(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 587 630**

(51) Int. CI.:

C12N 15/79 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2010 PCT/EP2010/001224**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **02.09.2010 WO10097240**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2010 E 10711001 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2401377**

(54) Título: **Sistema de vector de expresión que comprende dos marcadores de selección**

(30) Prioridad:

27.02.2009 EP 09153995

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.10.2016

(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

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 vector de expresión que comprende dos marcadores de selección

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un sistema de selección novedoso adecuado para seleccionar células hospedadoras, en particular células hospedadoras de mamífero, que expresen un producto de interés. Este sistema de selección se basa en el uso de al menos dos marcadores de selección (sm I y sm II), en donde la actividad del marcador de selección (sm I) o (sm II) está al menos parcialmente influenciada por la actividad del otro marcador de selección. La invención proporciona vectores de expresión, células hospedadoras y métodos adecuados para seleccionar células hospedadoras que expresen un producto de interés con un alto rendimiento. Adicionalmente, la presente invención se refiere a un método para producir de una manera eficiente polipéptidos con un alto rendimiento.

Antecedentes de la invención

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 escenario 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-expresar en una célula hospedadora y posteriormente se aíslan y purifican.

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 postraduccionales 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 la capacidad para llevar a cabo el plegamiento adecuado de la proteína, la compleja glucosilación N-enlazada y la auténtica glucosilación O-enlazada, así como un amplio espectro de otras modificaciones postraduccionales. 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.

La estrategia más común para obtener células hospedadoras 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 hospedadora y proporciona al menos un marcador de selección para generar la línea celular recombinante. Los elementos clave 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 escisión del ARNm y poliadenilación, un terminador de transcripción y marcadores de selección para la preparación de líneas celulares estables y para la amplificación genética; adicionalmente se pueden proporcionar un origen de replicación procariótico y marcadores de selección para la propagación del vector en bacterias mediante el vector de expresión.

En los últimos años, el enfoque del desarrollo se ha concentrado en el diseño de vectores mejorados para la expresión génica en hospedadores y en particular en células de mamífero. A pesar de la gran cantidad de vectores disponibles, sin embargo, todavía es compleja la producción robusta de polipéptidos/proteínas con un alto rendimiento en células de mamífero.

El documento WO 2004/081167 divulga vectores de expresión que comprenden el gen mCMV-IE2 y también en seña una serie de posibles marcadores de selección que pueden usarse para la selección. Rothem et al. (Molecular Pharmacology, Vol. 68; 616-624, 2005) describen que el gen de portador de folato reducido puede usarse como marcador de selección. Zhu et al. (Journal of Cellulas Biochemistry 81; 205-219 (2001)) analiza el cambio en el nivel de expresión del receptor alfa de folato endógeno en respuesta a cambios en la concentración de folato en el medio de cultivo.

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 hospedadoras. Sin embargo, la integración estable en el genoma es un suceso raro y solamente un pequeño subconjunto de células establemente transfectadas son altas productoras.

Los marcadores de selección 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 hospedadoras 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 de selección respectivos y los sistemas de selección es introducir un gen de selección que, después de su exposición a condiciones de crecimiento selectivas, permita hacer la identificación de las células capaces de tener un alto nivel de producción de los productos recombinantes 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 para una enzima, tal como dihidrofolato reductasa (DHFR) o glutamina sintetasa (GS) en conjunto con vectores de expresión que contengan genes que codifiquen estas enzimas marcadoras de selección y agentes tales como metotrexato (MTX), que inhibe la dihidrofolato reductasa (DHFR) y la metionina-sulfoxamina (MSX) que inhibe la glutamina sintetasa (GS). También se pueden utilizar formas mutantes más sensibles de los marcadores de selección respectivos en conjunto con las células de tipo silvestre. Utilizando vectores de expresión que contengan el gen recombinante bajo el control de un promotor fuerte y genes que codifiquen marcadores de selección, tales como dihidrofolato reductasa (DHFR) o glutamina sintetasa (GS), primero se obtienen transfectantes DHFR+ (más) o GS+ (más), respectivamente y entonces se logra la amplificación genética haciendo crecer los transfectantes en concentraciones progresivamente crecientes de MTX o MSX. El objetivo de proporcionar esta presión de selección es aislar las células que expresen los marcadores de selección y, por consiguiente, el producto de interés, con un alto rendimiento.

Por consiguiente, es crucial un sistema de selección de alta rigurosidad para enriquecer las células de alta producción a partir de la población transfectada. Cuanto 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.

Es el objeto de la presente invención proporcionar un sistema de selección riguroso para seleccionar células hospedadoras que produzcan un producto de interés, con un alto rendimiento, así como vectores de expresión y células hospedadoras adecuadas.

Sumario de la invención

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

De acuerdo con una realización, la presente invención se refiere a un vector de expresión o a una combinación de al menos dos vectores de expresión, que comprende al menos:

(a) un polinucleótido que codifica un producto de interés o un sitio de inserción para incorporar un polinucleótido que codifique un producto de interés;
(b) un polinucleótido que codifica un primer marcador de selección (sm I);
(c) un polinucleótido que codifica un segundo marcador de selección (sm II), el cual difiere del primer marcador de selección (sm I),

en donde la actividad del marcador de selección (sm I) o (sm II) está al menos parcialmente influenciada por la actividad del otro marcador de selección y en donde los marcadores de selección (sm I) y (sm II) están involucrados en el metabolismo de folato y en donde el primer marcador de selección (sm I) es un transportador de folato y el segundo marcador de selección (sm II) es DHFR o una variante funcional de la misma.

La presente invención se refiere además a una célula hospedadora, en particular a una célula hospedadora de mamífero, la cual comprende al menos:

(a) un polinucleótido introducido que codifica un producto de interés;
(b) un polinucleótido introducido que codifica un primer marcador de selección (sm I);
(c) un polinucleótido introducido que codifica un segundo marcador de selección (sm II), el cual difiere del primer marcador de selección (sm I);

en donde la actividad del marcador de selección (sm I) o (sm II) está al menos parcialmente influenciada por la actividad del otro marcador de selección y en donde los marcadores de selección (sm I) y (sm II) están involucrados en el metabolismo de folato y en donde el primer marcador de selección (sm I) es un transportador de folato y el segundo marcador de selección (sm II) es DHFR o una variante funcional de la misma.

Adicionalmente, se proporciona un método para seleccionar al menos una célula hospedadora capaz de expresar un producto de interés, el cual comprende:

(a) proporcionar una pluralidad de células hospedadoras, las cuales comprenden al menos:

(i) un polinucleótido introducido que codifica un producto de interés;
(ii) un polinucleótido introducido que codifica un primer marcador de selección (sm I);
(iii) un polinucleótido introducido que codifica un segundo marcador de selección (sm II); el cual difiere del primer marcador de selección (sm I);

en donde la actividad del marcador de selección (sm I) o (sm II) está al menos parcialmente influenciada por la actividad del otro marcador de selección y en donde los marcadores de selección (sm I) y (sm II) están involucrados en el metabolismo de folato y en donde el primer marcador de selección (sm I) es un transportador de folato y el segundo marcador de selección (sm II) es DHFR o una variante funcional de la misma;

(b) cultivar la pluralidad de células hospedadoras mencionada en condiciones de crecimiento selectivas para los marcadores de selección (sm I) y (sm II), obteniendo de esta manera una célula hospedadora que expresa el producto de interés.

También se proporciona un medio de cultivo selectivo en el método de selección de acuerdo con la presente invención, el cual comprende folato en una concentración limitante y un anti-folato. Un “medio de cultivo selectivo” es un medio de cultivo celular útil para la selección de las células hospedadoras.

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

La invención también se refiere al uso de un primer marcador de selección (sm I) en combinación con un segundo marcador de selección (sm II), el cual difiere del primer marcador de selección (sm I). La actividad del marcador de selección (sm I) o (sm II) está al menos parcialmente influenciada por la actividad del otro marcador de selección, para seleccionar una célula hospedadora eucariótica, en particular una célula hospedadora de mamífero, que exprese un producto de interés, en donde el primer marcador de selección (sm I) es un transportador de folato y el segundo marcador de selección (sm II) es DHFR o una variante funcional de la misma.

La estrategia de la presente invención de usar dos marcadores de selección (sm I) y (sm II), tal como se especifica en las reivindicaciones, da como resultado condiciones de selección muy rigurosas. El metabolismo del folato es una vía metabólica esencial que es crucial para la supervivencia celular y el crecimiento celular. Ya que la actividad del marcador de selección (sm I) influencia la actividad del otro marcador de selección y ambos marcadores de selección están implicados en el metabolismo del folato, el metabolismo del folato funciona en condiciones de cultivo selectivas solo eficaces si ambos marcadores de selección (sm I) y (sm II) se expresan en cantidades suficientes y, por consiguiente, se expresan con un alto rendimiento en la célula hospedadora receptora. De esta manera, se incrementa notoriamente la presión de selección sobre las células hospedadoras. El marcador de selección (sm I) es o comprende un polipéptido transportador que incorpora un folato en la célula hospedadora. El marcador de selección (sm II) es un polipéptido catalítico que procesa como sustrato el folato incorporado por el marcador de selección (sm I) o un producto posterior obtenido o generado a partir del folato importado. El marcador de selección (sm II) es DHFR o una variante funcional de la misma. Se cree que el segundo marcador de selección (sm II) funciona con una mayor eficacia o con una mayor tasa de renovación si el transportador de folato (sm I) incorpora suficientes cantidades de folato al interior de las células hospedadoras. Sin quedar ligados a la teoría, se cree que una fuerte expresión del transportador de folato como el primer marcador de selección (sm I) permite que las células hospedadoras importen más folato desde el medio de cultivo hacia esa célula y, por consiguiente, permite que las células hospedadoras toleren concentraciones más bajas de folato en el medio de cultivo. Una fuerte expresión del transportador de folato (sm I) da como resultado que se importe suficiente sustrato para la enzima DHFR (sm II) (o precursor de este sustrato) hacia la célula hospedadora y, por consiguiente, que esté disponible para la enzima DHFR (sm II). Por consiguiente, la actividad de la enzima DHFR (sm II) está influenciada por la actividad del transportador de folato (sm I), debido a que la actividad de la enzima DHFR (sm II) depende de que se importen cantidades suficientes de folato hacia la célula hospedadora mediante el transportador de folato (sm I). Por consiguiente, se mantiene/se aumenta la viabilidad celular en el caso de que la célula hospedadora exprese fuertemente el primer marcador de selección (sm I) y, por consiguiente, importa cantidades suficientes de folato hacia dentro de la célula con el objeto de mantener activo el metabolismo de folato, inclusive si la concentración de folato en el medio de cultivo es muy baja. Debido a la actividad del transportador de folato (sm I), aumenta la disponibilidad del sustrato para la enzima DHFR (sm II). El medio de cultivo selectivo puede comprender un inhibidor de la enzima DHFR (sm II), por ejemplo, un competidor de su sustrato real. Las células que expresan fuertemente la enzima DHFR (sm II) toleran concentraciones más altas de este inhibidor, en especial en altas concentraciones de sustrato, siendo esta concentración al menos parcialmente dependiente de la actividad del transportador de folato

utilizado como marcador de selección (sm I). Este acoplamiento de la actividad/funcionalidad de los marcadores de selección (sm I) y (sm II) tiene el efecto de que aumenta considerablemente la viabilidad y/o la velocidad de crecimiento de la célula hospedadora en condiciones de cultivo selectivas, si se expresan fuertemente ambos marcadores de selección (sm I) y (sm II). Las células hospedadoras sobreviven/proliferan de esta manera, a pesar de que las condiciones de cultivo selectivas puedan mantener activo el metabolismo de folato suficientemente para permitir la supervivencia y el crecimiento celular.

El diseño único del sistema de expresión de acuerdo con la presente invención proporciona un sistema de selección muy riguroso que permite el enriquecimiento de las células de alta producción a partir de la población de células hospedadoras 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 y aumenta la oportunidad de encontrar los muy raros clones de ultra-alta producción. Esto aumenta la productividad de la población celular que sobreviva a la selección. Los ejemplos muestran que las células hospedadoras obtenidas con el sistema de selección de acuerdo con la presente invención producen el producto de interés con un alto rendimiento. También se incrementa la productividad promedio de los clones productores individuales. Por consiguiente, el sistema de selección de acuerdo con la presente invención aumenta las oportunidades de encontrar clones de alta producción con esfuerzos de rastreo más bajos.

Las suposiciones anteriores reflejan el entendimiento actual del mecanismo subyacente, pero, sin embargo, no son vinculantes debido a que puede haber otras explicaciones para la dependencia/el incremento observado en la presión de selección cuando se utilizan los marcadores de selección (sm I) y (sm II) como se han descrito anteriormente. Adicionalmente, como también se ilustra en la descripción detallada, el principio general de la presente invención también es aplicable a otros procesos o vías metabólicas y otros marcadores de selección (sm I) y (sm II). Sin embargo, es importante que la actividad del marcador de selección (sm I) o (sm II) esté al menos parcialmente influenciada por y en particular dependa de, la actividad del otro marcador de selección, con el objeto de aumentar la presión de selección. Por consiguiente, otros objetos, características, ventajas y aspectos de la presente solicitud llegarán a ser evidentes para los expertos en la materia 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 realizaciones preferidas de la solicitud, se proporcionan con fines ilustrativos solamente. Serán fácilmente evidentes diferentes cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención divulgada para los expertos en la materia a partir de la lectura de lo siguiente.

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un vector de expresión o una combinación de al menos dos vectores de expresión, que comprende al menos:

(a) un polinucleótido que codifica un producto de interés o un sitio de inserción para incorporar un polinucleótido que codifique un producto de interés;
(b) un polinucleótido que codifica un primer marcador de selección (sm I);
(c) un polinucleótido que codifica un segundo marcador de selección (sm II), el cual difiere del primer marcador de selección (sm I),

en donde la actividad del marcador de selección (sm I) o (sm II) está al menos parcialmente influenciada por la actividad del otro marcador de selección y en donde los marcadores de selección (sm I) y (sm II) están implicados en el metabolismo de folato y en donde el primer marcador de selección (sm I) es un transportador de folato y el segundo marcador de selección (sm II) es DHFR o una variante funcional de la misma.

Un “marcador de selección” (sm), el cual se expresa por el polinucleótido introducido permite, en condiciones de cultivo selectivas apropiadas, la selección de células hospedadoras que expresen ese marcador de selección. Un marcador de selección es preferentemente una biomolécula, en particular un polipéptido. Los marcadores de selección adecuados se describen con detalle más adelante. El primer marcador de selección (sm I) es un transportador de folato y el segundo marcador de selección (sm II) es DHFR o una variante funcional de la misma.

Un “vector”, de acuerdo con la presente invención, es un polinucleótido capaz de portar al menos un fragmento de polinucleótido. Un vector funciona como un portador molecular, suministrando fragmentos de ácidos nucleicos, respectivamente polinucleótidos, a una célula hospedadora. Puede comprender al menos un casete de expresión, el cual comprende secuencias reguladoras para expresar apropiadamente un polinucleótido incorporado en el mismo. Los polinucleótidos (por ejemplo, que codifiquen el producto de interés o los marcadores de selección) que se van a introducir en la célula, se pueden insertar dentro de los casetes de expresión del vector con el objeto de expresarse a partir de los mismos. El vector de acuerdo con la presente invención puede estar presente en una forma circular o lineal (linearizada) y también abarca fragmentos de vectores. El término “vector” también comprende cromosomas artificiales o polinucleótidos respectivos similares que permitan la transferencia de fragmentos de ácidos nucleicos exógenos.

Un “polinucleótido” es un polímero de nucleótidos que usualmente se enlazan a partir de una desoxirribosa o ribosa a otro 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.

Un “polinucleótido introducido” se refiere a un polinucleótido que se ha introducido en una célula hospedadora, por ejemplo, mediante el uso de técnicas recombinantes, tales como transfección. La célula hospedadora puede o no comprender un polinucleótido endógeno correspondiente a, respectivamente, que es idéntico a, el 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 hospedadora (transfección estable). Los vectores adecuados que permiten la introducción de polinucleótidos en la célula hospedadora, se describen con detalle más adelante. En el caso de que el polinucleótido introducido no se inserte en el genoma, el polinucleótido introducido 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 hospedadora 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 hospedadora, los cuales se describen con mayor detalle más adelante.

Un “producto de interés” se refiere al producto que se va a expresar en la célula hospedadora. El producto de interés puede ser, por ejemplo, un polipéptido o un polinucleótido, tal como ARN. Preferentemente, el producto de interés es un polipéptido, en particular una molécula de inmunoglobulina. Los ejemplos se describen más adelante.

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

La característica de que la “actividad del marcador de selección (sm I) o (sm II) es al menos parcialmente influenciado por la actividad del otro marcador de selección”, significa en particular que la actividad de un marcador de selección está influenciada por y/o depende al menos hasta cierto grado directa o indirectamente de la actividad, respectivamente, función del otro marcador de selección (y opcionalmente *viceversa*). “Actividad” en este contexto, describe en particular cualquier función o acción del marcador de selección que proporcione, promueva y/o aumente la resistencia a la presión selectiva, e incluye, pero no se limita a, la actividad catalítica, el índice de renovación, el índice de reacción cinética y/o el índice de transportación del marcador de selección. Esta dependencia/interacción de los marcadores de selección (sm I) y (sm II) puede aumentar considerablemente la presión de selección sobre las células hospedadoras en condiciones de cultivo selectivas. Preferentemente, el marcador de selección (sm I) y el marcador de selección (sm II) están involucrados en el mismo proceso o vía metabólica o en un proceso o vía metabólica en concierto esencial para la viabilidad o proliferación celular. Los ejemplos adecuados de los marcadores de selección (sm I) y (sm II) y de los procesos y vías metabólicas se describen con detalle más adelante.

Posteriormente, los presentes inventores describen las realizaciones y ventajas del vector de expresión o de las combinaciones de vectores de expresión de acuerdo con la presente invención. Cuando sea apropiado, describimos estas ventajas en conjunto con el uso de estos vectores de expresión en la selección de células hospedadoras que expresen el producto de interés.

De acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, la actividad del marcador de selección (sm I) o (sm II) está influenciada por, y, por consiguiente, es al menos parcialmente dependiente de, la actividad del otro marcador de selección, en condiciones de cultivo selectivas para ambos marcadores de selección. Tal como se especifica en las reivindicaciones, el primer marcador de selección (sm I) es un transportador de folato y el segundo marcador de selección (sm II) es DHFR o una variante funcional de la misma. Debido a esta interacción de los marcadores de selección (sm I) y (sm II), se incrementa la presión selectiva sobre las células hospedadoras. Debido a su diseño único, se proporciona un sistema de selección muy riguroso que permite el enriquecimiento de las células de alta producción a partir de la población de células hospedadoras 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 y aumenta la oportunidad de encontrar los muy raros clones de ultra-alta producción.

