

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 086**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/16 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2008 E 08865304 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 2227549**

54 Título: **Sistema de selección en un cultivo de células eucariotas basado en un gen receptor de folato unido a la membrana**

30 Prioridad:

21.12.2007 EP 07150326

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

18.09.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ASSARAF, YEHUDA G.;
JOSTOCK, THOMAS y
KNOPF, HANS-PETER**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 546 086 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

Sistema de selección en un cultivo de células eucariotas basado en un gen receptor de folato unido a la membrana

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un nuevo sistema de selección para su uso en un proceso de cultivo de células eucariotas y para la expresión de un producto recombinante de interés. El sistema de selección se basa en la introducción de un gen receptor funcional de folato unido a la membrana exógeno junto con el polinucleótido o gen
10 que codifica el producto de interés en células eucariotas y se puede utilizar ampliamente con células eucariotas para las que la viabilidad celular depende de la captación de ácido fólico.

Antecedente de la invención

15 Los marcadores de selección y los sistemas de selección se usan ampliamente en modificación genética, tecnología de ADN recombinante y producción de productos recombinantes, por ejemplo anticuerpos, hormonas y ácidos nucleicos, en cultivos celulares eucariotas. El objetivo principal de tales marcadores de selección y sistemas de selección dominantes es introducir un gen indicador que con la exposición a condiciones de cultivo selectivas proporciona células capaces de producir altos niveles de los productos recombinantes de interés.

20 Hasta la fecha, hay disponibles 3 sistemas principales de selección por marcador:

(a) El sistema glutamina sintasa: La enzima glutamina sintasa (GS) es responsable de la biosíntesis de glutamina a partir de glutamato y amoniaco. Esta reacción biosintética proporciona la única ruta para la formación de glutamina en células de mamífero. Por lo tanto, en ausencia de glutamina en el medio de cultivo, la enzima GS es esencial para la supervivencia de células de mamífero en cultivo. De manera importante, ciertas líneas celulares de mamífero que incluyen las células de mieloma de ratón carecen de la expresión de GS suficiente y por lo tanto no pueden sobrevivir sin glutamina añadida de manera exógena. Por lo tanto, tal línea celular es un receptor adecuado para un gen GS transfectado que en este sistema puede funcionar como un marcador
25 indicador que permite a la células crecer en un medio que carece de glutamina. Por el contrario, las líneas celulares tal como las de células de ovario de hámster chino (CHO), que se utilizan ampliamente, expresan suficiente GS para mantener el crecimiento en un medio libre de glutamina. Por lo tanto, en estas células CHO que se van a utilizar como células receptoras del gen GS, se puede aplicar la sulfoximina metionina (MSX) un potente inhibidor específico de GS con el fin de inhibir la actividad de la GS endógena tal que solo puedan sobrevivir los transfectantes que expresan altos niveles del gen GS transfectado en un medio libre de glutamina. Una desventaja principal del sistema GS es el tiempo relativamente largo (es decir, 2-6 meses) de crecimiento selectivo con el fin de establecer células que sobre-expresen de manera estable el gen diana de interés. Otra desventaja es la utilización frecuente del agente citotóxico MSX para aumentar la presión selectiva. La presencia de tal agente citotóxico junto con el producto recombinante de interés (por ejemplo, un polipéptido como un anticuerpo) puede necesitar etapas de purificación adicionales para deshacerse de este agente citotóxico.
30
35
40

(b) El sistema de selección dihidrofolato reductasa/MTX: La dihidrofolato reductasa (DHFR) cataliza la reducción dependiente de NADP del ácido dihidrofólico en ácido tetrahidrofólico (THF). El THF se reconvierte entonces en 10-formil-THF y 5,10-metileno-THF que se utilizan en la biosíntesis *de novo* de purinas y timidato, respectivamente. El DHF es un subproducto de la actividad catalítica de la timidilato sintasa (TS) que cataliza la conversión de dUMP en dTMP en una reacción dependiente del 5,10-metileno-THF. Por lo tanto, la DHFR es crucial para el reciclaje de factores THF que son esenciales para la biosíntesis de nucleótidos purinas y pirimidinas que son necesarios para la replicación de ADN. Por lo tanto, se pueden utilizar células (por ejemplo, células CHO) que carecen del gen DHFR (es decir, por eliminación genómica dirigida) como receptores para la transfección del gen DHFR en un medio que está libre de nucleótidos. Tras la transfección, las células se pueden someter a un aumento gradual de concentraciones del antifolato MTX, un inhibidor de DHFR muy potente ($K_d = 1 \text{ pM}$), forzando de esta manera la producción de niveles de DHFR aumentados. Con múltiples rondas de selección, el marcador indicador DHFR frecuentemente experimenta una amplificación genética significativa. Además, también se ha utilizado extensamente un ratón mutante DHFR con una importante resistencia al MTX como marcador indicador dominante que aumenta de manera importante la adquisición de altos niveles de resistencia a MTX en las células transfectantes. Una desventaja importante del sistema de selección DHFR/MTX es que esta técnica utiliza un agente citotóxico mutagénico, el MTX, que puede alterar fácilmente el genotipo de las células receptoras. Además puede que se tengan que tomar medidas de seguridad específicas para proteger las personas que manejan tales agentes. Esto da frecuentemente como resultado poblaciones celulares resistentes al MRX en las que no está presente la expresión del gen diana de interés debido a la pérdida de mutaciones funcionales en el portador de folato reducido (RFC) y/o pérdida de la expresión genética de RFC, que abolen ambas la captación de MTX. Otra desventaja es que el fármaco mutagénico puede contaminar fácilmente el producto diana sobre-expresado que se segrega (por ejemplo, un polipéptido como un anticuerpo) que está contenido en el medio de cultivo por lo que necesita una labor intensiva de métodos cromatográficos que consumen tiempo y son caros, necesarios para deshacerse de este compuesto mutagénico, el MTX. Además, la ausencia de MTX en el producto final tiene que demostrarse con sus respectivos ensayos.
45
50
55
60
65

(c) Sistema de selección por portador de folato reducido: El portador de folato (RFC) es una glucoproteína de membrana que se expresa de manera ubicua que sirve como el transportador más importante para la captación de folatos reducidos tales como el 5-metil-THF y el 5-formil-THF. Sin embargo el RFC presenta una afinidad muy pobre por el folato oxidado, el ácido fólico. Por lo tanto, las células que carecen de la expresión de RFC o se les ha eliminado el locus genómico RFC pueden servir como receptores para la transfección del gen marcador indicador RFC bajo condiciones en las que se ha privado gradualmente de folatos reducidos tales como el 5-formil-THF del medio de cultivo forzando de esta manera a las células a expresar niveles aumentados de este transportador de folato. Hay varias desventajas para el sistema de selección RFC: a) se deben utilizar células receptoras sin RFC en las que el locus RFC endógeno se haya anulado o inactivado por anulación dirigida o mutaciones de pérdida de función. b) el RFC tiene una afinidad extremadamente baja por el ácido fólico y por lo tanto este folato oxidado no se puede utilizar para la selección. c) Al contrario del sistema basado en el receptor de folato actual que es un sistema de captación de folato unidireccional y que se explicará en detalle posteriormente, el RFC es un transportador de folato bi-direccional que presenta una importación y exportación de folatos igualmente potentes. Esto implica que bajo condiciones de privación de folato, la sobre-expresión de RFC puede ser perjudicial para las células receptoras que exporten más folato por medio del RFC sobreexpresado.

