péptidos receptores, proteínas o péptidos transportadores, proteínas bactericidas y/o de unión a endotoxinas, proteínas o péptidos estructurales, polipéptidos inmunitarios, toxinas, antibióticos, hormonas, factores de crecimiento, vacunas o similares. Dicho polipéptido puede seleccionarse del grupo que consiste en hormonas peptídicas, interleucinas, activadores de plasminógeno tisular, citocinas, inmunoglobulinas, en particular anticuerpos o fragmentos de anticuerpo o variantes de los mismos.

Tal como se usa en el presente documento, una "molécula de inmunoglobulina" como ejemplo para un polipéptido de interés se refiere a una proteína que comprende uno o más polipéptidos sustancial o parcialmente codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina, por ejemplo, un fragmento que contiene una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR). Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como una miríada de genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican normalmente por ejemplo como o bien kappa o bien lambda.

Las cadenas pesadas se clasifican normalmente por ejemplo como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dicha inmunoglobulina puede ser de cualquier isotipo. Con mucha frecuencia se producen/necesitan moléculas de IgG (por ejemplo IgG1) como proteínas terapéuticas. Una unidad estructural de inmunoglobulina típica (anticuerpo) comprende un tetrámero. En la naturaleza, cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, teniendo cada una una cadena "ligera" (de aproximadamente 25 kD) y una "pesada" (de aproximadamente 50-70 kD). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento del antígeno. Los términos cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) se refieren a esas cadenas ligera y pesada respectivamente.

Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como varios fragmentos bien caracterizados que pueden producirse por ejemplo mediante digestión con diversas peptidasas. Un fragmento de anticuerpo es cualquier fragmento de un anticuerpo que comprende al menos 20 aminoácidos de dicho anticuerpo completo, preferiblemente al menos 100 aminoácidos que todavía tiene al menos una capacidad de unión a antígeno. El fragmento de anticuerpo puede comprender la región de unión del anticuerpo tal como un fragmento Fab, un fragmento F(ab)₂, multicuerpos que comprenden múltiples dominios de unión tales como diacuerpos, triacuerpos o tetracuerpos, anticuerpos de un único dominio o aficuerpos. Una variante de anticuerpo es un derivado de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene la misma función de unión pero, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos alterada. Dicho anticuerpo y/o fragmento de anticuerpo puede comprender una cadena ligera murina, cadena ligera humana, cadena ligera humanizada, cadena pesada humana y/o cadena pesada murina así como fragmentos o derivados activos de las mismas. Por tanto, puede ser por ejemplo murino, humano, quimérico o humanizado. Aunque se definen diversos fragmentos de anticuerpo en cuanto a la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que tales fragmentos Fab' o F(ab)₂ pueden sintetizarse *de novo* o bien químicamente o bien utilizando metodología de ADN recombinante, presentación de péptido, o similares. Por tanto, el término anticuerpo, tal como se usa en el presente documento, también incluye fragmentos de anticuerpo o bien producidos mediante la modificación de anticuerpos completos o bien sintetizados *de novo* usando metodologías de ADN recombinante. Los anticuerpos también incluyen anticuerpos monoclonales compuestos de una única rama, anticuerpos de cadena sencilla, incluyendo anticuerpos Fv de cadena sencilla (scFv) en los que una cadena pesada variable y una ligera variable se unen entre sí (directamente o a través de un ligador peptídico) para formar un polipéptido continuo, así como diacuerpos, tricuerpos y tetracuerpos (véase por ejemplo Pack *et al.* J Mol Biol. 10 de febrero de 1995; 246(1): 28-34; Pack *et al.* Biotechnology (N Y). Noviembre de 1993; 11(11): 1271-7; Pack & Plueckthun Biochemistry. 18 de febrero de 1992; 31(6): 1579-84). Los anticuerpos son, por ejemplo, policlonales, monoclonales, quiméricos, humanizados, de cadena sencilla, fragmentos Fab, Fab de cadena sencilla (Hust *et al.*, BMC Biotechnol (2007) 7:14), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, o similares.

Pueden recuperarse polipéptidos producidos según la invención mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido puede recuperarse del medio nutriente mediante procedimientos convencionales incluyendo, pero sin limitarse a, centrifugación, filtración, ultrafiltración, extracción o precipitación. Puede realizarse la purificación mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, cromatografía (por ejemplo de intercambio iónico, afinidad, hidrófoba, cromatografía de exclusión molecular), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoque preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio) o extracción. Además, el polipéptido puede obtenerse de las células huésped mediante rotura celular.

También se proporciona un método para producir un ácido nucleico vector tal como se describió anteriormente que comprende la etapa de ensamblar al menos un casete (Cas-POI), preferiblemente un casete de expresión (Exp-POI), en un vector de tal manera que dicho casete comprende un primer polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés, al menos un codón de terminación en el sentido de 3' del primer polinucleótido y un segundo polinucleótido en el sentido de 3' del codón de terminación que codifica para un anclaje transmembrana de inmunoglobulina. Dicho método puede comprender además ensamblar

- un casete de expresión (Exp-MSM) que comprende un gen de marcador seleccionable de mamífero,

- un casete de expresión (Exp-MASM) que comprende un gen de marcador seleccionable amplificable de mamífero,

preferiblemente de tal manera que el casete de expresión (Exp-MASM) está ubicado en 5' y el casete de expresión (Exp-MSM) está ubicado en 3' del casete de expresión (Exp-POI) y en el que los casetes de expresión (Exp-MASM), (Exp-POI) y (Exp-MSM) están dispuestos en la misma orientación de 5' a 3'.

También se proporciona una célula huésped eucariota, preferiblemente de mamífero, que se obtiene mediante el método de examen descrito anteriormente. También se proporciona una célula huésped eucariota, preferiblemente de mamífero, que comprende un casete (Cas-POI) que comprende un polinucleótido heterólogo, y por tanto foráneo, que codifica para un polipéptido de interés, al menos un codón de terminación en el sentido de 3' de dicho polinucleótido heterólogo y un polinucleótido en el sentido de 3' del codón de terminación que codifica para un anclaje transmembrana de inmunoglobulina. El casete (Cas-POI) puede introducirse por ejemplo mediante el ácido nucleico vector según la presente invención. Preferiblemente, el casete (Cas-POI) y/o el casete (Cas-POI') es un casete de expresión.

Anteriormente se describieron características adicionales del casete (Cas-POI) y detalles de vectores adecuados y también se aplican a la célula huésped de la presente invención. Anteriormente se describieron células huésped eucariotas adecuadas. Preferiblemente, la célula huésped eucariota es una célula huésped de mamífero. Según una realización la célula huésped eucariota no es una célula B ni un derivado de célula B. Por consiguiente, La célula huésped eucariota, preferiblemente de mamífero, es una célula huésped que no expresa de manera natural las cadenas de receptor de Ig alfa e Ig beta. Además, según una realización, no se produce coexpresión artificial de la cadena de receptor de Ig alfa e Ig beta en dicha célula huésped. Las células CHO son células huésped preferidas.

