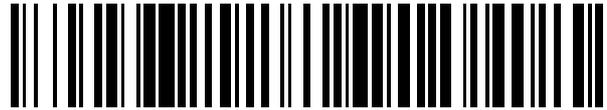


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 321**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2010 E 10709687 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013 EP 2401383**

54 Título: **Métodos para seleccionar células eucarióticas que expresan una proteína heteróloga**

30 Prioridad:

27.02.2009 EP 09154000

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

28.01.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JOSTOCK, THOMAS y
KNOPF, HANS-PETER**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 440 321 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

Métodos para seleccionar células eucarióticas que expresan una proteína heteróloga

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método novedoso para seleccionar células huésped eucarióticas, en particular células huésped de mamífero, que expresan un producto de interés. Adicionalmente, la presente invención se refiere a un método para producir de una manera eficiente un producto de interés con un alto rendimiento.

Antecedentes de la invención

10 La capacidad para clonar y expresar productos de interés, tales como péptidos y proteínas recombinantes en grandes cantidades, ha llegado a ser cada vez más importante. La capacidad para purificar altos niveles de proteínas es importante en el campo farmacéutico y biotecnológico humano, por ejemplo, para producir productos farmacéuticos de proteínas, así como en el establecimiento de la investigación básica, por ejemplo, para cristalizar proteínas con el fin de permitir la determinación de su estructura tridimensional. Las proteínas que sean de otra manera difíciles de obtener en cantidad, se pueden sobre-exresar en una célula huésped, y subsiguientemente se aíslan y se purifican.

15 La selección de un sistema de expresión para la producción de proteínas recombinantes depende de muchos factores, incluyendo las características del crecimiento celular, los niveles de expresión, la expresión intracelular y extracelular, las modificaciones posteriores a la traducción y la actividad biológica de la proteína de interés, así como las cuestiones regulatorias y las consideraciones económicas en la producción de proteínas terapéuticas. Las ventajas clave de las células de mamífero sobre otros sistemas de expresión, tales como bacterias o levadura, son
20 la capacidad para llevar a cabo el plegamiento apropiado de la proteína, la compleja glicosilación N-enlazada, y una auténtica glicosilación O-enlazada, así como un amplio espectro de otras modificaciones posteriores a la traducción. Debido a las ventajas descritas, las células eucarióticas, y en particular las células de mamífero son actualmente el sistema de expresión de elección para producir proteínas terapéuticas complejas tales como anticuerpos monoclonales.

25 El planteamiento más común para obtener células huésped de alta expresión (también denominadas como altas productoras) genera un vector de expresión apropiado para expresar el producto de interés como un primer paso. El vector de expresión impulsa la expresión del polinucleótido que codifica el producto de interés en la célula huésped, y proporciona cuando menos un marcador seleccionable para generar la línea celular recombinante. Los elementos
30 de los vectores de expresión de mamífero usualmente incluyen un promotor constitutivo o inducible capaz de tener una actividad de transcripción robusta; un procesamiento de ARNm optimizado, y señales de traducción que usualmente incluyen una secuencia Kozak, un codón de terminación de traducción, señales de poliadenilación y disociación del ARNm, un terminador de transcripción y marcadores seleccionables para la preparación de líneas celulares estables y para la amplificación genética; adicionalmente se pueden proporcionar un origen de replicación procariótico y marcadores seleccionables para la propagación del vector en bacterias mediante el vector de
35 expresión.

En los años recientes, el enfoque del desarrollo se ha estado concentrando en el diseño de vectores mejorados para la expresión genética en las células huésped. A pesar de la gran cantidad de vectores disponibles, sin embargo, todavía es desafiante una producción robusta de polipéptidos/proteínas con un alto rendimiento en las células de mamífero.

40 Un procedimiento establecido para obtener líneas celulares de alta producción que expresen el producto de interés con un alto rendimiento es la transfección estable de las células huésped. Sin embargo, la integración estable en el genoma es un suceso raro, y solamente un pequeño subconjunto de células establemente transfectadas son altas productoras. De conformidad con lo anterior, esta selección es desafiante.

45 Los marcadores seleccionables y los sistemas de selección se utilizan ampliamente en la ingeniería genética, en la tecnología de ADN recombinante, y en la producción de productos recombinantes con el objeto de obtener células huésped que expresen el producto de interés con un alto rendimiento. Los sistemas respectivos son también útiles para generar e identificar los clones establemente transfectados. La meta primaria de la utilización de los marcadores seleccionables respectivos y los sistemas de selección es introducir un gen seleccionable que, después de su exposición a condiciones de crecimiento selectivas, permita hacer la identificación de las células capaces de
50 tener un alto nivel de producción del marcador seleccionable introducido, y de acuerdo con lo mismo, del producto recombinante de interés. El aumento del rendimiento de la expresión del producto se puede lograr, por ejemplo, mediante amplificación genética utilizando líneas celulares, por ejemplo, deficientes en una enzima, tal como reductasa de dihidrofolato (DHFR) o sintetasa de glutamina (GS) en conjunto con vectores de expresión que contengan genes que codifiquen estas enzimas marcadoras seleccionables, y agentes tales como metotrexato

(MTX), que inhibe la reductasa de dihidrofolato (DHFR), y la metionina-sulfoxamina (MSX) que inhibe la sintetasa de glutamina (GS).

5 La Patente Europea Número EP 0 246 049 describe un método para obtener un transformante de célula animal, en el que el transformante se obtiene introduciendo en una célula de animal de tipo silvestre un gen de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) de tipo silvestre y un gen estructural que codifica una proteína de interés. Se cultivan las células en un medio de cultivo selectivo que comprende metotrexato (MTX).

10 Zhou y colaboradores, (2006 Biotechnology Progress 22, 313-318) describen un sistema de selección de reductasa de dihidrofolato (DHFR) en el que se co-transfectaron células CHO usando plásmidos, uno que contiene los genes de reductasa de dihidrofolasa y cadena pesada de IgG y el otro que contiene los genes de fosfotransferasa de neomicina (neo) y cadena ligera de IgG. Se cultivan las células mediante aumentos por etapas en la concentración de metotrexato (MTX) y se notifican las tasas de (inv.).

Mayer-Kuckuk y colaboradores (PNAS, 19 de marzo de 2002, vol. 99 n.º 6; 3400-3405) describen que las células humanas enfrentadas a antifolatos muestran un rápido aumento en los niveles de la enzima reductasa de dihidrofolato.

15 Zhu y colaboradores (Journal of Experimental Therapeutics and Oncology, 2:264-277, 2002) muestran que las restricciones graves de folato dan como resultado el agotamiento de y la alteración en la composición de la reserva de folato intracelular, sensibilización moderada al metotrexato y trimetrexato y una regulación por incremento de la actividad de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) endógena.

20 Santos y colaboradores (Bioorganic and Medicinal Chemistry 15 (2007) 1266-1274) describen una serie de nuevos derivados de hidroxamato basados en aminopteroilo que seleccionan como diana dos familias de enzimas, concretamente metaloproteinasas de la matriz y reductasa de dihidrofolato (DHFR). Se sometieron a prueba sus efectos en modelos de cultivo celular *in vitro*.

Etienne y colaboradores (Biochemical Pharmacology, vol. 46, n.º 10, págs. 1767-1774, 1993) analizan el efecto *in vitro* de diferentes concentraciones de folatos reducidos con MTX sobre diferentes tipos celulares de cáncer.

25 Backus y colaboradores (Int. J. Cancer: 87, 771-778 (2000)) analizan el efecto del agotamiento de folato sobre la sensibilidad de líneas celulares de tumores sólidos con respecto a diferentes inhibidores de sintasa de timidilato (TS) o reductasa de dihidrofolato (DHFR).

30 Un sistema de selección prominente que se utiliza comúnmente en la técnica anterior, es el sistema de selección de reductasa de dihidrofolato (DHFR)/MTX. La reductasa de dihidrofolato (DHFR) cataliza la reducción dependiente de NADP del ácido dihidrofólico hasta ácido tetrahidrofólico (THF). El tetrahidrofolato (THF) se intraconvierte entonces hasta 10-formil-DHF y 5,10-metilen-DHF que se utilizan en la biosíntesis *de novo* de purinas y timidilato, respectivamente. DHF es el subproducto de la actividad catalítica de la sintasa de timidilato (TS), la cual cataliza la conversión de dUMP hasta dTMP en una reacción dependiente de 5,10-metilen-THF. Por consiguiente, la reductasa de dihidrofolato (DHFR) es crucial para el reciclaje de los co-factores de tetrahidrofolato (THF) que son esenciales para la biosíntesis de los nucleótidos de purina y pirimidina que son necesarios para la replicación del ADN. Por consiguiente, las células (por ejemplo, las células CHO) que carecen del gen de reductasa de dihidrofolato (DHFR) (es decir, mediante la supresión genómica dirigida) se pueden utilizar como receptoras para la transfección del gen de reductasa de dihidrofolato (DHFR) en un medio que esté libre de nucleótidos. Después de la transfección, las células se pueden someter a un aumento gradual en las concentraciones del anti-folato MTX, un inhibidor muy potente de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) ($K_d = 1 \text{ pM}$), forzando de esta manera a las células para producir mayores niveles de la reductasa de dihidrofolato (DHFR). Después de múltiples rondas de selección, el marcador seleccionable de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) con frecuencia experimenta una amplificación significativa. También se pueden utilizar formas mutantes más sensibles de los marcadores seleccionables respectivos en conjunto con las células huésped de tipo silvestre. De una manera alternativa, también se ha utilizado extensamente una reductasa de dihidrofolato (DHFR) de ratón mutante con una mayor resistencia, es decir, con menos sensibilidad, al MTX o a otras formas mutantes de la reductasa de dihidrofolato (DHFR), como un marcador seleccionable dominante que mejora notoriamente la adquisición de la resistencia a MTX de alto nivel en las células transfectadas. Sin embargo, un inconveniente importante del sistema de selección de reductasa de dihidrofolato (DHFR)/MTX utilizado en la técnica anterior, es que esta técnica utiliza un agente citotóxico mutagénico, MTX, que, particularmente en concentraciones más altas, puede alterar el genotipo de las células receptoras. Esto con frecuencia da como resultado poblaciones de células resistentes al MTX, en donde no hay expresión del gen de interés objetivo presente, debido a las mutaciones de pérdida de función, por ejemplo, en el portador de folato reducido (RFC)/o pérdida de la expresión genética del portador de folato reducido (RFC), ambas de las cuales eliminan la absorción de MTX. Sin embargo, son necesarias las concentraciones crecientes/altas de MTX, con el objeto de lograr condiciones de selección suficientemente restringentes para aislar las células huésped que produzcan el producto de interés con un rendimiento suficiente.