Los marcadores de selección (sm I) y (sm II) tal como se especifica en las reivindicaciones están ambos involucrados en el mismo proceso metabólico que es preferentemente esencial para la viabilidad y/o proliferación celular; por ejemplo, la síntesis de ácidos nucleicos o polipéptidos. Por consiguiente, cuando el vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión se introduce en la célula hospedadora receptora, la actividad/presencia de los marcadores de selección (sm I) y (sm II) en conjunto con las condiciones de cultivo selectivas tienen influencia sobre/atacan al mismo proceso metabólico de la célula hospedadora receptora. Por consiguiente, la actividad de los marcadores de selección (sm I) y (sm II) tiene influencia uno sobre el otro dentro de dicho proceso metabólico, aumentando de esta manera la presión de selección sobre la célula hospedadora. Las

células hospedadoras sobreviven/proliferan en condiciones de cultivo selectivas que, a pesar de que las condiciones de cultivo selectivas, pueden mantener el proceso metabólico suficientemente activo para permitir la supervivencia y el crecimiento celular. La supervivencia/el crecimiento se promueve si las células hospedadoras expresan ambos marcadores de selección (sm I) y (sm II) y, por consiguiente, los vectores de expresión introducidos con un alto rendimiento. De esta manera, se seleccionan células hospedadoras que también expresen el producto de interés, con un alto rendimiento.

Un “proceso metabólico” describe en particular un proceso en la célula hospedadora, el cual es esencial para la viabilidad celular y/o la proliferación celular. Los ejemplos de los procesos metabólicos son la síntesis de ácidos nucleicos o la síntesis de polipéptidos. Una “vía metabólica” se refiere en particular a un subgrupo de un proceso metabólico y describe una serie definida de reacciones químicas que se presentan dentro de una célula. En cada vía, un producto químico principal se modifica mediante reacciones químicas. Un ejemplo clásico de una vía metabólica es la síntesis de nucleótidos (perteneciente al proceso metabólico de la síntesis de ácidos nucleicos), en particular la biosíntesis de purina o pirimidina o la síntesis de aminoácidos (perteneciente al proceso metabólico de la síntesis de polipéptidos). Hay varios niveles de vías metabólicas, que con frecuencia son también interdependientes y, por consiguiente, están conectadas. Por consiguiente, estos términos se deben entender más bien funcionalmente como las vías metabólicas individuales y también los procesos metabólicos con frecuencia se traslapan.

El primer marcador de selección (sm I) y el segundo marcador de selección (sm II) están implicados en el metabolismo del folato.

El metabolismo del folato es importante para mantener la viabilidad celular de la célula hospedadora y/o para la proliferación de las células hospedadoras. Por lo tanto, el metabolismo del folato es un punto funcional adecuado para el sistema de selección de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, esta vía metabólica es muy adecuada para seleccionar los marcadores de selección adecuados, (sm I) y (sm II) tal como se describe en el presente documento y condiciones de selección adecuadas que permitan la selección de células hospedadoras que expresen dichos marcadores. Se conocen en la técnica anterior marcadores de selección adecuados involucrados en las vías metabólicas respectivas, así como células hospedadoras adecuadas y condiciones de selección adecuadas y se describen a continuación y, por lo tanto, pueden usarse conjuntamente con la presente invención.

De acuerdo con una realización, el primer marcador de selección (sm I) y/o el segundo marcador de selección (sm II) es un marcador de selección eucariótico. Un “marcador de selección eucariótico” permite la selección de las células hospedadoras eucarióticas, que comprende, respectivamente, expresar ese marcador de selección. El marcador de selección eucariótico puede ser un marcador de selección metabólico y, por consiguiente, un marcador que está involucrado en un proceso o vía metabólica de la célula, por ejemplo, síntesis de ácidos nucleicos o de polipéptidos.

El segundo marcador de selección (sm II) que es DHFR o una variante funcional de la misma, es un marcador de selección amplificable. Un marcador de selección amplificable permite la selección de células hospedadoras que contienen al vector y promueve la amplificación génica.

El primer marcador de selección (sm I) y/o el segundo marcador de selección (sm II) puede ser un polipéptido catalítico o un polipéptido transportador. Existen muchos marcadores de selección adecuados respectivos que se puede utilizar en conjunto con la presente invención y se explicarán con detalle más adelante.

El segundo marcador de selección (sm II), que es DHFR o una variante funcional de la misma, es un polipéptido catalítico que procesa un sustrato que es un compuesto que se incorpora por el primer marcador de selección (sm I), que es un transportador de folato, hacia el interior de la célula hospedadora o un producto posterior obtenido a partir de dicho compuesto incorporado.

Por consiguiente, el marcador de selección (sm II) procesa un sustrato que se importa hacia el interior de la célula hospedadora por la actividad del primer marcador de selección (sm I). Dicho compuesto que se incorpora dentro de la célula hospedadora por el primer marcador de selección (sm I) también puede ser un precursor del sustrato real que se procesa por el segundo marcador de selección (sm II). Por lo tanto, el polipéptido catalítico (sm II) también puede procesar que es un producto posterior obtenido a partir del compuesto que se incorpora en la célula hospedadora por la actividad del primer marcador de selección (sm I).

Sin quedar ligados a la teoría, se asume que la actividad del segundo marcador de selección (sm II) depende fuertemente de la actividad del primer marcador de selección (sm I) en condiciones de cultivo selectivas para ambos marcadores. La presencia y/o la cantidad de sustrato para el segundo marcador de selección (sm II) depende al menos hasta cierto grado de la expresión/actividad apropiada del marcador de selección (sm I). La fuerte sobre-expresión del primer marcador de selección (sm I) conduce a una disponibilidad más alta de sustrato para el segundo marcador de selección (sm II). La mayor biodisponibilidad del sustrato aumenta la actividad del segundo marcador de selección (por ejemplo, el índice de renovación). Sin embargo, si el marcador de selección (sm I) no se

expresa con un rendimiento suficiente, no se genera sustrato o se genera menos sustrato para el marcador de selección (sm II), cuya actividad, por consiguiente, también disminuye.

El primer marcador de selección (sm I) es un polipéptido transportador responsable de introducir/incorporar un compuesto a partir del medio de cultivo en la célula hospedadora, el cual es el sustrato o un precursor de un sustrato del segundo marcador de selección (sm II). Dicho compuesto es esencial para la viabilidad y/o proliferación celular. Se cree que el segundo marcador de selección (sm II) opera con una eficiencia o índice de renovación más alto si el primer marcador de selección (sm I) incorpora cantidades suficientes del compuesto mencionado en las células hospedadoras. Sin quedar ligados a la teoría, se cree que la fuerte sobre-expresión del primer marcador de selección (sm I) permite que las células hospedadoras importen más del compuesto mencionado desde el medio de cultivo hacia esa célula y, por consiguiente, permite que las células hospedadoras toleren concentraciones más bajas del compuesto mencionado en el medio de cultivo. Esto también conduce a una disponibilidad más alta del compuesto mencionado y, por consiguiente, del sustrato (o precursor de este sustrato) del segundo marcador de selección (sm II) en la célula hospedadora. Esta suposición refleja el entendimiento actual del mecanismo subyacente, pero, sin embargo, no es vinculante, debido a que puede haber otras explicaciones para la dependencia/el incremento observado en la presión de selección.

La actividad de los marcadores de selección (sm I) o (sm II) tiene influencia sobre la actividad del otro marcador de selección y ambos se dirigen al mismo proceso o vía metabólica o a una concernida, por ejemplo, el metabolismo de folato, que, por consiguiente, funciona más efectivamente en condiciones de cultivo selectivas, si ambos marcadores de selección se expresan en cantidades suficientes y, por consiguiente, se expresan con un alto rendimiento en la célula hospedadora. Esto da como resultado condiciones de selección altamente rigurosas.

El primer marcador de selección (sm I) opera corriente arriba del segundo marcador de selección (sm II). Esto significa que el primer marcador de selección (sm I) opera al inicio de dicha vía y el segundo marcador de selección (sm II) opera corriente abajo del marcador de selección (sm II).

El primer marcador de selección (sm I) es o comprende un polipéptido transportador. Un “polipéptido transportador” es en particular un polipéptido que media la transferencia de un compuesto de un compartimiento a otro, en particular del medio de cultivo a la célula hospedadora. Los ejemplos de polipéptidos transportadores adecuados incluyen polipéptidos receptores, canales y transportadores.

Como polipéptido transportador, dicho marcador de selección (sm I) importa un compuesto hacia dentro de la célula hospedadora que está implicado en y/o que es esencial para la viabilidad o proliferación celular de la célula hospedadora. Por consiguiente, la viabilidad o proliferación celular depende, al menos parcialmente, de la importación del compuesto mencionado hacia dentro de la célula hospedadora. El segundo marcador de selección (sm II) utilizado en combinación con el polipéptido transportador (sm I) es preferentemente una enzima que está involucrada en una vía o proceso metabólico que es dependiente/está influenciado por la actividad transportadora del primer marcador de selección (sm I), a medida que hace uso, por ejemplo, del compuesto importado o de un producto posterior del mismo. La actividad y, en particular, el índice de renovación del segundo marcador de selección (sm II) depende, al menos parcialmente, de la actividad del polipéptido transportador (sm I), el cual importa el compuesto mencionado hacia dentro de la célula hospedadora. En conjunto con esta realización, se puede utilizar un medio de cultivo selectivo que comprenda una concentración limitante del compuesto mencionado que sea importado por el polipéptido transportador (sm I) hacia dentro de la célula hospedadora.

Una “concentración limitante” se refiere a una concentración del compuesto mencionado en el medio de cultivo selectivo que proporciona una presión selectiva sobre la célula hospedadora. Por consiguiente, el compuesto mencionado no está comprendido en el medio de cultivo selectivo en afluencia, proporcionando de esta manera una presión de selección sobre las células hospedadoras. Por consiguiente, el medio de cultivo selectivo, por ejemplo, se puede privar de, respectivamente, puede contener, bajas cantidades del compuesto mencionado que es incorporado/ transportado por el polipéptido transportador (sm I) hacia dentro de la célula.

Por consiguiente, se mantiene/se aumenta la viabilidad celular en el caso de que la célula hospedadora sobre-exprese el primer marcador de selección (sm I) y, por consiguiente, importe cantidades suficientes del compuesto mencionado hacia dentro de la célula, con el objeto de mantener activa la vía metabólica concernida, inclusive si la concentración del compuesto mencionado en el medio de cultivo es muy baja. Si aumenta la expresión y, por consiguiente, la actividad del polipéptido transportador (sm I), se incrementa la disponibilidad del sustrato para el segundo marcador de selección (sm II), que es DHFR o una variante funcional de la misma. El medio de cultivo selectivo puede comprender un inhibidor de dicho segundo marcador de selección (sm II), por ejemplo, un competidor del sustrato real del segundo marcador de selección (sm II). Las células que sobre-expresan fuertemente el segundo marcador de selección (sm II), toleran concentraciones más altas de este inhibidor, en especial en altas concentraciones de sustrato (el cual es al menos parcialmente dependiente de la actividad del marcador de selección (sm I)). Esto tiene el efecto de que aumenta considerablemente la viabilidad de la célula hospedadora en condiciones selectivas, si se expresan fuertemente ambos marcadores de selección (sm I) y (sm II). De este modo, aumenta el índice de expresión del producto de interés. Por lo tanto, el acoplamiento de la actividad/funcionalidad de

los marcadores de selección (sm I) y (sm II) da como resultado condiciones de selección muy restrictivas que permiten la selección de clones celulares de alta, así como de ultra alta expresión.

El primer marcador de selección (sm I) y el segundo marcador de selección (sm II) están involucrados en el metabolismo 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 es útil dentro de la presente invención siempre que tal folato sea capaz de absorberse dentro de una célula hospedadora, en particular una célula hospedadora de mamífero. El folato oxidado, es decir, 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 THF son particularmente cruciales para la replicación del ADN y, por consiguiente, para la proliferación celular. De una manera específica, los co-factores de THF funcionan como donadores de unidades de un átomo de carbono en una serie de vías 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 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 folatos reducidos son ácido 5-metil-tetrahidrofólico, ácido 5-formil-tetrahidrofólico, ácido 10-formil-tetrahidrofólico y ácido 5,10-metilen-tetrahidrofólico.

En contraste con la mayoría de los procariotas, las plantas y hongos que sintetizan sus propios folatos, los mamíferos y otras especies eucarióticas están desprovistas de la biosíntesis del co-factor de 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:

a) El sistema de transporte celular predominante de co-factores de folato reducido es el portador de folato reducido (RFC). El portador de folato reducido (RFC) (también conocido como miembro 1 de la familia portadora de soluto 19, SLC19A1) es una glicoproteína de membrana de aproximadamente 85 kDa ubicuamente expresada que funciona como un portador facilitativo bidireccional que media el transporte hacia arriba de los folatos reducidos mediante el intercambio de los fosfatos orgánicos, tales como los nucleótidos de adenina, que se sabe que se acumulan hasta niveles intracelulares muy altos, así como mono- y piro-fosfato de tiamina. El portador de folato reducido (RFC) exhibe una alta afinidad por los co-factores de tetrahidrofolato (THF), incluyendo leucovorina (5-formil-THF; Kt = 1 µM), mientras que tiene una afinidad de transporte solamente muy pobre (Kt = de 200 a 400 µM) por el ácido fólico, un folato oxidado.

b) Otra ruta de absorción de folato es el transportador de folato acoplado con protones (PCFT, también conocido como SLC46A), el cual se ha clonado recientemente. El transportador de folato acoplado con protones (PCFT) parece expresarse independientemente del portador de folato reducido (RFC), funciona óptimamente a un pH ácido (5,5) y media el influjo de los co-factores tanto oxidados (por ejemplo, ácido fólico), como de tetrahidrofolato (THF) (es decir, folatos reducidos), así como diferentes anti-folatos hidrófilos, incluyendo MTX. El transportador de folato acoplado con protones (PCFT), que muestra un transporte óptimo de folatos y anti-folatos a un pH ácido (5,5), pero ninguno a un pH fisiológico (7,4), tiene una función clave en la absorción tanto de folatos como de anti-folatos en el intestino delgado superior.

c) La tercera ruta de transporte involucra los receptores de folato (FR). Los receptores de folato (FR) son glicoproteínas de enlace de folato de alta afinidad codificadas por tres genes distintos FR alfa, FR beta y FR gamma. FR alfa también es conocido como proteína de enlace de folato de adultos o FDP, como el receptor de folato 1 o FOLR (en ratones folbp1) y como el antígeno asociado con cáncer de ovario o MOv 18. FR beta también es conocido como FOLR2 (fetal) y como FBP/PL-1 (placenta). FR gamma también es conocido como FOLR3 y como FR-G (revisado por M.D. Salazar y M. Ratnam, Cancer Metastasis Rev. 2007 26(1), páginas 141-52.). Los receptores de folato (FRs) maduros, los cuales están bien caracterizados, son proteínas homólogas con de aproximadamente el 70 al 80 por ciento de identidad de aminoácidos y que contienen de 229 a 236 aminoácidos, así como de dos a tres sitios de N-glucosilación. FR alfa y FR beta, son glicoproteínas de superficie celular enlazadas a membrana, en particular, ancladas a glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), mientras que FR gamma está desprovisto de un ancla de GPI y es una proteína secretada. FR alfa y FR beta exhiben una alta afinidad por el ácido fólico (Kd = de 0,1 a 1 nM), por el ácido 5,10-didesaza-tetrahidrofólico (DDATHF; lometrexol; Ki = de 0,4 a 1,3 nM utilizando [^{3}H]ácido fólico como un sustrato) y por el BGC945 (el cual es un inhibidor de timidilato sintasa basado en ciclopenta-[g]-quinazolina específicamente transportado de manera exclusiva por medio de FR alfa y no por medio del portador de folato reducido) (Kd = 1 nM), pero una afinidad mucho más baja por el MTX (Kd >100 nM). La absorción dependiente del receptor de folato (FR) de los folatos y anti-folatos, procede por medio de un mecanismo clásico de endocitosis mediada por el receptor.

El primer marcador de selección (sm I) es un polipéptido transportador, el cual importa al menos un folato a partir del medio de cultivo hacia dentro de la célula hospedadora. En general, un folato es útil dentro de la presente invención

siempre que este folato sea capaz de absorberse dentro de una célula hospedadora, en particular una célula hospedadora de mamífero, mediante el primer marcador de selección (sm I).

De acuerdo con una realización, el primer marcador de selección (sm I) es o comprende el portador de folato reducido (RFC) o una variante funcional o un fragmento del mismo. RFC es una glicoproteína de membrana expresada de manera ubicua que sirve como el principal transportador para la absorción de los folatos reducidos, tales como 5-metil-THF y 5-formil-THF, hacia dentro de la célula. Sin embargo, RFC exhibe una afinidad muy pobre por el folato oxidado, el ácido fólico. Por consiguiente, las células que carecen de la expresión de RFC que se han suprimido del *locus* de RFC genómico, pueden servir como receptoras para la transfección de RFC del gen marcador de selección (como (sm I)) en condiciones en donde los folatos reducidos, tales como 5-formil-THF, se privan gradualmente del medio de cultivo, forzando de esta manera a las células para expresar mayores niveles de este transportador de folato.

De acuerdo con una realización preferida, la cual también se describe con detalle en la sección de ejemplos, el primer marcador de selección (sm I) es o comprende un polipéptido transportador de folato y, preferentemente, es un receptor de folato funcional. El uso de un receptor de folato o de una variante funcional o de un fragmento del mismo, tiene varias ventajas sobre el uso del sistema de selección de RFC. No es necesario utilizar células en donde se ha eliminado genéticamente o inactivado el *locus* de FR endógeno mediante la eliminación genética dirigida o mediante mutaciones de pérdida de función. Adicionalmente, RFC tiene una pobre afinidad de transporte por el ácido fólico y, por consiguiente, este folato oxidado no se puede utilizar en el medio de cultivo para la selección. Sin embargo, el ácido fólico puede ser procesado por el receptor de folato. Adicionalmente, el sistema de selección basado en el receptor de folato es un sistema de absorción de folato unidireccional en donde RFC es un transportador de folato bi-direccional que exhibe importación y exportación de folatos igualmente potentes. Por consiguiente, el uso del receptor de folato tiene varias ventajas importantes. Sin embargo, también se puede utilizar en combinación con RFC como un marcador de selección.