Se proporciona además un método para producir una célula huésped eucariota tal como se describió anteriormente, en el que la célula huésped eucariota se transfecta con el ácido nucleico vector según la presente invención y/o un ácido nucleico heterólogo que comprende un casete (Cas-POI) según la presente invención. Hay varios métodos apropiados conocidos en la técnica anterior para introducir un vector de expresión en una célula huésped de mamífero. Los métodos respectivos incluyen, pero no se limitan a, transfección con fosfato de calcio, electroporación, lipofección, transferencia de genes biolística y mediada por polímero. Además de métodos tradicionales basados en integración al azar también pueden usarse enfoques mediados por recombinación para transferir el casete (Cas-POI) al genoma de la célula huésped. Tales métodos de recombinación pueden incluir el uso de recombinasas específicas de sitio tales como Cre, Flp ΦC31 (véase por ejemplo Oumard *et al*, Cytotechnology (2006) 50: 93 - 108) que pueden mediar la inserción dirigida de transgenes. Alternativamente, puede usarse el mecanismo de recombinación homóloga para insertar el casete (Cas-POI) (revisado en Sorrell *et al*, Biotechnology Advances 23 (2005) 431 - 469). La inserción de genes basada en recombinación permite minimizar el número de elementos que deben incluirse en el ácido nucleico heterólogo que se transfiere/introduce en la célula huésped. Por ejemplo, puede usarse un locus de inserción que ya proporciona un promotor y un sitio de poliA (exógeno o endógeno) de tal manera que sólo se necesita transferir/transfectar a la célula huésped los elementos restantes (por ejemplo polinucleótido de interés, el codón de terminación y polinucleótido que codifica para un anclaje transmembrana de inmunoglobulina). Incluso la transferencia de partes del casete (Cas-POI) será suficiente si las partes que faltan están presentes en el sitio de inserción. Anteriormente se describieron en detalle realizaciones de un vector de expresión adecuado según la presente invención así como células huésped y polipéptidos de interés adecuados; se hace referencia a la descripción anterior.

También se proporciona un polipéptido obtenido mediante un método según la presente invención tal como se definió anteriormente y en las reivindicaciones. Dicho polipéptido es preferiblemente una molécula de inmunoglobulina o un fragmento de la misma. Los polipéptidos producidos según los métodos de la presente invención representan buenas propiedades de estabilidad. Los resultados también muestran que los polipéptidos se expresan de una forma funcional y por tanto en la conformación correcta. Por consiguiente, la invención también proporciona polipéptidos obtenidos mediante el método de producción según la presente invención usando el vector de expresión descrito en detalle anteriormente. Tal como se expuso anteriormente, se obtienen polipéptidos con un buen rendimiento debido a la etapa de selección/examen incorporada. El polipéptido es preferiblemente una molécula de inmunoglobulina tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos, que sin embargo describen

realizaciones preferidas de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de vectores de la versión transmembrana de Ig

5 Se insertó una parte codificante de fragmento de ADN de 1113 pb sintético de la región de cadena pesada constante de IgG1 más el relleno de codón de terminación rezumante y el dominio citoplasmático y transmembrana de Ig en pBW201 (un vector convencional que contiene una cadena ligera kappa y una cadena pesada de IgG1) mediante Age1 y Asc1 generando pNT11 (véase la tabla 1). La secuencia de nucleótidos del dominio transmembrana de Ig usado se muestra en SEQ ID No: 1, se indica el relleno de codón de terminación rezumante. Evidentemente, también pueden usarse variantes del dominio transmembrana de Ig codificado según los principios de la presente invención que proporcionan la misma función de anclaje a la membrana. Dichas variantes son homólogas al dominio transmembrana de Ig codificado y pueden obtenerse por ejemplo mediante sustitución de aminoácidos conservativa. Comparten preferiblemente una homología de al menos el 80%, el 85%, el 90%. Polinucleótidos que codifican para variantes respectivas se hibridan por ejemplo con la secuencia mostrada en condiciones rigurosas.

15 El gen de marcador de selección DHFR wt de pNT11 y pBW201 puede reemplazarse por un fragmento de 1252 pb sintético que codifica para un mutante puntual L23P de DHFR mediante Swal y BglIII, generando de ese modo pNT29 y pBW478. El mutante de DHFR permite la selección de líneas celulares dhfr+.

20 Los vectores de FACS (pNT11, pNT29) se basan en los vectores convencionales para la expresión de anticuerpos (pBW201, pBW478). pNT11 y pBW201 se diferencian de pNT29 y pBW478 en el casete de marcador de selección DHFR que portan. Aparte de eso, las estructuras principales son idénticas. El vector tiene una configuración en "tándem" monocistrónica y contiene casetes de expresión de cadenas ligera y pesada de anticuerpos, ambos dirigidos por el promotor/potenciador de CMV. La única modificación para generar los vectores de FACS fue la inserción de un dominio citoplasmático y transmembrana de IgG1 en 3' del ADNc de la cadena pesada (HC) de anticuerpo. Se coloca un relleno corto con una señal de terminación de la traducción rezumante entre HC y el dominio transmembrana. Se espera que el entorno de secuencia seleccionado para el codón de terminación conduzca a una ultralectura de hasta el 5%. Los cuatro vectores codifican para el mismo anticuerpo IgG humano.

30 Tal como se expuso anteriormente, los ácidos nucleicos vectores usados para la expresión y en particular la orientación y disposición de los elementos de vector elegidos permiten la expresión muy eficaz de moléculas inmunoglobulina. En la siguiente tabla se ilustran vectores adecuados que pueden usarse conjuntamente con la presente invención y que se describieron anteriormente (las flechas indican la orientación de 5' a 3' de los elementos genéticos):

Tabla 1: Mapa de vector

pNT11 - "vector de FACS"
prom/pot de CMV →
intrón RK →
LC de AcM →
poliA de SV40 –
prom/pot de CMV →
intrón RK →
HC de AcM →
Relleno + codón de terminación rezumante
dominio citoplasmático y dominio transmembrana de Ig →

(continuación)

pNT11 - "vector de FACS"
poliA de SV40 →
región f1 de fago →
prom/pot de SV40 →
Neo →
poliA sint.
Amp →
prom/pot de SV40 →
DHFR →
pA de SV40→

5 Las abreviaturas en la tabla 1 tienen los significados habituales tal como resultan evidentes para el experto en la técnica y tal como se describieron anteriormente, y tienen en particular los siguientes significados:

promo/pot de CMV = promotor/potenciador temprano inmediato de citomegalovirus humano

10 intrón RK = comprende el sitio de corte y empalme donador de intrón del promotor de CMV y el sitio de corte y empalme aceptor de la región variable de cadena pesada de IgG de ratón (véase por ejemplo Eaton *et al.*, 1986, *Biochemistry* 25, 8343-8347, Neuberger *et al.*, 1983, *EMBO J.* 2(8), 1373-1378; puede obtenerse del vector pRK-5 (BD PharMingen))

LC de AcM = cadena ligera de anticuerpo monoclonal

HC de AcM = cadena pesada de anticuerpo monoclonal

poliA de SV40 = sitio de poliA de SV40

promo/pot de SV40 = promotor/potenciador de SV40

15 Neo = neomicina fosfotransferasa

poliA sint. = sitio de poliadenilación sintético

Amp = gen de resistencia a antibiótico beta-lactamasa

DHFR = gen de dihidrofolato reductasa.