55

Como llega a ser evidente, es crucial un sistema de selección de alta rigurosidad para enriquecer las células de alta producción a partir de una población transfectada. Mientras más alta sea la rigurosidad del sistema de selección, más bajo será el número de bajas productoras después del proceso de selección, y más alta será la oportunidad de encontrar los muy raros clones de ultra-alta producción en una población de células transfectadas.

- 5 Por consiguiente, es el objeto de la presente invención, proporcionar un sistema de selección restringente para seleccionar las células huésped que produzcan un producto de interés, con un alto rendimiento, así como métodos para la producción de un producto de interés con suficiente rendimiento. En particular, es el objeto de la presente invención, proporcionar un sistema de selección restringente que requiera de menores cantidades de agentes tóxicos, en particular de MTX. Adicionalmente, es el objeto de la presente invención, proporcionar un método para producir un producto de interés, con un alto rendimiento.
- 10

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un sistema de selección para seleccionar las células huésped que expresen un producto de interés, con un alto rendimiento, y a la producción de los productos respectivos, en particular polipéptidos, tales como anticuerpos.

- 15 De acuerdo con un aspecto, la presente invención se refiere a un método para seleccionar cuando menos una célula huésped eucariótica que exprese un producto de interés, comprendiendo este método cuando menos los siguientes pasos:

- (a) proporcionar una pluralidad de células huésped eucarióticas, en donde la viabilidad celular de las células huésped dependa de la absorción de folato, en donde estas células huésped eucarióticas comprendan cuando menos:
- 20

(i) un polinucleótido introducido que codifica un producto de interés, y

(ii) un polinucleótido introducido que codifica una enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR);

(b) cultivar la pluralidad de células huésped eucarióticas en un medio de cultivo selectivo, el cual comprenda cuando menos un inhibidor de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) y folato en una concentración limitante;

- (c) seleccionar cuando menos una célula huésped eucariótica que exprese el producto de interés.
- 25

La invención también se refiere a un proceso para la producción de un producto de interés, el cual comprende cultivar una célula huésped seleccionada de acuerdo con la presente invención, bajo condiciones que permitan la expresión del producto de interés.

- También se proporciona un medio de cultivo selectivo, el cual comprende cuando menos un inhibidor de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) y folato en una concentración limitante para su uso en el método de selección de acuerdo con la presente invención. Un "medio de cultivo selectivo" es un medio de cultivo celular útil para la selección de las células huésped.
- 30

- Otros objetos, características, ventajas y aspectos de la presente solicitud llegarán a ser evidentes para los expertos en este campo a partir de la siguiente descripción y de las reivindicaciones adjuntas. Se debe entender, sin embargo, que la siguiente descripción, las reivindicaciones adjuntas, y los ejemplos específicos, aunque indican las modalidades preferidas de la solicitud, se dan a manera de ilustración solamente. Diferentes cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención dada a conocer llegarán a ser fácilmente evidentes para los expertos en este campo a partir de la lectura de lo siguiente.
- 35

Descripción detallada de la invención

- La presente invención se refiere a un sistema de selección que utiliza la reductasa de dihidrofolato (DHFR) como un marcador seleccionable, el cual requiere de una concentración más baja de agentes tóxicos, tales como el anti-folato MTX, pero todavía proporciona condiciones de selección restringentes suficientes para identificar las células huésped de alta producción.
- 40

- De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para seleccionar cuando menos una célula huésped eucariótica que expresa un producto de interés, comprendiendo este método cuando menos los siguientes pasos:
- 45

(a) proporcionar una pluralidad de células huésped eucarióticas, en donde la viabilidad celular de las células

huésped depende de la absorción de folato, en donde estas células huésped eucarióticas comprenden cuando menos:

- (i) un polinucleótido introducido que codifica un producto de interés, y
- (ii) un polinucleótido introducido que codifica una enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR);

5 (b) cultivar la pluralidad de células huésped eucarióticas en un medio de cultivo selectivo, el cual comprende cuando menos un inhibidor de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) y folato en una concentración limitante;

(c) seleccionar cuando menos una célula huésped eucariótica que exprese el producto de interés.

10 Un "polinucleótido" es un polímero de nucleótidos que usualmente se enlazan de una desoxi-ribosa 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 y también abarca polinucleótidos que comprenden modificaciones, en particular nucleótidos modificados.

15 Un "producto de interés" se refiere al producto que se va a expresar a partir de la célula huésped. El producto de interés puede ser, por ejemplo, un polipéptido o un polinucleótido, tal como ARN. De preferencia, el producto de interés es un polipéptido, en particular una molécula de inmunoglobulina. Otros ejemplos de productos de interés se describen con detalle más adelante.

20 Un "polinucleótido introducido" 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 o no comprender un polinucleótido endógeno correspondiente, respectivamente, que es idéntico, al polinucleótido introducido. La introducción se puede lograr, por ejemplo, mediante la transfección de un vector adecuado que se pueda integrar en el genoma de la célula huésped (transfección estable). Los vectores de expresión adecuados que permiten la introducción de polinucleótidos en la célula huésped, se describen con detalle más adelante. En el caso de que el ácido nucleico heterólogo no se inserte en el genoma, el ácido nucleico heterólogo se puede perder en la etapa posterior, por ejemplo, cuando las células experimenten la mitosis (transfección transitoria). Los vectores adecuados también se podrían mantener en la célula huésped sin integrarse en el genoma, por ejemplo, mediante la replicación episomal. Sin embargo, también se conocen otros métodos en la técnica anterior para introducir un polinucleótido en una célula huésped, los cuales se describen con mayor detalle más adelante.

30 Un "inhibidor de reductasa de dihidrofolato (DHFR)" es un compuesto que inhibe la actividad de la reductasa de dihidrofolato (DHFR). Un inhibidor respectivo, por ejemplo, puede competir con el sustrato de reductasa de dihidrofolato (DHFR) para enlazarse a una reductasa de dihidrofolato (DHFR). Los inhibidores de reductasa de dihidrofolato (DHFR) adecuados son, por ejemplo, anti-folatos, tales como metotrexato (MTX). Otros ejemplos incluyen, pero no se limitan a, trimetrexato glucuronato (neutrexina), trimetoprim, pirimetamina y pemetrexed.

35 El término "seleccionar" o "selección", como se utiliza en la presente, se refiere en particular a un proceso para utilizar un marcador seleccionable y condiciones de cultivo selectivas para seleccionar y, de conformidad con lo anterior, obtener las células huésped que hayan incorporado el vector o la combinación del vector de acuerdo con la presente invención. De esta manera, las células huésped transfectadas con éxito se pueden aislar y/o enriquecer a partir de la población de las células huésped transfectadas.

40 Las células huésped que no hayan incorporado con éxito el vector o la combinación del vector de acuerdo con la presente invención de preferencia mueren o se deteriora su crecimiento bajo las condiciones de cultivo selectivas, comparándose con las células huésped que hayan incorporado con éxito el vector o la combinación del vector de acuerdo con la presente invención. Durante la selección, las células huésped, las cuales han incorporado con éxito el vector o la combinación del vector de acuerdo con la presente invención, se pueden enriquecer como una reserva a partir de la población de las células huésped transfectadas. También se pueden aislar las células huésped individuales a partir de la población de las células huésped transfectadas durante la selección (por ejemplo, mediante selección clonal). Las modalidades adecuadas de los procedimientos de selección para obtener las células huésped transfectadas con éxito (por ejemplo, mediante clasificación FACS o dilución limitada) son bien conocidas en la técnica anterior y, de conformidad con lo anterior, no necesitan una descripción detallada.

50 Una "concentración limitante de folato" se refiere a una concentración de folatos en el medio de cultivo selectivo, que proporciona una presión selectiva sobre la célula huésped. De conformidad con lo anterior, los folatos no están comprendidos en el medio de cultivo selectivo en abundancia, proporcionando de esta manera una presión de selección sobre las células huésped. El folato comprendido en el medio de cultivo selectivo en una concentración limitante es capaz de absorberse en, y de ser procesado por, la célula huésped. Los folatos y en particular los derivados de folato que no serían procesados por la célula huésped, no contribuirían a la presión de selección y, de

conformidad con lo anterior, no contribuirían a la concentración limitante. Los intervalos de concentración adecuados se describen más adelante.

5 Un "polipéptido" se refiere a una molécula que comprende un polímero de aminoácidos enlazados entre sí mediante un enlace/enlaces peptídico(s). Los polipéptidos incluyen polipéptidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas (por ejemplo, que tienen más de 50 aminoácidos), y péptidos (por ejemplo, que tienen de 2 a 49 aminoácidos). Los polipéptidos incluyen proteínas y/o péptidos de cualquier actividad o bioactividad. Los ejemplos adecuados se ilustran más adelante.