Los receptores de folato respectivos se pueden introducir en la célula eucariótica pretendida para producir un producto de interés por medio del vector de expresión o por medio de una combinación de al menos dos vectores de expresión de acuerdo con la presente invención. En seguida de la introducción de un polinucleótido que codifique un receptor de folato como el primer marcador de selección (sm I), así como el polinucleótido que codifique un producto de interés (como un polipéptido) y el polinucleótido que codifique el segundo marcador de selección (sm II), las células se hacen crecer en un medio selectivo que contenga concentraciones limitantes de folatos. Cuanto más baja sea la concentración de folato en el medio de cultivo, más rigurosas serán las condiciones de selección aplicadas. El segundo marcador de selección (sm II) es un polipéptido catalítico, concretamente, DHFR o una variante funcional de la misma, que procesa un sustrato que es bien un folato y/o un producto posterior obtenido a partir de un folato. Por consiguiente, las células que sobre-expresan el receptor de folato introducido pueden absorber cantidades suficientes de folatos para sostener el crecimiento celular, la replicación del ADN y, por consiguiente, la proliferación celular. Este efecto se mejora además debido al hecho de que la actividad del segundo marcador de selección (sm II) es dependiente/está influenciada por la actividad del primer marcador de selección (sm I), y de este modo la actividad transportadora del receptor de folato (véase anteriormente). Esto tiene el efecto de que solamente sobreviven las células que sobre-expresen fuertemente los marcadores de selección introducidos (sm I) y (sm II) y, por consiguiente, sobre-expresan el producto de interés. Este planteamiento no requiere, dependiendo de la realización seleccionada, ninguna supresión previa de un gen receptor de folato (FR) endógeno, incluso cuando ésta constituya una posible realización.

El receptor de folato introducido en la célula hospedadora eucariótica por medio de un vector de expresión utilizado de acuerdo con la presente invención, se puede derivar a partir de cualquier especie, siempre que sea funcional dentro de la presente invención, es decir, compatible con la célula eucariótica utilizada. Preferentemente, se utilizará un receptor de folato derivado a partir de una especie de mamífero, por ejemplo, derivado a partir de un receptor de folato de roedor y muy preferiblemente humano.

En general, el transportador de folato, en particular el receptor de folato introducido en la célula hospedadora eucariótica y utilizado como marcador de selección, puede ser homólogo o heterólogo para un receptor de folato endógeno de la célula hospedadora. Si es homólogo se derivará a partir de la misma especie que la célula hospedadora, y, por ejemplo, puede ser idéntico a un receptor de folato endógeno de la célula hospedadora. Si es heterólogo, se derivará a partir de otra especie diferente de la célula hospedadora, y, por consiguiente, puede ser diferente de un receptor de folato endógeno de la célula hospedadora. Típicamente, el transportador de folato introducido, preferentemente el receptor utilizado como marcador de selección, será heterólogo para la célula hospedadora. Por ejemplo, se puede utilizar un receptor de folato derivado de humano como marcador de selección para una célula hospedadora de roedor, por ejemplo, una célula CHO.

De acuerdo con una realización, el receptor de folato es un receptor de folato funcional enlazado a membrana. Este receptor puede ser un receptor funcional enlazado a membrana capaz de tener importación o absorción unidireccional de un folato o un derivado del mismo hacia dentro de una célula eucariótica. El receptor de folato enlazado a membrana se puede derivar a partir de cualquier especie como se ilustra anteriormente.

El receptor de folato funcional enlazado a membrana utilizado como el primer marcador de selección (sm I), se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en un receptor de folato alfa, un receptor de folato beta, un receptor de folato gamma, un receptor de folato que tiene o que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2 o 3 y las variantes funcionales de los anteriores. Preferentemente, es un receptor alfa fólico humano o una variante funcional del mismo.

Una variante funcional comprende un derivado de un receptor de folato, el cual es funcional de una manera fisiológica, es decir, capaz de tener absorción de folato en la célula hospedadora (la cual es en particular una célula hospedadora eucariótica y preferentemente de mamífero) y contribuye a la viabilidad celular por medio del metabolismo de folato de la célula. Por ejemplo, una forma variante del receptor de folato puede comprender una o más mutaciones de aminoácidos, como una sustitución, supresión y/o adición de uno o más aminoácidos. También, el término variante abarca las proteínas de fusión que comprenden un receptor de folato respectivo.

Preferentemente, el receptor de folato es un receptor de folato alfa humano, un receptor de folato beta humano o una variante funcional de los mismos. Más preferiblemente, un receptor de folato alfa humano que tiene o que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ. ID. NO: 1, código de 1 letra, mostrada en la dirección desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal):

MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGEAQTRIAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEA HKDVSYLYRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERVLNVPLCKEDCEQWWEDCR TSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTHSYKVSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNP NEEVARFYAAAMSGAGPWAAWPFLLSLALMLLWLLS

Otra realización preferida se refiere a un receptor de folato beta humano que tiene o que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ. ID. NO: 2, código de 1 letra, mostrada en la dirección desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal):

MVWKWMPLLLLLVCVATMCSAQDRTDLLNVCMDAKHHKTKPGPEDKLHDQCSPWKKNACCTASTSQELHKDTS RLYNFNWDHCGKMEPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVNQTWRKERFLDVPLCKEDCQRWWEDCHTSHTC KSNWHRGWDWTSGVNKCPAGALCRTFESYFPTPAALCEGLWSHSYKVSNYSRGSGRCIQMWFDSAQGNPNEEV ARFYAAAMHVNAGEMLHGTGGLLLSLALMLQLWLLG

En una alternativa, se utiliza un receptor de folato como el primer marcador de selección (sm I), el cual naturalmente no está enlazado a membrana. Este receptor no enlazado a membrana se puede alterar con el objeto de llegar a enlazarse a membrana. Por ejemplo, se puede proporcionar un ancla de membrana y/o este receptor de folato se puede expresar como una proteína de fusión, el cual comprende al receptor de folato no enlazado a membrana y una región transmembrana de otro polipéptido. De la misma manera, se pueden utilizar otras variantes, las cuales estarían fácilmente disponibles para una persona experta en este campo. Los ejemplos preferidos en este aspecto, se basarían en el receptor de folato gamma soluble, preferentemente el receptor de folato gamma soluble humano. En una realización muy preferida del mismo, el receptor de folato gamma soluble humano tendría/comprendería la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ. ID. NO: 3, código de 1 letra, mostrada en la dirección desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal):

MDMAWQMMQLLLLALVTAAGSAQPRSARARTDLLNVCMNAKHHKTQPSPEDELYGQCSPWKKNACCTASTSQE LHKDTSRLYNFNWDHCGKMEPTCKRHFIQDSCLYECSPNLGPWIRQVNQSWRKERILNVPLCKEDCERWWEDCR TSYTCKSNWHKGWNWTSGINECPAGALCSTFESYFPTPAALCEGLWSHSFKVSNYSRGSGRCIQMWFDSAQGNP NEEVAKFYAAAMNAGAPSRGIIDS

Este receptor se puede mutar o se puede alterar, derivar o modificar de otra manera genéticamente, para formar un receptor de folato funcional enlazado a membrana capaz de tener absorción de folato dentro del contexto de la presente invención.

Como llega a ser evidente a partir de lo anterior, el marcador de selección (sm II) es o puede comprender un polipéptido catalítico, a saber, DHFR o una variante funcional de la misma, que está implicado en la síntesis de ácidos nucleicos y/o en el metabolismo de folato. Dicho segundo marcador de selección (sm II) es un polipéptido catalítico involucrado en la síntesis de ácidos nucleicos, por ejemplo, en la generación de nucleótidos. El segundo marcador de selección (sm II) es una enzima implicada en la síntesis de ácido nucleico, en particular, el metabolismo de folato. Esto es particularmente útil, ya que el primer marcador de selección (sm I) transporta folato hacia dentro de la célula hospedadora y es, por ejemplo, un receptor de folato.

En el proceso de la síntesis de ácidos nucleicos, la primera enzima, glicinamida-ribonucleótido-transformilasa (GARTF), está involucrada en la formación del anillo de imidazol de las purinas, mientras que la reacción más corriente abajo mediada por la 5-aminoimidazol-4-carboxamida-ribonucleótido-transformilasa (AICARTF), proporciona el intermediario de purina, 5'-monofosfato de inosina (IMP). Éste último sirve como un precursor clave

para la biosíntesis regulada de AMP y GMP. Adicionalmente, el 5,10-metilen-THF (5,10-CH_2-THF), es otra co-enzima de THF importante que funciona as un co-factor crucial para la enzima de timidilato sintasa (TS). La timidilato sintasa (TS) cataliza la formación de monofosfato de timidina (dTMP) a partir de dUMP utilizando 5,10-metilen-THF (5,10-CH_2-THF), proporcionando de esta manera el ácido dihidrofólico. La dihidrofolato reductasa (DHFR) cataliza la reducción dependiente de NADP del ácido dihidrofólico (DHF) hasta el ácido tetrahidrofólico (THF). THF se interconvierte entonces hasta 10-formil-THF y 5,10-metilen-THF, que se utilizan en la biosíntesis *de novo* de purinas y timidilato, respectivamente. Esta reacción es catalizada por la hidroxi-metil-transferasa de serina (SHMT). El ácido dihidrofólico (DHF) es, por consiguiente, el subproducto de la actividad catalítica de la timidilato sintasa (TS) que cataliza la conversión de dUMP hasta dTMP en una reacción dependiente de 5,10-metilen-THF. Por consiguiente, la dihidrofolato reductasa (DHFR) es crucial para el reciclaje de los co-factores de THF, que son esenciales para la biosíntesis de los nucleótidos de purina y pirimidina que son necesarios para la replicación del ADN.

Las enzimas descritas, las cuales son hasta cierto grado dependientes de folato, son los mediadores clave de la biosíntesis *de novo* de los nucleótidos de purina y timina esenciales para la replicación del ADN.

El segundo marcador de selección (sm II) procesa un sustrato que es un folato, un derivado de folato y/o un producto que se puede obtener mediante el procesamiento de folato, tal como DHF o THF o una variante funcional o un derivado de los anteriores. Los sustratos respectivos son importantes para la producción de ácidos nucleicos. Dicho segundo marcador de selección (sm II) es o comprende la dihidrofolato reductasa (DHFR). Esto es en particular adecuado ya que el marcador de selección (sm I) es un transportador de folato.

En la técnica anterior se conocen varias enzimas DHFR adecuadas y, de conformidad con lo mismo, los genes, que se pueden utilizar en conjunto con la presente invención. La DHFR puede ser una DHFR de tipo silvestre o una variante funcional o derivado de la misma. El término una “variante" o "derivado” incluye enzimas 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 DHFR respectiva, proteínas de fusión, las cuales comprenden una enzima DHFR o un fragmento funcional de la misma y enzimas DHFR que se han modificado para proporcionar una estructura y/o función adicional, así como fragmentos funcionales de las anteriores, que todavía tengan al menos una función de una enzima DHFR. Por ejemplo, una enzima DHFR se puede utilizar como un marcador de selección (sm II) es decir, por ejemplo, más o menos sensible para los anti-folatos, tal como MTX, que la enzima DHFR de tipo silvestre y/o la enzima DHFR endógenamente expresada por la célula hospedadora si se expresa. La enzima DHFR se puede derivar a partir de cualquier especie, siempre que sea funcional dentro de la presente invención, es decir, compatible con la célula hospedadora utilizada. Por ejemplo, una dihidrofolato reductasa (DHFR) de ratón mutante con una mayor resistencia a MTX se ha utilizado extensamente como un marcador de selección dominante que mejora notoriamente la adquisición de la resistencia a MTX de alto nivel en las células transfectantes. Preferentemente, una enzima DHFR se utiliza como marcador de selección, el cual es menos susceptible a un inhibidor de la DHFR, tal como MTX, que la enzima DHFR endógenamente expresada en una célula hospedadora $DHFR^+$ (positiva).

De acuerdo con una realización, se coloca un intrón o un fragmento del mismo en el extremo 3' del marco de lectura abierta del gen de DHFR. Esto tiene efectos convenientes sobre el índice de expresión/amplificación de la construcción. El intrón utilizado en el casete de expresión de la DHFR conduce a una variante no funcional más pequeña del gen de DHFR (Grillari y colaboradores, 2001, J. Biotechnol. 87, 59-65). De esta manera, disminuye el nivel de expresión del gen de DHFR, y, por consiguiente, se incrementa adicionalmente la rigurosidad del sistema de selección. Por consiguiente, la célula hospedadora puede comprender un polinucleótido introducido que codifica una enzima DHFR, comprendiendo este polinucleótido un intrón que se localiza en 3’ de la secuencia que codifica la DHFR. Los métodos alternativos que hacen uso de un intrón para reducir el nivel de expresión del gen de DHFR se describen en el documento EP0 724 639 y también se podrían utilizar.

De acuerdo con una realización preferida, el primer marcador de selección (sm I) es un receptor de ácido fólico y el segundo marcador de selección es una variante de la DHFR que es menos sensible a MTX que la enzima DHFR de tipo silvestre y/o la enzima DHFR endógenamente expresada por la célula hospedadora. Esta variante de la DHFR preferentemente también comprende un intrón como se describe anteriormente. Se prefiere en particular una combinación del marcador respectivo en combinación con las células $DHFR^+$ (positivas).

La enseñanza de la presente invención se puede llevar a cabo utilizando diferentes realizaciones de vectores de expresión y/o combinaciones de al menos dos vectores de expresión como se describe en el presente documento. El polinucleótido que codifica un producto de interés o el sitio de inserción para incorporar un polinucleótido respectivo, el polinucleótido que codifica un primer marcador de selección (sm I) y/o el polinucleótido que codifica un segundo marcador de selección (sm II) y opcionalmente elementos de vectores adicionales, tales como marcadores de selección adicionales, se pueden localizar sobre los mismos vectores de expresión o sobre vectores de expresión separados.

Por ejemplo, la utilización de un vector de expresión, el cual comprende al menos todos los elementos decisivos descritos anteriormente, es decir, el polinucleótido que codifica el producto de interés (o un sitio de inserción para

incorporar un polinucleótido respectivo), el polinucleótido que codifica el primer marcador de selección (sm I) y el polinucleótido que codifica el segundo marcador de selección (sm II), tiene la ventaja de que solamente se necesita introducir un vector de expresión en la célula hospedadora. Adicionalmente, en particular cuando se establece una línea de expresión estable, hay más oportunidades de que todos los elementos sean igualmente expresados o al menos sean expresados con un índice similar por la célula hospedadora, debido a que se integrarían juntos en el genoma.

Sin embargo, también es posible y dentro del alcance de la presente invención utilizar una combinación de al menos dos o tres vectores de expresión para la transfección, en donde los polinucleótidos respectivos se localizan sobre diferentes vectores de expresión. Esta combinación de vectores de expresión se transfecta entonces en la célula hospedadora. Cuando se utiliza una combinación de al menos dos vectores de expresión, preferentemente se utiliza una situación en donde al menos un polinucleótido que codifique el producto de interés (o el sitio de inserción para introducir el polinucleótido de interés) y al menos uno de los marcadores de selección (sm I) o (sm II), se configuran sobre el mismo vector de expresión. Esto en particular, cuando se utiliza la combinación de vectores de expresión con el objeto de establecer una línea celular de expresión estable, con el objeto de asegurar un acoplamiento apretado de la expresión del marcador de selección ((sm I) y/o (sm II) para la expresión del producto de interés. El otro marcador de selección (sm I) o (sm II) se puede localizar sobre un vector de expresión separado de esta combinación del vector de expresión. El vector de expresión separado, que, por consiguiente, comprende el otro marcador de selección (sm I) o (sm II), puede comprender un polinucleótido adicional que codifica un producto de interés. Por ejemplo, se puede utilizar un establecimiento respectivo para expresar las moléculas de inmunoglobulina. Sin embargo, también está dentro de las enseñanzas de la presente invención que todos los polinucleótidos (que codifiquen el producto de interés, (sm I) y (sm II)) se localizan sobre los vectores de expresión separados y, por consiguiente, individuales.

De acuerdo con una realización, el vector de expresión de acuerdo con la presente invención comprende un sitio de inserción para insertar el polinucleótido que codifica un producto de interés pero que todavía no comprende el polinucleótido que codifica el producto de interés. Se puede utilizar un vector de expresión "vacío" respectivo para insertar el polinucleótido que codifica el producto de interés deseado, obteniendo de esta manera el vector de expresión listo para usarse que se puede incorporar en la célula hospedadora con el objeto de expresar el producto de interés. La incorporación se puede lograr utilizando métodos de clonación apropiados, por ejemplo, utilizando enzimas de restricción, con el objeto de insertar el polinucleótido que codifica el producto de interés. Para este propósito, el vector de expresión puede comprender, por ejemplo, un sitio de clonación múltiple (MCS) el cual, por ejemplo, se puede utilizar en todos los marcos de lectura. Un sitio de clonación múltiple respectivo, como un ejemplo de un sitio de inserción, se puede localizar dentro de un casete de expresión. Un vector de expresión "vacío" respectivo proporciona una herramienta útil para expresar diferentes productos de interés, debido a que el vector de expresión se puede adaptar fácilmente al uso pretendido mediante la inserción del polinucleótido que codifique el producto de interés deseado. El vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión puede comprender adicionalmente elementos de vectores adicionales. Por ejemplo, se puede proporcionar al menos un polinucleótido adicional que codifique un producto de interés adicional. Esta realización es particularmente adecuada para expresar las moléculas de inmunoglobulina. Otros elementos de vectores generales que podrían ser útiles, son conocidos en la técnica anterior, e incluyen, pero no se limitan a, orígenes de replicación, marcadores de selección adicionales, promotores para la expresión en diferentes células hospedadoras o expresión *in vitro*.

El vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión de acuerdo con la presente invención, puede comprender al menos un polinucleótido que codifique al menos un fragmento funcional de la cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina y al menos un polinucleótido que codifique al menos un fragmento funcional de la cadena ligera de una molécula de inmunoglobulina. Estos polinucleótidos se pueden localizar sobre los mismos o sobre diferentes vectores de expresión en el caso de que se utilice una combinación de al menos dos vectores de expresión. También está dentro del alcance de la presente invención, utilizar una combinación de al menos dos vectores de expresión, en donde un vector de expresión comprenda al menos el polinucleótido que codifique el primer marcador de selección (sm I) y al menos un polinucleótido que codifique al menos un fragmento funcional de una cadena ligera de una molécula de inmunoglobulina y/o un polinucleótido que codifique una cadena pesada de la molécula de inmunoglobulina y el otro vector de expresión de esta combinación comprenda al menos el polinucleótido que codifique el segundo marcador de selección (sm II) y al menos un polinucleótido que codifique al menos un fragmento funcional de una cadena ligera de la molécula de inmunoglobulina y/o un polinucleótido que codifique una cadena pesada de la molécula de inmunoglobulina. También se describe un establecimiento respectivo en Los ejemplos. Después de la expresión de estos polinucleótidos en una célula hospedadora, se obtiene una molécula de inmunoglobulina funcional. El polinucleótido que codifica al menos un fragmento funcional de la cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina y el polinucleótido que codifica al menos un fragmento funcional de la cadena ligera de una molécula de inmunoglobulina, pueden estar comprendidos en el mismo casete de expresión o en casetes de expresión diferentes como también se describe más adelante.

El vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión de acuerdo con la presente invención, puede comprender adicionalmente uno o más polinucleótidos adicionales que codifiquen uno o más

marcadores de selección adicionales. Estos marcadores adicionales pueden estar involucrados en el mismo proceso o vía metabólica o en un proceso o vía metabólica en concierto, que los marcadores de selección (sm I) y (sm II). Sin embargo, también pueden estar involucrados en una vía metabólica diferente. En una realización de la presente invención, se puede aplicar una co-selección utilizando el sistema de la presente invención, junto con uno o más sistemas de selección diferentes (por ejemplo, los sistemas de selección de resistencia a los antibióticos, tales como neo/G418), para mejorar adicionalmente el desempeño. Además de los marcadores de selección eucarióticos adicionales que permiten la selección de las células hospedadoras eucarióticas, también se pueden utilizar marcadores de selección procarióticos. Un “marcador de selección procariótico” es un marcador de selección que permite la selección en células hospedadoras procarióticas en condiciones de selección apropiadas. Los ejemplos de los marcadores de selección procarióticos respectivos son los marcadores que proporcionan la resistencia a antibióticos, tales como, por ejemplo, ampicilina, canamicina, tetraciclina y/o cloranfenicol.

Los vectores utilizados para expresar los productos de interés 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 elementos de un casete de expresión. Si el producto deseado es una proteína, los elementos de control de traducción adecuados preferentemente se incluyen en el vector, 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, el polinucleótido que sirve como los genes marcadores de selección, 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 de selección y aquélla 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. Los polinucleótidos que codifican el producto de interés y los polinucleótidos que codifican los marcadores de selección (sm I) y (sm II) preferentemente están comprendidos en un casete de expresión. Varias realizaciones son adecuadas, por ejemplo, cada uno de los polinucleótidos puede estar comprendido en un casete de expresión diferente. Sin embargo, también está dentro del alcance de la presente invención que al menos dos de los polinucleótidos respectivos estén comprendidos en un casete de expresión.

Por consiguiente, el vector de expresión o la combinación de vectores de expresión de acuerdo con la presente invención, puede comprender al menos un elemento promotor y/o promotor/potenciador como 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. Ambos son adecuados en conjunto con las enseñanzas de la presente invención. Los promotores utilizados para la producción de alto nivel de proteínas en las células de mamífero deben ser fuertes y preferentemente deben ser activos en un amplio rango de tipos de células.

Los promotores constitutivos fuertes que impulsan la expresión en muchos tipos de células incluyen, pero no se limitan a, el promotor tardío mayor de adenovirus, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano, el promotor de SV40 y del virus de sarcoma de Rous y el promotor 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 de SV40. Los promotores de transcripción se pueden seleccionar a partir del 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.

Una realización preferida se refiere a un vector de expresión de acuerdo con la presente invención, en donde el polinucleótido que codifica un producto de interés, el polinucleótido que codifica un primer marcador de selección (sm I) y/o el polinucleótido que codifica un segundo marcador de selección (sm II), 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 hospedadora, en particular en una célula hospedadora eucariótica. Los distintos promotores de transcripción que impulsan la expresión a partir de los polinucleótidos pueden ser iguales o diferentes.

De acuerdo con una realización, 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 el primer marcador de selección (sm I) y/o (sm II). Esta configuración tiene el efecto de que se genera más transcripción para el producto de interés, que para los marcadores de selección. Es conveniente que la producción del producto de interés sea dominante sobre la producción de los marcadores de selección, 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, mediante la utilización de un promotor menos fuerte para expresar los marcadores de selección (sm I) y/o (sm II) que el polipéptido de interés, se aumenta adicionalmente la presión de selección.

De acuerdo con una realización, 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 el marcador de selección (sm I) y/o (sm II) 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 transcripción que el promotor de SV40.

De acuerdo con una realización adicional, el polinucleótido que codifica el producto de interés, el polinucleótido que codifica un primer marcador de selección (sm I) y/o el polinucleótido que codifica un segundo marcador de selección (sm II), están bajo el control del mismo promotor de transcripción. Los promotores adecuados se describen anteriormente. En esta realización, se obtiene un largo transcrito a partir del casete de expresión respectivo que está bajo el control del promotor de transcripción. De acuerdo con una realización, al menos se localiza un elemento IRES funcionalmente entre el polinucleótido que codifica un primer marcador de selección (sm I) y/o el polinucleótido que codifica un segundo marcador de selección (sm II). De esta manera, se asegura que se obtengan productos de traducción separados a partir de dicha transcripción.

El vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión puede comprender un sitio de terminación de transcripción apropiado como elemento de un casete de expresión. 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 oclusión del promotor o interferencia de la transcripción. Este suceso se ha descrito tanto en procariotas como en eucariotas. La colocación apropiada de las señales de terminación de transcripción entre dos unidades de transcripción puede prevenir la oclusión del promotor. Se ha demostrado que los sitios de terminación de transcripción están bien caracterizados y su incorporación en vectores de expresión tienen múltiples efectos benéficos sobre la expresión genética.

Preferentemente, la célula hospedadora utilizada es una célula hospedadora eucariótica, en particular una célula hospedadora 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 de la transcripción primaria 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 del vector de acuerdo con la presente invención usualmente comprenden un sitio de poliadenilación. Hay 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 bovino (bgh), beta-globina de ratón, la unidad de transcripción temprana de SV40 y el gen de cinasa de timidina del virus de Herpes símplex. 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, el polinucleótido que codifica el primer marcador de selección (sm I) y/o el polinucleótido que codifica el segundo marcador de selección (sm II), puede comprender al menos un intrón. Esta realización es particularmente adecuada cuando se utiliza una célula hospedadora eucariótica, en particular una célula hospedadora de mamífero, para la expresión. La mayoría de los genes a partir de los eucariotas superiores contienen intrones que se remueven durante el procesamiento del ARN. Las construcciones respectivas se expresan más eficientemente en los sistemas transgénicos que las construcciones idénticas que carezcan de intrones. Usualmente, los intrones se colocan en el extremo 5’ del marco de lectura abierta, pero también se pueden colocar en el extremo 3'. Por consiguiente, un intrón puede estar comprendido en los casetes de expresión para aumentar el índice de expresión. Este intrón se puede localizar entre los elementos promotores y/o promotores/ potenciadores y el extremo 5’ del marco de lectura abierta 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 realización, 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 preferentemente se coloca antes del codón de inicio ATG del gen de interés. El intrón RK consiste en el sitio de empalme de 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)).

El vector de expresión o la combinación del vector de acuerdo con la presente invención, se puede transfectar en la célula hospedadora 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 linealiza antes de la transfección. Por consiguiente, De acuerdo con una realización de la presente invención, el vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión, comprende al menos un sitio de restricción previamente definido, el cual se puede utilizar para la linearización de los vectores antes de la transfección. La colocación inteligente del sitio de restricción de linearización es conveniente, debido a que este sitio de restricción determina en dónde se abre/se linealiza el vector y, por consiguiente, determina el orden/la configuración de los casetes de expresión cuando se integra la construcción en el genoma de la célula eucariótica, en particular de mamífero. En el caso de que el vector se utilice como un vector de expresión estándar pretendido, por ejemplo, como una herramienta para la expresión de varios productos/polipéptidos diferentes, es conveniente proporcionar un sitio de restricción de linearización que comprenda múltiples sitios de reconocimiento para las enzimas que tengan una baja frecuencia de corte. Las enzimas de restricción seleccionadas para la linearización preferentemente no deben cortarse dentro de los casetes de expresión para el producto de interés, los marcadores de selección u otras secuencias de estructura base de vector, con el fin de asegurar que la enzima se corte solamente una vez para la linearización apropiada del vector. Al proporcionar un sitio de restricción de linearización que comprenda múltiples sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción que tengan una baja frecuencia de corte, el usuario puede seleccionar una enzima de restricción adecuada para la linearización a partir de las opciones proporcionadas con el objeto de evitar la restricción con seguridad dentro del polinucleótido que codifique el producto de interés. Sin embargo, como se ilustra anteriormente, se pueden mutar sitios de restricción adicionales o se podría llevar a cabo una digestión de restricción parcial. De acuerdo con una realización, el sitio de linearización se configura de tal manera que, después de la linearización, un polinucleótido que codifique un marcador de selección amplificable eucariótico se localice a 5' del polinucleótido que codifique el producto de interés. Esta configuración es conveniente para la amplificación genética. En el caso de que se utilice adicionalmente un marcador de selección procariótico, el polinucleótido que codifique este marcador se localiza a 3' del polinucleótido que codifique 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 los genes procarióticos presumiblemente no son convenientes para la expresión procariótica y, en particular, para la expresión en mamífero, debido a que las secuencias procarióticas pueden conducir a un aumento de la metilación o a otros efectos del silenciamiento en las células de mamífero.

El vector de expresión puede comprender elementos adicionales con el fin de permitir la combinación del método de selección de acuerdo con la presente invención con otros sistemas de selección conocidos en la técnica anterior. Un método de selección establecido conocido en la técnica anterior se basa en el uso de citometría de flujo, en particular clasificación de células activada por fluorescencia (FACS). Los métodos de selección que emplean citometría de flujo tienen la ventaja de que se pueden rastrear grandes números de células rápidamente. En un método de selección que es particularmente útil para identificar los clones de células de alta producción, se expresa una porción del producto de interés, por ejemplo, un anticuerpo, como un polipéptido de fusión enlazado a membrana. De esta manera, una porción del producto se exhibe como un polipéptido de fusión sobre la superficie celular. Debido a que la cantidad de polipéptido de fusión producida se correlaciona con el índice de expresión global, las células hospedadoras se pueden seleccionar por medio de citometría de flujo basándose en la cantidad de polipéptido de fusión exhibido sobre la superficie celular. Esto permite hacer una rápida selección de las células hospedadoras de alta producción. Se encontró que el sistema de selección de acuerdo con la presente invención se puede combinar convenientemente con los métodos de selección respectivos que se basan en el uso de citometría de flujo. Con el fin de permitir una selección eficiente utilizando FACS, preferentemente se utiliza un casete de expresión especial para expresar el producto de interés. Por consiguiente, De acuerdo con una realización, el vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión de acuerdo con la presente invención, comprende un casete de expresión para expresar el polinucleótido que codifica el producto de interés que se diseña de tal manera que una porción del producto de interés expresado comprende un ancla transmembrana. Existen varias opciones para lograr ese resultado.

De acuerdo con una realización, el casete de expresión comprende al menos:

(a) el polinucleótido que codifica el producto de interés,
(b) al menos un codón de paro corriente abajo del polinucleótido que codifica el producto de interés y
(c) un polinucleótido adicional corriente abajo del codón de paro que codifica un ancla de membrana y/o una señal para un ancla de membrana.

Este diseño del casete de expresión tiene el efecto de que, a través de los procesos de lectura cruzada de traducción (el codón de paro se "filtra"), una porción del producto de interés se produce como un polipéptido de fusión, el cual comprende un ancla de membrana. Como un resultado, este polipéptido de fusión se exhibe sobre la

superficie celular y se pueden seleccionar las células que exhiban altos niveles de polipéptido de fusión anclado a membrana mediante citometría de flujo, preferentemente mediante FACS. De esta manera, se seleccionan las células hospedadoras que tengan un alto índice de expresión. Los detalles y las realizaciones preferidas de esta tecnología basada en el codón de paro se describen en los documentos WO2005/073375 y PCT/EP2009/006246. Se hace referencia a esta divulgación.

De acuerdo con una realización alternativa, el casete de expresión comprende al menos:

(a) el polinucleótido que codifica el producto de interés,
(b) un intrón, el cual comprende un sitio donador de empalme 5' y un sitio aceptor de empalme 3' y que comprende un codón de paro de traducción dentro del marco y una señal de poliadenilación, y
(c) un polinucleótido corriente abajo de este intrón que codifica un ancla de membrana y/o una señal para un ancla de membrana.

Este diseño del casete de expresión tiene el efecto de que, a través de la transcripción y del procesamiento de la transcripción, se obtienen al menos dos ARNm maduros diferentes (ARNm-POI) y (ARNm-POI-ANCLA) a partir del casete de expresión. La traducción del ARNm-POI da como resultado el producto de interés. La traducción del ARNm-POI-ANCLA da como resultado un polipéptido de fusión, el cual comprende el producto de interés y un ancla de membrana. Como un resultado, este polipéptido de fusión nuevamente se exhibe sobre la superficie celular y se pueden seleccionar las células que exhiban altos niveles de polipéptido de fusión anclado a membrana mediante citometría de flujo, preferentemente FACS. De esta manera, se seleccionan las células hospedadoras que tengan un alto índice de expresión. Los detalles y las realizaciones preferidas de esta tecnología basada en los intrones se describen en el documento WO2007/131774. Se hace referencia a esta divulgación.

De acuerdo con una realización preferida, la cual es particularmente útil para la expresión de anticuerpos como el producto de interés, el ancla de membrana es un ancla transmembrana de inmunoglobulina. Otras anclas de membrana adecuadas y las realizaciones preferidas de un ancla transmembrana de inmunoglobulina, se describen en los documentos WO2007/131774, WO2005/073375 y PCT/EP2009/006246.

También se proporciona una célula hospedadora, la cual comprende al menos:

(a) un polinucleótido introducido que codifica un producto de interés;
(b) un polinucleótido introducido que codifica un primer marcador de selección (sm I);
(c) un polinucleótido introducido que codifica un segundo marcador de selección (sm II), el cual difiere del primer marcador de selección (sm I);

en donde la actividad del marcador de selección (sm I) o (sm II) está al menos parcialmente influenciada por la actividad del otro marcador de selección, en donde los marcadores de selección (sm I) o (sm II) están implicados en el metabolismo de folato y en donde el primer marcador de selección (sm I) es un transportador de folato y el segundo marcador de selección (sm II) es DHFR o una variante funcional de la misma.

De acuerdo con una realización, la célula hospedadora comprende un vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión, como se describe con detalle anteriormente y en las reivindicaciones. Los presentes inventores hacen referencia a la divulgación anterior.

Adicionalmente, la célula hospedadora puede tener al menos una de las siguientes características:

La célula hospedadora es preferentemente una célula hospedadora eucariótica. Esta célula eucariótica se selecciona preferentemente 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, para 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 vía 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. Preferentemente, la célula hospedadora es una célula de mamífero. Esta célula de mamífero preferentemente se selecciona 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 preferentemente se selecciona a partir del grupo que consiste en una célula CHO, una célula BHK, una célula NS0, 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, preferentemente, 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, preferentemente, se selecciona a partir del grupo que consiste en una célula COS-1, una célula COS-7 y una célula Vero.

La célula hospedadora y los marcadores de selección incorporados (sm I) y (sm II) deberán ser compatibles, lo cual significa que la combinación seleccionada de célula hospedadora y marcadores de selección (sm I) y (sm II) permite la selección de las células hospedadoras que expresen los marcadores respectivos en condiciones de cultivo selectivas. La expresión de los marcadores de selección (sm I) y (sm II) proporcionará una ventaja selectiva en condiciones de cultivo selectivas. Por consiguiente, preferentemente se selecciona una célula hospedadora que sea susceptible a la selección mediante los marcadores de selección (sm I) y (sm II) en condiciones selectivas de crecimiento. Por ejemplo, en el caso de que se utilice cierta enzima como marcador de selección (sm I) y/o (sm II), la célula hospedadora puede no expresar la enzima respectiva de una manera endógena o al menos puede expresar esta enzima no en cantidades suficientes o con una actividad suficiente para permitir que la célula funcione/crezca apropiadamente en condiciones de cultivo selectivas en ausencia de una expresión suficiente de los polinucleótidos heterólogos que codifican los marcadores de selección (sm I) y (sm II). Por consiguiente, la célula hospedadora solamente puede sobrevivir/proliferar con un índice suficiente, si la célula hospedadora expresa los marcadores de selección introducidos y, por consiguiente, el polinucleótido que codifica el producto de interés con un rendimiento suficiente sobrevive a las condiciones selectivas de crecimiento. La selección/el diseño de las células hospedadoras adecuadas depende de los marcadores de selección elegidos (sm I) y (sm II). Las células hospedadoras adecuadas son conocidas en la técnica anterior o se podrían generar mediante el desarrollo de las líneas celulares apropiadas, por ejemplo, mediante ingeniería genética (por ejemplo, mutagénesis, eliminación genética; silenciamiento genético y similares). Estos principios son bien conocidos en la técnica anterior y, por consiguiente, no se necesita una explicación detallada en la presente.