Ejemplo 2: Transfección y selección de células CHO

20 El cultivo, la transfección y el examen de células se llevan a cabo en frascos de agitación usando células CHO que crecen en suspensión en un medio de cultivo químicamente definido, registrado. Se transfectan las células o bien mediante lipofección o bien mediante electroporación (nucleofección) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se comprueba la eficacia de transfección transfectando un plásmido indicador de GFP (proteína verde fluorescente) y análisis de citometría de flujo de las células transfectadas. Dependiendo de la viabilidad celular, se inicia la selección
 25 24-48 h tras la transfección añadiendo medio selectivo que contiene G418 a las células. En cuanto las células se recuperan hasta una viabilidad superior al 80%, se aplica una segunda etapa de selección haciendo pasar las células a medio libre de G418, que contiene MTX (metotrexato). Tras la recuperación de las células de la selección con MTX, se continúa el cultivo en medio que contiene MTX a través de ciclos de enriquecimiento por FACS, clonación por FACS o examen y clonación por dilución limitada.

Se monitorizan la viabilidad y el crecimiento celular usando un sistema automatizado (ViCell, Beckmann Coulter).

Ejemplo 3: Análisis de FACS, enriquecimiento y clonación de células

5 Marcaje de células: Se centrifugan 2×10^7 células por combinación transfectada y se lavan con 5 ml de PBS (solución salina tamponada con fosfato) enfriada y se resuspenden en 1 ml de PBS fría. Se añade una cantidad adecuada de anticuerpo anti-IgG marcado con FITC (isotiocianato de fluoresceína) a las células y se incuban sobre hielo durante 30 minutos en la oscuridad. Posteriormente, se lavan las células dos veces a temperatura ambiente con 5 ml de PBS, se resuspenden en 1 ml de PBS, se filtran y se dispensan en un tubo de FACS para su análisis, clasificación y clonación.

10 Análisis, clasificación y clonación de células: La clasificación de células se realiza con un instrumento FACSAria (Becton Dickinson) equipado con una unidad automática de deposición de células (ACDU) usando software FACSDiva. Se usa un láser de estado sólido y enfriado con aire de baja potencia (estado sólido Sapphire™ de Coherent®) ajustado a 488 nm para excitar tintes de fluoresceína unidos al anticuerpo secundario. Se mide la intensidad de fluorescencia de FITC relativa en un detector E a través de un filtro 530/30 BP. Se separa el cinco por ciento de las células más fluorescentes de FITC y se clasifican o bien en bloque o bien como células individuales en
15 placas de 96 pocillos.

Ejemplo 4: Determinación de la estabilidad y la productividad clonal

Se analiza la productividad de clones en experimentos discontinuos o discontinuos alimentados usando diferentes formatos. Se realiza un examen de clones inicial en ensayos discontinuos en placas de 24 pocillos sembrando
20 células en placas de 24 pocillos con agitación. Se determinan las concentraciones de anticuerpo en el sobrenadante de cultivo celular mediante HPLC de proteína A 10 días tras el inicio del cultivo. También se analizan los clones de más alta producción en modelos de frasco de agitación en modo discontinuo y discontinuo alimentado. Se siembran cultivos discontinuos en frasco de agitación 500 con 100 ml de volumen de trabajo y se cultivan en una cabina de agitación (no humidificada) a 150 rpm y el 10% de CO₂. La viabilidad de las células debe ser >90% cuando se inicia el ensayo. La densidad celular de siembra es de 2×10^5 c/ml. La determinación de la concentración de producto /
25 número de células / viabilidad tuvo lugar en los días 3-7, 10 y 13. Se realizan experimentos discontinuos alimentados usando las mismas condiciones pero con una densidad celular inicial de 4×10^5 c/ml y con adición regular de alimentaciones. Se evalúa la estabilidad clonal cultivando las células a lo largo de un periodo de 14 semanas con mediciones de productividad usando el modelo discontinuo de frasco de agitación cada dos semanas.

Ejemplo 5: Análisis de células transfectadas de manera transitoria

30 Para someter a prueba si están presentes productos de traducción unidos a la membrana sobre la superficie celular tras la transfección con el nuevo vector de FACS (en este caso, pNT11 o pNT29), se analizan células transfectadas de manera transitoria mediante inmunotinción y citometría de flujo. 48 h tras la transfección, se tiñen las células con un anticuerpo marcado con FITC dirigido contra IgG humana. Se usan células transfectadas con un vector de expresión de GFP como control de transfección, se calcula que la eficacia de transfección es de aproximadamente el
35 60%. Las células no transfectadas y las células transfectadas con el vector convencional (que no comprende un dominio transmembrana) no muestran niveles significativos de anticuerpo asociado a la superficie, mientras que el 16% de las células transfectadas con el vector de FACS están teñidas por encima del nivel de fondo. Esto muestra que puede detectarse sobre la superficie celular el péptido de fusión, en este caso una molécula de anticuerpo, anclado a la membrana celular.

40 **Ejemplo 6: Análisis y enriquecimiento de células transfectadas estables**

Habiendo mostrado la presencia de anticuerpo unido a membrana en células transfectadas de manera transitoria, se analiza el nivel de expresión en la superficie y la distribución en combinaciones seleccionadas de células transfectadas. De ese modo, puede mostrarse que pueden enriquecerse selectivamente células productoras mediante clasificación FACS. Por tanto, se seleccionan células tras la transfección con G418 y posteriormente con
45 MTX. Se tiñen las combinaciones resultantes de células resistentes con anticuerpo anti-IgG marcado con FITC y se analizan mediante citometría de flujo. Como control, se tiñen y se analizan células no transfectadas. Se detectan subpoblaciones de células positivas en las combinaciones seleccionadas transfectadas con el vector de FACS. La distribución de células positivas se diferenció de ese modo entre las dos combinaciones analizadas. Para evaluar si pueden enriquecerse células de alta producción basándose en su señal de fluorescencia (y por tanto permitir una selección cuantitativa), se clasifican las células que tienen la mayor intensidad de fluorescencia (el 5% superior) de
50 cada una de las dos combinaciones y se subcultivan para comparar la productividad con la combinación antes del enriquecimiento.