10 De una manera sorprendente, se encontró que un sistema de selección para proporcionar células eucarióticas recombinantes capaces de producir un producto de interés, se puede basar en la disponibilidad limitada de folatos en el medio de cultivo selectivo en conjunto con el uso de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) como marcador seleccionable. El sistema es ampliamente aplicable, es decir, a las células huésped eucarióticas cuya viabilidad celular depende de la absorción de folato. Como se describe anteriormente, la técnica anterior debe utilizar concentraciones de anti-folato/MTX más bien altas con el objeto de lograr una presión de selección suficiente para la amplificación genética y, de conformidad con lo anterior, para lograr un aumento en la producción del producto de interés. Ésta es una desventaja debido a que los anti-folatos, tales como MTX, son tóxicos y pueden alterar genéticamente la célula huésped. El planteamiento de la presente invención, el cual se basa en el uso combinado de un marcador de selección de reductasa de dihidrofolato (DHFR) con una concentración limitante de folatos en el medio de cultivo selectivo, tiene la ventaja de que se incrementa considerablemente la rigurosidad de la selección, incluso con bajas concentraciones de inhibidor de la reductasa de dihidrofolato (DHFR). Por consiguiente, cuando se utiliza el sistema de selección de la presente invención, se obtienen altos productores, incluso cuando se utilizan en bajas concentraciones del inhibidor de reductasa de dihidrofolato (DHFR) (por ejemplo, MTX) en el medio de cultivo selectivo. Por consiguiente, se necesita menos inhibidor de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) y, de conformidad con lo anterior, menores concentraciones del agente tóxico, cuando se utiliza la enseñanza de la presente invención, comparándose con los planteamientos de la técnica anterior para proporcionar condiciones de selección restringentes que permitan hacer la identificación de los clones de células de alta producción. Debido a su diseño único, se proporciona un sistema de selección muy restringente que permite el enriquecimiento de las células de alta producción a partir de la población de células huésped transfectadas. Esta alta rigurosidad del sistema de selección de acuerdo con la presente invención disminuye el número de bajas productoras en la población después de la selección en la población, y aumenta la oportunidad de encontrar los muy raros clones de ultra-alta producción.

30 El medio de cultivo selectivo puede comprender uno o más tipos de folato. Un folato de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, puede ser un folato oxidado (es decir, ácido fólico) o un folato reducido o un derivado de los mismos. En general, un folato puede ser útil dentro de la presente invención, siempre que tal folato sea capaz de absorberse por una célula eucariótica, de preferencia mediante un receptor de folato enlazado a membrana funcional. El folato oxidado, es decir, el ácido fólico, así como los derivados reducidos de ácido fólico, conocidos como folatos reducidos o tetrahidrofolatos (THF), son un grupo de vitaminas B-9 que son co-factores y/o coenzimas esenciales para la biosíntesis de purinas, timidilato y ciertos aminoácidos en las células eucarióticas, en particular en las células de mamífero. Los co-factores de tetrahidrofolato (THF) son particularmente cruciales para la replicación del ADN y, por consiguiente, para la proliferación celular. De una manera específica, los co-factores de tetrahidrofolato (THF) funcionan como donadores de unidades de un átomo de carbono en una serie de sendas metabólicas interconectadas que involucran la biosíntesis *de novo* de purinas y timidilato, aminoácidos, así como el metabolismo del grupo metilo, incluyendo la metilación de isla CpG del ADN. De una manera específica, los co-factores de tetrahidrofolato (THF), incluyendo 10-formil-THF (10-CHO-THF), contribuyen con unidades de un átomo de carbono en dos reacciones de formil-transferasa *de novo* clave involucradas en la biosíntesis *de novo* de las purinas. Un ejemplo preferido de un folato oxidado es el ácido fólico. Los ejemplos preferidos de los folatos reducidos son ácido 5-metil-tetrahidrofólico, 5-formil-tetrahidrofólico, ácido 10-formil-tetrahidrofólico y ácido 5,10-metilen-tetrahidrofólico.

La concentración de folato en el medio selectivo depende en particular de la célula huésped eucariótica utilizada. Es adecuada una concentración de folato de 500 nM o menos, de 250 nM o menos, de 150 nM o menos, de 100 nM o menos, de 75 nM o menos, de 50 nM o menos, de 25 nM o menos, de 15 nM o menos, o incluso de 10 nM o menos, tal como de 7,5 nM o menos. Los intervalos adecuados incluyen de 0,1 nM a 500 nM, de 0,1 nM a 250 nM, de 5 ó 10 nM a 250 nM, de preferencia de 1 nM a 150 nM, de 5 ó 10 nM a 150 nM, de 1 nM a 100 nM, de 5 ó 10 nM a 100 nM, y más preferiblemente de 1 nM a 50 nM, de 2,5 nM a 50 nM, de 10 nM a 50 nM, o de 12,5 nM a 50 nM. Estas concentraciones son particularmente adecuadas cuando se utiliza ácido fólico como el folato.

Las concentraciones respectivas son limitantes en el sentido de la presente invención y, por consiguiente, son adecuadas para proporcionar una presión selectiva sobre las células huésped. Mientras más baja sea la concentración, más fuerte será la presión de selección ejercida, siempre que las células sean todavía viables. Los intervalos de concentración descritos son particularmente adecuados para la utilización de las células CHO como las células huésped.

La concentración del inhibidor de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) utilizada en el medio de cultivo selectivo,

también depende de la célula huésped eucariótica utilizada. Es conveniente una concentración del inhibidor de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) de 500 nM o menos, de 400 nM o menos, de 300 nM o menos, de 250 nM o menos, de 200 nM o menos, de 150 nM o menos, en el caso de que se suponga que se va a reducir la concentración del inhibidor de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) en el medio selectivo. Sin embargo, de preferencia, el medio selectivo comprende cuando menos 10 nM del inhibidor de la reductasa de dihidrofolato (DHFR). Las concentraciones de anti-folato preferidas, de preferencia MTX, son de 1 nM a 500 nM, de preferencia de 10 nM a 200 nM, de 10 nM a 150 nM, y más preferiblemente de 10 nM a 100 nM. Las concentraciones respectivas en el medio de cultivo selectivo son particularmente adecuadas para las células CHO.

Las concentraciones y los intervalos de concentración preferidos de folato y anti-folato descritos anteriormente, se pueden combinar entre sí. De acuerdo con una modalidad, se utiliza un medio de cultivo selectivo que comprende una concentración de inhibidor de la reductasa de dihidrofolato (DHFR), de preferencia MTX, de 200 nM o menos, de preferencia de 150 nM o menos, de preferencia de 100 nM o menos, y una concentración de folato, de preferencia de ácido fólico, de menos de 100 nM, de preferencia de menos de 75 nM. En una modalidad, se utiliza una concentración de folato de 12,5 nM a 50 nM en combinación con una concentración de anti-folato de 10 nM a 100 nM. De preferencia, el ácido fólico y el MTX se utilizan como el folato y el anti-folato.

Las concentraciones factibles de ácido fólico y MTX pueden ser dependientes entre sí; una combinación preferida es una concentración de ácido fólico de 2,5 nM a 75 nM, de 2,5 nM a 50 nM, o de 12,5 nM a 50 nM, combinada con una concentración de MTX de 10 nM a 500 nM, de preferencia de 10 nM a 100 nM. Estas concentraciones se prefieren en particular cuando se utiliza una célula DHFR⁺ (positiva).

Las concentraciones descritas anteriormente son particularmente adecuadas para las células en suspensión de crecimiento rápido, las cuales son un fenotipo preferido para las líneas celulares de producción comercial. Sin embargo, diferentes líneas celulares pueden tener diferentes propiedades de consumo de ácido fólico. Adicionalmente, las concentraciones limitantes/selectivas pueden variar dependiendo del folato utilizado, respectivamente, el anti-folato. Por consiguiente, las concentraciones limitantes de folato, en particular de ácido fólico y anti-folato, en particular de MTX, así como las proporciones adecuadas del ácido fólico al MTX, pueden diferir para diferentes líneas celulares. Las concentraciones adecuadas, sin embargo, pueden ser fácilmente determinadas de una manera experimental por la persona experta.

De acuerdo con una modalidad, las células huésped se cultivan previamente en un medio de cultivo libre de folato o en un medio de cultivo que comprenda una concentración limitante de folato antes de la transfección y/o selección. Las concentraciones limitantes de folato adecuadas se describen anteriormente. De preferencia, el medio de cultivo para cultivar previamente las células huésped, comprende folato, en particular ácido fólico, en una concentración de 50 nM o menos.

La expresión del marcador seleccionable de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) incorporado proporciona una ventaja selectiva bajo condiciones de cultivo selectivas, a las células huésped. Por ejemplo, las células huésped (por ejemplo, las células CHO) que carecen del gen de reductasa de dihidrofolato (DHFR) (por ejemplo, mediante la supresión genómica dirigida, también denominadas como células huésped DHFR⁻), se pueden utilizar como receptoras para la transfección del gen de reductasa de dihidrofolato (DHFR), como el gen marcador seleccionable, en un medio que esté libre de nucleótidos. Sin embargo, también es posible utilizar células huésped que expresen la reductasa de dihidrofolato (DHFR) de una manera endógena (células huésped DHFR⁺ (positivas)) cuando se lleve a cabo una selección de reductasa de dihidrofolato (DHFR), si se emplean las condiciones de cultivo selectivas apropiadas. Después de la transfección con los polinucleótidos de acuerdo con la presente invención, las células se pueden someter a un aumento gradual en las concentraciones de los inhibidores de la reductasa de dihidrofolato (DHFR). Un ejemplo de los inhibidores de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) es el de los anti-folatos, tales como el MTX, el cual es un potente inhibidor de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) (K_d = 1 pM). La presencia del anti-folato, tal como MTX, en el medio, fuerza a las células para producir mayores niveles de la reductasa de dihidrofolato (DHFR), para sobrevivir. Después de múltiples rondas de selección, el marcador seleccionable de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) con frecuencia experimenta una amplificación genética significativa para lograrlo.

Se conocen varios genes de reductasa de dihidrofolato (DHFR) adecuados en la técnica anterior, que se pueden utilizar en conjunto con la presente invención. La reductasa de dihidrofolato (DHFR) puede ser una reductasa de dihidrofolato (DHFR) de tipo silvestre o una variante funcional o derivado de la misma. El término una "variante" o un "derivado" incluyen las enzimas de reductasa de dihidrofolato (DHFR) que tienen uno o más intercambios de las secuencias de aminoácidos (por ejemplo, supresiones, sustituciones o adiciones) con respecto a la secuencia de aminoácidos de la enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR) respectiva, las proteínas de fusión, las cuales comprenden una enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR) o un fragmento funcional de la misma, y las enzimas de reductasa de dihidrofolato (DHFR) que se han modificado para proporcionar una estructura y/o función adicional, así como fragmentos funcionales de los anteriores, que todavía tengan cuando menos una función de una enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR). Las enzimas/variantes de reductasa de dihidrofolato (DHFR) se pueden utilizar como marcadores de selección, los cuales son más o menos sensibles al MTX que la enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR) de tipo silvestre. De acuerdo con una modalidad, la enzima de reductasa de dihidrofolato

(DHFR) utilizada es más sensible a los anti-folatos, tales como MTX, que la correspondiente enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR) de tipo silvestre y/o la enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR) endógenamente expresada por la célula huésped, si se expresa. La enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR) se puede derivar a partir de cualquier especie, siempre que sea funcional dentro de la presente invención, es decir, puede ser compatible con la célula huésped utilizada. Por ejemplo, se ha utilizado extensamente una reductasa de dihidrofolato (DHFR) de ratón mutante con una resistencia importante a MTX, como un marcador seleccionable dominante que mejora notoriamente la adquisición de la resistencia a MTX de alto nivel en las células transfectantes. De preferencia, se utiliza una enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR), la cual es menos susceptible y, por consiguiente, menos sensible a un inhibidor de la reductasa de dihidrofolato (DHFR), tal como MTX, que la enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR) endógenamente expresada en una célula huésped DHFR⁺(positiva)).