Por ejemplo, las células hospedadoras (por ejemplo, las células CHO) que carecen del gen de DHFR (por ejemplo, mediante la supresión genómica dirigida, también denominada como células hospedadoras $DHFR^{-}$) se pueden utilizar como receptoras para la transfección del gen de DHFR como el gen marcador de selección en un medio que esté libre de nucleótidos. Sin embargo, también es posible utilizar células hospedadoras que expresen la DHFR de una manera endógena (células hospedadoras $DHFR^{+}$ (positivas)) cuando se lleve a cabo una selección de DHFR si se emplean las condiciones de cultivo selectivas apropiadas. En este caso, preferentemente se utiliza una enzima DHFR como marcador de selección (sm II), la cual es menos sensible a MTX que la enzima DHFR endógena expresada por la célula hospedadora $DHFR^{+}$ (positiva). Después de la transfección con los polinucleótidos heterólogos, por ejemplo, un vector de expresión de acuerdo con la presente invención, el cual comprende el gen de DHFR, por ejemplo, como segundo marcador de selección (sm II), las células se pueden someter a un aumento gradual en las concentraciones de los inhibidores de la DHFR. Un ejemplo es el de los anti-folatos, tales como MTX, el cual es un potente inhibidor de la DHFR (Kd = 1 pM). La presencia del anti-folato, tal como MTX, en el medio fuerza a las células para producir mayores niveles de la DHFR para sobrevivir. Después de múltiples rondas de selección, el marcador de selección de la DHFR con frecuencia experimenta una amplificación genética significativa con para lograrlo. La técnica anterior debe utilizar concentraciones de anti-folato/MTX más bien altas con el objeto de lograr una amplificación genética suficiente y, por consiguiente, un aumento en la producción del producto de interés. Ésta es una desventaja debido a que los anti-folatos son tóxicos y pueden alterar a la célula hospedadora. El planteamiento novedoso de la presente invención de combinar dos marcadores de selección (sm I y sm II) que están involucrados en la misma vía metabólica o en una vía metabólica en concierto (preferentemente el metabolismo de folato) tiene la ventaja de que aumenta considerablemente la rigurosidad de la selección ya con bajos niveles del inhibidor (por ejemplo, de MTX). Por consiguiente, se necesita menos inhibidor y, por consiguiente, menos agentes tóxicos con las enseñanzas de la presente invención, comparándose con los planteamientos de la técnica anterior para proporcionar las condiciones de selección muy rigurosos.

Los ejemplos adecuados para los marcadores de selección (sm I) y (sm II), así como de las combinaciones de los mismos, se describen con detalle anteriormente; los presentes inventores hacen referencia a la divulgación anterior.

El polinucleótido que codifica un producto de interés, el polinucleótido que codifica un primer marcador de selección (sm I) y/o el polinucleótido que codifica un segundo marcador de selección (sm II), se pueden introducir establemente en la célula hospedadora. La introducción estable, respectivamente, la transfección, es conveniente para el establecimiento de las líneas celulares de expresión y en particular para la gran escala y, por consiguiente, para la producción industrial del producto de interés.

El polinucleótido que codifica un producto de interés, el polinucleótido que codifica un primer marcador de selección (sm I) y/o el polinucleótido que codifica un segundo marcador de selección (sm II), se pueden localizar sobre los mismos vectores de expresión o sobre vectores de expresión separados comprendidos en las células hospedadoras. Los detalles con respecto a estas realizaciones se describieron anteriormente; los presentes inventores hacen referencia a la divulgación anterior.

El índice de viabilidad o proliferación celular de la célula hospedadora utilizada puede depender de la absorción de un compuesto (tal como, por ejemplo, folato) que sea incorporado por el primer marcador de selección (sm I) en la célula hospedadora. Como se ilustra anteriormente, el primer marcador de selección (sm I) puede codificar un

polipéptido transportador capaz de importar un compuesto en el huésped. De acuerdo con una realización descrita con detalle anteriormente, el primer marcador de selección (sm I) importa al menos un folato hacia dentro de la célula hospedadora y preferentemente, es un receptor de folato como se describe anteriormente. Esta realización funciona particularmente bien cuando se utiliza la DHFR como el segundo marcador de selección (sm II). De acuerdo con una realización preferida, el primer marcador de selección (sm I) es un receptor de ácido fólico y el segundo marcador de selección es una variante de la DHFR que es menos sensible a MTX que la enzima DHFR de tipo silvestre. Se prefiere en particular una combinación del marcador respectivo en combinación con la célula $DHFR^+$ (positiva). En este caso, preferentemente se utiliza una enzima DHFR como marcador de selección (sm II), la cual es menos sensible a MTX que la enzima DHFR endógena expresada por la célula hospedadora $DHFR^+$ (positiva). Los detalles se describen anteriormente y más adelante.

De acuerdo con una realización, la célula hospedadora carece de la actividad total de al menos un receptor de folato endógeno enlazado a membrana funcional. Las líneas celulares respectivas se pueden obtener a través de los procesos de selección/rastreo o mediante las técnicas de ingeniería genética, por ejemplo, con el objeto de generar líneas celulares con eliminación genética. Por consiguiente, también se proporciona una célula hospedadora, en donde el sistema de transporte de folato funcional unidireccional endógeno, por ejemplo, el cual comprende al menos un receptor de folato endógeno enlazado a membrana funcional, carece de la actividad completa, es decir, está atenuado. Esta atenuación se puede proporcionar, por ejemplo, mediante cualquier tipo de mutagénesis del sistema de transporte de folato endógeno en cuestión, por ejemplo, el receptor de folato endógeno enlazado a membrana funcional, por ejemplo, mediante mutación puntual, alteración genética y similares. La atenuación puede ser parcial o completa. En el último caso, la célula eucariótica de acuerdo con la presente invención no comprende un sistema de transporte de folato funcional unidireccional funcional endógeno, por ejemplo, un receptor de folato endógeno enlazado a membrana funcional.

De acuerdo con una realización, la célula hospedadora de acuerdo con la presente invención, comprende al menos un sistema de transporte de folato funcional unidireccional funcional endógeno en adición al receptor de folato heterólogo enlazado a membrana funcional introducido en la célula hospedadora, por ejemplo, por medio del vector de expresión descrito anteriormente, en particular uno o más receptores de folato endógenos enlazados a membrana funcionales. Es una ventaja de la presente invención, que el sistema de selección descrito en la presente se puede utilizar incluso en la presencia de este sistema de transporte de folato funcional unidireccional endógeno, es decir, en donde se retiene el sistema endógeno. Éste, como el uso de las células hospedadoras respectivas para la siguiente producción del producto de interés en condiciones no selectivas, es más fácil de manejar si se retiene el sistema endógeno y, por consiguiente, es funcional.

Por consiguiente, una realización preferida adicional se refiere a una célula hospedadora de la presente invención, la cual comprende al menos un sistema de transporte de folato funcional unidireccional endógeno, en donde este sistema de transporte de folato funcional unidireccional endógeno preferentemente comprende al menos un receptor de folato endógeno enlazado a membrana funcional. En una realización preferida del mismo, el receptor de folato endógeno enlazado a membrana funcional se selecciona a partir del grupo que consiste en el receptor de folato alfa y el receptor de folato beta.

Otras combinaciones adecuadas son la elección de un receptor de folato como el primer marcador de selección (sm I) combinado con una DHFR mutante como el segundo marcador de selección (sm II), la cual es menos susceptible a un inhibidor de la DHFR, tal como MTX, que la enzima DHFR endógenamente expresada en una célula hospedadora $DHFR^+$ (positiva). La célula hospedadora también puede ser RFC^+ (positiva) como se ilustra anteriormente.

También se proporciona un método para producir una célula hospedadora como se describe anteriormente, el cual comprende el paso de introducir en la célula hospedadora, al menos:

(a) un polinucleótido que codifica un producto de interés;
(b) un polinucleótido que codifica un primer marcador de selección (sm I);
(c) un polinucleótido que codifica un segundo marcador de selección (sm II), el cual difiere del primer marcador de selección (sm I);

en donde la actividad del marcador de selección (sm I) o (sm II) está al menos parcialmente influenciada por la actividad del otro marcador de selección y en donde los marcadores de selección (sm I) y (sm II) están implicados en el metabolismo de folato y en donde el primer marcador de selección (sm I) es un transportador de folato y el segundo marcador de selección (sm II) es DHFR o una variante funcional de la misma.

Hay varios métodos apropiados conocidos en la técnica anterior para introducir polinucleótidos y vectores de expresión en células hospedadoras, incluyendo células hospedadoras eucarióticas, tales como células hospedadoras 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 codifique el producto de interés, los polinucleótidos que codifiquen un primer marcador de selección (sm I) y/o el polinucleótido que codifique un segundo marcador de selección (sm II) en el genoma de la célula hospedadora. Estos métodos de recombinación pueden incluir el uso de recombinasas específicas del sitio como Cre, Flp o ΦC31 (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 genes basada en la recombinación permite minimizar el número de elementos que se deban incluir en el ácido nucleico heterólogo que se transfiera/introduzca en la célula hospedadora. 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 necesiten transferir/transfectar los elementos restantes (por ejemplo, el polinucleótido que codifique el producto de interés, el polinucleótido que codifique un primer marcador de selección (sm I) y/o el polinucleótido que codifique un segundo marcador de selección (sm II)) en la célula hospedadora. Anteriormente se describe con detalle las realizaciones de un vector adecuado de expresión o la combinación de vectores de expresión de acuerdo con la presente invención, así como las células hospedadoras adecuadas; los presentes inventores hacen referencia a la divulgación anterior.

Los polinucleótidos que codifican los marcadores de selección adecuados (sm I) y (sm II), así como las combinaciones de los mismos, se describen con detalle anteriormente; los presentes inventores hacen referencia a la divulgación anterior. De acuerdo con una realización, un vector de expresión o una combinación de vectores de expresión de acuerdo con la presente invención, se introduce en la célula hospedadora. El vector de expresión y una combinación de vectores de expresión se describen con detalle anteriormente y en las reivindicaciones.

También se proporciona un método para seleccionar al menos una célula hospedadora capaz de expresar un producto de interés, el cual comprende:

(a) proporcionar una pluralidad de células hospedadoras, las cuales comprenden al menos:

(i) un polinucleótido introducido que codifica un producto de interés;
(ii) un polinucleótido introducido que codifica un primer marcador de selección (sm I);
(iii) un polinucleótido introducido que codifica un segundo marcador de selección (sm II); el cual difiere del primer marcador de selección (sm I);

en donde la actividad del marcador de selección (sm I) o (sm II) está al menos parcialmente influenciada por la actividad del otro marcador de selección y en donde los marcadores de selección (sm I) y (sm II) están implicados en el metabolismo de folato y en donde el primer marcador de selección (sm I) es un transportador de folato y el segundo marcador de selección (sm II) es DHFR o una variante funcional de la misma;

(b) cultivar la pluralidad de células hospedadoras mencionada en condiciones selectivas para los marcadores de selección (sm I) y (sm II), obteniendo de esta manera una célula hospedadora que expresa el producto de interés.

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

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

Las células hospedadoras adecuadas y las realizaciones específicas en particular con respecto a la elección de los marcadores de selección (sm I) y (sm II) y de las combinaciones de los mismos, se describen con detalle anteriormente. Los presentes inventores hacen referencia a la divulgación anterior.

Dependiendo de las células hospedadoras utilizadas y, por consiguiente, los marcadores de selección seleccionados (sm I) y (sm II), las condiciones de crecimiento se adaptan con el objeto de ejercer una presión de selección sobre la célula hospedadora. Por ejemplo, el medio de cultivo selectivo puede comprender inhibidores adecuados para los polipéptidos catalíticos seleccionados como marcadores de selección (sm I) y/o (sm II). Por ejemplo, se pueden utilizar los anti-folatos, tales como MTX, con el objeto de inhibir la actividad de la DHFR que se utiliza como marcador de selección (sm II). Dependiendo de la concentración utilizada de este inhibidor en el medio de cultivo (la cual también se puede incrementar gradualmente), se aumenta la rigurosidad de las condiciones de selección. Adicionalmente, con el objeto de mantener activa la presión de selección, el medio de cultivo no debe comprender cantidades suficientes de metabolitos que permitan derivar la actividad de los marcadores de selección (sm I) y/o (sm II). Por ejemplo, al utilizarse DHFR como marcador de selección (sm II), es conveniente que el medio de cultivo selectivo no comprenda los nucleótidos relevantes. En general, se deben controlar los metabolitos que interfieran con esta estrategia de selección, por ejemplo, evitándose.

Adicionalmente, al ser el primer marcador de selección (sm I) un polipéptido transportador, el medio de cultivo selectivo debe comprender una concentración limitante de estos compuestos esenciales para el crecimiento celular que son importados por el primer marcador de selección (sm I), es decir, los folatos ya que que el primer marcador de selección (sm I) transporta folato hacia dentro de la célula hospedadora. Los principios de la elección de tales condiciones selectivas son conocidos en el estado de la técnica y también se pueden determinar de una manera experimental y, por consiguiente, no necesitan una descripción detallada. Las concentraciones adecuadas para los folatos y anti-folatos, particularmente adecuados para las células en suspensión de crecimiento rápido, también se describen en la presente.

Las condiciones de selección para los marcadores de selección (sm I) y (sm II) se pueden aplicar de una manera simultánea. Esto aumenta la presión selectiva y permite tener un procedimiento de selección más rápido, al saltarse un paso de selección cuando se utilizan las condiciones óptimas. Esto reduce el tiempo para obtener líneas celulares adecuadas. Por ejemplo, para la combinación del marcador de selección, de receptor de folato/DHFR, se puede utilizar un medio de cultivo que comprenda cantidades reducidas de folatos y que comprenda un inhibidor de la DHFR. Los inhibidores adecuados son los anti-folatos, tales como, por ejemplo, MTX.

En el caso de que se utilice un marcador de selección adicional además de (sm I) y (sm II), se pueden aplicar las condiciones selectivas para ese marcador de selección antes de (por ejemplo, en un paso de selección previa) o simultáneamente con la aplicación de las condiciones selectivas para los marcadores de selección (sm I) y/o (sm II). Por ejemplo, en el caso de que se utilice el gen de fosfotransferasa de neomicina (neo) como marcador de selección 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 el vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión de acuerdo con la presente invención. Este primer medio también puede ser ya selectivo para al menos uno de los marcadores de selección (sm I) o (sm II). Después, se aplican las condiciones selectivas para el marcador de selección (sm I) y/o (sm II). Este procedimiento es particularmente útil en el caso de que uno de los marcadores de selección (sm I) y/o (sm II) sea un marcador de selección amplificable.

Como se ilustra anteriormente, (sm I) es un transportador de folato, en particular un receptor de folato y, por consiguiente, una realización de la presente invención se basa en la disponibilidad limitada de un folato en el medio de cultivo celular. El sistema será ampliamente aplicable y en particular a una célula eucariótica, cuya viabilidad celular depende de la absorción de un folato. Esta realización se puede utilizar para la selección, el rastreo y el establecimiento acelerados de las células hospedadoras, en particular de los clones de las células eucarióticas, por ejemplo, de mamífero, que preferentemente sobre-expresan establemente altos niveles de productos recombinantes. Todavía además y en contraste con otros sistemas de selección conocidos, no hay una necesidad esencial (aunque esto es factible algunas veces) de células modificadas, proporcionadas, por ejemplo, mediante la mutación o eliminación genética de los genes endógenos. Debido a que, por ejemplo, FR alfa exhibe una afinidad más alta por FA (K_D = 0,1 nM) que, por ejemplo, el portador de folato reducido (RFC) para leucovorina (Kt = 1 µM) y transporta ácido fólico hacia dentro de las células por medio de una vía unidireccional, la presente invención proporciona el uso de FR alfa y de otros receptores de folato como un marcador de selección metabólico dominante notoriamente mejorado, en particular, por medio de la privación gradual de folato (por ejemplo, ácido fólico) en el medio de cultivo. Esta selección basada en folato es una excelente estrategia que es muy adecuada para la sobre-expresión acelerada, estable y de alto nivel, de las proteínas objetivo en las células de mamífero cultivadas.

La estrategia de la presente invención de usar dos marcadores de selección (sm I) y (sm II) hasta cierto grado interdependientes, que preferentemente están involucrados en un proceso o vía metabólica común o en concierto, tiene la ventaja de que se obtiene una rigurosidad muy alta debido a los efectos aditivos/sinérgicos de las condiciones de selección que se dirigen a una vía metabólica. Por consiguiente, se incrementa notoriamente la productividad de la población celular que sobreviva a la selección. Los ejemplos han demostrado que las células hospedadoras obtenidas después del método de selección producen el producto de interés, con un alto rendimiento. También se incrementa la productividad promedio de las células hospedadoras individuales. Por consiguiente, se mejoran las oportunidades de encontrar 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 para la combinación preferida del uso de un receptor de folato en conjunto con una enzima DHFR como marcadores de selección (sm I) y (sm II), se obtienen células hospedadoras que tienen una productividad más alta comparándose con el uso de los marcadores de selección respectivos solos. Por consiguiente, debido a la rigurosidad más alta de las condiciones de selección, se optimiza el procedimiento de selección.

El método de selección de acuerdo con la presente invención también se puede llevar a cabo más rápido y más eficientemente que las estrategias de selección convencionales conocidas en la técnica anterior, debido a que se puede llevar a cabo la selección para los marcadores de selección (sm I) y (sm II) en un paso de selección, si se utilizan condiciones de cultivo celular óptimas.

El método puede comprender adicionalmente un paso de:

(c) seleccionar al menos una célula hospedadora que exprese el producto de interés con el rendimiento deseado.

Las células obtenidas como un resultado del procedimiento de rastreo/selección riguroso 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. Sin embargo, también es posible utilizar una población enriquecida. Las células hospedadoras obtenidas 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 realización, una población enriquecida de células hospedadoras productoras seleccionadas como se describe anteriormente, se utiliza directamente como la población para la producción del polipéptido de interés con un buen rendimiento.

Preferentemente, se selecciona una célula hospedadora que exprese establemente el producto de interés. Las ventajas de una transfección/expresión estable se describen con detalle anteriormente. Los presentes inventores hacen referencia a la divulgación anterior.

En una realización muy preferida del método para la selección, la pluralidad de células hospedadoras comprende las células hospedadoras de acuerdo con la presente invención, es decir, como se dan a conocer en la presente. Nos referimos a la descripción anteriormente detallada, en particular a los marcadores de selección adecuados (sm I) y (sm II) y a las combinaciones de los mismos.

Otras realizaciones preferidas en particular con respecto a las células hospedadoras y al vector de expresión, respectivamente, combinación de vectores de expresión, se describen con detalle anteriormente. Los presentes inventores hacen referencia a la divulgación anterior.

El primer marcador de selección (sm I) es un transportador/receptor que es capaz de transportar folato hacia dentro de la célula hospedadora. Esta realización del sistema de selección de acuerdo con la presente invención no requiere de una supresión genómica o de la atenuación de los genes del receptor de folato endógeno alfa, beta o gamma, antes de la transfección y, por consiguiente, se puede aplicar a cualquier célula receptora, incluso cuando esté presente algo de la expresión genética del receptor de folato endógeno (véase anteriormente). Esta ventaja clave se basa en el hecho de que, en seguida de la transfección del receptor de folato alfa, las células se pueden exponer a una privación abrupta y severa de folatos (por ejemplo, ácido fólico) a partir del medio de cultivo. En consecuencia, solamente las células transfectantes que expresen cantidades significativas del marcador de selección del receptor de folato alfa pueden transportar suficiente folato para sostener la replicación del ADN y la proliferación celular. Esto se presenta en ausencia de cualquier elevación significativa en la expresión del gen del receptor de folato endógeno alfa. Adicionalmente, esta realización del sistema de selección de acuerdo con la presente invención no sufre de pérdida de rigurosidad de la selección debido al alivio de la presión selectiva por medio de un aumento en la expresión de las rutas alternativas de absorción de folato, incluyendo el aumento en la expresión del portador de folato reducido (RFC) endógeno. Esta importante ventaja se debe al hecho de que, mientras que el receptor de folato alfa tenga una afinidad sobrante por el ácido fólico (Kd = 0,1 nM), el portador de folato reducido (RFC) exhibe una afinidad extremadamente pobre por el ácido fólico (Km = 0,2-0,4 mM).