Ejemplo 7: Análisis de la productividad de células enriquecidas y no enriquecidas

Se realizan análisis de productividad de las combinaciones seleccionadas antes y después del enriquecimiento por citometría de flujo en cultivos discontinuos en frasco de agitación para comparar la concentración de producto final en el día 13. En el día 13, se recoge el sobrenadante y se analiza para determinar el contenido de IgG mediante HPLC de proteína A. Ambas combinaciones ya muestran un aumento significativo del nivel de producción tras realizar un ciclo de enriquecimiento por FACS según las enseñanzas de la presente invención. Mientras que la concentración de producto para la combinación 1 aumenta en un factor de aproximadamente 2, la combinación 2 aumenta en un factor de casi 10, lo que muestra que se detectan selectivamente células de alta producción durante la tinción y la clasificación. Ya en el primer ciclo de enriquecimiento pueden obtenerse concentraciones de anticuerpo de casi 250 mg/l.

Ejemplo 8: Clonación selectiva basada en citometría de flujo de células de alta producción

Puede usarse la citometría de flujo para clasificar y sembrar células teñidas individuales según su perfil de tinción. Para analizar si una clonación selectiva de este tipo da como resultado un mayor número de clones de alta producción que la clonación mediante dilución limitante, se generan clones usando ambos métodos y se analiza la productividad en cultivos discontinuos en placas de 24 pocillos. Se realizan cultivos discontinuos en placas de 24 pocillos y en el día 10 se recogen los sobrenadantes y se miden para determinar su contenido de IgG mediante HPLC de proteína A. Los resultados son los siguientes:

Tabla 2: Clasificación por FACS frente a dilución limitada (LD)

Método	0-25 mg/l	26-50 mg/l	51-75 mg/l	76-100 mg/l	101-125 mg/l	126-150 mg/l
Clones obtenidos mediante LD	12	0	1	0	1	0
Clones obtenidos mediante FACS	2	2	2	2	0	1

Los clones derivados mediante citometría de flujo tienen una productividad promedio superior en comparación con los clones derivados mediante dilución limitante, lo que también se refleja en la distribución clonal del intervalo de productividad.

Ejemplo 9: Comparación de vector convencional y de FACS

Para confirmar el efecto beneficioso del enriquecimiento por citometría de flujo de células transfectadas y para comparar el uso del vector de FACS (pNT29) con un vector convencional, se transfectan células y se seleccionan con G418 y MTX. Se analizan tres combinaciones de células transfectadas con el vector de FACS (muestras 1, 2 y 3) y tres combinaciones de células transfectadas con el vector convencional (muestras 7, 9 y 9) mediante citometría de flujo y se clasifica el 5% que tienen la mayor señal de tinción. Se realizan cultivos discontinuos en frasco de agitación para comparar el aumento de la concentración de producto tras el enriquecimiento. Se tiñen las combinaciones transfectadas y seleccionadas y se clasifican mediante citometría de flujo para enriquecer el 5% superior basándose en la intensidad de fluorescencia. Antes y después del enriquecimiento, se realizan cultivos discontinuos en frasco de agitación y tras 13 días se analizan los sobrenadantes mediante HPLC de proteína A. Los resultados son los siguientes (aproximadamente):

Tabla 3: Resultados obtenidos con el vector de FACS

Muestra	Concentración de producto	Muestra	Concentración de producto	Muestra	Concentración de producto
Muestra 1; vector de FACS, antes del enriquecimiento	10 mg/l	Muestra 2; vector de FACS, antes del enriquecimiento	40 mg/ml	Muestra 3; vector de FACS, antes del enriquecimiento	15 mg/ml
Muestra 1; vector de FACS, 1 ^{er} enriquecimiento	55 mg/ml	Muestra 2; vector de FACS, 1 ^{er} enriquecimiento	65 mg/ml	Muestra 3; vector de FACS, 1 ^{er} enriquecimiento	95 mg/ml

(continuación)

Muestra	Concentración de producto	Muestra	Concentración de producto	Muestra	Concentración de producto
Muestra 1; FACS 2 ^o enriquecimiento	100 mg/ml	Muestra 2; vector de FACS, 2 ^o enriquecimiento	90 mg/ml	Muestra 3; vector de FACS, 2 ^o enriquecimiento	155 mg/ml
Muestra 1; vector de FACS, 3 ^{er} enriquecimiento	365 mg/ml	Muestra 2; vector de FACS, 3 ^{er} enriquecimiento	340 mg/ml	Muestra 3; vector de FACS, 3 ^{er} enriquecimiento	85 mg/ml

Tabla 4: Resultados obtenidos con el vector convencional

Muestra	Concentración de producto	Muestra	Concentración de producto	Muestra	Concentración de producto
Muestra 7; vector convencional, antes del enriquecimiento	40 mg/l	Muestra 8; vector convencional, antes del enriquecimiento	5 mg/ml	Muestra 9; vector convencional, antes del enriquecimiento	5 mg/ml
Muestra 7; vector convencional, 1 ^{er} enriquecimiento	55 mg/ml	Muestra 8; vector convencional, 1 ^{er} enriquecimiento	10 mg/ml	Muestra 9; vector convencional, 1 ^{er} enriquecimiento	2 mg/ml
Muestra 7; vector convencional, 2 ^o enriquecimiento	50 mg/ml	Muestra 8; vector convencional, 2 ^o enriquecimiento	12 mg/ml	Muestra 9; vector convencional, 2 ^o enriquecimiento	10 mg/ml
Muestra 7; vector convencional, 3 ^{er} enriquecimiento	25 mg/ml	Muestra 8; vector convencional, 3 ^{er} enriquecimiento	15 mg/ml	Muestra 9; vector convencional, 3 ^{er} enriquecimiento	10 mg/ml

5 Tal como se demuestra mediante los resultados, el nivel de producción de las células transfectadas con vector de FACS aumenta significativamente para las tres combinaciones sometidas a prueba, mientras que en el caso del vector convencional sólo una combinación mostró un aumento significativo en la concentración de producto. El promedio de las concentraciones de producto tras el enriquecimiento con el vector de FACS es significativamente mayor que con el vector convencional. Se realizan dos ciclos de enriquecimiento por FACS secuenciales adicionales para enriquecer células de alta producción mostrando que sólo en el caso del vector de FACS se aumenta la productividad de las poblaciones celulares. Finalmente, pueden aumentarse las concentraciones de producto de 4 a 30 veces.

10 Para la comparación de la idoneidad de ambos vectores para la clonación selectiva, se clasifican selectivamente mediante citometría de flujo clones de combinaciones no enriquecidas con productividad comparable. Posteriormente, se analiza la productividad de los clones en cultivos discontinuos en 24 pocillos. Se encuentra que clones derivados de combinaciones transfectadas con vector de FACS tiene un nivel de expresión promedio superior al de clones de combinaciones transfectadas con vector convencional. La distribución clonal de la productividad muestra que en el caso del vector de FACS se obtiene un número superior de clones de buena producción (véase la tabla 5):

20

Tabla 5: Vector convencional frente a vector de FACS (pNT29)

Método	0-50 mg/l	51-100 mg/l	101-150 mg/l	151-200 mg/l	201-250 mg/l	251-300 mg/l	301-350 mg/ml
Vector convencional	31	7	0	2	0	1	0
Vector de FACS	21	20	4	4	4	2	1

Ejemplo 10: Comparaciones adicionales entre el vector de FACS y vectores de expresión convencionales

a) Construcción de vectores

5 Se obtienen los vectores pBW201, pNT11, pBW478 y pNT29 tal como se describió en el ejemplo 1.

b) Transfección, selección y clonación de células CHO

Esto se realiza tal como se describió en el ejemplo 2.

c) Análisis de FACS, enriquecimiento y clonación de células

Esto se realiza tal como se describió en el ejemplo 3.