De acuerdo con una modalidad, se coloca un intrón o un fragmento del mismo en el extremo 3' del marco de lectura abierto del gen de reductasa de dihidrofolato (DHFR). Esto tiene efectos convenientes sobre el índice de expresión/amplificación de la construcción. El intrón utilizado en el casete de expresión de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) conduce a una variante no funcional más pequeña del gen de reductasa de dihidrofolato (DHFR) (Grillari y colaboradores, 2001, J. Biotechnol. 87, 59-65). De esta manera, disminuye el nivel de expresión del gen de reductasa de dihidrofolato (DHFR), y, por consiguiente, se puede incrementar adicionalmente la rigurosidad del sistema de selección. De conformidad con lo anterior, la célula huésped puede comprender un polinucleótido introducido que codifica una enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR), comprendiendo este polinucleótido un intrón que se localiza en 3' de la secuencia que codifica la reductasa de dihidrofolato (DHFR). Los métodos alternativos que hacen uso de un intrón para reducir el nivel de expresión del gen de reductasa de dihidrofolato (DHFR) se describen en la Patente Europea Número EP 0 724 639, y también se podrían utilizar.

En contraste con la mayoría de los procariontes, las plantas y hongos que sintetizan sus propios folatos, los mamíferos y otras especies eucarióticas están desprovistas de la biosíntesis del co-factor de tetrahidrofolato (THF) y, por consiguiente, deben obtenerlo a partir de fuentes exógenas, usualmente del medio de cultivo. Actualmente se sabe que tres sistemas de transporte independientes median la absorción de folatos y anti-folatos en las células de mamífero, es decir, el portador de folato reducido (RFC); el transportador de folato acoplado con protones (PCFT, también conocido como SLC46A), y los receptores de folato (FRs).

La célula huésped eucariótica se selecciona de preferencia a partir del grupo que consiste en una célula de mamífero, una célula de insecto, una célula de planta y una célula de hongo. Las células de hongos y las células de plantas pueden ser prototróficas para los folatos (es decir, estas células pueden sintetizar de una manera autónoma sus propios folatos necesarios para su viabilidad celular, es decir, su crecimiento y proliferación celular). La presente invención abarca en particular las células de hongos y plantas que son o pueden llegar a ser auxotróficas para los folatos. Esto puede ser, por ejemplo, debido a la manipulación genética, es decir, las células ahora son incapaces de sintetizar cantidades suficientes de los folatos necesarios para su viabilidad celular. Por ejemplo, se puede inactivar la capacidad de las células de hongos o de plantas para biosintetizar de una manera endógena los folatos, por ejemplo, por medio de una senda metabólica apropiada, por ejemplo, mediante la alteración genética o el silenciamiento genético de los genes objetivo apropiados, o mediante la inhibición de las enzimas clave, etc. De preferencia, la célula huésped es una célula de mamífero. Esta célula de mamífero se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en una célula de roedor, una célula humana, y una célula de mono. En particular se prefiere una célula de roedor, que de preferencia se selecciona a partir del grupo que consiste en una célula CHO, una célula BHK, una célula NSO, una célula de fibroblasto 3T3 de ratón, y una célula SP2/0. Una célula de roedor más particularmente preferida es una célula CHO. También se prefiere una célula humana, la cual, de preferencia, se selecciona a partir del grupo que consiste en una célula HEK293, una célula MCF-7, una célula PerC6, y una célula HeLa. Además se prefiere una célula de mono, la cual, de preferencia, se selecciona a partir del grupo que consiste en una célula COS-1, una célula COS-7, y una célula Vero. La célula huésped es de preferencia una célula DHFR⁺(positiva), en particular una célula CHO DHFR⁺ (positiva)).

De acuerdo con una modalidad, el polinucleótido que codifica un producto de interés y el polinucleótido que codifica una enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR) se introdujeron mediante cuando menos un vector de expresión. Las técnicas adecuadas para introducir un vector respectivo se describen más adelante, e incluyen, por ejemplo, la transfección.

Un "vector de expresión" de acuerdo con la presente invención, es un polinucleótido capaz de portar cuando menos un fragmento de ácido nucleico extraño. Un vector funciona como un portador molecular, suministrando fragmentos de ácidos nucleicos, respectivamente, de polinucleótidos, a una célula huésped. Comprende cuando menos un casete de expresión, el cual comprende secuencias reguladoras para expresar apropiadamente un polinucleótido incorporado en el mismo. Los polinucleótidos (por ejemplo, que codifican el producto de interés o los marcadores seleccionables) se pueden insertar dentro del/de los casete(s) de expresión del vector de expresión, con el objeto de expresarse a partir de los mismos. El vector de expresión de acuerdo con la presente invención, puede estar presente en una forma circular o linealizada. El término "vector de expresión" también comprende cromosomas artificiales o polinucleótidos respectivos similares que permiten la transferencia de los fragmentos de ácidos nucleicos extraños.

- 5 El polinucleótido que codifica el producto de interés y el polinucleótido que codifica la enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR) se pueden localizar sobre el mismo o sobre diferentes vectores de expresión. El uso de un vector de expresión que lleve ambos polinucleótidos tiene la ventaja de que solamente se necesita introducir un vector de expresión en la célula huésped. Adicionalmente, en particular cuando se establece una línea de expresión estable, es más probable que los polinucleótidos se integren juntos en el genoma y, de conformidad con lo anterior, se expresen con un rendimiento similar. Sin embargo, también es posible, dentro del alcance de la presente invención, utilizar una combinación de cuando menos dos vectores de expresión para la transfección, en donde los polinucleótidos respectivos se localicen sobre diferentes vectores de expresión. Esta combinación de vectores de expresión se transfecta entonces en la célula huésped.
- 10 La célula huésped eucariótica puede comprender cuando menos un polinucleótido adicional introducido que codifica un producto de interés adicional. Esta modalidad es particularmente adecuada para expresar las moléculas de inmunoglobulina. De acuerdo con una modalidad preferida, la célula huésped comprende cuando menos dos polinucleótidos introducidos, cada uno codificando un producto de interés, en donde cuando menos un polinucleótido codifica la cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina, o un fragmento funcional de la misma, y el otro polinucleótido codifica la cadena ligera de una molécula de inmunoglobulina, o un fragmento funcional de la misma. Los polinucleótidos respectivos se pueden introducir utilizando un vector de expresión apropiado. Estos polinucleótidos que codifican la cadena pesada y la cadena ligera de una molécula de inmunoglobulina (o un fragmento funcional de la misma) se pueden localizar sobre los mismos o sobre diferentes vectores de expresión, en el caso de que se utilice una combinación de cuando menos dos vectores de expresión.
- 15 La célula huésped y, de conformidad con lo anterior, el vector de expresión para introducir polinucleótidos en la célula huésped, puede comprender adicionalmente uno o más polinucleótidos adicionales que codifiquen uno o más marcadores seleccionables adicionales. De conformidad con lo anterior, en una modalidad de la presente invención, la co-selección utilizando el sistema de la presente invención, junto con uno o más sistemas de selección diferentes (por ejemplo, los sistemas de selección resistentes a los antibióticos, tales como neo/G418), se pueden aplicar para mejorar adicionalmente el rendimiento. Además de los marcadores seleccionables eucarióticos adicionales, que permiten la selección de las células huésped eucarióticas, también se pueden utilizar los marcadores seleccionables procarióticos, que permiten la selección en las células huésped eucarióticas. Los ejemplos de los marcadores seleccionables procarióticos respectivos son los marcadores que proporcionan la resistencia a antibióticos, tales como, por ejemplo, ampicilina, canamicina, tetraciclina y/o cloranfenicol.
- 20 Los vectores utilizados para introducir los polinucleótidos en las células huésped usualmente contienen elementos de control de transcripción adecuados para impulsar la transcripción, tales como, por ejemplo, promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, señales de pausa o terminación de transcripción, como los elementos de un casete de expresión. Si el producto deseado es una proteína, de preferencia se incluyen elementos de control de traducción adecuados en el vector, y se enlazan operativamente a los polinucleótidos que se vayan a expresar, tales como, por ejemplo, las regiones no traducidas 5' que conducen a las estructuras de tapa 5' adecuadas para reclutar los ribosomas y los codones de paro para terminar el proceso de traducción. En particular, los polinucleótidos que sirven como los genes marcadores seleccionables, así como el polinucleótido que codifica el producto de interés, se pueden transcribir bajo el control de los elementos de transcripción presentes en los promotores apropiados. Las transcripciones resultantes de los genes marcadores seleccionables, y aquella del producto de interés, alojan elementos de traducción funcionales que facilitan niveles sustanciales de expresión de proteína (es decir, traducción), y la terminación de traducción apropiada. Una unidad de expresión funcional, capaz de impulsar apropiadamente la expresión de un polinucleótido incorporado, también es referida como un "casete de expresión" en la presente.
- 25 El vector de expresión o la combinación de vectores de expresión de acuerdo con la presente invención, que se utiliza para introducir los polinucleótidos en las células huésped eucarióticas, puede comprender cuando menos un elemento promotor y/o promotor/potenciador, como los elementos de un casete de expresión. Aunque los límites físicos entre estos dos elementos de control no siempre están claros, el término "promotor" usualmente se refiere a un sitio sobre la molécula de ácido nucleico con el que se enlaza una polimerasa de ARN y/o cualesquiera factores asociados, y con el que se inicia la transcripción. Los potenciadores potencian la actividad del promotor, tanto temporalmente como espacialmente. Muchos promotores son transcripcionalmente activos en un amplio rango de tipos de células. Los promotores se pueden dividir en dos clases, aquéllos que funcionan de una manera constitutiva, y aquéllos que son regulados por inducción o des-represión. Ambas clases son adecuadas para las enseñanzas de la presente invención. Los promotores utilizados para la producción de un alto nivel de polipéptidos en las células de mamífero deben ser fuertes y, de preferencia, deben ser activos en un amplio rango de tipos de células.
- 30 Los promotores constitutivos fuertes que impulsan la expresión en muchos tipos de células incluyen, pero no se limitan a, el promotor tardío principal de adenovirus, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano, el promotor de SV40 y del virus de sarcoma de Rous, y el promotor de cinasa de 3-fosfoglicerato de murino, EF1a. Se logran buenos resultados con el vector de expresión de la presente invención cuando el promotor y/o el potenciador se obtiene ya sea a partir de CMV y/o SV40. Los promotores de transcripción se pueden seleccionar a partir del
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

grupo que consiste en un promotor de SV40, un promotor de CMV, un promotor de EF1alfa, un promotor de RSV, un promotor de BROAD3, un promotor de Rosa 26 de murino, un promotor de pCEFL, y un promotor de β -actina.