El objetivo de la presente invención es proporcionar un nuevo sistema de selección metabólica que tiene ciertas ventajas sobre los sistemas de selección de la técnica anterior que se han mencionado anteriormente. El nuevo sistema de selección se basa en el uso de folatos en el medio de cultivo celular y en la presencia de receptores de folato que se introducen por medio de un vector de expresión en la célula eucariota recombinante que se pretende que produzca un producto de interés. Esta nueva estrategia no necesita la eliminación previa de un gen endógeno de receptor de folato (FR). Después de la introducción de un vector que alberga tanto el gen indicador FR así como el polinucleótido que codifica un producto de interés (como un polipéptido), las células se cultivan en un medio selectivo que contiene concentraciones altamente limitantes de folatos. Por lo tanto, solamente las células que sobre-expresan marcadamente FR pueden captar suficientes folatos para sostener el crecimiento celular, la replicación de ADN y la proliferación celular, permitiendo de esta manera la sobre-expresión del producto diana de interés.

El folato oxidado, es decir, el ácido fólico, así como los derivados reducidos del ácido fólico, que se conocen como folatos reducidos o tetrahidrofolatos (THF) son un grupo de vitaminas B-9 que son cofactores esenciales y/o coenzimas para la biosíntesis de purinas, timidilato y ciertos aminoácidos en células eucariotas, en particular de mamífero. Específicamente, los cofactores THF funcionan como donantes de unidades de un carbono en una serie de rutas metabólicas interconectadas que implican la biosíntesis *de novo* de purinas y timidilato, aminoácidos así como el metabolismo del grupo metilo, incluyendo la metilación de la isla CpG del ADN. Específicamente, los cofactores THF incluyen 10-formil-THF (10-CHO-THF) que contribuye con unidades de un carbono en dos reacciones *de novo* formiltransferasa claves implicadas en la biosíntesis *de novo* de purinas. La primera enzima, glicinamida ribonucleótido transformilasa (GARTF), está implicada en la formación del anillo imidazol de las purinas, mientras que la reacción más corriente abajo mediada por la 4-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido transformilasa (AICARTF) da lugar al intermediario de purina inosina 5'-monofosfato (IMP). Este último funciona como un precursor clave de la biosíntesis regulada de AMP y GMP. Además, el 5,10-metilen-THF (5,10-CH₂-THF), es otra coenzima THF importante que funciona como un cofactor crucial para la enzima timidilato sintasa (TS). La TS cataliza la formación de timidina monofosfato (dTMP) a partir de dUMP. Por lo tanto estas enzimas dependientes de folato son mediadores clave de la biosíntesis *de novo* de purina y nucleótidos de timina esenciales para la replicación del ADN. Por tanto, estas enzimas dependientes de folato se identificaron como dianas para la actividad de los antagonistas del ácido fólico conocidos como antifolatos. Por ejemplo, el análogo del ácido 4-amino fólico, aminopterina, y su homólogo el ácido 4-amino-10-metilfólico, el metotrexato (MTX) fueron la primera clase de metabolitos que se introdujeron en la clínica para el tratamiento terapéutica de la leucemia linfoblástica aguda infantil (ALL). Los antifolatos son normalmente componentes clave de diferentes regímenes de quimioterápicos que se utilizan actualmente para el tratamiento de otras enfermedades malignas humanas que incluyen el osteosarcoma, cáncer de mama, linfoma primario del sistema nervioso central, coriocarcinoma y neoplasia trofoblástica gestacional.

Al contrario que la mayoría de procariotas, plantas, hongos y ciertos protistas que sintetizan sus propios folatos, los mamíferos y otras especies eucariotas están desprovistos de la biosíntesis del cofactor THF y por lo tanto deben obtenerlo de fuentes exógenas. Se conocen actualmente tres sistemas de transporte independientes que median en la captación de folatos y antifolatos en las células de mamífero:

a) El sistema de transporte celular predominante para reducir los folatos cofactores es el portador de folato reducido (RFC). El RFC (también conocido como miembro 1 de la familia 19 portadora de soluto, SLC19A1) es una glucoproteína de membrana de 85 kDa que se expresa de manera ubicua y que funciona como un portador proveedor bidireccional que media en el transporte cuesta arriba de folatos reducidos intercambiando fosfatos orgánicos tales como nucleótidos de adenina que se conocen por acumularse en niveles intracelulares muy altos así como mono y pirofosfato de tiamina. Los RFC presentan una alta afinidad por los cofactores THF que incluyen leucovorina (5-formil-THF; K_t = 1 μM), a la vez que tiene una afinidad muy pobre (K_t = 200-400 μM) por el ácido fólico, un folato oxidado.

b) Otra ruta de captación de folato es el transportador de folato acoplado a un protón (PCFT, también conocido

como SLC46A) que se ha clonado recientemente. El PCFT que parece que se expresa independientemente del RFC, funciona óptimamente a pH ácido (5,5) y media el influjo de tanto cofactores oxidados (por ejemplo, ácido fólico) como cofactores THF (es decir, folatos reducidos) así como varios antifolatos hidrófilos que incluyen el MTX. El PCFT, que muestra un transporte óptimo de folatos y antifolatos a pH ácido (5,5) pero ninguno a pH fisiológico (7,4), tiene un papel clave en la absorción de ambos folatos y antifolatos en el intestino delgado superior.

c) La tercera ruta de transporte, en la que se basa la presente invención, implica receptores de folato (FR). Los FR son glucoproteínas que se unen al folato con alta afinidad que están codificados por tres genes distintos FR α (FR alfa), FR β (FR beta) y FR γ (FR gamma). El FR α (o FR-alfa) también se conoce como Proteína de Unión a Folatos de Adulto o FDP, como receptor de folato 1 o FOLR (en ratones folbp1), y como Antígeno Asociado con el cáncer Ovárico o MOv18. El FR β (o FR-beta) se conoce también como FOLR2 (fetal) y como FBP/PL-1 (placenta). El FR γ (o FR gamma) también se conoce como FOLR3 y como FR-G (revisado por M.D. Salazar y M. Ratnam, Cancer Metastasis Rev. 2007 26(1), pp.141-52). Los FR maduros, que están bien caracterizados, son proteínas homólogas con ~ 70-80 % de identidad de aminoácidos y contienen de 229 a 236 aminoácidos, así como dos a tres sitios de N-glucosilación. El FR α y FR β (FR beta) son glucoproteínas de superficie celular unidas a la membrana, en particular ancladas por glucosilfosfatidilinositol (GPI), mientras que los FR γ carecen de un ancla GPI y es una proteína segregada. El FR α (FR alfa) y FR β (FR beta) presentan una alta afinidad por el ácido fólico (K_d = 0,1-1 nM), ácido 5,10-dideazatetrahidrofólico (DDTAHF; lometrexol; K_i = 0,4-1,3 nM utilizando [³H] ácido fólico como sustrato) y BGC945 (que es un inhibidor de la timidilato sintasa basado en ciclopenta[g]quinazolina, que se transporta únicamente por medio de FR α (FR alfa) y no por medio de portador de folato reducido) (K_d = 1 nM), pero con mucha menos afinidad por MTX (K_d > 100 nM). La captación de folato y antifolatos dependiente de FR progresa por medio de un mecanismo clásico de endocitosis mediada por receptor. Los estudios de anulación genética han demostrado que el FR α (FR alfa) (también conocido como Folbp1 en ratones) es esencial para el desarrollo embrionario temprano y que el suplemento maternal de folato rescataba de la mortalidad embrionaria *in utero* y permitía el desarrollo normal.

Existe la necesidad en curso de un sistema de selección seguro, altamente eficaz y rentable que supere una o más de las desventajas de los sistemas de selección conocidos hasta la fecha.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un vector de expresión en eucariotas que comprende un primer polinucleótido que codifica un receptor funcional de folato unido a la membrana y un segundo polinucleótido que codifica un producto de interés, en que el producto de interés es un polipéptido farmacéutica o terapéuticamente activo o de diagnóstico.

La presente invención se refiere además a células eucariotas en las que la viabilidad celular depende de la captación de ácido fólico, y en las que el dicho vector de expresión se ha introducido de manera estable tal que las células expresan el receptor funcional de folato codificado por el vector.

Además, la presente invención se refiere a un método de selección para proporcionar una célula eucariota recombinante capaz de expresar de manera estable el producto de interés con altos rendimientos.