10 *d) Determinación de la estabilidad clonal y la producción de anticuerpo*

Se analiza la productividad de clones y combinaciones en experimentos discontinuos y discontinuos alimentados usando diferentes formatos. Se analizan combinaciones antes y después del enriquecimiento por FACS en ensayos discontinuos en frasco de agitación sembrando 1×10^5 células por ml (c/ml) en 50 ml de volumen de trabajo usando frascos de agitación con una capacidad de 250 ml. Se analiza el contenido de IgG mediante HPLC de proteína A a partir de muestras tomadas en el día 13 del cultivo discontinuo. Se realiza el examen inicial de clones en ensayos discontinuos en placas de 24 pocillos sembrando células en placas de 24 pocillos con agitación. Se determinan las concentraciones de anticuerpo en el sobrenadante de cultivo celular mediante HPLC de proteína A cuantitativa 10 días tras el inicio del cultivo. Se analizan los clones de más alta producción en modelos de frasco de agitación en modo discontinuo y discontinuo alimentado. Se siembran cultivos discontinuos en frascos de agitación (capacidad de 500 ml) con 100 ml de volumen de trabajo y se cultivan en una cabina de agitación (no humidificada) a 150 rpm, 36,5°C y el 10% de CO₂. La viabilidad de las células es >90% cuando se inicia el ensayo. La densidad celular de siembra es de 2×10^5 c/ml. Se determinan las concentraciones de anticuerpo, el número de células y la viabilidad en los días 3-7, 10 y 13. Se realizan experimentos discontinuos alimentados usando las mismas condiciones pero con un tiempo de ejecución de 17 días y con una densidad celular inicial de 4×10^5 c/ml y con adición regular de alimentaciones comenzando a densidades celulares viables superiores a 7×10^6 c/ml. Se evalúa la estabilidad clonal cultivando las células a lo largo de un periodo de 12 semanas con mediciones de la productividad usando el modelo discontinuo de frasco de agitación cada dos semanas.

e) Análisis y enriquecimiento de células transfectadas estables

30 Se analiza la expresión en superficie en poblaciones de células transfectadas de manera estable para someter a prueba si pueden enriquecerse selectivamente células productoras mediante clasificación por FACS. Por tanto, se seleccionan células tras la transfección con G418 y posteriormente con MTX. Se tiñen las combinaciones resultantes (10 por vector) de células resistentes tal como se describió anteriormente y se analizan mediante citometría de flujo. Con el protocolo de tinción usado, pueden detectarse subpoblaciones de células positivas tanto en combinaciones de células transfectadas con pBW478 como con pNT29. Tal como se esperaba, se encuentra una proporción superior de células positivas para FACS con el vector de FACS.

Para mostrar que pueden enriquecerse células de alta producción basándose en su señal de fluorescencia, se clasifican células que tienen la mayor intensidad de fluorescencia (el 5% superior) de las combinaciones de células individuales y se subcultivan para comparar la productividad con la combinación antes del enriquecimiento. Se realiza un segundo ciclo de enriquecimiento tras la expansión y combinación de las poblaciones de células clasificadas una vez. El porcentaje de células positivas para la tinción aumentó sorprendentemente en la mayor medida con el vector convencional en el primer ciclo de enriquecimiento. Combinaciones transfectadas con vector de FACS mostraron factores de enriquecimiento similares con el protocolo de tinción usado y generalmente se observó una variación significativa entre combinaciones. Tras el segundo ciclo de enriquecimiento, se obtienen poblaciones

de células positivas para FACS casi homogéneamente (véanse las tablas 6a y 6b).

Tablas 6a y 6b: Resultados de tinción promedio y productividades antes y después de la clasificación

Tabla 6a: Análisis de FACS de células teñidas antes y después de ciclos de enriquecimiento por FACS

% de células por encima de la tinción de FITC de fondo	pBW478 (vector de referencia)			pNT29 (vector de FACS)		
	No FACS	1xFACS	2x FACS	No FACS	1xFACS	2xFACS
PROM.	5,9	83,2	90,4	14,2	46,6	90,5
DE	3,396403	15,80158	1,126795	8,974284	13,51148	1,422439

5 *Tabla 6a: Se tiñeron combinaciones de células transfectadas y seleccionadas para determinar IgG de superficie. Se muestra el porcentaje promedio de células teñidas por encima del nivel de células no transfectadas. Antes del enriquecimiento, se encuentra un porcentaje superior de células positivas con el vector de FACS. Tras el primer ciclo de enriquecimiento del 5% superior, la proporción de células positivas para la tinción era la más alta con el vector convencional. Tras el segundo ciclo de enriquecimiento, más del 90% de todas las células eran positivas con ambos enfoques. Abreviaturas: PROM.: promedio y DE: desviación estándar.*

10

Tabla 6b: Productividades del modelo discontinuo en frasco de agitación antes y después de ciclos de enriquecimiento por FACS

AcM (mg/l)	pBW478 (vector de referencia)			pNT29 (vector de FACS)		
	No FACS	1xFACS	2x FACS	No FACS	1xFACS	2xFACS
PROM.	38,5	123,4	68,3	46,5	171,8	363
DE	17,66509	101,8563	6,592926	15,30614	114,1936	70,19259

15 *Tabla 6b: Se analiza la productividad de combinaciones de células a partir de cultivos discontinuos en frasco de agitación mediante HPLC de proteína A en el día 13 del cultivo. El primer ciclo de enriquecimiento condujo a un aumento significativo de la productividad en ambos casos. Tras el segundo enriquecimiento, sólo las combinaciones de células transfectadas con vector de FACS mostraron un aumento adicional en la productividad.*

f) Análisis de la productividad de células enriquecidas y no enriquecidas

20 Se realizan análisis de la productividad de las combinaciones seleccionadas antes y después del enriquecimiento por citometría de flujo en cultivos discontinuos en frasco de agitación para comparar los títulos finales en el día 13. La productividad de las combinaciones antes del enriquecimiento está en un intervalo muy comparable para ambos vectores usados. Con el primer ciclo de enriquecimiento en las combinaciones individuales se logra una mejora significativa de la productividad promedio con todos los enfoques y, de nuevo, hay una variación sustancial entre combinaciones individuales (véase la tabla 6b). Sorprendentemente, la productividad de las combinaciones

25 transfectadas con vector convencional no es superior en comparación con las transfectadas con vector de FACS aunque se observaba anteriormente un nivel mucho más alto de células positivas para la tinción de FACS. Clasificando una segunda vez a partir de las poblaciones de células clasificadas combinadas, no se logra una mejora adicional de la productividad con el vector convencional. En cambio, se obtiene una productividad inferior aunque el resultado de la tinción de FACS sugiere que casi el 100% de las células deben estar produciendo

30 anticuerpo (véase la tabla 6a). Pudo mejorarse significativamente la productividad de combinaciones transfectadas con vector de FACS clasificando una segunda vez. El procedimiento de FACS usado conduce a un enriquecimiento más selectivo de células de alta producción con un aumento de la productividad de aproximadamente al menos 8 veces en comparación con la población no clasificada y de al menos 2 veces en comparación con las combinaciones tras una clasificación.