De preferencia, el polinucleótido que codifica el producto de interés y el polinucleótido que codifica la enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR), están bajo el control de distintos promotores de transcripción. En general, será adecuado un promotor capaz de promover la expresión, en particular la transcripción, de los polinucleótidos esenciales en una célula huésped eucariótica. Los distintos promotores de transcripción que impulsan la expresión a partir de los polinucleótidos pueden ser iguales o diferentes.

De acuerdo con una modalidad, se utiliza un promotor y/o potenciador más fuerte para impulsar la expresión del polinucleótido que codifica el producto de interés, que para impulsar la expresión del polinucleótido que codifica la enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR) y/o los marcadores seleccionables adicionales, si están presentes. Esta configuración tiene el efecto de que se genera más transcrito para el producto de interés, que para los marcadores seleccionables. Es conveniente que la producción del producto de interés sea dominante sobre la producción de los marcadores seleccionables, debido a que la capacidad de la célula individual para producir productos heterólogos no está ilimitada y, por consiguiente, se debe enfocar en el producto de interés. Adicionalmente, el proceso de selección solamente se presenta en las etapas iniciales del establecimiento de una línea celular de expresión, la cual entonces produce constantemente el producto de interés. Por consiguiente, es conveniente enfocar los recursos de las células en la expresión/producción del producto de interés. Adicionalmente, la utilización de un promotor menos fuerte para expresar el/los marcador(es) seleccionable(s), en particular la reductasa de dihidrofolato (DHFR), aumenta adicionalmente la presión de selección y, por consiguiente, permite hacer uso de concentraciones más bajas de los inhibidores de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) en el medio de cultivo selectivo.

De acuerdo con una modalidad, el promotor que impulsa la expresión del polinucleótido que codifica el producto de interés es un promotor de CMV, y el promotor que impulsa la expresión del polinucleótido que codifica la enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR) es un promotor de SV40. El promotor de CMV se conoce como uno de los promotores más fuertes disponibles para la expresión en mamífero, y conduce a un índice de expresión muy bueno. Se considera que da significativamente más transcrito que el promotor de SV40.

De acuerdo con una modalidad adicional, el polinucleótido que codifica el producto de interés, y el polinucleótido que codifica la enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR), están bajo el control del mismo promotor de transcripción y, por consiguiente, se expresan a partir de un casete de expresión. Los promotores adecuados se describen anteriormente. En esta modalidad, se obtiene un transcrito largo a partir del casete de expresión respectivo que está bajo el control del promotor de transcripción. De acuerdo con una modalidad, cuando menos se localiza un elemento IRES funcionalmente entre el polinucleótido que codifica el producto de interés y/o el polinucleótido que codifica la enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR). De esta manera, se asegura que se obtengan productos de traducción separados a partir de dicho transcrito.

El casete de expresión puede comprender un sitio de terminación de transcripción apropiado. Esto, como una transcripción continua a partir de un promotor corriente arriba a través de una segunda unidad de transcripción, puede inhibir la función del promotor corriente abajo, un fenómeno conocido como la oclusión del promotor o la interferencia de la transcripción. Este suceso se ha descrito tanto en procariontes como en eucariotes. La colocación apropiada de las señales de terminación de transcripción entre dos unidades de transcripción puede prevenir la oclusión del promotor. Los sitios de terminación de transcripción están bien caracterizados y se ha mostrado que su incorporación en vectores de expresión tiene múltiples efectos benéficos sobre la expresión genética.

La célula huésped utilizada es una célula huésped eucariótica, en particular una célula huésped de mamífero. La mayoría de los ARNm nacientes eucarióticos poseen una cola de poli-A en su extremo 3' que se agrega durante un proceso complejo que involucra la disociación del transcrito primario, y una reacción de poliadenilación acoplada. La cola de poli-A es conveniente para la estabilidad y posibilidad de transferencia del ARNm. Por consiguiente, los casetes de expresión para expresar los polinucleótidos que codifican el producto de interés y la enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR), usualmente comprenden un sitio de poliadenilación adecuado para la terminación de la transcripción y la poliadenilación. Existen varias señales de poli-A eficientes que se pueden utilizar en los vectores de expresión de mamífero, incluyendo aquéllas derivadas a partir de la hormona de crecimiento bovina (bgh), la beta-globina de ratón, la unidad de transcripción temprana de SV40, y el gen de cinasa de timidina del virus de herpes simple. Sin embargo, también se conocen los sitios de poliadenilación sintéticos (véase, por ejemplo, el vector de expresión pCI-neo de Promega, el cual está basado en Levitt y colaboradores, 1989, Genes Dev. 3, (7): 1019-1025). El sitio de poliadenilación se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en el sitio SV40poliA, tal como el sitio poli-A tardío y temprano de SV40 (véase, por ejemplo, el plásmido pSV2-DHFR, como se describe en Subramani y colaboradores, 1981, Mol. Cell. Biol. 854-864), un sitio poli-A sintético (véase, por ejemplo, el vector de expresión pCI-neo de Promega, el cual está basado en Levitt y colaboradores, 1989, Genes Dev. 3, (7): 1019-1025), y un sitio poli-A de bgh (la hormona de crecimiento bovina).

Adicionalmente, un casete de expresión, el cual comprende el polinucleótido que codifica el producto de interés y el

polinucleótido que codifica la enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR), puede comprender cuando menos un intrón. Esta modalidad es particularmente adecuada cuando se utiliza una célula huésped de mamífero para la expresión. La mayoría de los genes a partir de los eucariontes superiores contienen intrones que se eliminan durante el procesamiento del ARN. Los constructos respectivos se expresan más eficientemente en los sistemas transgénicos que los constructos idénticos que carecen de intrones. Usualmente, los intrones se colocan en el extremo 5' del marco de lectura abierto, pero también se pueden colocar en el extremo 3'. De conformidad con lo anterior, un intrón puede estar comprendido en el/los casete(s) de expresión para aumentar el índice de expresión. Este intrón se puede localizar entre el/los elemento(s) promotor(es) y/o potenciador(es) y el extremo 5' del marco de lectura abierto del polinucleótido que se vaya a expresar. En el estado de la técnica, se conocen varios intrones adecuados que se pueden utilizar en conjunto con la presente invención.

De acuerdo con una modalidad, el intrón utilizado en los casetes de expresión para expresar el producto de interés, es un intrón sintético, tal como el intrón SIS o el intrón RK. El intrón RK es un intrón sintético fuerte, el cual de preferencia se coloca antes del codón de inicio ATG del gen de interés. El intrón RK consiste en el sitio de empalme del donador de intrón del promotor de CMV y el sitio de empalme del aceptor de la región variable de cadena pesada de IgG de ratón (véase, por ejemplo, Eaton y colaboradores, 1986, *Biochemistry* 25, 8343-8347, Neuberger y colaboradores, 1983, *EMBO J.* 2(8), 1373-1378; éste se puede obtener a partir del vector pRK-5 (BD Pharmingen)).

Un vector de expresión, el cual comprende los polinucleótidos y/o casetes de expresión como se describen anteriormente, se puede transfectar en la célula huésped en su forma circular. Las moléculas de vector súper-enrolladas usualmente se convertirán en moléculas lineales dentro del núcleo, debido a la actividad de las endo- y exo-nucleasas. Sin embargo, la linearización del vector de expresión antes de la transfección con frecuencia mejora la eficiencia de una transfección estable. Esto también se puede controlar como el punto de la linearización si el vector de expresión se lineariza antes de la transfección. Por consiguiente, de acuerdo con una modalidad de la presente invención, el vector de expresión o la combinación de cuando menos dos vectores de expresión, comprende cuando menos un sitio de restricción previamente definido, el cual se puede utilizar para la linearización del/de los vector(es) antes de la transfección. De acuerdo con una modalidad, el sitio de la linearización se configura de tal manera que, después de la linearización, el polinucleótido que codifica la enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR) se localiza en 5' del polinucleótido que codifica el producto de interés. Esta configuración es conveniente para la amplificación genética. En el caso de que se utilice adicionalmente un marcador seleccionable procariótico, el polinucleótido que codifica este marcador procariótico se localiza en 3' del polinucleótido que codifica el producto de interés. Esto tiene el efecto de que el gen marcador de selección procariótico es 3' y, por consiguiente, "está afuera" de las partes del ácido nucleico del vector linearizado del "mamífero". Esta configuración es favorable debido a que presumiblemente los genes procarióticos no son convenientes para la expresión en mamífero, debido a que las secuencias procarióticas pueden conducir a un aumento en la metilación, o a otros efectos de silenciamiento en las células de mamífero.

El polinucleótido que codifica un producto de interés y el polinucleótido que codifica la enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR), de preferencia se introducen establemente en la célula huésped. La introducción estable, respectivamente, la transfección, es conveniente para el establecimiento de las líneas celulares de expresión, y en particular para la producción a gran escala y, de conformidad con lo anterior, industrial del producto de interés.