La presente invención se puede utilizar favorablemente en un proceso para la producción de un producto de interés con altos rendimientos.

Descripción detallada de la invención

En el curso de la presente invención, se ha descubierto ahora sorprendentemente que un sistema de selección para proporcionar células eucariotas recombinantes capaces de producir un producto de interés se puede basar en la disponibilidad limitada de un folato en un medio de cultivo celular. El sistema será aplicable ampliamente, es decir a una célula eucariota cuya viabilidad celular dependa de la captación de un folato.

El nuevo sistema se puede utilizar para la selección acelerada, exploración y establecimiento de clones celulares eucariotas, por ejemplo de mamífero, que sobre-expresan de manera estable altos niveles de productos recombinantes en ausencia de fármacos citotóxicos. Más incluso, y al contrario de otros sistemas de selección, no existe una necesidad esencial (aunque a veces es factible) de células modificadas, que se proporcionen por ejemplo, por mutación o anulación de genes endógenos. Debido a que, por ejemplo, el FR α (FR alfa) presenta una afinidad más alta por el AF (K_D = 0,1 nM) que, por ejemplo, el RFC por el leucovorin (K_t = 1 μ M), y transporta el ácido fólico al interior de las células por medio de una ruta unidireccional, la presente invención proporciona el uso del FR α (FR alfa) y otros receptores de folato como un marcador indicador metabólico dominante marcadamente mejorado, en particular, por medio de la privación gradual de folato (por ejemplo, ácido fólico) en el medio de cultivo. La nueva selección basada en folatos es una estrategia excelente que es muy adecuada para la sobre-expresión acelerada, estable y de alto nivel de proteínas diana en células de mamífero cultivadas en ausencia de un fármaco citotóxico de selección como se utiliza de manera rutinaria en distintos sistemas de sobre-expresión.

El nuevo sistema de selección muestra varias ventajas importantes sobre los sistemas de selección disponibles en la técnica anterior.

- 5 1. El sistema de selección de acuerdo con la presente invención es un sistema de selección muy rápido: en cuatro semanas de privación de ácido fólico, se puede aislar fácilmente la población celular o los derivados celulares clónicos que expresan el gen diana. En contraposición al sistema GS mencionado anteriormente que puede necesitar de 2-6 meses de selección y estabilización del gen diana.
- 10 2. El sistema de selección de acuerdo con la presente invención no necesita una eliminación o atenuación genómica de los genes endógenos FR α (alfa), β (beta) o γ (gamma) antes de la transfección y por lo tanto se puede aplicar a cualquier célula receptora incluso cuando está presente la expresión de genes FR endógenos. Esta ventaja clave se basa en el hecho de que tras la transfección de FR α (FR alfa), las células se pueden exponer a una privación brusca y extrema de folatos (por ejemplo, ácido fólico) en el medio de cultivo. En consecuencia, solo las células transfectadas que expresan cantidades significativas del marcador indicador FR α (FR alfa) pueden transportar suficiente folato para mantener la replicación de ADN y la proliferación celular. Esto se produce en ausencia de cualquier elevación significativa de la expresión del gen FR α (FR alfa) endógeno. Esto es lo contrario que en el sistema DHFR/MTX mencionado anteriormente en el que a las células receptoras se les ha eliminado el gen DHFR endógeno (por ejemplo, células CHO DG44 y células CHO Dux).
- 15 20 c). El sistema de selección de acuerdo con la presente invención no sufre por la pérdida de rigurosidad de selección debido al alivio de la presión selectiva por medio del aumento de expresión de rutas alternativas de captación de folatos incluyendo el aumento de expresión del RFC endógeno. Esta importante ventaja es debida al hecho de que mientras que el FR α (FR alfa) tiene una afinidad espectacular por el ácido fólico (Kd = 0,1 nM), el RFC presenta una afinidad extremadamente baja por el ácido fólico (Km = 0,2-0,4 mM). Por el contrario, varios de los sistemas de selección de la técnica anterior incluyendo el sistema DHFR/MTX pueden sufrir de una pérdida intensa de rigurosidad de selección ya que con la selección por MTX, se pueden obtener frecuentemente células resistentes a MTX que no tienen o tienen poca expresión del marcador indicador. En vez de pérdida de función de RFC, el transportador primario de MTX puede volverse un mecanismo frecuente de resistencia a MTX. Se ha demostrado que esto es debido a la aparición frecuente de mutaciones inactivadoras en el gen RFC o pérdida intensa de expresión del gen RFC.
- 25 30 d). El sistema de selección de acuerdo con la presente invención no utiliza un fármaco citotóxico y/o compuesto mutagénico tal como el MTX en el sistema DHFR o el MSX en el sistema GS que pueden alterar el genotipo de las células receptoras así como el gen diana de interés. Más bien, la selección con FR utiliza el principio de privación de una vitamina en el medio de cultivo.

En consecuencia, en un aspecto la presente invención se refiere por tanto a un vector de expresión en eucariotas que comprende un primer polinucleótido que codifica un receptor funcional de folato unido a la membrana (es decir, el gen marcador indicador) y un segundo polinucleótido que codifica un producto de interés, en que el producto de interés es un polipéptido farmacéutica o terapéuticamente activo o de diagnóstico.

Un receptor funcional de folato unido a la membrana de acuerdo con la presente invención se define particularmente como un receptor funcional unido a la membrana capaz de importar unidireccionalmente o captar un folato en una célula eucariota.

Un folato de acuerdo con la presente invención puede ser o un folato oxidado (es decir, ácido fólico) o un folato reducido. En general, un folato puede ser útil en la presente invención siempre que tal folato sea capaz de ser captado por una célula eucariota con el receptor funcional de folato unido a la membrana. Un ejemplo preferido de folato oxidado es el ácido fólico. Ejemplos preferidos de folatos reducidos son ácido 5-metil-tetrahidrofólico, ácido 5-formil-tetrahidrofólico, ácido 10-formil-tetrahidrofólico y ácido 5,10-metileno-tetrahidrofólico.

En una realización preferida, el vector de expresión de la presente invención es capaz de expresar tanto el receptor funcional de folato unido a la membrana como el producto de interés en una célula eucariota.

55 El producto de interés codificado por el segundo polinucleótido puede ser cualquier producto biológico capaz de producirse por transcripción, traducción o cualquier otro acontecimiento de expresión de la información genética codificada por el segundo polinucleótido. A este respecto, el producto será un producto de expresión. Por ejemplo, en una realización preferida, tal producto se selecciona de entre el grupo que consiste en un polipéptido, un ARN, y un ADN. Un "polipéptido" se refiere a una molécula que comprende un polímero de aminoácidos unidos entre ellos por enlaces peptídicos. El término "polipéptido" incluye polipéptidos de cualquier longitud, que se puede llamar "proteína" en el caso de una molécula más grande (que comprende por ejemplo más de aproximadamente 50 aminoácidos) o "péptido" en el caso de una molécula más pequeña (que comprende por ejemplo de 2 - 49 aminoácidos). El producto puede ser un compuesto farmacéutica o terapéuticamente activo, o una herramienta de investigación para utilizarse en ensayos y similares. En una realización particularmente preferida, el producto es un polipéptido, preferentemente un polipéptido farmacéutica o terapéuticamente activo, o una herramienta de

investigación que se va a utilizar en ensayos diagnósticos u otros ensayos y similares. En una realización más preferida el polipéptido es una molécula de inmunoglobulina o anticuerpo, o un fragmento (en particular un fragmento funcional) del mismo, por ejemplo, un anticuerpo quimérico, o un anticuerpo parcial o totalmente humanizado. Tal anticuerpo puede ser un anticuerpo diagnóstico, o un anticuerpo farmacéutica o terapéuticamente activo. Normalmente, el producto de interés será heterólogo a la célula huésped eucariota que se utiliza para la expresión, lo que significa que la célula huésped no produce naturalmente o endógenamente el producto de interés antes de la transfección. Más bien, con el fin de conseguir la producción o expresión del producto de interés tiene que introducirse un polinucleótido que codifica el producto de interés en la célula huésped eucariota, en particular por transfección con un vector de expresión de acuerdo con la presente invención.