35 g) Clonación selectiva basada en citometría de flujo de células de alta producción

Puede usarse citometría de flujo para clasificar y sembrar células teñidas individuales según su perfil de tinción. Para analizar si una clonación selectiva de este tipo da como resultado un número superior de clones de alta producción cuando se usa el vector de FACS en comparación con el vector convencional, se generan clones usando ambos métodos y se analiza la productividad en cultivos discontinuos en placas de 24 pocillos.

- 5 En una primera ronda, se clonan células directamente por FACS a partir de combinaciones de células seleccionadas mediante MTX sin ninguna etapa de enriquecimiento previo. Se eligen tres combinaciones por vector basándose en su perfil de tinción. Se generan clones a partir del 5% superior de las combinaciones de células teñidas y en total se analizan aproximadamente 500 clones. Mientras que la productividad promedio de clones con el vector de referencia fue de 39 mg/l, los clones con vector de FACS produjeron un promedio de 87 mg/l. Tal como se muestra en la tabla 10 7a, esto también se refleja mediante la distribución clonal que confirma que se obtiene una proporción mucho más alta de clones de alta producción con el vector de FACS. De manera interesante, uno de los más de 270 clones analizados de la transfección con vector convencional tenía una productividad casi 2 veces superior en comparación con los otros. Este clon excepcional se denominó LP. Por tanto, generalmente es posible identificar un clon celular de alta producción de este tipo con la configuración de vector convencional en combinación con un procedimiento de examen por FACS. Sin embargo, esto es muy poco frecuente y por tanto es un acontecimiento fortuito. También es 15 la diferencia decisiva con el procedimiento de selección según las enseñanzas de la presente invención. Mientras que la configuración convencional sólo permite la selección de clones de (muy) alta producción en casos excepcionales y por tanto poco frecuentes, el método según la presente invención permite la selección de clones de (muy) alta producción de manera reproducible y por tanto fiable.
- 20 Se realiza un segundo experimento de clonación por FACS comenzando a partir de las 10 poblaciones combinadas por vector tras el primer ciclo de enriquecimiento. Esta vez se examinaron aproximadamente 240 clones en cultivos discontinuos en 24 pocillos. De nuevo, los clones obtenidos con el vector de FACS tienen una productividad promedio mucho más alta que el vector convencional de referencia. No se logra ninguna mejora en comparación con la clonación sin enriquecimiento previo con el vector de referencia a una productividad de clon promedio de 40 mg/l. 25 No se identificó de nuevo el clon LP. En el caso de los clones transfectados con vector de FACS, se obtuvo una productividad promedio de 275 mg/l con el método de FACS usado. La distribución clonal demuestra claramente la superioridad de la configuración de vector de FACS con respecto a la clonación selectiva de clones de alta producción (véase la tabla 7b).

Tablas 7a y 7b: Comparación de productividad de clones

30 *Tabla 7a: Discontinuo en 24 pocillos – Distribución clonal*

	pBW478	pNT29
0-50 mg/l	196	163
51-100 mg/l	70	22
101-150 mg/l	8	11
151-200 mg/l	2	5
201 - 250 mg/l	0	13
251 - 300 mg/l	2	9
301 - 350 mg/l	1	10
351 - 400 mg/l	0	6
401 - 450 mg/l	0	5
451 - 500 mg/l	0	2
501 - 550 mg/l	0	1
551 - 600 mg/l	1	0

5 *Tabla 7a: Se generan clones mediante citometría de flujo a partir del 5% superior de las tres combinaciones de células teñidas con el mayor porcentaje de células positivas para la tinción tras la selección. Para la evaluación de la productividad, se realizaron cultivos discontinuos en placas de 24 pocillos y en el día 10 se recogieron los sobrenadantes y se midieron para determinar el contenido de IgG mediante HPLC de proteína A. Se muestra en este caso la distribución clonal del intervalo de productividad. Se obtiene una proporción significativamente superior de clones de alta producción cuando se usa el vector de FACS (pNT29).*

Tabla 7b: Discontinuo en 24 pocillos: Combinaciones combinadas de clonación por FACS

	pBW478	pNT29
0-50 mg/l	102	22
51-100 mg/l	17	2
101-150 mg/l	13	5
151-200 mg/l	5	3
201 - 250 mg/l	2	7
251 - 300 mg/l	0	11
301 - 350 mg/l	0	11
351 - 400 mg/l	0	15
401 - 450 mg/l	0	9
451 - 500 mg/l	0	7
501 - 550 mg/l	0	7
551 - 600 mg/l	0	1
601 - 650 mg/l	0	3

10 *Tabla 7b: Se analizaron clones obtenidos mediante clonación por FACS a partir del 5% superior de las combinaciones combinadas teñidas tras un ciclo de enriquecimiento. No se encontró ningún beneficio del enriquecimiento previo para células transfectadas con vector de referencia (pBW478), mientras que en el caso de células transfectadas con vector de FACS (pNT29), el enriquecimiento previo condujo a una reducción significativa de clones no productores y a un aumento de la productividad promedio de los clones.*

h) Caracterización de clones

15 Se expandieron en frascos de agitación el clon LP derivado del vector convencional así como 10 clones de vector de FACS de alta producción y se sometieron a prueba en modelos discontinuo y discontinuo alimentado en frasco de agitación genéricos para evaluar su posibilidad de fabricación.

20 Se encuentra que la productividad en cultivos discontinuos es aproximadamente la misma en el intervalo de 1 g/l para todos los clones sometidos a prueba. Las productividades discontinuas alimentadas también son muy comparables para todos los clones y en el intervalo de 3,5 - 4 g/l (véase la tabla 8). No se observa ninguna diferencia significativa en parámetros de crecimiento cuando se comparan los clones transfectados con vector de FACS con clones transfectados con vector de referencia (LP y clones de experimentos anteriores). Además, se encuentra que la estabilidad de la producción es alta para los clones derivados de vector de FACS, sólo uno de 10 clones analizados mostró una disminución de la productividad superior al 25% tras 12 semanas en cultivo, lo que es una razón inferior de clones inestables a la que se observó con el vector convencional de referencia en experimentos anteriores (datos no mostrados).