Ya que (sm II) es la DHFR o una variante funcional de la misma, el medio de cultivo selectivo contiene adicionalmente un inhibidor de una enzima respectiva, por ejemplo, anti-folatos, tales como, por ejemplo, MTX, con el objeto de proporcionar las condiciones selectivas.

El medio de cultivo selectivo que se utiliza en al menos un paso de selección puede comprender uno o más tipos de folato. 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 hospedadora. Los folatos y en particular los derivados de folato que no serían procesados por la célula hospedadora no contribuirían a la presión de selección y, por consiguiente, no contribuirían a la concentración limitante. El medio de cultivo selectivo puede tener una o más de las siguientes características:

(a) comprende una concentración limitante de folato, preferentemente en una concentración de aproximadamente 500 nM o menos, de aproximadamente 250 nM o menos, de aproximadamente 150 nM o menos, de aproximadamente 100 nM o menos, de aproximadamente 75 nM o menos, de aproximadamente 50 nM o menos, de aproximadamente 25 nM o menos, de aproximadamente 15 nM o menos, de aproximadamente 10 nM o menos, de aproximadamente 5 nM o menos o de hasta aproximadamente 2,5 nM y en donde este folato es preferentemente ácido fólico; y/o
(b) comprende ácido fólico en una concentración de aproximadamente 500 nM o menos, de aproximadamente 250 nM o menos, de aproximadamente 150 nM o menos, de aproximadamente 100 nM o menos, de aproximadamente 75 nM o menos y preferentemente de aproximadamente 50 nM o menos; y/o
(c) comprende un inhibidor de la DHFR; y/o
(d) comprende un anti-folato; y/o
(e) comprende un anti-folato en una concentración de aproximadamente 500 nM o menos, de aproximadamente 350 nM o menos, de aproximadamente 200 nM o menos, preferentemente de aproximadamente 150 nM o menos; y/o
(f) comprende MTX como un anti-folato; y/o
(g) comprende MTX en una concentración de aproximadamente 350 nM o menos, 200 nM o menos, preferentemente de aproximadamente 150 nM o menos; y/o
(h) comprende ácido fólico en una concentración de hasta 100 nM, preferentemente de hasta 50 nM y una concentración equimolar de hasta 20 veces de un anti-folato.

Las concentraciones preferidas de folato y en particular de ácido fólico, se seleccionan a partir de:

(a) aproximadamente 500 nM a 100 pM;
(b) aproximadamente 250nM a 1nM; preferentemente de aproximadamente 250 nM a 2,5 nM o de aproximadamente 250nM a 5 o 10nM;
(c) aproximadamente 150 nM a 1 nM; preferentemente de aproximadamente 150 nM a 2,5 nM o de aproximadamente 150 nM a 5 o 10 nM;
(d) aproximadamente 100 nM a 1 nM; preferentemente de aproximadamente 100 nM a 2,5 nM o de aproximadamente 100 nM a 5 o 10 nM;
(e) aproximadamente 75 nM a 1 nM, preferentemente de aproximadamente 75 nM a 2,5 nM o de aproximadamente 75 nM a 5 o 10 nM;
(f) aproximadamente 50 nM a 1 nM; preferentemente de aproximadamente 50 nM a 2,5 nM o de aproximadamente 50 nM a 5 o 10nM;
(g) aproximadamente 50 nM a 12,5 nM; y
(h) aproximadamente 25 nM a 2,5 nM o de aproximadamente 25 nM a 5 nM.

Las concentraciones preferidas de anti-folato y en particular de MTX, se seleccionan a partir de:

(a) aproximadamente 500 nM a 5 nM;
(b) aproximadamente 350 nM a 5 nM;
(c) aproximadamente 200 nM a 5 nM;
(d) aproximadamente 100 nM a 10 nM;
(e) aproximadamente 50 nM a 10 nM; y
(f) aproximadamente 50 nM.

Las concentraciones preferidas y los intervalos de concentración de folato y anti-folato descritos anteriormente se pueden combinar unas con otros. En una realización, se utiliza una concentración de folato de aproximadamente 12,5 nM a 50 nM en combinación con una concentración de anti-folato de 10 nM a 100 nM. Como se describe, preferentemente se utiliza ácido fólico como el folato y se utiliza MTX como el anti-folato.

Adicionalmente, también se encontró que las concentraciones utilizadas de folato y anti-folato pueden tener influencia una sobre la otra. Por consiguiente, además de la concentración absoluta de folatos y anti-folatos, también la proporción puede ser un factor para proporcionar las condiciones de selección adecuadas. La concentración del anti-folato (preferentemente MTX) puede ser hasta aproximadamente 20 veces la concentración del folato (preferentemente ácido fólico). La concentración del anti-folato (preferentemente MTX) puede ser aproximadamente 10 veces la concentración del folato (preferentemente ácido fólico). Preferentemente, el medio de cultivo selectivo comprende un folato y un anti-folato en una proporción de concentración de 1:10 a 10:1, preferentemente en una proporción de concentración de 1:5 a 5:1. Se obtienen muy buenos resultados si se utilizan concentraciones aproximadamente equimolares de folato y anti-folato. Como se muestra mediante Los ejemplos, estas proporciones proporcionan condiciones de cultivo selectivas muy adecuadas para obtener las células hospedadoras de alta producción. El medio de cultivo selectivo descrito anteriormente también constituye un elemento individual de la presente invención, debido a que la presente invención también proporciona un medio de cultivo selectivo respectivo adecuado para seleccionar las células hospedadoras de acuerdo con el método de la presente invención.

Las concentraciones descritas anteriormente son particularmente adecuadas para las células en suspensión de rápido crecimiento, el cual es 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 pueden variar dependiendo del folato utilizado, respectivamente, el anti-folato. Por consiguiente, las concentraciones limitantes de folato, en particular ácido fólico y anti-folato, en particular MTX, así como las proporciones adecuadas del ácido fólico al MTX, pueden diferir dependiendo de las células hospedadoras seleccionadas y el folato, respectivamente, el anti-folato. Las concentraciones adecuadas, sin embargo, pueden ser fácilmente determinadas de una manera experimental por la persona experta.

De acuerdo con una realización, las células hospedadoras 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. Preferentemente, el medio de cultivo para cultivar previamente las células hospedadoras comprende folato, en particular ácido fólico, en una concentración de 50 nM o menos.

Como se ilustra anteriormente, el método de selección de acuerdo con la presente invención se puede combinar con los métodos de selección basados en citometría de flujo conocidos en la técnica anterior. Por consiguiente, De acuerdo con una realización, se lleva a cabo un paso de selección que involucre citometría de flujo después de que se seleccionen las células hospedadoras de acuerdo con el método de la presente invención, con el objeto de seleccionar las células hospedadoras que expresen el producto de interés, con un alto rendimiento. Para este propósito, preferentemente al menos una porción del producto de interés se expresa como un polipéptido de fusión anclado a membrana que se exhibe sobre la superficie celular de la célula hospedadora. Basándose en la cantidad de polipéptido de fusión exhibido, las células hospedadoras se pueden seleccionar utilizando citometría de flujo, preferentemente utilizando FACS, que exprese el producto de interés, con un alto rendimiento.

De acuerdo con una realización preferida, el polinucleótido de interés se expresa, por consiguiente, a partir de:

a) un casete de expresión que comprenda al menos:

aa) el polinucleótido que codifique el producto de interés,
bb) al menos un codón de paro corriente abajo del polinucleótido que codifique el producto de interés y
cc) un polinucleótido corriente abajo del codón de paro que codifique un ancla de membrana y/o una señal para un ancla de membrana; o

b) un casete de expresión que comprenda al menos:

aa) el polinucleótido que codifique el producto de interés,
bb) un intrón que comprenda un sitio donador de empalme 5' y un sitio aceptor de empalme 3' y que comprenda un codón de paro de traducción dentro del marco y una señal de poliadenilación, y
cc) un polinucleótido corriente abajo de este intrón que codifique un ancla de membrana y/o una señal para un ancla de membrana.

Los detalles con respecto al diseño de estos casetes de expresión se discutieron anteriormente. Se refiere a la divulgación respectiva. Para la selección, las células hospedadoras se cultivan con el fin de permitir la expresión del producto de interés, de tal manera que se exprese al menos una porción del producto de interés como un polipéptido de fusión, el cual comprenda el ancla de membrana, en donde el polipéptido de fusión se esté exhibiendo sobre la superficie de la célula hospedadora y en donde se seleccione al menos un célula hospedadora basándose en la cantidad del polipéptido de fusión exhibido sobre la superficie celular. Como se discute anteriormente, las células hospedadoras preferentemente se seleccionan utilizando citometría de flujo, en particular FACS. Como se muestra en Los ejemplos, la combinación del método de selección de acuerdo con la presente invención con un planteamiento de selección basado en citometría de flujo respectivo es muy conveniente y se identifican células hospedadoras que tienen índices de expresión muy buenos.

De acuerdo con una realización, la presente invención también proporciona un medio de cultivo selectivo, el cual comprende folato en una concentración limitante y un anti-folato. Como se ilustra anteriormente, 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 hospedadora. Los folatos y en particular los derivados de folato, que no serían procesados por la célula hospedadora, no contribuirían a la presión de selección y, por consiguiente, no contribuirían a la concentración limitante. El medio de cultivo selectivo preferentemente tiene una o más de las características descritas anteriormente para el medio de cultivo selectivo utilizado en conjunto con el método de selección descrito de la presente invención, en particular con respecto a la concentración de folato y anti-folato comprendidos en el medio y a las realizaciones preferidas. También se ilustraron las ventajas con detalle anteriormente. Se hace referencia a la divulgación anterior, la cual también se aplica aquí. El medio de cultivo selectivo se puede utilizar en conjunto con el sistema de selección de la presente invención.

También se proporciona un proceso para la producción de un producto de interés, el cual comprende el paso de cultivar una célula hospedadora de acuerdo con la presente invención y/o una célula hospedadora seleccionada de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, en condiciones que permitan la expresión del producto de interés.

El uso de las células hospedadoras de acuerdo con la presente invención para producir un producto de interés, en particular un polipéptido, tiene la ventaja de que el producto de interés se puede producir con un rendimiento muy alto. Esto, en particular cuando se lleve a cabo el método de selección de acuerdo con la presente invención, para seleccionar las células hospedadoras apropiadas para la expresión. Por consiguiente, la presente invención proporciona un método mejorado para producir un polipéptido de interés. Las células hospedadoras adecuadas, se describen anteriormente; los presentes inventores hacen referencia a la divulgación anterior.

El producto de interés expresado se puede obtener mediante la alteración de las células hospedadoras. 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 esta manera, se pueden producir y obtener/aislar los productos, en particular los polipéptidos, de una manera eficiente, 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, con el objeto de producir el producto de interés en la calidad deseada. De acuerdo con una realización, las células hospedadoras se cultivan en condiciones sin suero.

El método para producir el producto de interés puede comprender al 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 hospedadora; y/o
- procesar el producto aislado de interés.

El producto de interés, por ejemplo, un polipéptido, producido de acuerdo con la invención, se puede recuperar, purificar adicionalmente, aislar y/o modificar, mediante los métodos conocidos en la técnica. 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, cromatoenfoque y por exclusión de tamaños), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoque preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio) o extracción.

El producto de interés puede ser cualquier producto biológico capaz de producirse mediante transcripción, traducción o cualquier otro suceso de expresión de la información genética codificada por este 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 y ácidos nucleicos, en particular ARN. El producto puede ser un compuesto farmacéuticamente o terapéuticamente activo o una herramienta de investigación para utilizarse en los ensayos y similares. En una realización particularmente preferida, el producto es un polipéptido, preferentemente un polipéptido farmacéuticamente o terapéuticamente activo o una herramienta de investigación para utilizarse en los ensayos de diagnóstico o en otros ensayos y similares. Un polipéptido, por consiguiente, no está limitado a cualquier proteína o grupo de proteínas particular, sino, por el contrario, puede ser cualquier proteína, de cualquiera tamaño, función u origen, que se desee seleccionar y/o expresar mediante los métodos descritos en la presente. Por consiguiente, se pueden expresar/producir varios polipéptidos de interés diferentes. El término "polipéptido" se refiere a una molécula que comprende un polímero de aminoácidos enlazados entre sí mediante enlaces peptídicos. Los polipéptidos incluyen polipéptidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas (por ejemplo, que tengan más de 50 aminoácidos) y péptidos (por ejemplo, de 2 a 49 aminoácidos). Los polipéptidos incluyen proteínas y/o péptidos de cualquier actividad o bioactividad, incluyendo, por ejemplo, polipéptidos bioactivos, tales como proteínas o péptidos enzimáticos (por ejemplo, proteasas, cinasas, fosfatasas), proteínas o péptidos receptores, proteínas o péptidos transportadores, proteínas bactericidas y/o de 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 realización muy preferida, el polipéptido es una molécula de inmunoglobulina o de anticuerpo 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 farmacéuticamente 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 preferentemente un polipéptido, en particular una molécula de inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de un primer marcador de selección (sm I) en combinación con un segundo marcador de selección (sm II) que difiere del primer marcador de selección (sm I), en donde la actividades del marcador de selección (sm I) o (sm II) están al menos parcialmente influenciadas por la

actividad del otro marcador de selección para seleccionar una célula hospedadora que sea capaz de expresar un producto de interés, en donde el primer marcador de selección (sm I) es un transportador de folato y el segundo marcador de selección (sm II) es DHFR o una variante funcional de la misma.

El primer marcador de selección (sm I) y/o el segundo marcador de selección (sm II) puede tener al menos una de las siguientes características:

(a) el primer marcador de selección (sm I) y/o el segundo marcador de selección (sm II) están involucrados en un proceso o vía metabólica seleccionada entre:

(aa) la síntesis de ácidos nucleicos y/o la síntesis de polipéptidos;
(ab) la síntesis de nucleótidos y/o la síntesis de aminoácidos; y
(ac) el metabolismo de folato; y/o

(b) el primer marcador de selección (sm I) y/o el segundo marcador de selección (sm II) es un polipéptido catalítico o un polipéptido transportador; y/o

(c) el segundo marcador de selección (sm II) es un polipéptido catalítico que procesa un sustrato que es un compuesto que es importado por el primer marcador de selección (sm I) hacia dentro de una célula hospedadora o un producto posterior obtenido a partir del compuesto incorporado, y/o

(d) el primer marcador de selección (sm I) opera corriente arriba del segundo marcador de selección (sm II); y/o

(e) el primer marcador de selección (sm I) es o comprende un polipéptido transportador que importa un compuesto involucrado en y/o esencial para la viabilidad y/o proliferación celular dentro de una célula hospedadora; y/o

(f) el primer marcador de selección (sm I) transporta/ incorpora al menos un folato en la célula hospedadora; y/o

(g) el primer marcador de selección (sm I) es o comprende un receptor de folato funcional enlazado a membrana; y/o

(h) el segundo marcador de selección (sm II) es un polipéptido catalítico, a saber, DHFR o una variante funcional de la misma, que procesa un sustrato que es ya sea un folato y/o un producto posterior obtenido a partir de un folato; y/o

(i) el primer marcador de selección (sm I) es un receptor de folato funcional enlazado a membrana, el cual es o comprende un receptor de folato que tiene una o más de las siguientes características:

(ia) el receptor de folato se selecciona a partir del grupo que consiste en un receptor de folato alfa, un receptor de folato beta, un receptor de folato gamma y las variantes funcionales de los anteriores, y/o
(ib) el receptor de folato es un receptor de folato humano o una variante funcional del mismo, y/o
(ic) el receptor de folato es un receptor de folato alfa humano o una variante funcional del mismo, y/o
(id) el receptor de folato es un receptor de folato que tiene o que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2 o 3 o una variante funcional de los anteriores; y/o

(j) el marcador de selección (sm II) es o comprende un polipéptido catalítico implicado en la síntesis de ácidos nucleicos y en el metabolismo del folato, a saber, DHFR o una variante funcional o fragmento de la misma; y/o

(k) el primer marcador de selección (sm I) es o comprende un polipéptido transportador que incorpora un compuesto involucrado en y/o esencial para la síntesis de ácidos nucleicos en el interior de una célula hospedadora y el segundo marcador de selección (sm II) es un polipéptido catalítico involucrado en la síntesis de ácidos nucleicos, y en donde el primer marcador de selección (sm I) es un transportador de folato y el segundo marcador de selección (sm II) es DHFR o una variante funcional de la misma; y/o

(l) el primer marcador de selección (sm I) y/o el segundo marcador de selección (sm II) es un marcador de selección eucariótico; y/o

(m) el segundo marcador de selección (sm II) es un marcador de selección amplificable.

Los detalles, combinaciones y ventajas de estas realizaciones se describen anteriormente. Los presentes inventores hacen referencia a la divulgación anterior. En particular se prefiere una combinación de un transportador de folato, tal como un receptor de folato, con la DHFR o una variante funcional o derivado de la misma.

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 realizaciones preferidas de la presente invención.

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 ejemplos se llevan a cabo de acuerdo con las instrucciones descritas.

1. Ejemplo 1 – Selección

Se hace un experimento de co-transfección en células CHO utilizando vectores que tienen casetes de expresión idénticos para la misma proteína de interés (anticuerpo monoclonal) pero diferentes combinaciones de marcadores de selección. Este experimento demuestra que una selección combinada de MTX y concentraciones limitantes de ácido fólico en el medio de cultivo celular, permiten la generación de poblaciones de células que sobre-expresan altamente el producto de interés, en la presente una molécula de inmunoglobulina y que la productividad de estas poblaciones es más alta comparándose con las estrategias que utilizan la DHFR o el receptor fólico alfa (FolR) como marcador de selección metabólico solamente.