Un vector de acuerdo con la presente invención se puede presentar en forma lineal o, preferentemente, en forma circular, por ejemplo, un plásmido.

Los vectores que se utilizan para la expresión de polinucleótidos de interés contienen elementos de control de la transcripción adecuados para dirigir la transcripción tal como por ejemplo, promotores, amplificadores, señales de poliadenilación, señales de pausa o terminación de la transcripción. Si el producto que se desea es una proteína, se incluyen los elementos de control de la transcripción habitualmente en el vector, tal como por ejemplo, regiones 5' no traducidas que dirigen estructuras 5' protegidas adecuadas para reclutar ribosomas y codones de parada para terminar el proceso de traducción. En particular, tanto el polinucleótido que funciona como gen marcador indicador así como el polinucleótido que codifica el producto de interés se transcribirán bajo los elementos de control de la transcripción presentes en promotores apropiados. Las transcripciones resultantes de ambos, el gen marcador indicador y el del producto de interés tienen elementos de traducción funcionales que facilitan niveles sustanciales de expresión proteica (es decir, la traducción).

En consecuencia, una realización preferida se refiere a un vector de expresión de acuerdo con la presente invención en que el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido están bajo el control de distintos promotores de transcripción. En general, será adecuado, un promotor capaz de promover la expresión, en particular la transcripción, del primer y/o el segundo polinucleótido en una célula eucariota. En una realización preferida, los distintos promotores de la transcripción son el mismo. En otra realización preferida los distintos promotores de la transcripción son diferentes. Preferentemente, los promotores de transcripción se seleccionan de entre el grupo que consiste en un promotor SV40, un promotor CMV, un promotor EF1 alfa, un promotor RSV, un promotor BROAD3, un promotor murino rosa 26, un pCEFL y un promotor β -actina. En una realización preferida de los mismos el promotor que controla la transcripción del primer polinucleótido y/o el segundo polinucleótido es un promotor CMV o, más preferente, un promotor SV40. En una realización particularmente preferida el promotor que controla la transcripción del primer polinucleótido es un promotor SV40.

En otra realización preferida de un vector de expresión de la presente invención el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido están bajo el control de un promotor de la transcripción común. Preferentemente, tal promotor de la transcripción se selecciona de entre el grupo que consiste en un promotor SV40, promotor CMV, promotor RSV, un promotor BROAD3, un promotor murino rosa 26, un promotor pCEFL y un promotor β -actina. En una realización preferida más del mismo el promotor de transcripción común es un promotor SV40. Una realización preferida más del vector de expresión que tiene tal promotor de transcripción común comprende un elemento IRES localizado funcionalmente entre el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido.

El receptor de folato unido a la membrana que se introduce en la célula huésped eucariota por medio de un vector de expresión que se utiliza de acuerdo con la presente invención se puede derivar de cualquier especie siempre que sea funcional en la presente invención, es decir, compatible con la célula eucariota que se utilice. Preferentemente, se utilizará un receptor de folato derivado de especies de mamíferos, por ejemplo, que deriven de un roedor, o se prefiere sobre todo un receptor de folato humano. En general, el receptor de folato introducido en la célula huésped eucariota y que se utiliza como marcador de selección puede ser homólogo o heterólogo del receptor de folato endógeno de la célula huésped. Si es homólogo derivará de la misma especie de la célula huésped, y puede ser idéntico, por ejemplo al receptor de folato endógeno de la célula huésped. Si es heterólogo derivará de otra especie distinta de la célula huésped, y por lo tanto puede ser diferente del receptor de folato endógeno de la célula huésped. Normalmente, el receptor de folato introducido que se utiliza como marcador de selección será heterólogo a la célula huésped. Por ejemplo, se puede utilizar un receptor de folato derivado de seres humanos como marcador de selección para una célula huésped de roedor, por ejemplo, una célula CHO.

Preferentemente, el receptor funcional de folato unido a la membrana codificado por el primer polinucleótido de un vector de expresión de la presente invención se selecciona de entre el grupo que consiste en al receptor de folato alfa (RF α), el receptor de folato beta (FR β), y un mutante funcional de los mismos. Un mutante funcional comprende un derivado de un receptor de folato que es funcional de una manera fisiológica, es decir, que es capaz de ser captado por la célula eucariota y que contribuye a la viabilidad de la célula por medio del metabolismo de folato en la célula. Por ejemplo, una forma mutante del receptor de folato comprenderá una o más mutaciones de aminoácidos, como una sustitución, eliminación y/o adición, así como un derivado químico, en que un resto químico, tal como un polímero, por ejemplo una estructura de polietilenglicol (PEG), está unido al receptor de folato. Preferentemente, el receptor de folato que está codificado por el primer polinucleótido es un receptor de folato alfa humano (hFR α), un

receptor de folato beta humano (hFR β), o un mutante funcional de los mismos. Más preferido es un receptor de folato alfa humano (hFR α), que tenga preferentemente la siguiente secuencia de aminoácidos (SEC ID N $^{\circ}$ 1, código de 1 letra, se muestra en dirección del extremo N al extremo C):

5 MAQRMTTQLLLLLVVANA/GEAQTRIAWARTELLNVCMAKHHKKEKPGPEDKLHEQCRP
 WRKNACCSTNTSQAHKDVSYLRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWI
 QQVDQSWRKERVNLNPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGNWWTSGFNKCAVG
 AACQPFHFYFPTVLCNEIWTSHYSKVSNSYRSGRGIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAA
 10 AMMSGAGPWAAWPFLLSLALMLLWLLS

Otra realización preferida se refiere a un receptor de folato beta humano (hFR β) que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (SEC ID N $^{\circ}$ 2, código de 1 letra, se muestra en dirección del extremo N al extremo C):

15 MVWKMPLLLLLVVCVATMCSAQDRTDLLNVCMDAKHHKTKPGPEDKLHDQCSPWKKNA
 CCTASTSQELHKDTSRLYNFNWDHCGKMEPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVQNT
 WRKERFLDVPLCKEDCQRWWEDCHTSHTCKSNWHRGWDWTSGVVKCPAGALCRTFE
 SYFPTPAALCEGLWSHSYKVSNSYRSGRGIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAMHVNA
 20 GEMLHGTGLLLLSLALMLLWLLG

20 En una alternativa, la presente invención se refiere a un receptor de folato que en su ambiente natural no está unido a la membrana. Tal receptor no unido a la membrana se puede mutar con el fin de que se convierta en uno unido a la membrana, por ejemplo, proporcionando una proteína de fusión entre el receptor de folato no unido a la membrana y una región transmembrana de otro polipéptido. Igualmente, son posibles otras formas mutantes que podrían estar fácilmente disponibles para un experto en la técnica. Ejemplos preferidos a este respecto se basarían en el receptor de folato gamma soluble (FR γ), preferentemente, el receptor de folato gamma soluble humano (FR γ).
 25 En una realización más preferida del mismo, el receptor de folato gamma soluble humano (FR γ) tendría la siguiente secuencia de aminoácidos (SEC ID N $^{\circ}$ 3, código de 1 letra, se muestra en dirección del extremo N al extremo C):

30 MDMAWQMMQL LLLALVTAAG SAQPR SARAR TDLLNVCMA KHHKTQPSPE DELYGQCSPW
 KKNACCTAST SQELHKDTSR LYNFNWDHCG KMEPTCKRHF IQDSCLYECSP NLGPWIRQV
 NQSWRKERIL NVPLCKEDCE RWWEDCRTSY TCKSNWHKGW NWTSGINECP AGALCSTFES
 YFPTPAALCE GLWSHSFKVS NYSRSGRGI QMWFDPAQGN PNEEVAKFYA AAMNAGAPSR GIIDS

35 la cual se ha mutado entonces o de otra manera alterado o derivado genéticamente para formar un receptor funcional unido a la membrana capaz de captar folato en el contexto de la presente invención.