25

Tabla 8: Productividades de combinaciones: Modelo de frasco de agitación (SF) discontinuo alimentado

	AcM (g/l)	
	SF discontinuo	SF discontinuo alimentado
1 = LP	1,1	4,3
2	0,9	3,7
3	1,0	3,9
4	1,0	3,8
5	1,0	3,8
6	1,0	3,9
7	1,2	3,3
8	1,0	3,8
9	0,9	3,6
10	1,0	3,7
11	0,9	3,3

5 Tabla 8: Se analizan el clon de más alta producción obtenido con el vector convencional (pBW478) y 10 clones derivados del vector de FACS (pNT29) en cultivos en frasco de agitación discontinuos y discontinuos alimentados. Se analiza el contenido de IgG mediante HPLC de proteína A en el día 13 (cultivos discontinuos) o día 17 (cultivos discontinuos alimentados). Todos los clones analizados producen en un intervalo comparable.

Ejemplo 11: Producción a gran escala de polipéptidos con células CHO transfectadas

10 La producción de polipéptidos a gran escala puede realizarse por ejemplo en biorreactores Wave, de vidrio o de acero inoxidable. Con ese fin, se expanden las células, comenzando habitualmente a partir de un único vial congelado, por ejemplo un vial de un banco de células maestro. Se descongelan las células y se expanden a lo largo de varias etapas. Se inoculan biorreactores de diferentes escalas con cantidades apropiadas de células. La densidad celular puede aumentarse añadiendo disoluciones de alimentación y aditivos al biorreactor. Se mantienen las células a una alta viabilidad durante un tiempo prolongado. Se alcanzan en la gran escala concentraciones de producto en el reactor que oscilan entre unos pocos cientos de miligramos por litro y varios gramos por litro. Puede realizarse la purificación mediante metodología de cromatografía convencional, que puede incluir etapas de cromatografía de afinidad, intercambio iónico, interacción hidrofoba o exclusión molecular. El tamaño del biorreactor puede ser de un volumen de hasta varios miles de litros en la escala final (véase también por ejemplo F. Wurm, Nature Biotechnology Vol. 22, 11, 2004, 1393-1398).

Lista de secuencias

20 <110> Novartis AG

<120> Sistema de expresión

<130> 50 858 K

<150> Documento EP08163161.6

<151> 28-08-2008

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 219

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de polinucleótido de un relleno que incluye dominio transmembrana de IgG1 humana

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (1)..(7)

<223> Relleno que incluye codón de terminación

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (1)..(3)

<223> Codón de terminación

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(6)

20 <223> Codón adicional para mediar la capacidad rezumante del codón de terminación en el sentido de 5'

<400> 1

tgactagagc	tgcaactgga	ggagagctgt	gCGgagGcgC	aggacgggga	gctggacggg	60
ctgtggacga	ccatcaccat	cttcatcaca	ctcttcctgt	taagcgtgtg	ctacagtgcc	120
accgtcacct	tcttcaaggt	gaagtggatc	ttctcctcgg	tggtggacct	gaagcagacc	180
atcatccccg	actacaggaa	catgatcggg	caggggggcc			219

<210> 2

25 <211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de polipéptido de una supuesta región transmembrana derivada de un dominio transmembrana de IgG1 humana

<400> 2

Leu Trp Thr Thr Ile Thr Ile Phe Ile Thr Leu Phe Leu Leu Ser Val
 1 5 10 15

Cys Tyr Ser Ala Thr Val Thr Phe Phe
 20 25

5 <210> 3

<211> 73

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia de polipéptido de una región transmembrana de Ig derivada del dominio transmembrana de IgG1 humana que comprende los aminoácidos derivados del codón de terminación y el codón adyacente, una región de conexión y una supuesta región transmembrana

<220>

<221> MISC_FEATURE

15 <222> (1)..(2)

<223> aminoácidos que se usan lo más probablemente en el codón de terminación TGA y el codón en el sentido de 3' en caso de ultralectura

<220>

<221> MISC_FEATURE

20 <222> (3)..(20)

<223> Supuesta región de conexión derivada del dominio transmembrana de IgG1 humana

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(45)

25 <223> Supuesta región transmembrana derivada del dominio transmembrana de IgG1 humana, también puede considerarse que dicha región comprende los dos aminoácidos siguientes

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (46)..(73)

30 <223> Supuesta región citoplasmática derivada de IgG1 humana, también puede considerarse que los dos primeros aminoácidos pertenecen al dominio transmembrana

<400> 3

Trp Leu Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Cys Ala Glu Ala Gln Asp Gly
 1 5 10 15

Glu Leu Asp Gly Leu Trp Thr Thr Ile Thr Ile Phe Ile Thr Leu Phe
 20 25 30

Leu Leu Ser Val Cys Tyr Ser Ala Thr Val Thr Phe Phe Lys Val Lys
 35 40 45

Trp Ile Phe Ser Ser Val Val Asp Leu Lys Gln Thr Ile Ile Pro Asp
 50 55 60

Tyr Arg Asn Met Ile Gly Gln Gly Ala
 65 70

<210> 4

<211> 28

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región citoplasmática derivada de un dominio transmembrana de IgG1 humana

<400> 4

Lys Val Lys Trp Ile Phe Ser Ser Val Val Asp Leu Lys Gln Thr Ile
 1 5 10 15

10 Ile Pro Asp Tyr Arg Asn Met Ile Gly Gln Gly Ala
 20 25

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> región de conexión derivada del dominio transmembrana de IgG1 humana

<400> 5

Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Cys Ala Glu Ala Gln Asp Gly Glu Leu
 1 5 10 15

Asp Gly

<210> 6

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Región citoplasmática derivada de un dominio transmembrana de IgG1 humana

<400> 6

Lys Trp Ile Phe Ser Ser Val Val Asp Leu Lys Gln Thr Ile Ile Pro
1 5 10 15

Asp Tyr Arg Asn Met Ile Gly Gln Gly Ala
20 25

<210> 7

<211> 27

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de polipéptido de una supuesta región transmembrana derivada de un dominio transmembrana de IgG1 humana