1.1. Materiales y métodos

1.1.1. Construcción del vector:

El VECTOR I contiene un casete de expresión de dihidrofolato reductasa (DHFR) (mutante para DHFR + (más) líneas celulares). Este vector de plásmido (VECTOR I), adecuado para la expresión en células eucarióticas, en particular en células CHO, aloja:

(i) un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica la cadena pesada y un casete de expresión que codifica la cadena ligera de un anticuerpo humano recombinante secretado del tipo IgG1. La expresión del anticuerpo recombinante está bajo el control de un promotor de CMV y una señal de poliadenilación estándar (SV40);
(ii) un casete de expresión distinto que comprende un polinucleótido que codifica la DHFR (una forma mutada que tiene una sensibilidad más baja para el MTX) como el gen marcador de selección (sm II). La expresión de la DHFR está bajo el control de un promotor de SV40 y una señal de poliadenilación estándar (SV40).

El vector de plásmido (VECTOR II) comprende un receptor de ácido fólico alfa humano como el primer marcador de selección (sm I) en lugar de la DHFR. Por consiguiente, ambos vectores contienen un gen de resistencia al G418 (neo) pero diferentes marcadores adicionales, es decir, la DHFR o el receptor fólico alfa humano. El VECTOR I y el VECTOR II comprenden los siguientes elementos principales:

ELEMENTOS DEL VECTOR I	**ELEMENTOS DEL VECTOR II**
Promotor/potenciador de CMV	Promotor/potenciador de CMV
Intrón-RK	Intrón-RK
Polinucleótido que codifica la cadena ligera del anticuerpo	Polinucleótido que codifica la cadena ligera del anticuerpo
Un sitio Poli de SV40	Un sitio Poli de SV40
Promotor/potenciador de CMV	Promotor/potenciador de CMV
Intrón-RK	Intrón-RK
Polinucleótido que codifica la cadena pesada del anticuerpo	Polinucleótido que codifica la cadena pesada del anticuerpo
Un sitio Poli de SV40	Un sitio Poli de SV40
Potenciador/promotor de SV40	Potenciador/promotor de SV40

ELEMENTOS DEL VECTOR I	ELEMENTOS DEL VECTOR II
Gen de resistencia a la neomicina	Gen de resistencia a la neomicina
Un sitio Poli sintético	Un sitio Poli sintético
Un gen de resistencia a la ampicilina	Un gen de resistencia a la ampicilina
Promotor SV40	Promotor SV40
Polinucleótido que codifica la DHFR (mutante)	huFolR
Fragmento de intrón de SV40	
Un sitio Poli de SV40	Un sitio Poli de SV40

1.1.2. 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 células CHO que crecen en suspensión en un medio de cultivo convencional. Con el objeto de reducir los depósitos intracelulares de ácido fólico en las células hospedadoras 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.

Las células se co-transfectan con el VECTOR I y el VECTOR II mediante electroporación. 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 selectivo que contiene G418 y ácido fólico 10 nM a las células. 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 MTX 100 nM y ácido fólico 10 nM. La concentración de ácido fólico se puede incrementar hasta 20 nM y posteriormente hasta 100nM si las células no se recuperan bajo las condiciones más rigurosos. Las reservas en donde todavía no se puede ver crecimiento, pero sí un aumento de las viabilidades, las células se transfieren al medio de cultivo que contiene ácido fólico 11,3 µM y nada de MTX. Después de esta transferencia, las poblaciones de células co-transfectadas que empiezan a crecer, se expanden para su análisis adicional.

1.1.3. Determinación de la productividad de la reserva:

Se analiza la productividad de las poblaciones de células seleccionadas después de los pasos primero y último de selección por medio de cultivos discontinuos en matraces de agitación con sobre-crecimiento en un medio que contiene ácido fólico 11,3 µM sin G418 y MTX.

Los cultivos discontinuos se siembran en el matraz de agitación 125 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 CO_2 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 de aproximadamente 2 x 10^5 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.

1.2. Resultados

Para demostrar la eficacia de una estrategia de selección utilizando la DHFR y FolR como marcadores de selección, se hace una co-transfección de los vectores que codifican la DHFR (VECTOR I) y FolR (VECTOR II) y un anticuerpo monoclonal idéntico. Ambos vectores también contienen un gen de resistencia al G418 (véase anteriormente).

1.2.1. Primer paso de selección:

Primero, se seleccionan las poblaciones de células transfectadas mediante la adición de G418 y reduciendo la concentración de ácido fólico hasta 10 nM. Este paso inicial de selección previa ayuda a aniquilar las células no transfectadas y, en paralelo, fuerza a las células a consumir sus depósitos intracelulares de ácido fólico antes de que se apliquen las condiciones de selección más rigurosos en el segundo paso de selección. Bajo estas primeras condiciones de selección, usualmente se recuperan todas las poblaciones de células transfectadas y se evalúa la productividad como se describe en materiales y métodos. Se analizan las células transfectadas seleccionadas en el medio que contiene G418 y ácido fólico 10 nM en los cultivos discontinuos 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. La Tabla 1 resume los resultados de productividad obtenidos en un ejemplo respectivo:

V

Vector	VECTOR I (DHFR) y VECTOR II (FolR)
Reserva No.	**mg/l**
1	53
2	42
3	62
4	66
5	47

Todas las poblaciones de células producen anticuerpos. Las células transfectadas con el vector de FolR (VECTOR II) en combinación con el vector de dihidrofolato reductasa (DHFR) (VECTOR I), responden con productividades promedio más altas a la selección, que los métodos convencionales de la técnica anterior (por ejemplo, la DHFR sola). El contenido limitado de ácido fólico en el medio de cultivo promueve el crecimiento de las células que sobre-expresan FolR.

1.2.2. Segundo paso de selección:

Con el fin de aumentar la rigurosidad de la selección, el siguiente paso es remover el G418, pero agregar MTX 100 nM al medio de cultivo y mantener la concentración de ácido fólico en 10 nM. Bajo estas condiciones, la viabilidad de las células de todas las poblaciones transfectadas cae dramáticamente y se queda en bajos niveles. En adición, usualmente no se detecta ningún crecimiento celular. La presión selectiva se puede reducir mediante el incremento del contenido de ácido fólico primero hasta 20 nM y luego hasta 100 nM. Con el objeto de impulsar el crecimiento de las poblaciones seleccionadas para la evaluación de la productividad, las células viables recuperadas se pueden transferir a un medio sin MTX y con ácido fólico 11,3 µM. Se guarda por separado una reserva ya parcialmente recuperada a partir de la doble transfección y en el medio que contiene ácido fólico 100 nM, mientras que las otras reservas de cada combinación de vectores se combinan para aumentar la densidad celular y, de esta manera, las oportunidades de supervivencia. Las células doblemente transfectadas responden con un rápido crecimiento, se expanden adicionalmente y se analiza la productividad. La Tabla 2 muestra los resultados:

Tabla 2: Productividad de las poblaciones de células después del segundo paso de selección

Vector	VECTOR I (DHFR) y VECTOR II (FolR)
Reserva No.	**mg/l**
1	1110
2-5	524

Las poblaciones de células seleccionadas con G418 y ácido fólico 10 nM se seleccionan adicionalmente mediante la adición de MTX 100 nM un aumento por pasos de la concentración de ácido fólico. Finalmente, las células se transfieren al medio sin MTX y que contiene ácido fólico 11,3 µM y las poblaciones recuperadas se analizan en los cultivos discontinuos 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.

La productividad de las poblaciones de células doblemente transfectadas después de este proceso de selección es sorprendentemente alta. Comparándose con el primer paso de selección, las titulaciones de anticuerpos aumentaron por aproximadamente 20 veces en el caso de la reserva 1 que alcanzó más de 1 gramo/litro y 10 veces en el caso de las reservas combinadas 2 a 5. También, en comparación con los procedimientos de selección mucho más intensivamente optimizados que utilizan, por ejemplo, la DHFR sola en combinación con G418 como marcadores de selección, las productividades encontradas después de la doble selección son mucho más altas con la combinación de vectores de acuerdo con la presente invención. Los experimentos anteriores utilizando una combinación de dihidrofolato reductasa (DHFR)/G418 para el mismo anticuerpo dieron como resultado titulaciones de la reserva considerablemente más bajas.

Por consiguiente, la selección combinada utilizando la DHFR y FolR como marcadores de selección, genera células que sobre-expresan altamente una proteína de interés. Esta combinación también es superior a los sistemas de selección del estado de la técnica (por ejemplo, DHFR/G418).

2. Ejemplo 2: Optimización de las condiciones de selección

2.1. Transfección, selección y caracterización de clones

2.1.1. Transfección y selección:

Para la optimización de las condiciones de selección, se prueban combinaciones adicionales de concentraciones de ácido fólico y MTX en dos pasos de selección en secuencia. Primero, en un medio que contiene 0,8 gramos/litro de G418, se combinan concentraciones de ácido fólico de 12,5 nM, 25 nM, 50 nM y 11,3 µM (referencia) con MTX 2,5 nM, 5 nM, o 10 nM o sin MTX. Las poblaciones de células que se recuperan bajo estas condiciones en un segundo paso de selección, se transfieren al medio sin G418 que contiene la misma concentración de ácido fólico, pero una concentración de MTX 10 veces más alta que en el primer paso de selección. Las células de referencia se transfieren al medio que contiene MTX 500 nM de acuerdo con un protocolo de selección de dihidrofolato reductasa (DHFR) estándar.

2.1.2. Clonación y caracterización de clones

La clonación se lleva a cabo mediante dilución limitante con las células sembradas en placas de 96 pozos a una densidad de 0,5 células por pozo. Posteriormente, las células se expanden primero en placas de 24 pozos y luego en matraces de agitación para el rastreo de la productividad.

La productividad de los clones se analiza en experimentos en lotes y de alimentación por lotes utilizando diferentes formatos. El rastreo inicial se lleva a cabo en ensayos por lotes en placas de 24 pozos mediante la siembra de las células en placas de 24 pozos agitadas. Las titulaciones de anticuerpos en el sobrenadante del cultivo celular se determinan mediante HPLC de Proteína-A cuantitativa, 10 días después del inicio del cultivo. Posteriormente se analizan los clones de más alta producción en los modelos del matraz de agitación en el modo por lotes y de alimentación por lotes. Los cultivos discontinuos en el medio de cultivo que contiene ácido fólico 11,3 µM se siembran en matraces de agitación (capacidad de 500 mililitros o de 250 mililitros) con un volumen de procesamiento de 100 mililitros o de 50 mililitros y se cultivan en un gabinete de agitación (no humidificado) a 150 revoluciones por minuto, a 36,5°C y con CO_2 al 10 por ciento. La viabilidad de las células es >90 por ciento cuando se inicia el ensayo. La densidad celular de la siembra es de 2 x 10^5 células/mililitro. La titulación de anticuerpos, el número de células y la viabilidad, se pueden determinar en puntos del tiempo de cultivo definidos. Los experimentos de alimentación por lotes se hacen utilizando las mismas condiciones, pero con una densidad celular inicial de 4 x 10^5 células/mililitro y con la adición regular de alimentaciones empezando en las densidades de células viables por encima de 7 x 10^6 células/mililitro. La estabilidad clonal se evalúa mediante el cultivo de las células durante un período de hasta 19 semanas con mediciones de productividad utilizando el modelo por lotes en matraz de agitación aproximadamente cada dos semanas.

2.2. Resultados:

2.2.1. Primer paso de selección

Las células transfectadas se seleccionan en un primer paso de selección en concentraciones de ácido fólico en el intervalo de 12,5 nM a 50 nM en combinación con concentraciones de MTX de 2,5 nM a 10 nM. Como una referencia, también se prueba el ácido fólico 11,3 µM (FA). Las productividades obtenidas después del primer paso de selección se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3: Productividad de las células después del primer paso de selección en diferentes combinaciones de concentraciones de ácido fólico y MTX. Todos los valores están en miligramos/litro

Marcador de selección	Ácido fólico	Sin MTX	MTX 2,5 nM	MTX 5 nM	MTX 10 nM
DHFR y FolR	FA 12,5 nM	16	19	27	333
	FA 25 nM	18	16	24	70
	FA 50 nM	12	18	13	887
DHFR sola, referencia	FA 11,3 nM	16	11	16	11

Se encuentra que se obtienen las productividades más altas, después de la selección con MTX 10 nM. Las células co-transfectadas con el VECTOR I y con el VECTOR II producen cantidades sorprendentemente altas del producto (hasta 887 miligramos/litro). Esto es significativamente más que la productividad de las células transfectadas con la DHFR sola (DHFR sola, referencia)

2.2.2. Segundo paso de selección:

Se aplica un segundo paso de selección a las poblaciones recuperadas mediante la transferencia de las células al medio sin G418, manteniendo la concentración de ácido fólico del primer paso de selección, pero aumentando la concentración de MTX 10 veces. Se analiza la productividad para la población de células que se recuperan bajo estas condiciones. Los resultados se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4: Productividad de las células después del segundo paso de selección en diferentes combinaciones de concentraciones de ácido fólico y MTX. Todos los valores están en miligramos/litro

Marcador de selección	**Ácido fólico**	**MTX 10 nM**	**2MTX 5 nM**	**MTX 50 nM**	**MTX 100 nM**	**MTX 500 nM**
DHFR y FolR	FA 12,5 nM	457	869	1170	193	nd
	FA 25 nM	624	967	842	907	nd
	FA 50 nM	27	68	1540	1320	nd
DHFR sola, referencia	FA 11,3 nM	nd	nd	nd	nd	31

De una manera sorprendente, se encuentra que, en condiciones de selección apropiadas, las células transfectadas con el VECTOR I y el VECTOR II y, por consiguiente, una combinación de acuerdo con la presente invención, tienen una productividad mucho más alta (de hasta 1,5 gramos/litro) comparándose con las células transfectadas con el VECTOR I solo. Esto muestra que la combinación de la DHFR y FolR como marcadores de selección proporciona una rigurosidad muy incrementada de la selección. Por consiguiente, la presente invención proporciona una mejora considerable sobre la técnica anterior.

2.2.3. Comparación de la productividad clonal

Se generan clones mediante clonación de dilución limitante a partir de las reservas co-transfectadas después de la selección. Los clones de más alta producción identificados en el rastreo de la placa de 24 pozos se expanden adicionalmente en matraces de agitación. La productividad se analiza en un ensayo por lotes en matraz de agitación con sobre-crecimiento y se compara con los resultados de los clones superiores obtenidos con los vectores individuales de los experimentos anteriores.

Tabla 5: Productividad de los 5 clones superiores a partir de la clonación de dilución limitante en un modelo por lotes de matraz de agitación. Todos los valores son gramos/litro de anticuerpos en el día 13-15 del cultivo

	Vector/Selección		
Clasificación de clones	**DHFR**	**FolR**	**DHFR/folR**
1	0,52	1,10	1,46
2	0,51	1,09	1,44
3	0,50	0,99	1,44
4	0,49	0,85	1,41
5	0,47	0,85	1,40

Los clones de más alta producción se obtienen mediante la co-transfección de los vectores que contienen DHFR y FolR como marcadores de selección y mediante la selección de las células transfectadas bajo concentraciones limitantes de ácido fólico más MTX.

2.2.4. Análisis de estabilidad de la producción clonal

Se determina la estabilidad de la producción clonal de los 10 clones co-transfectados y seleccionados con DHFR/foIR superiores durante un período de 19 semanas empezando a partir de la descongelación de los frascos hasta la primera evaluación de productividad en la semana 5 después de la descongelación. Las células se cultivan

en condiciones selectivas en ácido fólico 50 nM y MTX 50 nM. El ensayo de productividad se lleva a cabo con el medio de cultivo que contiene ácido fólico 11,3 µM.

Tabla 6: Estabilidad de la producción clonal de los 10 clones superiores a partir de la clonación de dilución limitante en un modelo por lotes de matraz de agitación. Todos los valores están en miligramos/litro de anticuerpos en el día 13-15 del cultivo

Clon	Semana 5	Semana 8	Semana 12	Semana 15	Semana 17	Semana 19
6A8	1070	1230	1040	924	980	987
7F2	1090	1140	1120	971	975	1060
7F7	1120	1240	1140	904	917	937
9C4	1110	1200	1030	769	560	573
9G12	1150	1240	1140	938	775	538
9H9	1100	1150	1130	969	1000	1040
10D3	1140	1130	1090	1020	1040	1090
10G10	1060	1180	1080	987	1080	1080
10H5	1100	1240	1170	1050	1140	1190
10H8	1050	1120	1140	1050	1020	1170

Ocho de los diez clones analizados muestran una alta estabilidad de producción durante 19 semanas y los diez clones muestran suficiente estabilidad durante 12 semanas.