En un aspecto más, el vector de expresión de acuerdo con la presente invención puede comprender adicionalmente uno o más polinucleótidos que codifican además uno o más marcadores de selección adicionales. En consecuencia, en una realización preferida se puede aplicar la co-selección utilizando el sistema de folato de la presente invención
 40 junto con uno o más sistemas de selección diferentes (por ejemplo, neo/G418) para proporcionar una actuación óptima.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una célula eucariota para la que la viabilidad celular depende de la captación de folato, y en cuya célula eucariota se ha introducido de manera estable un primer polinucleótido
 45 localizado en un vector de expresión y que codifica un receptor funcional de folato unido a la membrana y un segundo polinucleótido localizado en un vector de expresión y que codifica el producto de interés, en que el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido se localizan en el mismo vector de expresión o en vectores de expresión separados y en que el producto de interés es un polipéptido farmacéutica o terapéuticamente activo o de diagnóstico. En una realización preferida del mismo, el receptor funcional de folato unido a la membrana y el
 50 producto de interés se expresan por la célula eucariota.

Además del receptor funcional de folato unido a la membrana que se introduce en la célula por medio de un vector de expresión, la célula eucariota de acuerdo con la presente invención puede comprender al menos un sistema funcional de transporte de folato unidireccional endógeno, en particular uno o más receptores funcionales de folato
 55 unidos a la membrana endógenos. Es una ventaja de la presente invención que el método de selección como se describe posteriormente en el presente documento se pueda utilizar incluso en presencia de tal sistema funcional de transporte de folato unidireccional endógeno, es decir, cuando tal sistema funcional de transporte de folato unidireccional endógeno se mantiene. En consecuencia, una realización preferida más se refiere a una célula de la presente invención, que comprende al menos un sistema funcional de transporte de folato unidireccional endógeno,
 60 en que tal sistema funcional de transporte de folato unidireccional endógeno comprende preferentemente al menos un receptor funcional de folato unido a la membrana endógeno. En una realización preferida del mismo, el receptor funcional de folato unido a la membrana endógeno se selecciona de entre el grupo que consiste en el receptor de folato alfa (FR α) y el receptor de folato beta (FR β).

Otra realización preferida se refiere a una célula eucariota de acuerdo con la presente invención, en que el sistema funcional de transporte de folato unidireccional endógeno, por ejemplo comprende al menos, por ejemplo, un receptor funcional de folato unido a la membrana que carece de actividad completa, es decir, está atenuado. Tal atenuación se puede proporcionar, por ejemplo, por cualquier tipo de mutagénesis del sistema de transporte de folato endógeno en cuestión, por ejemplo, del receptor funcional de folato unido a la membrana endógeno, por ejemplo por mutación puntual, alteración genética, y similares. La atenuación puede ser parcial o completa. En el último caso la célula eucariota de acuerdo con la presente invención no comprende un sistema funcional de transporte de folato unidireccional endógeno, por ejemplo, un receptor funcional de folato unido a la membrana endógeno. En consecuencia, una realización preferida de la presente invención se refiere a tal célula eucariota en que se ha introducido de manera estable un vector de expresión de la presente invención, y en que la célula carece de actividad completa de al menos un receptor funcional de folato unido a la membrana endógeno.

Con respecto al vector de expresión introducido en dicha célula huésped, se puede utilizar cualquier vector de expresión de la presente invención, incluyendo sus realizaciones específicas, como se describe en el presente documento. En una realización preferida de la célula eucariota de la presente invención el primer polinucleótido que codifica un receptor funcional de folato unido a la membrana y el segundo nucleótido que codifica el producto de interés se localizan en el mismo vector de expresión. Preferentemente, tal vector de expresión es un vector de expresión de acuerdo con la presente invención, es decir, como se describe en el presente documento.

La célula eucariota de acuerdo con la presente invención, preferentemente, se selecciona de entre el grupo que consiste en una célula de mamífero, una célula de insecto, una célula vegetal y una célula fúngica. Con respecto a las células fúngicas y células vegetales, que habitualmente son prototróficas para los folatos (es decir, tales células pueden sintetizar autónomamente sus propios folatos necesarios para su viabilidad celular, es decir, el crecimiento celular y proliferación). La presente invención engloba en particular tales células fúngicas y vegetales que pueden convertirse en auxotróficas para los folatos. Esto puede producirse por ejemplo debido a modificación genética, es decir, las células son incapaces ya de sintetizar suficientes cantidades de folato necesarias para su viabilidad celular. Por ejemplo, la capacidad de tales células fúngicas o vegetales para biosintetizar folatos endógenamente, por ejemplo, por medio de la ruta metabólica adecuada, estará desactivada, por ejemplo, por alteración genética o silenciamiento genético o de los genes diana apropiados, o la inhibición de enzimas clave, etc.

En una realización preferida de la misma, la célula eucariota es una célula de mamífero. Preferentemente, tal célula de mamífero se selecciona de entre el grupo que consiste en una célula de roedor, una célula humana, una célula de mono. Particularmente preferida es una célula de roedor, la cual se selecciona preferentemente de entre el grupo que consiste en una célula CHO, una célula BHK, una célula NS0, una célula fibroblasto 3T3 de ratón, y una célula SP2/0. Una célula de roedor más particularmente preferida es una célula CHO. También es preferida una célula humana, la cual, preferentemente, se selecciona de entre el grupo que consiste en una célula HEK293, una célula MCF-7, una célula PerC6, y una célula HeLa. Más preferida es una célula de mono, la cual, preferentemente, se selecciona de entre el grupo que consiste en una célula COS-1, una célula COS-7 y una célula Vero.

En otra realización la presente invención se refiere a un proceso de producción de una célula eucariota de acuerdo con la presente invención, dicho proceso comprende proporcionar una célula eucariota para la que la viabilidad celular depende de la captación de folato, e introducir un primer polinucleótido localizado en un vector de expresión y que codifica el receptor funcional de folato unido a la membrana y un segundo polinucleótido localizado en un vector de expresión y que codifica el producto de interés, en que el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido están localizados en el mismo vector de expresión o en vectores de expresión separados. En una realización preferida, el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido se localizan en el mismo vector de expresión el cual, en una realización más preferida, es un vector de expresión de acuerdo con la presente invención, es decir, como se desvela en el presente documento.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere a un método de selección de una célula eucariota capaz de expresar de manera estable un producto de interés codificado por un vector de expresión que se ha introducido en la célula, que comprende

(i) proporcionar una pluralidad de células eucariotas para las que la viabilidad celular depende de la captación de folato, y en las que se han introducido un primer polinucleótido localizado en un vector de expresión y que codifica un receptor funcional de folato unido a la membrana y un segundo polinucleótido localizado en un vector de expresión y que codifica el producto de interés, en que el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido se localizan en el mismo vector de expresión o en vectores de expresión separados,

(ii) cultivar dicha pluralidad de células eucariotas en un medio de cultivo celular que tiene una concentración limitante de un folato, obteniendo de esta manera una célula eucariota en la que se consigue una expresión estable del producto de interés. En principio, tal folato puede ser un folato oxidado o un folato reducido. Se prefiere un folato oxidado, que en particular es el ácido fólico.