Existen varios métodos apropiados conocidos en la técnica anterior para introducir polinucleótidos y vectores de expresión en las células huésped eucarióticas, incluyendo las células huésped de mamífero. Los métodos respectivos incluyen, pero no se limitan a, transfección con fosfato de calcio, electroporación, lipofección, transferencia de genes mediada por biolística y por polímeros. Además de los métodos basados en la integración aleatoria tradicionales, también se pueden utilizar los planteamientos mediados por recombinación para transferir el polinucleótido que codifica el producto de interés, y los polinucleótidos que codifiquen una enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR) en el genoma de la célula huésped. Estos métodos de recombinación pueden incluir el uso de recombinasas específicas del sitio como Cre, Flp o Φ C31 (véase, por ejemplo, Oumard y colaboradores, *Cytotechnology* (2006) 50: 93 - 108), las cuales pueden mediar la inserción dirigida de los transgenes. De una manera alternativa, se podría utilizar el mecanismo de recombinación homóloga para insertar estos polinucleótidos (revisado en Sorrell y colaboradores, *Biotechnology Advances* 23 (2005) 431 - 469). La inserción de los genes basada en la recombinación permite minimizar el número de elementos que se deban incluir en el ácido nucleico heterólogo que se transfiera/introduce en la célula huésped. Por ejemplo, se podría utilizar un *locus* de inserción que ya proporcione el promotor y el sitio poli-A (exógeno o endógeno), de tal manera que solamente se necesite transferir/transfectar los elementos restantes (por ejemplo, el polinucleótido que codifica el producto de interés y el polinucleótido que codifica la enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR)) a la célula huésped. Las modalidades de un vector de expresión adecuado o de la combinación de vectores de expresión de acuerdo con la presente invención, así como de las células huésped adecuadas, se describen con detalle anteriormente; nos referimos a la divulgación anterior.

En el caso de que se utilice un marcador seleccionable adicional en adición a la enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR), las condiciones selectivas para ese marcador seleccionable se pueden aplicar antes de que se apliquen las condiciones selectivas para la enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR). Por ejemplo, en el caso de

que se utilice el gen de fosfotransferasa de neomicina (neo) como marcador seleccionable adicional, las células se pueden cultivar primero en un medio, por ejemplo, que contenga G418, con el objeto de seleccionar las células que hayan incorporado los vectores de expresión de acuerdo con la presente invención.

5 La estrategia de la presente invención de utilizar una concentración limitante de folato en el medio de cultivo selectivo en adición a un marcador seleccionable de reductasa de dihidrofolato (DHFR), tiene la ventaja de que se obtiene una muy alta rigurosidad, inclusive cuando se utilicen concentraciones más bajas del inhibidor de la reductasa de dihidrofolato (DHFR). La productividad de la población celular que sobreviva a estas condiciones de selección novedosas, se incrementa notoriamente. Los ejemplos han demostrado que las células huésped obtenidas después del método de selección producen el producto de interés, con un alto rendimiento. También se incrementa la productividad promedio de las células huésped individuales. Por consiguiente, aumentan las oportunidades de encontrar los clones de alta producción con esfuerzos de rastreo más bajos. Por consiguiente, el sistema de selección de acuerdo con la presente invención es superior a los sistemas de selección utilizados en la técnica anterior. En particular, se obtienen células huésped que tienen una productividad más alta, comparándose con el uso de los marcadores seleccionables respectivos solos. Por consiguiente, debido a la rigurosidad más alta de las condiciones de selección, se optimiza el procedimiento de selección.

15 Las células obtenidas como un resultado del procedimiento de rastreo/selección restringente de la presente invención, en general se aislarán y se pueden enriquecer a partir de las células no seleccionadas de la población de células original. Se pueden aislar y cultivar como células individuales. También se pueden utilizar en una o más rondas de selección adicionales, opcionalmente para el análisis cualitativo o cuantitativo adicional, o se pueden utilizar, por ejemplo, en el desarrollo de una línea celular para la producción de proteínas. De acuerdo con una modalidad, se utiliza directamente una población enriquecida de células huésped productoras seleccionadas, como se describe anteriormente, como la población para la producción del polipéptido de interés, con un buen rendimiento. De preferencia, se selecciona una célula huésped que exprese establemente el producto de interés. Anteriormente se describen con detalle las ventajas de una transfección/expresión estable. Nos referimos a la divulgación anterior.

20 También se proporciona un método para producir un producto de interés, el cual comprende cuando menos los siguientes pasos:

(a) llevar a cabo el método de selección de acuerdo con la presente invención para seleccionar cuando menos una célula huésped eucariótica que exprese el producto de interés; y

30 (b) cultivar cuando menos una célula huésped eucariótica seleccionada bajo condiciones que permitan la expresión del producto de interés.

Debido a que el método de selección de acuerdo con la presente invención permite hacer la identificación de los clones de células de alta producción, este sistema de selección es una parte importante e integral del proceso de producción. El producto de interés expresado se puede obtener mediante la alteración de las células huésped. Los polipéptidos también se pueden expresar, por ejemplo, se pueden secretar, en el medio de cultivo, y se pueden obtener a partir del mismo. También son posibles las combinaciones de los métodos respectivos. De acuerdo con una modalidad, las células huésped se cultivan bajo condiciones sin suero.

40 De esta manera, se pueden producir productos, en particular polipéptidos, y se pueden obtener/aislar de una manera eficiente y con un alto rendimiento. El producto obtenido también se puede someter a pasos de procesamiento adicionales, tales como, por ejemplo, los pasos de purificación y/o modificación. De conformidad con lo anterior, el método para producir el producto de interés puede comprender cuando menos uno de los siguientes pasos:

- aislar el producto de interés a partir del medio de cultivo celular y/o a partir de la célula huésped; y/o

- procesar el producto de interés aislado.

45 El producto de interés, por ejemplo, un polipéptido, producido de acuerdo con la invención, se puede recuperar y opcionalmente se puede procesar adicionalmente, por ejemplo, se puede purificar, aislar y/o modificar adicionalmente, mediante los métodos conocidos en este campo. Por ejemplo, el producto se puede recuperar a partir del medio nutriente mediante los procedimientos convencionales, incluyendo, pero no limitándose a, centrifugación, filtración, ultra-filtración, extracción o precipitación. La purificación se puede llevar a cabo mediante una variedad de procedimientos conocidos en la materia, incluyendo, pero no limitándose a, cromatografía (por ejemplo, de intercambio de iones, de afinidad, hidrofóbica, de cromatoenfoco, y por exclusión de tamaños), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, enfoque isoelectrónico de preparación), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio) o extracción.

50 El producto de interés puede ser cualquier producto biológico que pueda ser producido mediante la transcripción, traducción o cualquier otro suceso de la expresión de la información genética codificada por ese polinucleótido. En

este aspecto, el producto será un producto de expresión. El producto de interés se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en polipéptidos, ácidos nucleicos, en particular ARN o ADN. El producto puede ser un compuesto farmacéuticamente o terapéuticamente activo, o una herramienta de investigación para utilizarse en los ensayos, y similares. En una modalidad particularmente preferida, el producto es un polipéptido, de preferencia un polipéptido farmacéutica o terapéuticamente activo, o una herramienta de investigación para utilizarse en los ensayos de diagnóstico o en otros ensayos, y similares. Un polipéptido, de conformidad con lo anterior, no está limitado a cualquier proteína o grupo de proteínas particular, 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 la presente. De conformidad con lo anterior, se pueden expresar/producir varios polipéptidos de interés diferentes. Como se ilustra anteriormente, 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, fosfatasa), proteínas o péptidos receptores, proteínas o péptidos transportadores, proteínas bactericidas y/o de enlace de endotoxina, proteínas o péptidos estructurales, polipéptidos inmunitarios, toxinas, antibióticos, hormonas, factores de crecimiento, vacunas, o similares. El polipéptido se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en hormonas peptídicas, interleucinas, activadores de plasminógeno de tejido, citoquinas, inmunoglobulinas, en particular anticuerpos o fragmentos funcionales de anticuerpos, o variantes de los mismos. En una modalidad muy preferida, el polipéptido es una molécula o anticuerpo de inmunoglobulina, o una variante funcional del mismo, por ejemplo, un anticuerpo quimérico, o parcial o totalmente humanizado. Este anticuerpo puede ser un anticuerpo de diagnóstico, o un anticuerpo farmacéutica o terapéuticamente activo.

También se proporciona un producto obtenido mediante un método de acuerdo con la presente invención, como se define anteriormente y en las reivindicaciones. Este producto es de preferencia un polipéptido, en particular una molécula de inmunoglobulina, o un fragmento funcional de la misma.

De acuerdo con una modalidad, la presente invención también proporciona un medio de cultivo selectivo, el cual comprende folato en una concentración limitante, y cuando menos un inhibidor de reductasa de dihidrofolato (DHFR) para su uso en el método de selección de la presente invención. De preferencia, el medio de cultivo selectivo tiene una o más de las siguientes características:

(a) comprende folato, de preferencia ácido fólico, en una concentración seleccionada a partir de:

- (aa) 500 nM o menos;
- (bb) 250 nM o menos;
- (cc) 150 nM o menos;
- (dd) 100 nM o menos;
- (ee) 75 nM o menos;
- (ff) 50 nM o menos;
- (gg) 25 nM o menos, y/o
- (hh) 15 nM o menos;

y/o

(b) comprende folato, de preferencia ácido fólico, en un intervalo de concentración seleccionado a partir de:

- (aa) de 0,1 nM a 500 nM;
- (bb) de 0,1 nM a 250 nM, de preferencia de 2,5 nM a 250 nM ó de 5 ó 10 nM a 250 nM;
- (cc) de 0,1nM a 150 nM, de preferencia de 2,5 nM a 150 nM ó de 5 ó 10 nM a 150 nM;
- (dd) de 1 nM a 100 nM; de preferencia de 2,5 nM a 100 nM ó de 5 ó 10 nM a 100 nM;
- (ee) de 1 nM a 75 nM; de preferencia de 2,5 nM a 75 nM ó de 5 ó 10 nM a 75 nM;
- (ff) de 1 nM a 50 nM;

(gg) de 2,5 nM a 50 nM; y/o

(hh) de 12,5 nM a 50 nM

y/o

5 (c) comprende el inhibidor de la reductasa de dihidrofolato (DHFR), el cual es de preferencia un anti-folato, en una concentración seleccionada a partir de:

(aa) 500 nM o menos;

(bb) 400 nM o menos;

(cc) 300 nM o menos;

(dd) 250 nM o menos;

10 (ee) 200 nM o menos;

(ff) 150 nM o menos; y/o

(gg) 100 nM o menos;

y/o

15 (d) comprende el inhibidor de la reductasa de dihidrofolato (DHFR), el cual es de preferencia un anti-folato, y más preferiblemente MTX, en una concentración seleccionada a partir de:

(aa) de 1 nM a 500 nM;

(bb) de 10 nM a 200 nM;

(cc) de 10 nM a 150 nM; y/o

(dd) de 10 nM a 100 nM.