3. Ejemplo 3 – Selección utilizando un vector de combinación y clasificación FACS

3.1. Construcción del vector:

Se genera un VECTOR III que contiene los marcadores de selección DHFR y FolR sobre una estructura base, lo cual también permite la selección adicional utilizando la clasificación FACS. Este VECTOR III comprende un casete de expresión para expresar la cadena pesada del anticuerpo que comprende un codón de paro "que se filtra" y un ancla transmembrana de inmunoglobulina. Como se ilustra anteriormente en la descripción, este diseño del casete de expresión tiene el efecto (debido a los procesos de lectura de traducción cruzada) de que una porción de los anticuerpos se produce como proteínas de fusión, las cuales se anclan a la superficie celular de la célula hospedadora. El VECTOR III comprende los siguientes elementos principales:

ELEMENTOS DEL VECTOR III
Promotor/potenciador de CMV
Intrón-RK
Polinucleótido que codifica la cadena ligera del anticuerpo
Un sitio Poli de SV40
Promotor/potenciador de CMV
Intrón-RK
Polinucleótido que codifica la cadena pesada del anticuerpo
Codón de paro (que se filtra)
Polinucleótido que codifica el ancla transmembrana de inmunoglobulina incluyendo el dominio citoplásmico
Un sitio Poli de SV40
Potenciador/promotor de SV40
Polinucleótido que codifica el huFolR
Un sitio Poli sintético
Un gen de resistencia a la ampicilina
Promotor SV40
Polinucleótido que codifica la DHFR (mutante)
Fragmento de intrón de SV40
Un sitio Poli de SV40

Este Vector de DHFR/FolR-FACS (VECTOR III) se compara con un vector de referencia de DHFR-FACS que contiene el gen neo como el segundo marcador de selección (VECTOR IV). El VECTOR IV comprende los siguientes elementos principales:

ELEMENTOS DEL VECTOR IV
Promotor/potenciador de CMV
Intrón-RK
Polinucleótido que codifica la cadena ligera del anticuerpo
Un sitio Poli de SV40
Promotor/potenciador de CMV
Intrón-RK
Polinucleótido que codifica la cadena pesada del anticuerpo
Codón de paro (que se filtra)
Polinucleótido que codifica el ancla transmembrana de inmunoglobulina incluyendo el dominio citoplásmico
Un sitio Poli de SV40
Potenciador/promotor de SV40
Gen de resistencia a la neomicina
Un sitio Poli sintético
Un gen de resistencia a la ampicilina
Promotor SV40
Polinucleótido que codifica la DHFR (mutante)
Fragmento de intrón de SV40
Un sitio Poli de SV40

Adicionalmente, para los experimentos de co-transfección utilizando dos vectores de expresión y la clasificación FACS, se crea el VECTOR V, el cual no comprende ningún gen de DHFR, pero sí el gen neo y el huFolR. El VECTOR V comprende los siguientes elementos principales:

ELEMENTOS DEL VECTOR V
Promotor/potenciador de CMV
Intrón-RK
Polinucleótido que codifica la cadena ligera del anticuerpo
Un sitio Poli de SV40
Promotor/potenciador de CMV
Intrón-RK
Polinucleótido que codifica la cadena pesada del anticuerpo
Codón de paro (que se filtra)
Polinucleótido que codifica el ancla transmembrana de inmunoglobulina incluyendo el dominio citoplásmico
Un sitio Poli de SV40
Potenciador/promotor de SV40
Gen de resistencia a la neomicina
Un sitio Poli sintético
Un gen de resistencia a la ampicilina
Promotor SV40
huFolR
Un sitio Poli de SV40

3.2. Selección, clonación y caracterización de clones:

Las células transfectadas con la combinación del VECTOR III se seleccionan en un medio que contiene ácido fólico 12,5 nM y MTX 5 nM. Las células transfectadas con el vector de referencia se seleccionan en un medio que contiene ácido fólico 12,5 nM, MTX 5 nM y 0,8 gramos/litro de G418. En un segundo paso de selección, que se aplica después de un ciclo de enriquecimiento de FACS, se aumenta la concentración de MTX hasta 50 nM, mientras que la concentración de ácido fólico se mantiene constante y se remueve el G418. Las poblaciones recuperadas de células (reservas) se rastrean para determinar la productividad en los cultivos discontinuos del matraz de agitación.

Análisis FACS, enriquecimiento y clonación de las células

Marcado de las células: 2 x 10E7 células por reserva transfectada se centrifugan y se lavan con 5 mililitros de suero regulado con fosfato (PBS) helado y se vuelven a suspender en 1 mililitro de suero regulado con fosfato (PBS) frío. Se agrega una cantidad adecuada de anticuerpo anti-IgG marcado con FITC (proveedor) a las células y se incuban sobre hielo durante 30 minutos en la oscuridad. Posteriormente, las células se lavan dos veces a temperatura ambiente con 5 mililitros de suero regulado con fosfato (PBS), se vuelven a suspender en 1 mililitro de suero regulado con fosfato (PBS), se filtran y se dosifican en un tubo FACS para el análisis, la clasificación y la clonación. La clasificación de células se lleva a cabo con un FACSAria (Becton Dickinson) equipado con una Unidad de Depósito de Células Automática (ACDU) utilizando el software FACSDiva. Se utiliza un dispositivo de láser de estado sólido y enfriado por aire de baja potencia (Coherent® Sapphire^{MR} de estado sólido) sintonizado a 488 nanómetros, para excitar los tintes de fluoresceína tintes enlazados al anticuerpo secundario. Se mide la intensidad de fluorescencia FITC relativa en el detector E a través de un filtro 530/30 BP. Se pasan por la compuerta cinco porcentajes de las células de más alta fluorescencia FITC y se clasifican ya sea en bloque o bien como células individuales en placas de 96 pozos.

Se generan clones ya sea mediante dilución limitante a partir de las reservas enriquecidas en FACS o bien mediante la clonación de FACS a partir de las reservas enriquecidas o no enriquecidas.

Determinación de la producción de anticuerpos y de la estabilidad clonal

La productividad de los clones se analiza en experimentos en lotes y de alimentación por lotes utilizando diferentes formatos. El rastreo inicial se lleva a cabo en ensayos por lotes en placas de 24 pozos mediante la siembra de las células en placas de 24 pozos agitadas. Las titulaciones de anticuerpos en el sobrenadante del cultivo celular se determinan mediante HPLC de Proteína-A cuantitativa, 10 días después del inicio del cultivo. Posteriormente se analizan los clones de más alta producción en los modelos del matraz de agitación en el modo por lotes y de alimentación por lotes. Los cultivos discontinuos en el medio de cultivo que contiene ácido fólico 11,3 µM se siembran en matraces de agitación (capacidad de 500 mililitros o de 250 mililitros) con un volumen de procesamiento de 100 mililitros o de 50 mililitros y se cultivan en un gabinete de agitación (no humidificado) a 150 revoluciones por minuto, a 36,5°C y con CO_2 al 10 por ciento. La viabilidad de las células debe ser >90 por ciento cuando se inicia el ensayo. La densidad celular de la siembra es de 2 x 10^5 células/ mililitro. La titulación de anticuerpos, el número de células y la viabilidad, se pueden determinar en puntos del tiempo de cultivo definidos. Los experimentos de alimentación por lotes se hacen utilizando las mismas condiciones, pero con una densidad celular inicial de 4 x 10^5 células/mililitro y con la adición regular de alimentaciones empezando en las densidades de células viables por encima de 7 x 10^6 células/mililitro. La estabilidad clonal se evalúa mediante el cultivo de las células durante un período de hasta 19 semanas con mediciones de productividad utilizando el modelo por lotes en matraz de agitación aproximadamente cada dos semanas.

3.3. Resultados:

Se generan cinco poblaciones de células, transfectadas con el vector de combinación de dihidrofolato reductasa (DHFR)/FolR (VECTOR III) y tres poblaciones de células transfectadas con el vector de referencia (VECTOR IV) y se seleccionan como se describe anteriormente. La productividad de las reservas de células recuperadas en los cultivos discontinuos del matraz de agitación se resume en la Tabla 5.

Tabla 7: Productividad de las células después de un paso de selección, transfectadas con un vector de combinación de dihidrofolato reductasa (DHFR)/FolR o con un vector de dihidrofolato reductasa (DHFR)/Neo (referencia). Todos los valores están en miligramos/litro

	Vector de DHFR/FolR (VECTOR III)	**Vector de DHFR/Neo (VECTOR IV)**
Reserva1	80	19
Reserva2	53	9
Reserva3	73	10

	Vector de DHFR/FolR (VECTOR III)	Vector de DHFR/Neo (VECTOR IV)
Reserva4	147	Nd
Reserva5	104	Nd

El uso del vector de combinación de dihidrofolato reductasa (DHFR)/FolR (VECTOR III) conduce, de una manera sorprendente, a buenas productividades ya solamente después de un paso de selección.

Las reservas se procesan adicionalmente mediante la aplicación de un ciclo de enriquecimiento de FACS y un segundo paso de selección con concentraciones aumentadas 10 veces de MTX. Nuevamente, se obtienen productividades de la reserva muy altas, en donde el vector de combinación funciona tan bien como el planteamiento de co-transfección (véase la Tabla 8).

Tabla 8: Modelo por lotes de matraz de agitación: Reservas enriquecidas con FACS después del segundo paso de selección (MTX 50 nM). Todos los valores están en miligramos/litro

Vector	Productividad promedio de la reserva después del ciclo de enriquecimiento con FACS y segundo paso de selección (miligramos/litro)
Co-transfección de VECTOR I y VECTOR II	418 (n = 1)
Co-transfección de los vectores de FACS VECTOR IV y VECTOR V	797 +/- 87 (n = 2)
Transfección del vector de combinación de FACS-(VECTOR III)	709 +/- 400 (n = 2)

Se generan clones mediante dilución limitante a partir de una reserva enriquecida con FACS y se expanden en placas de 24 pozos para el rastreo primario. Los mejores productores se expanden adicionalmente en matraces de agitación. Se analiza la productividad en los cultivos discontinuos del matraz de agitación y se compara con los resultados de los clones superiores obtenidos en los experimentos anteriores con el vector de referencia de dihidrofolato reductasa (DHFR) mediante la clonación FACS.

La productividad de los clones transfectados con la combinación del VECTOR III en un modelo por lotes de matraz de agitación es significativamente más alta comparándose con los clones que se transfectaron con el vector de referencia IV, el cual comprende solamente el gen de DHFR (véase la Tabla 9)

Tabla 9: Modelo por lotes de matraz de agitación: Los 5 clones superiores del vector de referencia de DHFR (VECTOR IV) y el vector de combinación (VECTOR III). Todos los valores son gramos/litro

	Vector/Clonación	
Clasificación de clones	DHFR-FACS (VECTOR IV)	DHFR/folR/FACS (VECTOR III)
1	1,12	1,90
2	1,11	1,58
3	1,10	1,42
4	1,10	1,39
5	1,10	1,26

Los clones transfectados con el VECTOR III se analizan adicionalmente para determinar la estabilidad de la producción clonal mediante la descongelación de los frascos crioconservados y el monitoreo de la productividad en un modelo por lotes de matraz de agitación. La productividad se monitorea a partir de la semana 5 después de la descongelación hasta la semana 19 después de la descongelación y se compara con la productividad antes de la crioconservación. Los clones se cultivan en condiciones selectivas mientras que los cultivos discontinuos en matraz de agitación se llevan a cabo en un medio con un alto contenido de ácido fólico (11,3 µM).

Tabla 10: Análisis de estabilidad de la producción clonal

Clon (VECTOR III)	Antes de congelación	Semana 5 (después de descon-gelación)	Semana 8 (después de descon-gelación)	Semana 12 (después de descon-gelación)	Semana 15 (después de descon-gelación)	Semana 17 (después de descon-gelación)	Semana 19 (después de descon-gelación)
14E3	1,06	1,16	1,17	1,17	0,92	1,02	1,08
15D1	1,12	1,09	1,10	1,13	0,84	0,89	0,91
15H7	1,42	1,32	1,36	1,34	1,09	1,15	1,13
15H9	1,58	1,68	1,69	1,50	1,22	1,35	1,29
17A10	1,26	1,16	1,14	1,07	0,90	1,00	1,00
17E7	1,90	1,79	1,82	1,76	1,56	1,78	1,76
17G3	1,16	1,13	1,14	1,14	0,87	0,94	0,95
17G11	1,26	1,19	1,21	1,14	0,98	0,96	1,03
19D1	1,39	1,15	1,18	1,11	0,86	0,85	0,87
19D7	1,17	0,95	1,02	1,05	0,82	0,90	0,97
19E11	1,14	1,01	1,04	1,08	0,88	1,06	1,00
20A7	1,07	1,00	1,00	0,98	0,84	0,89	0,91

Solamente uno de los 12 clones analizados muestra una pérdida mayor del 25 por ciento en la productividad durante un período de 19 semanas; todos los demás muestran una alta estabilidad de producción.

IV. Ejemplo 4 - Producción a gran escala de polipéptidos con las células transfectadas CHO

La producción de polipéptidos a gran escala se puede hacer, por ejemplo, en bio-reactores de microondas, de vidrio o de acero inoxidable. Para ese 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 de 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 pasos de cromatografía de 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 varios miles de litros en la escala final (véase también, por ejemplo, F. Wurm, Nature Biotechnology, Volumen 22, 11, 2004, 1393-1398).

Listado de secuencias

<110> Novartis AG

<120> Nuevos vectores de selección y métodos para seleccionar células hospedadoras eucariotas

<130> 51 438 K

<150> EP 09 153 995.7
<151> 27-02-2009

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 257
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```
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
```

<210> 2
<211> 255
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

```
Met Val Trp Lys Trp Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Val Cys Val Ala
1               5                  10                  15

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                  80

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
```

51 438k listado de secuencias como parte de la descripción_ST25

```
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
<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                  15

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
                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
```

51 438k listado de secuencias como parte de la descripción_ST25

```
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 o una combinación de al menos dos vectores de expresión, que comprende al menos:

(a) un polinucleótido que codifica un producto de interés o un sitio de inserción para incorporar un polinucleótido que codifica un producto de interés;
(b) un polinucleótido que codifica un primer marcador de selección (sm I);
(c) un polinucleótido que codifica un segundo marcador de selección (sm II), el cual difiere del primer marcador de selección (sm I),

en donde la actividad del marcador de selección (sm I) o (sm II) está al menos parcialmente influenciada por la actividad del otro marcador de selección y en donde los marcadores de selección (sm I) y (sm II) están involucrados en el metabolismo de folato y en donde el primer marcador de selección (sm I) es un transportador de folato y el segundo marcador de selección (sm II) es DHFR o una variante funcional de la misma.

2. El vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el primer marcador de selección (sm I) es receptor de ácido fólico y el segundo marcador de selección es una variante de DHFR que es menos sensible al MTX que la enzima DHFR de tipo silvestre y/o la enzima DHFR que se expresa de manera endógena por la célula hospedadora.

3. El vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el primer marcador de selección (sm I) es o comprende un receptor de folato humano o una variante funcional del mismo y/o el primer marcador de selección es un receptor de folato que tiene o que comprende la secuencia de aminoácidos las SEQ ID NO: 1, 2 o 3 o una variante funcional de las anteriores.

4. El vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el polinucleótido que codifica el producto de interés está comprendido en un casete de expresión que comprende al menos:

(a) el polinucleótido que codifica el producto de interés,
(b) al menos un codón de parada cadena abajo del polinucleótido que codifica el producto de interés, y
(c) un polinucleótido cadena abajo del codón de parada que codifica un anclaje de membrana y/o una señal para un anclaje de membrana.

5. Una célula hospedadora que comprende al menos:

(a) un polinucleótido introducido que codifica un producto de interés;
(b) un polinucleótido introducido que codifica un primer marcador de selección (sm I);
(c) un polinucleótido introducido que codifica un segundo marcador de selección (sm II), que difiere del primer marcador de selección (sm I);

en donde la actividad del marcador de selección (sm I) o (sm II) está al menos parcialmente influenciada por la actividad del otro marcador de selección y en donde los marcadores de selección (sm I) y (sm II) están implicados en el metabolismo de folato y en donde el primer marcador de selección (sm I) es un transportador de folato y el segundo marcador de selección (sm II) es DHFR o una variante funcional de la misma.

6. La célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 5, que tiene una o más de las siguientes características:

a) un vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 4 que se ha introducido en dicha célula hospedadora;
b) es una célula CHO, preferentemente una célula $DHFR^+$ (positiva); y/o
c) la célula hospedadora es una célula $DHFR^+$ (positiva) y el primer marcador de selección (sm I) es un receptor de ácido fólico y el segundo marcador de selección (sm II) es una variante de DHFR que es menos sensible al MTX que la enzima DHFR de tipo silvestre y/o que la enzima DHFR expresada de manera endógena por la célula hospedadora.

7. Un método para producir una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, que comprende la etapa de introducir en dicha célula hospedadora al menos:

(a) un polipéptido que codifica un producto de interés;
(b) un polinucleótido que codifica un primer marcador de selección (sm I);
(c) un polinucleótido que codifica un segundo marcador de selección (sm II), que difiere del primer marcador de selección (sm I);

en donde la actividad del marcador de selección (sm I) o (sm II) está al menos parcialmente influenciada por la actividad del otro marcador de selección y en donde los marcadores de selección (sm I) y (sm II) están implicados en el metabolismo del folato y en donde el primer marcador de selección (sm I) es un transportador de folato y el segundo marcador de selección (sm II) es DHFR o una variante funcional de la misma.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde se introduce en la célula hospedadora un vector de expresión o una combinación de vectores de expresión de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 4.

9. Un método para seleccionar al menos una célula hospedadora capaz de expresar un producto de interés, que comprende:

(a) proporcionar una diversidad de células hospedadoras, que comprenden al menos:

(i) un polinucleótido introducido que codifica un producto de interés;
(ii) un polinucleótido introducido que codifica un primer marcador de selección (sm I);
(iii) un polinucleótido introducido que codifica un segundo marcador de selección (sm II), que difiere del primer marcador de selección (sm I);

en donde la actividad del marcador de selección (sm I) o (sm II) depende al menos parcialmente de la actividad del otro marcador de selección y en donde los marcadores de selección (sm I) y (sm II) están involucrados en el metabolismo del folato y en donde el primer marcador de selección (sm I) es un transportador de folato y el segundo marcador de selección (sm II) es DHFR o una variante funcional de la misma;
(b) cultivar dicha diversidad de células hospedadoras en condiciones selectivas para los marcadores de selección (sm I) y (sm II), obteniendo de este modo una célula hospedadora que expresa el producto de interés.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 9 que comprende además un paso de (c) seleccionar al menos una célula hospedadora que expresa el producto de interés.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10, que tiene una o más de las siguientes características:

a) la diversidad de células hospedadoras comprende células hospedadoras de acuerdo con la reivindicación 5 o 6;
b) se usa un medio de cultivo selectivo en al menos un paso de selección, que comprende folato en una concentración limitante y un antifolato.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde se usa un medio de cultivo selectivo en al menos un paso de selección, que comprende folato en una concentración limitante y un antifolato y en donde el medio de cultivo selectivo comprende folato en una concentración de 500 nM o menor, preferentemente 100 nM o menor y/o en donde el medio de cultivo selectivo comprende un antifolato a una concentración de 500 nM o menor, preferentemente a una concentración de 200 nM o menor.

13. Un proceso para producir un producto de interés, que comprende cultivar

(a) una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 5 o 6; y/o
(b) una célula hospedadora de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 9 a 12 en condiciones que permitan la expresión del producto de interés.

14. El proceso de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende al menos uno de los siguientes pasos:

(a) aislar el producto de interés a partir de dicho medio de cultivo y/o a partir de dicha célula hospedadora; y/o
(b) procesar el producto de interés aislado.

15. El uso de un medio de cultivo selectivo que comprende folato a una concentración limitante y un antifolato y en donde el medio de cultivo selectivo comprende un antifolato a una concentración de 500 nM o menor y folato a una concentración limitante de 500 nM o menor, para seleccionar al menos una célula hospedadora capaz de expresar un producto de interés de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 9 a 12.

16. El uso de un primer marcador de selección (sm I) en combinación con un segundo marcador de selección (sm II) que difiere del primer marcador de selección (sm I), en donde la actividades de los marcadores de selección (sm I) o (sm II) están al menos parcialmente influenciadas por la actividad del otro marcador de selección, para seleccionar una célula hospedadora que sea capaz de expresar un producto de interés, en donde el primer marcador de selección (sm I) es un transportador de folato y el segundo marcador de selección (sm II) es DHFR o una variante funcional de la misma.