Con respecto a la cantidad limitante de un folato, la concentración en el medio la puede determinar un experto en la técnica de acuerdo con las necesidades de la célula huésped y la rigurosidad de la condición de selección que se va a aplicar. En el caso de que se utilice ácido fólico como folato, por ejemplo con una célula huésped CHO, una

concentración de ácido fólico en el medio de cultivo celular para un proceso de selección riguroso sería aproximadamente 100 nM o menor, preferentemente aproximadamente 30 nM o menor, o aproximadamente 10 nM o menor. Por ejemplo, una concentración adecuada de ácido fólico puede ser cualquier valor en el intervalo de 0,001 nM - 100 nM, preferentemente en el intervalo de 0,01 nM - 100 nM, más preferentemente 0,1 nM - 100 nM o en el intervalo de 1 nM - 100 nM. Igualmente se prefiere el intervalo de 0,001 nM - 30 nM, el intervalo de 0,01 nM - 30 nM, el intervalo de 0,1 nM - 30 nM, el intervalo de 1 nM - 30 nM, o el intervalo de 3 nM - 10 nM. Por ejemplo, la concentración de ácido fólico en el medio de cultivo celular adecuado para la selección puede ser 1 nM, 3 nM, 10 nM o 30 nM.

En el caso de que se utilice un folato reducido tal como leucovorin en el proceso de selección la concentración del mismo la puede determinar de nuevo un experto en la técnica de acuerdo con las necesidades de la célula huésped y la rigurosidad de la condición de selección que se va a aplicar. Tal concentración de leucovorin en el medio de cultivo célula puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,2 nM - 2 nM para un proceso de selección riguroso.

En una realización más del mismo, el método de selección comprende además la identificación y aislamiento de una célula eucariota en la que se consigue la expresión estable del producto de interés.

En una realización más preferida de la realización del método de selección, la pluralidad de células eucariotas está compuesta por células eucariotas de acuerdo con la presente invención, en particular con respecto a la célula eucariota y el vector de expresión.

Otra realización de la presente invención se refiere a un proceso para la producción de un producto de interés, que comprende

- (i) llevar a cabo un método de selección de acuerdo con la presente invención, es decir, como se desvela en el presente documento,
- (ii) y aislar el producto de interés de dicho medio de cultivo celular o de dicha célula.

De nuevo, las realizaciones preferidas de este aspecto de la presente invención se describen en el presente documento, en particular con la célula eucariota y el vector de expresión.

El producto de interés, por ejemplo un polipéptido, que se produce de acuerdo con la invención se puede recuperar, purificar más y aislar por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar del medio de nutrientes por procedimientos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, centrifugación, filtración, ultrafiltración, extracción o precipitación. La purificación se puede llevar a cabo por varios procedimientos conocidos en la técnica que incluye, pero no se limita a, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, afinidad, hidrófoba, cromatografía de exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, enfoque isoeléctrico preparatorio), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico) o extracción.

Un aspecto más de la presente invención se refiere al uso de un receptor funcional de folato unido a la membrana por medio de un vector de expresión como un marcador de selección para la selección de una célula eucariota, para la que la viabilidad de la célula eucariota depende de la captación de folato, y en que la célula eucariota expresa de manera estable un producto de interés recombinante, en que el producto de interés es un polipéptido farmacéutico o terapéuticamente activo o de diagnóstico. En una realización preferida de tal uso, el receptor de folato se selecciona de entre el grupo que consiste en el receptor de folato alfa (FR α), el receptor de folato beta (FR β), y un mutante funcional de los mismos. Preferentemente, los receptores de folato que se utilizan en este aspecto de la presente invención son los receptores de folato humanos respectivos, siendo preferido el folato ácido alfa humano (FR α). Realizaciones preferidas más de este aspecto de la presente invención se describen en el presente documento, en particular con respecto a la célula eucariota y el vector de expresión.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención sin que se limite de ninguna manera el ámbito de la misma. En particular, los ejemplos se refieren a realizaciones preferidas de la presente invención.

Ejemplos

En general, los materiales mencionados en el presente documento, tales como reactivos, son familiares para un experto en la técnica, están disponibles comercialmente y se pueden utilizar de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 1: Expresión de altos niveles de un anticuerpo recombinante utilizando el sistema de selección basado en el receptor de folato

Ejemplo 1.1: Vectores de expresión

Se construyó un vector plásmido (es decir, el vector de ensayo), adecuado para la expresión en células eucariotas, en particular células CHO, que albergaba tanto (i) un casete de expresión que comprendía un polinucleótido que

codifica las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo humano recombinante segregado de tipo IgG1, y (ii) un casete de expresión distinto que comprendía un polinucleótido que codifica un receptor de ácido fólico humano alfa (hFR α) como gen marcador indicador, para explorar la eficacia de selección de células transfectadas con hFR alfa (hFR α) bajo concentraciones limitantes de un folato, es decir, ácido fólico, en el medio de cultivo. La expresión del receptor de ácido fólico alfa humano (hFR α) está bajo el control de un promotor SV40 y una señal de poliadenilación (SV40) de referencia. La expresión del anticuerpo recombinante está bajo el control de un promotor CMV y una señal de poliadenilación (SV40) de referencia. Como control (es decir, el vector de control), se utilizó un vector de expresión similar, que codifica el mismo anticuerpo, y carecía del casete de expresión hFR alfa (hFR α), pero que contiene un gen de neomicina fosfotransferasa como marcador indicador.

Ejemplo 1.2: Células y condiciones de cultivo

Se mantuvieron las células de ovario de hámster chino derivadas de la cepa CHO-K1 bajo condiciones de cultivo en suspensión en un medio de cultivo definido químicamente que contenía 2,3 μ M (microM) de ácido fólico.

Para los análisis de dependencia del ácido fólico para la supervivencia, se hizo un experimento de privación de ácido fólico utilizando concentraciones de ácido fólico que variaban desde 2300 nM a 0,1 nM. Las células se cultivaron en tal medio y se analizó la viabilidad celular para cuantificar el porcentaje de células supervivientes. La Tabla 1 resume los resultados que se obtuvieron con la línea CHO-K1 mencionada anteriormente.

Tabla 1: Supervivencia de células CHO a diferentes concentraciones de ácido fólico:

Concentración de AF [nM]	Porcentaje de supervivencia
0,1	2,08
1	2,45
3	2
10	2,7
30	6,8
100	55,5
300	88,6
1000	100,8
2300	100

Estos resultados indican que para esta línea específica de célula huésped las concentraciones por debajo de 100 nM, preferentemente por debajo de 30 nM deberían ser adecuadas para generar una presión de selección significativa para la selección basada en el receptor de ácido fólico de células transfectadas de manera estable.

Ejemplo 1.3: Transfección y selección

Las células se transfectaron por electroporación o con el vector de ensayo que contenía un casete de expresión hFR alfa (hFR α) o el vector de control que carecía del hFR alfa (hFR α). Las células transfectadas posteriormente se cultivaron bajo condiciones de cultivo en suspensión en matraces de 125 ml con agitado en un medio suplementado con una concentración apropiada de glutamina y 2,3 μ M (microM) de ácido fólico. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se transfirieron a un medio que contenía un cantidad limitada de ácido fólico, a saber 10 nM o 1 nM de ácido fólico para iniciar el proceso de selección de acuerdo con la invención en placas de 24 pocillos para las muestras transfectadas con el vector de ensayo. Además, las células transfectadas con el plásmido de control se seleccionaron añadiendo un agente de selección, a saber 0,8 mg/ml de G418, a un medio que contenía 2,3 μ M (microM) de ácido fólico (es decir, control 1) o se cultivaron en ausencia de cualquier selección (es decir, control 2). Las células que se recuperaron satisfactoriamente con este esquema de selección se transfirieron a placas de 6 pocillos y después se expandieron en matraces con agitado para el análisis de los niveles de producción de anticuerpo.