20 Las concentraciones indicadas y los intervalos de concentración para el folato y el inhibidor de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) se pueden combinar entre sí. Las ventajas y otras modalidades preferidas de intervalos de concentración, y las modalidades adecuadas para los folatos y anti-folatos en el medio de cultivo selectivo, se ilustraron con detalle anteriormente en conjunto con el método de selección de acuerdo con la presente invención; se hace referencia a la divulgación anterior. El medio de cultivo selectivo se puede utilizar en conjunto con el sistema de selección de la presente invención.

25

El contenido completo de los textos y documentos como se mencionan en la presente, se incorporan a la presente como referencia y, por consiguiente, forman parte de la presente divulgación.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención sin limitar de ninguna manera el alcance de la misma. En particular, los ejemplos se relacionan con las modalidades preferidas de la presente invención.

30 Ejemplos

En general, los materiales adecuados, tales como los reactivos, son familiares para la persona experta, están comercialmente disponibles, y se pueden utilizar de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los experimentos se llevan a cabo de acuerdo con las instrucciones descritas.

35 Se hace un experimento de transfección en células CHO utilizando un vector de expresión que contiene casetes de expresión para expresar un anticuerpo monoclonal como el producto de interés. Como los marcadores seleccionables, están presentes un gen de resistencia al G418 (NEO) y un gen de reductasa de dihidrofolato (DHFR) sobre el vector de expresión, en casetes de expresión separados. Este experimento demuestra que la selección con cantidades reducidas de MTX bajo condiciones reducidas de ácido fólico, proporciona poblaciones de células de alta producción. Como referencia, se utilizan condiciones de selección para la reductasa de dihidrofolato (DHFR)

40 convencionales, las cuales utilizan concentraciones más altas de MTX y ácido fólico en cantidades no limitantes.

Ejemplo I - Reductasa de dihidrofolato (DHFR) y concentraciones limitantes de ácido fólico

1.1. El vector de expresión

El vector de expresión es un vector de expresión de mamífero, el cual comprende los siguientes elementos decisivos, los cuales se arreglan en la misma orientación sobre el vector de expresión:

5

Promotor/potenciador de CMV
Intrón
Polinucleótido que codifica la cadena ligera del anticuerpo
Sitio de clonación múltiple
Sitio Poli A de SV40
Promotor/potenciador de CMV
Intrón
Polinucleótido que codifica la cadena pesada del anticuerpo
Sitio de clonación múltiple
Sitio Poli A de SV40
Potenciador/promotor de SV40
Fosfotransferasa de neomicina (neo)
Sitio Poli A (sintético)
Gen de resistencia a la ampicilina
Promotor SV40
Gen mutante de reductasa de dihidrofolato (DHFR) que es menos sensible a MTX que la reductasa de dihidrofolato (DHFR) de tipo silvestre
Intrón
Sitio Poli A

1.2. Transfección y selección de células CHO

El cultivo, la transfección, y el rastreo de las células se llevan a cabo en matraces de agitación utilizando una suspensión de células CHO en crecimiento en un medio de cultivo apropiado para las células CHO sin FCS. Las células se transfectaron con el vector de expresión mediante electroporación. Con el objeto de reducir los depósitos intracelulares de ácido fólico en las células huésped, y para prevenir la co-transferencia de ácido fólico desde el medio de cultivo previo hasta el medio de selección, las células se pasan al medio sin ácido fólico o al medio con un contenido reducido de ácido fólico (por ejemplo, 50 nM) antes de la transfección y de la selección. Dependiendo de la viabilidad celular, se inicia un primer paso de selección de 24 a 48 horas después de la transfección mediante la adición del medio de cultivo selectivo que contiene G418 y MTX, a las células. En un primer paso de selección, se prueban tres diferentes concentraciones de MTX (2,5, 5 y 10 nM), y de ácido fólico (12,5, 25 y 50 nM). Como referencia, se utiliza un medio de cultivo que comprende cantidades no limitantes de ácido fólico, en la presente,

10

15

11,3 µM - que corresponde a una concentración estándar en el medio de cultivo).

5 Tan pronto como las células se recuperan hasta una viabilidad de más del 80 por ciento, se aplica un segundo paso de selección pasando las células al medio sin G418 que contiene la misma cantidad de ácido fólico que en el primer paso de selección, pero 10 veces más MTX (es decir, 25, 50 y 100 nM). En el caso de las condiciones de cultivo de referencia, se agrega MTX 500 nM a las células.

1.3. Determinación de la productividad de la reserva

10 Se analiza la productividad de las poblaciones de células seleccionadas después de los pasos primero y último de selección por medio de cultivos por lotes en matraces de agitación con sobre-crecimiento en un medio que contiene cantidades no limitantes de ácido fólico (11,3 µM) sin G418, pero que contiene MTX en la misma concentración que en el medio de selección respectivo.

15 Los cultivos por lotes se siembran en un matraz de agitación que tiene una capacidad de 250 mililitros con un volumen de procesamiento de 50 mililitros, y se cultivan en un gabinete de agitación (no humidificado) a 150 revoluciones por minuto y con CO₂ al 10 por ciento. La viabilidad de las células tiene que ser >90 por ciento cuando se inicia el ensayo. La densidad celular de la siembra es usualmente de aproximadamente 2 x 10⁵ células/mililitro. La determinación de la titulación tiene lugar en el día 13. Las titulaciones de anticuerpos en el sobrenadante del cultivo celular se determinan mediante HPLC de proteína-A, 13 días después del inicio del cultivo.

1.4. Resultados

20 Para evaluar la rigurosidad de la selección de reductasa de dihidrofolato (DHFR)/MTX bajo concentraciones limitantes de ácido fólico, en este ejemplo I se hace la transfección de un vector expresión de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) para expresar un anticuerpo monoclonal. El vector también contiene un gen de resistencia al G418 (véase anteriormente). Primero, se seleccionan las poblaciones de células transfectadas mediante la adición de G418 y diferentes concentraciones de MTX en diferentes concentraciones de ácido fólico. Este primer paso de selección inicial debe ayudar a aniquilar las células no transfectadas y, en paralelo, fuerzan a las células para consumir los depósitos intracelulares de ácido fólico antes de que se aplique una rigurosidad más alta en el segundo paso de selección. Bajo estas condiciones, usualmente se recuperan todas las poblaciones de células transfectadas, y se evalúa la productividad como se describe anteriormente.

La Tabla 1 resume los resultados de productividad obtenidos:

Tabla 1

Medio de selección	Productividad mAb (mg/L)
I. Serie de prueba sin MTX y bajas concentraciones de ácido fólico (FA) (12,5 nM, 25 nM y 50 nM)	
+ 0,8 g/L de G418 + FA 12,5 nM + Sin MTX	16
+ 0,8 g/L de G418 + FA 25 nM + Sin MTX	12
+ 0,8 g/L de G418 + FA 50 nM + Sin MTX	17

ES 2 440 321 T3

II. Serie de prueba con una baja concentración de MTX (2,5 nM), y bajas concentraciones de ácido fólico (FA) (12,5 nM, 25 nM y 50 nM)	
+ 0,8 g/L de G418 + FA 12,5 nM + MTX 2,5 nM	12
+ 0,8 g/L de G418 + FA 25 nM + MTX 2,5 nM	17
+ 0,8 g/L de G418 + FA 50 nM + MTX 2,5 nM	11
III. Serie de prueba con una baja concentración de MTX (5 nM) y bajas concentraciones de ácido fólico (FA) (12,5 nM, 25 nM y 50 nM)	
+ 0,8 g/L de G418 + FA 12,5 nM + MTX 5 nM	12
+ 0,8 g/L de G418 + FA 25 nM + MTX 5 nM	33
+ 0,8 g/L de G418 + FA 50 nM + MTX 5 nM	16
IV. Serie de prueba con una baja concentración de MTX (10 nM), y bajas concentraciones de ácido fólico (FA) (12,5 nM, 25 nM y 50 nM)	
+ 0,8 g/L de G418 + FA 12,5 nM + MTX 10 nM	205

(continuación)

+ 0,8 g/L de G418 + FA 25 nM + MTX 10 nM	30
+ 0,8 g/L de G418 + FA 50 nM + MTX 10 nM	23
V. Serie de prueba con concentraciones no limitantes de ácido fólico (FA) (11,3 µM), y diferentes concentraciones de MTX (0; 2; 2,5; 5 y 10 nM)	
+ 0,8 g/L de G418 + FA 11,3 µM + Sin MTX	16
+ 0,8 g/L de G418 + FA 11,3 µM + MTX 2,5 nM	11
+ 0,8 g/L de G418 + FA 11,3 µM + MTX 5 nM	16
+ 0,8 g/L de G418 + FA 11,3 µM + MTX 10 nM	11
<i>Tab. 1: Productividad de las poblaciones de células tras el primer paso de selección</i>	

5 Se analizan las células transfectadas seleccionadas en el medio que contiene G418 y MTX, con diferentes concentraciones de ácido fólico, en los cultivos por lotes del matraz de agitación. En el día 13 del cultivo, se toman muestras del medio de cultivo, y se analizan para determinar el contenido de anticuerpos mediante HPLC de proteína-A.

10 Los resultados muestran que todas las poblaciones de células producen anticuerpos. La adición de menos de MTX 10 nM no muestra mucho efecto sobre las células, incluso en bajas concentraciones de ácido fólico. La concentración del anticuerpo producido es comparable con la selección en ausencia de MTX. Sin embargo, cuando se utiliza MTX 10 nM en el primer paso de selección, la productividad de las células en bajas concentraciones de ácido fólico aumenta significativamente y de una manera dependiente de la concentración. Después de la selección con la concentración más baja de ácido fólico (12,5 nM) y MTX 10 nM, se encuentra que la productividad de las células es más de 10 veces más alta, comparándose con el medio con la concentración convencional de ácido fólico.