15 <400> 7

Leu Trp Thr Thr Ile Thr Ile Phe Ile Thr Leu Phe Leu Leu Ser Val
1 5 10 15

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

REIVINDICACIONES

1. Método para seleccionar al menos una célula huésped eucariota que expresa un nivel deseado de un polipéptido de interés, que comprende:
- 5 a) proporcionar una pluralidad de células huésped eucariotas que comprenden un ácido nucleico heterólogo que comprende al menos un casete (Cas-POI) que comprende al menos un primer polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés, al menos un codón de terminación en el sentido de 3' del primer polinucleótido y un segundo polinucleótido en el sentido de 3' del codón de terminación que codifica para un anclaje transmembrana de inmunoglobulina;
- 10 b) cultivar las células huésped eucariotas para permitir la expresión del polipéptido de interés de manera que al menos una parte del polipéptido de interés se expresa como un polipéptido de fusión que comprende el anclaje transmembrana de inmunoglobulina, en el que dicho polipéptido de fusión está presentándose sobre la superficie de dicha célula huésped;
- c) seleccionar al menos una célula huésped eucariota basándose en la presencia o cantidad del polipéptido de fusión presentado sobre la superficie celular.
- 15 2. Método para producir un polipéptido de interés con alto rendimiento, comprendiendo el método:
- a) proporcionar una pluralidad de células huésped eucariotas que comprenden un ácido nucleico heterólogo que comprende al menos un casete (Cas-POI) que comprende un primer polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés, al menos un codón de terminación en el sentido de 3' del primer polinucleótido y un segundo polinucleótido en el sentido de 3' del codón de terminación que codifica para un anclaje transmembrana de inmunoglobulina;
- 20 b) cultivar las células huésped eucariotas para permitir la expresión del polipéptido de interés de manera que al menos una parte del polipéptido de interés se expresa como un polipéptido de fusión que comprende el anclaje transmembrana de inmunoglobulina o una variante funcional del mismo, en el que dicho polipéptido de fusión está presentándose sobre la superficie de dicha célula huésped;
- 25 c) seleccionar al menos una célula huésped eucariota basándose en la presencia o cantidad del polipéptido de fusión presentado sobre la superficie celular;
- d) cultivar la célula huésped eucariota seleccionada en medio de cultivo en condiciones que permiten la expresión del polipéptido de interés.
- 30 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la expresión del casete (Cas-POI) da como resultado un transcrito que comprende al menos
- un primer polinucleótido, en el que la traducción de dicho primer polinucleótido da como resultado el polipéptido de interés;
- al menos un codón de terminación en el sentido de 3' de dicho primer polinucleótido;
- un segundo polinucleótido en el sentido de 3' de dicho codón de terminación, en el que la traducción de dicho
- 35 segundo polinucleótido da como resultado el anclaje transmembrana de inmunoglobulina,
- en el que al menos una parte del transcrito se traduce para dar un polipéptido de fusión que comprende el anclaje transmembrana de inmunoglobulina o una variante funcional del mismo mediante ultralectura traduccional del al menos un codón de terminación.
- 40 4. Método según al menos una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anclaje transmembrana de inmunoglobulina se selecciona del grupo que consiste en
- a) un anclaje transmembrana derivado de IgA, IgE, IgM, IgG y/o IgD,
- b) un anclaje transmembrana de inmunoglobulina que comprende un dominio citoplasmático, y
- c) un anclaje transmembrana de inmunoglobulina que comprende una secuencia tal como se muestra en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y/o SEQ ID NO: 7.

5. Método según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa c) comprende poner en contacto la pluralidad de células huésped eucariotas con un compuesto de detección que se une al polipéptido de fusión y seleccionar al menos una célula huésped eucariota basándose en la presencia o cantidad del compuesto de detección unido.
6. Método según al menos una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la ultralectura del codón de terminación da como resultado aproximadamente $\leq 50\%$, $\leq 25\%$, $\leq 15\%$, $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 2,5\%$, $\leq 1,5\%$, $\leq 1\%$ o menos de $\leq 0,5\%$ del polipéptido de fusión.
7. Método según al menos una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que se realizan dos o más ciclos de selección, en el que en cada ciclo de selección se selecciona al menos una célula huésped eucariota basándose en la presencia o cantidad del polipéptido de fusión presentado sobre la superficie celular.
8. Método según al menos una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la unión del compuesto de detección a la superficie de la célula huésped eucariota se detecta mediante citometría de flujo.
9. Ácido nucleico vector adecuado para expresar al menos un polipéptido de interés en una célula huésped eucariota y adecuado para su uso en el método de selección según una o más de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende
- a) al menos un casete (Cas-POI) que comprende un sitio de inserción para un primer polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés y/o un primer polinucleótido que codifica para un polipéptido de interés,
- b) al menos un codón de terminación en el sentido de 3' de dicho sitio de inserción y/o en el sentido de 3' del primer polinucleótido, y
- c) un segundo polinucleótido en el sentido de 3' del codón de terminación que codifica para un anclaje transmembrana de inmunoglobulina.
10. Ácido nucleico vector según la reivindicación 9, que comprende al menos una de las siguientes características:
- un primer polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés en el casete (Cas-POI);
 - un casete de expresión (MSM) que comprende un gen de marcador seleccionable de mamífero; y/o
 - un casete de expresión (MASM) que comprende un gen de marcador seleccionable amplificable de mamífero.
11. Ácido nucleico vector según la reivindicación 9 ó 10 para expresar al menos una molécula de inmunoglobulina o una variante funcional de la misma, que comprende
- un casete de expresión (Exp-POI) que comprende un primer polinucleótido que codifica para la cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma, al menos un codón de terminación en el sentido de 3' del primer polinucleótido y un segundo polinucleótido en el sentido de 3' del codón de terminación que codifica para un anclaje transmembrana de inmunoglobulina; y
 - un casete de expresión adicional (Exp-POI') que comprende un polinucleótido que codifica para la cadena ligera correspondiente de una molécula de inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma.
12. Método para producir un ácido nucleico vector según al menos una de las reivindicaciones 9 a 11, comprendiendo el método ensamblar al menos un casete (Cas-POI) en un vector de manera que dicho casete (Cas-POI) comprende un primer polinucleótido (Pn-POI) que codifica para el polipéptido de interés, al menos un codón de terminación en el sentido de 3' del primer polinucleótido y un segundo polinucleótido en el sentido de 3' del codón de terminación que codifica para un anclaje transmembrana de inmunoglobulina.
13. Célula huésped eucariota que tiene al menos una de las siguientes características:
- a) se obtiene mediante el método según al menos una de las reivindicaciones 1 a 8;
- b) comprende un casete (Cas-POI) que comprende al menos un polinucleótido heterólogo que codifica para un polinucleótido de interés, al menos un codón de terminación en el sentido de 3' de dicho polinucleótido heterólogo y un polinucleótido en el sentido de 3' del codón de terminación que codifica para un anclaje transmembrana de inmunoglobulina; y/o
- c) comprende un ácido nucleico vector según al menos una de las reivindicaciones 9 a 11.

14. Método para producir un polipéptido de interés, en el que se cultiva una célula huésped eucariota según la reivindicación 13 para expresar el polipéptido de interés.

15. Método para producir un polipéptido de interés según una de las reivindicaciones 2 a 8 ó 14, en el que se realiza al menos una de las siguientes etapas:

- 5 - se obtiene el polipéptido a partir del cultivo celular;
- se secreta el polipéptido al, y se obtiene del, medio de cultivo;
- se rompen las células huésped eucariotas para obtener el polipéptido expresado;
- se aísla el polipéptido expresado;
- se purifica el polipéptido expresado; y/o
- 10 - se procesa y/o se purifica adicionalmente el polipéptido expresado.