Ejemplo 1.4: Análisis de la producción de anticuerpo

Se prepararon a partir de los transfectantes y poblaciones celulares privadas de ácido fólico, lotes sobre-confluentes de cultivos en matraces con agitado para analizar los niveles de expresión de anticuerpo. Las células se sembraron a 2×10^5 células/ml en un medio que contenía 2,3 μ M (microM) de ácido fólico y se incubaron bajo condiciones de cultivo en suspensión (es decir, en agitador). El día 14, se recolectó el sobrenadante del cultivo celular y se analizó

en cuanto a los niveles de anticuerpo utilizando una metodología HPLC de proteína A, es decir, un tipo de purificación por afinidad. Las moléculas de IgG se unían específicamente a la columna, principalmente por medio de la parte Fc, mientras que el resto de proteínas pasaba por la columna sin interactuar con la matriz. Bajo condiciones de pH bajo, se eluyeron las proteínas IgG de la columna, se cuantificaron por medio de medición de absorción UV, y, si era necesario, se purificaban y aislaban más.

Ejemplo 1.5: Resultados

El objetivo de esta estrategia es proporcionar una prueba del concepto de que un gen de folato, en particular el gen hFR alfa (hFR α), puede servir como un marcador indicador bajo condiciones de privación de folato de manera que se seleccionan células que co-sobre-expresan un producto de interés, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal. Como control se utilizó también un vector que contenía un gen de resistencia a la neomicina como marcador indicador. Tras la transfección, las células se sometieron a una selección rigurosa por reduciendo bruscamente las concentraciones de ácido fólico en el medio desde 2,3 μ M (microM) a 10 nM o 1 nM. Las células transfectadas con un plásmido que albergaba el receptor de ácido fólico se recuperaban fácilmente bajo las condiciones de privación de folato y además se podían expandir en el medio selectivo. Por el contrario, en el caso del vector control, la concentración de ácido fólico se mantenía sin cambios, pero se aplicó una presión de selección con G418 o no se aplicó presión de selección alguna. Las poblaciones celulares seleccionadas se analizaron entonces en cuanto a la producción de anticuerpos utilizando la suspensión de sobre-crecimiento (es decir, sobre-confluencia) en cultivo en matraces (es decir, con agitado) en un medio que contenía 2,3 μ M (microM) de ácido fólico. La concentración de anticuerpo en el medio de cultivo se determinó entonces el día 14. Como se muestra en la Tabla 2 posteriormente, las células transfectadas con el plásmido que contenían el receptor de ácido fólico y que se seleccionaron reduciendo la disponibilidad de ácido fólico, sobre-expresaban el anticuerpo recombinante. La cantidad de anticuerpo producida en estas poblaciones celulares transfectantes es mayor en comparación con las células transfectadas con el vector de control y seleccionadas con G418. Como un control más, cuando no se aplicó ninguna presión de selección, no se obtuvieron células que proporcionaran producción de anticuerpos. Estos datos proporcionan la prueba del concepto de que la estrategia actual de gen receptor de ácido fólico se puede aplicar fácilmente como un marcador indicador metabólico dominante que actúa solo para establecer rápidamente células que sobre-expresen un producto recombinante de interés.

Tabla 2: ($C_{\text{Ácido fólico}}$: concentración de ácido fólico en el medio durante la selección; C_{G418} : concentración de G418 en el medio durante la selección; C_{mAb} : concentración del anticuerpo segregado en el medio de cultivo con sobre-crecimiento)

Vector	$C_{\text{Ácido fólico}}$ (nM)	C_{G418} (mg/ml)	C_{mAb} (mg/l)
Vector de ensayo (hFR alfa (hFR α))	10	ninguno	25
	1	ninguno	24
Vector Control (Neo)	2300	0,8	8
	2300	ninguno	0

Ejemplo 2: Aumento de niveles de producción de anticuerpo recombinante en función de la disminución de la concentración de ácido fólico en el medio de cultivo

Ejemplo 2.1: Vector de expresión

Se proporciona un vector plásmido (es decir, el vector de ensayo) como se ha descrito en el Ejemplo 1.1 anterior.

Ejemplo 2.2: Células y condiciones de cultivo

Se mantuvieron células ováricas de hámster chino derivadas de la cepa CHO-K1 bajo condiciones de cultivo monocapa en el medio RPMI-1640 definido químicamente que contenía 2,3 μ M (microM) de ácido fólico. Las células carecían de actividad transportadora de RFC, como se ha desvelado en otro sitio (Assaraf, Y.G. y Schimke, R.T. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7154-7158; Rothem, L., et al., Mol. Pharmacol. 68: 616-624). Tales células deficientes en RFC se utilizan para evitar que se supere la privación de ácido fólico por este otro sistema portador en este ejemplo.

Ejemplo 2.3: Transfección y selección

Las células C15 deficientes en RFC se transfectaron con el vector de ensayo por electroporación. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se propagaron las células en medio libre de ácido fólico suplementado con ácido fólico 30 nM con el fin de promover la expresión tanto del marcador indicador así como del anticuerpo recombinante y posteriormente se sometieron a clonación por dilución. Las células se diluyeron a una densidad final de 5

células/ml y se sembraron en placas de 96 pocillos a 100 μ l/pocillo (es decir 0,5 células/pocillo). Los clones se mantuvieron entonces en un medio que contenía 0,25 nM de ácido fólico y 500 μ g/ml de G418. La co-selección utilizando el sistema de folato de la presente invención junto con un sistema de selección adicional (es decir neo/G418) se aplicó para proporcionar una actuación óptima del proceso de selección. Los clones con mayores niveles de producción de anticuerpo se cultivaban entonces bajo concentraciones bajas de ácido fólico (es decir 1200 pM, 600 pM, y 60 pM) para mantener y establecer más la sobre-expresión de anticuerpo. Esto se corrobora por posteriores análisis de la expresión del anticuerpo en los distintos clones.

Ejemplo 2.4: Análisis de la producción de anticuerpos

El análisis de producción de anticuerpos se llevó a cabo en principio como se ha perfilado en el ejemplo 1.4 anterior. La concentración del anticuerpo segregado se controló utilizando un ensayo ELISA de la siguiente manera: Se recubrían microplacas Maxisorp con una IgG anti-humana. Tras el bloqueo con un tampón que contenía albúmina sérica bovina (BSA) y varios lavados, se añadieron múltiples diluciones de las muestras de anticuerpo segregado. Luego, se añadió un segundo anticuerpo conjugado con una peroxidasa que consistía en una anti-IgG humana de cabra-peroxidasa. Finalmente, se añadió un sustrato de peroxidasa colorimétrico tras lo cual se determinaba espectrofotométricamente la concentración de colorante resultante en cada pocillo y luego se comparaba con concentraciones de referencia de concentraciones de IgG conocidas.

2.5 Resultados

Como se presenta en la Tabla 3 posterior, los niveles de producción de anticuerpo recombinante se correlacionaba con la rigurosidad de privación de ácido fólico. Por lo tanto, los niveles de producción de anticuerpo aumentan según disminuye la concentración de ácido fólico en el medio. Estos resultados corroboran además la prueba del concepto de que el gen hFR alfa (hFR α) es un marcador indicador eficaz que se puede utilizar para la sobre-expresión de proteínas recombinantes bajo condiciones de privación de folatos.