15 Para incrementar adicionalmente la rigurosidad de la selección, el siguiente paso es eliminar el G418, pero aumentar la concentración de MTX en el medio de cultivo por un factor de 10, mientras que se mantiene la concentración de

ES 2 440 321 T3

ácido fólico utilizado en el primer paso de selección. En el caso de la referencia, MTX, se agrega en una alta concentración, como es común en la técnica anterior, en la presente en 500 nM. Bajo estas condiciones, cae dramáticamente la viabilidad de las células de muchas poblaciones transfectadas, y se queda en bajos niveles, de tal manera que no todas ellas se pueden recuperar. Las poblaciones de células que se podrían recuperar, se expanden adicionalmente, y se analiza la productividad (Tabla 2).

5

Medio de selección	Productividad mAb (mg/L)
Serie de prueba con MTX 10 nM y bajas concentraciones de ácido fólico (FA) (12,5 nM, 25 nM y 50 nM)	
+ Sin G418 + FA 12,5 nM + MTX 10 nM	No hay recuperación
+ Sin G418 + FA 25 nM + MTX 10 nM	19
+ Sin G418 + FA 50 nM + MTX 10 nM	15
Serie de prueba con MTX 25 nM y bajas concentraciones de ácido fólico (FA) (12,5 nM, 25 nM y 50 nM)	
+ Sin G418 + FA 12,5 nM + MTX 25 nM	No hay recuperación
+ Sin G418 + FA 25 nM + MTX 25 nM	No hay recuperación
+ Sin G418 + FA 50 nM + MTX 25 nM	20
Serie de prueba con MTX 50 mM y bajas concentraciones de ácido fólico (FA) (12,5 nM, 25 nM y 50 nM)	

ES 2 440 321 T3

(continuación)

+ Sin G418 + FA 12,5 nM + MTX 50 nM	No hay recuperación
+ Sin G418 + FA 25 nM + MTX 50 mM	No hay recuperación
+ Sin G418 + FA 50 nM + MTX 50 mM	20
Serie de prueba con MTX 100 nM y bajas concentraciones de ácido fólico (FA) (12,5 nM, 25 nM y 50 nM)	
+ Sin G418 + FA 12,5 nM + MTX 100 nM	277
+ Sin G418 + FA 25 nM + MTX 100 nM	131
+ Sin G418 + FA 50 nM + MTX 100 nM	15
Serie de prueba con una concentración no limitante de ácido fólico (FA) (11,3 μ M), y una concentración de MTX de 500 nM	
+ Sin G418 + FA 11,3 μ M + MTX 500 nM	31

(continuación)

+ Sin G418 + FA 11,3 µM + MTX 500 nM	26
+ Sin G418 + FA 11,3 µM + MTX 500 nM	21
+ Sin G418 + FA 11,3 µM + MTX 500 nM	25
<i>Tab.2: Productividad de las poblaciones de células después del segundo paso de selección</i>	

5 Las poblaciones de células seleccionadas con G418 y MTX se seleccionan adicionalmente mediante el incremento de la concentración de MTX. Las poblaciones recuperadas se analizan en los cultivos por lotes del matraz de agitación. En el día 13 del cultivo, se toman muestras del medio de cultivo, y se analizan para determinar el contenido de anticuerpos mediante HPLC de proteína-A.

10 La productividad de las poblaciones de células de referencia (MTX 500 nM, FA 11,3 µM) después de este paso de selección se incrementan hasta aproximadamente de 25 a 30 miligramos/litro. No se ve beneficio alguno en concentraciones de MTX por debajo de 100 nM. Sin embargo, cuando se utiliza MTX 100 nM en combinación con un bajo contenido de ácido fólico (12,5 ó 25 nM), las productividades son de hasta 277 miligramos/litro y, por consiguiente, 10 veces más altas que la referencia, incluso cuando se utilicen bajas concentraciones de MTX para la amplificación/selección.

15 Por consiguiente, mediante la utilización de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) como marcador seleccionable en combinación con una concentración limitante de ácido fólico en el medio selectivo, se generan células que sobre-expresan altamente una proteína de interés, incluso con bajas concentraciones del inhibidor de la reductasa de dihidrofolato (DHFR). Los resultados también muestran que esta combinación es superior a los sistemas de selección convencionales (por ejemplo, DHFR/G418, utilizando la concentración convencional de ácido fólico en el medio selectivo).

20 **Ejemplo II - Producción a gran escala de polipéptidos con las células CHO transfectadas**

25 Se puede hacer la producción de polipéptidos a gran escala, por ejemplo, en bio-reactores de microondas, de vidrio, o de acero inoxidable. Para este propósito, las células se expanden, usualmente empezando a partir de un solo frasco congelado, por ejemplo, un frasco de un Banco de Células Maestras. Las células se descongelan y se expanden a través de varios pasos. Los bio-reactores a diferentes escalas se inoculan con las cantidades apropiadas de las células. La densidad celular se puede incrementar mediante la adición de soluciones de alimentación y aditivos al bio-reactor. Las células se mantienen a una alta viabilidad durante un tiempo prolongado. Se alcanzan concentraciones del producto en el reactor en el intervalo desde unos cuantos cientos de miligramos por litro hasta varios gramos por litro a gran escala. La purificación se puede hacer mediante la metodología de cromatografía convencional, la cual puede incluir los pasos de cromatografía por afinidad, de intercambio de iones, de interacción hidrofóbica, o por exclusión de tamaños. El tamaño del bio-reactor puede ser de un volumen de hasta 30 varios miles de litros en la escala final (véase también, por ejemplo, F. Wurm, Nature Biotechnology, Volumen 22, 11, 2004, 1393-1398).

REIVINDICACIONES

1. Un método para seleccionar cuando menos una célula huésped eucariótica que exprese un producto de interés, el cual comprende cuando menos los siguientes pasos:
 - 5 (a) proporcionar una pluralidad de células huésped eucarióticas transfectadas, en donde la viabilidad celular de las células huésped depende de la absorción de folato, en donde estas células huésped eucarióticas comprenden cuando menos:
 - (i) un polinucleótido introducido que codifica un producto de interés, y
 - (ii) un polinucleótido introducido que codifica una enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR);
 - 10 (b) cultivar la pluralidad de células huésped eucarióticas en un medio de cultivo selectivo, el cual comprende cuando menos un inhibidor de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) y folato en una concentración limitante;
 - (c) seleccionar cuando menos una célula huésped eucariótica que exprese el producto de interés.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el medio de cultivo selectivo comprende el inhibidor de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) en una concentración de 500 nM o menos, y un folato en una concentración de 500 nM o menos.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde el medio de cultivo selectivo comprende el inhibidor de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) en una concentración de 200 nM o menos, y/o comprende un folato en una concentración de 2,5 nM a 100 nM.
- 20 4. El método de acuerdo con cuando menos una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el medio de cultivo selectivo comprende ácido fólico como folato en una concentración de 12,5 nM a 50 nM, combinado con MTX como inhibidor de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) en una concentración de 10 nM a 100 nM.
- 25 5. El método de acuerdo con cuando menos una de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR) es una enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR) que tiene una sensibilidad más baja a un inhibidor de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) que la enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR) endógenamente expresada por la célula huésped.
6. El método de acuerdo con cuando menos una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la célula huésped eucariota mencionada es una célula huésped CHO, de preferencia una célula DHFR⁺ (positiva).
- 30 7. El método de acuerdo con cuando menos una de las reivindicaciones 1 a 6, en donde se utiliza una célula huésped DHFR⁺ (positiva), en conjunto con una enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR) introducida que es menos sensible al MTX que la enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR) endógenamente expresada por la célula huésped.
- 35 8. El método de acuerdo con cuando menos una de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el polinucleótido que codifica un producto de interés y el polinucleótido que codifica una enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR) se han introducido mediante cuando menos un vector de expresión.
9. El método de acuerdo con cuando menos una de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la célula huésped comprende cuando menos dos polinucleótidos introducidos que codifican un producto de interés, en donde de preferencia cuando menos un polinucleótido codifica la cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina, y el otro polinucleótido codifica la cadena ligera de una molécula de inmunoglobulina.
- 40 10. El método de acuerdo con cuando menos una de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el/los polinucleótido(s) introducido(s) que codifica(n) el producto de interés, y el polinucleótido introducido que codifica la enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR), están comprendidos en casetes de expresión diferentes, y en donde el/los casete(s) de expresión para impulsar la expresión del/de los polinucleótido(s) que codifica(n) el producto de interés comprende(n) un promotor y/o potenciador más fuerte que el casete de expresión para impulsar la expresión del polinucleótido que codifica la enzima de reductasa de dihidrofolato (DHFR).
- 45 11. Un método para producir un producto de interés, el cual comprende cuando menos los siguientes pasos:

(a) llevar a cabo el método de selección de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para seleccionar cuando menos una célula huésped eucariótica que exprese el producto de interés; y

(b) cultivar cuando menos una célula huésped eucariótica seleccionada bajo condiciones que permitan la expresión del producto de interés.

5 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, el cual comprende cuando menos uno de los siguientes pasos:

(c) aislar el producto de interés a partir de dicho medio de cultivo celular y/o a partir de dicha célula huésped eucariótica; y/o

(d) procesar adicionalmente el producto de interés aislado.

10 13. El método de acuerdo con la reivindicación 11 ó 12, en donde el producto de interés es una molécula de inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma.

14. Uso de un medio de cultivo selectivo, el cual comprende un inhibidor de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) en una concentración de 500 nM o menos y un folato en una concentración limitante de 500 nM o menos en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

15 15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el medio de cultivo selectivo tiene una o más de las siguientes características

(a) el medio de cultivo selectivo comprende folato en una concentración limitante de 2,5 nM a 100 nM, y/o el inhibidor de la reductasa de dihidrofolato (DHFR) en una concentración de 200 nM o menos; y/o

20 (b) el medio de cultivo selectivo comprende ácido fólico en una concentración de 12,5 nM a 50 nM, combinado con una concentración de MTX de 10 nM a 100 nM.