Tabla 3: (C_{ácido fólico}: concentración de ácido fólico en el medio durante la selección; C_{mAb}: concentración del anticuerpo segregado en el medio)

C _{ácido fólico} (pM)	C _{mAb} (μ g/l)
60	216 \pm 30
600	138 \pm 15
1200	19 \pm 8

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novartis AG

<120> Compuestos orgánicos

<130> 52412-WO-PCT

<150> EP07150326.2

<151> 21-12-2007

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 257

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 546 086 T3

Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Val Trp Val
 1 5 10 15

Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu
 20 25 30

Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly
 35 40 45

Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala
 50 55 60

Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr
 65 70 75 80

Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys
 85 90 95

Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn
 100 105 110

Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg
 115 120 125

Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu
 130 135 140

Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp
 145 150 155 160

Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln
 165 170 175

Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile
 180 185 190

Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg
 195 200 205

Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu
 210 215 220

Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala
 225 230 235 240

Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu
 245 250 255

Ser

5 <210> 2
 <211> 255

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

5

```

Met Val Trp Lys Trp Met Pro Leu Leu Leu Leu Val Cys Val Ala
 1          5          10
Thr Met Cys Ser Ala Gln Asp Arg Thr Asp Leu Leu Asn Val Cys Met
 20          25          30
Asp Ala Lys His His Lys Thr Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu His
 35          40          45
Asp Gln Cys Ser Pro Trp Lys Lys Asn Ala Cys Cys Thr Ala Ser Thr
 50          55          60
Ser Gln Glu Leu His Lys Asp Thr Ser Arg Leu Tyr Asn Phe Asn Trp
 65          70          75
Asp His Cys Gly Lys Met Glu Pro Ala Cys Lys Arg His Phe Ile Gln
 85          90          95
Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln
 100         105         110
Gln Val Asn Gln Thr Trp Arg Lys Glu Arg Phe Leu Asp Val Pro Leu

```

115 120 125
Cys Lys Glu Asp Cys Gln Arg Trp Trp Glu Asp Cys His Thr Ser His
130 135 140
Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Arg Gly Trp Asp Trp Thr Ser Gly Val
145 150 155 160
Asn Lys Cys Pro Ala Gly Ala Leu Cys Arg Thr Phe Glu Ser Tyr Phe
165 170 175
Pro Thr Pro Ala Ala Leu Cys Glu Gly Leu Trp Ser His Ser Tyr Lys
180 185 190
Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe
195 200 205
Asp Ser Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala
210 215 220
Ala Ala Met His Val Asn Ala Gly Glu Met Leu His Gly Thr Gly Gly
225 230 235 240
Leu Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Gln Leu Trp Leu Leu Gly
245 250 255

<210> 3
<211> 245
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Met Asp Met Ala Trp Gln Met Met Gln Leu Leu Leu Leu Ala Leu Val
1 5 10
Thr Ala Ala Gly Ser Ala Gln Pro Arg Ser Ala Arg Ala Arg Thr Asp
20 25 30
Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Thr Gln Pro Ser
35 40 45
Pro Glu Asp Glu Leu Tyr Gly Gln Cys Ser Pro Trp Lys Lys Asn Ala
50 55 60
Cys Cys Thr Ala Ser Thr Ser Gln Glu Leu His Lys Asp Thr Ser Arg
65 70 75 80
Leu Tyr Asn Phe Asn Trp Asp His Cys Gly Lys Met Glu Pro Thr Cys

10

ES 2 546 086 T3

				85					90					95			
Lys	Arg	His	Phe	Ile	Gln	Asp	Ser	Cys	Leu	Tyr	Glu	Cys	Ser	Pro	Asn		
			100					105					110				
Leu	Gly	Pro	Trp	Ile	Arg	Gln	Val	Asn	Gln	Ser	Trp	Arg	Lys	Glu	Arg		
		115					120					125					
Ile	Leu	Asn	Val	Pro	Leu	Cys	Lys	Glu	Asp	Cys	Glu	Arg	Trp	Trp	Glu		
	130					135					140						
Asp	Cys	Arg	Thr	Ser	Tyr	Thr	Cys	Lys	Ser	Asn	Trp	His	Lys	Gly	Trp		
145					150					155					160		
Asn	Trp	Thr	Ser	Gly	Ile	Asn	Glu	Cys	Pro	Ala	Gly	Ala	Leu	Cys	Ser		
				165					170					175			
Thr	Phe	Glu	Ser	Tyr	Phe	Pro	Thr	Pro	Ala	Ala	Leu	Cys	Glu	Gly	Leu		
			180					185					190				
Trp	Ser	His	Ser	Phe	Lys	Val	Ser	Asn	Tyr	Ser	Arg	Gly	Ser	Gly	Arg		
		195					200					205					
Cys	Ile	Gln	Met	Trp	Phe	Asp	Ser	Ala	Gln	Gly	Asn	Pro	Asn	Glu	Glu		
	210					215					220						
Val	Ala	Lys	Phe	Tyr	Ala	Ala	Ala	Met	Asn	Ala	Gly	Ala	Pro	Ser	Arg		
225					230					235					240		
Gly	Ile	Ile	Asp	Ser													
				245													

REIVINDICACIONES

1. Un vector de expresión en eucariotas que comprende un primer polinucleótido que codifica un receptor funcional de folato unido a la membrana y un segundo polinucleótido que codifica un producto de interés, en donde el producto de interés es un polipéptido farmacéutica o terapéuticamente activo o de diagnóstico.
2. El vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el receptor funcional de folato unido a la membrana codificado por el primer polinucleótido se selecciona de entre el grupo que consiste en un receptor de folato alfa (FR α), un receptor de folato beta (FR β) y un mutante funcional de los mismos.
3. El vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el receptor funcional de folato unido a la membrana codificado por el primer polinucleótido es un receptor de folato alfa humano (hFR α).
4. Una célula eucariota para la que la viabilidad celular depende de la captación de folato, e introduciéndose en la célula eucariota de manera estable un primer polinucleótido localizado en un vector de expresión y que codifica un receptor funcional de folato unido a la membrana y un segundo polinucleótido localizado en un vector de expresión que codifica un producto de interés, en donde el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido están localizados en el mismo vector de expresión o en vectores de expresión separados y en donde el producto de interés es un polipéptido farmacéutica o terapéuticamente activo o de diagnóstico.
5. La célula eucariota de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicha célula carece de actividad completa de al menos un receptor funcional de folato unido a la membrana endógeno.
6. La célula eucariota de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en donde dicho primer polinucleótido que codifica un receptor funcional de folato unido a la membrana y dicho segundo polinucleótido que codifica un producto de interés se localizan en el mismo vector de expresión.
7. La célula eucariota de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde el vector de expresión es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
8. Un proceso de producción de una célula eucariota de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, comprendiendo dicho proceso proporcionar una célula eucariota para la que la viabilidad celular depende de la captación de folato, e introducir un primer polinucleótido localizado en un vector de expresión y que codifica el receptor funcional de folato unido a la membrana y un segundo polinucleótido localizado en un vector de expresión y que codifica el producto de interés, en donde el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido se localizan en el mismo vector de expresión o en vectores de expresión separados.
9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el vector de expresión es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
10. Un método de selección de una célula eucariota capaz de expresar de manera estable un producto de interés codificado por un vector de expresión que se ha introducido en la célula, que comprende
- (i) proporcionar una pluralidad de células eucariotas para las que la viabilidad celular depende de la captación de folato, e introduciéndose en las células un primer polinucleótido localizado en un vector de expresión y que codifica un receptor funcional de folato unido a la membrana y un segundo polinucleótido localizado en un vector de expresión y que codifica el producto de interés, en donde el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido están localizados en el mismo vector de expresión o en vectores de expresión separados,
- (ii) cultivar dicha pluralidad de células eucariotas en un medio de cultivo celular que tiene una concentración limitante de un folato, obteniendo de esta manera una célula eucariota en que se consigue la expresión estable del producto de interés.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende además la identificación y el aislamiento de una célula eucariota en la que se consigue la expresión estable del producto de interés.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en que la pluralidad de células eucariotas está compuesta de células eucariotas como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7.
13. Un proceso para la producción de un producto de interés, que comprende
- (i) llevar a cabo un método de selección de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12,
- (ii) y aislar el producto de interés de dicho medio de cultivo celular o de dicha célula.
14. El uso de un receptor funcional de folato unido a la membrana que se introduce por medio de un vector de expresión como un marcador de selección para la selección de una célula eucariota, para la que la viabilidad celular de la célula eucariota depende de la captación de folato, y en donde la célula eucariota expresa de manera estable

un producto recombinante de interés, en donde el producto de interés es un polipéptido farmacéutica o terapéuticamente activo o de diagnóstico.

- 5 15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el receptor de folato se selecciona de entre el grupo que consiste en el receptor de folato alfa ($FR\alpha$), el receptor de folato beta ($FR\beta$) y un mutante funcional de los mismos.