(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 661 464**

(51) Int. CI.:

C12Q 1/68 (2008.01)
C12N 15/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2011 PCT/IL2011/000956**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12085911**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2011 E 11813826 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2652150**

(54) Título: **Moléculas informadoras unidas a la membrana y su uso en clasificación de células**

(30) Prioridad:

19.12.2010 IL 21009310

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.04.2018

(73) Titular/es:

MERCK SERONO SA (100.0%)
Centre Industriel
1267 Coinsins, Vaud, CH

(72) Inventor/es:

HELMAN, DANIEL;
TOISTER-ACHITUV, MIRA;
BAR-SHIMON, MEIRAV y
SMOLARSKY, MOSHE

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Moléculas informadoras unidas a la membrana y su uso en clasificación de células

Campo de la invención

La presente invención se refiere a moléculas de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido mimético de biotina (BMP, por sus siglas en inglés) unido a la membrana. La invención también se refiere a un método para la selección de células altamente productoras que secretan una proteína de interés.

Antecedentes

Uno se los principales desafíos en el desarrollo de las células productoras para la fabricación de proteínas recombinantes es la selección de células altamente productoras entre una población muy grande de células, con diferenes niveles de productividad, generadas durante el desarrollo del clon. La selección de los altos productores suele ser intensa y consumir mucho tiempo. El número de células que se pueden cribar manualmente es limitado y también lo es la probabilidad de aislar los clones del nivel de productividad requerido.

Se han empleado métodos tradicionales para el cribado de células altamente productoras. Una de las técnicas comunes de clonación de células únicas es el procedimiento de “dilución limitante”. La selección manual y la selección de clones por este procedimiento es una tarea laboriosa, tediosa y que consume mucho tiempo. Incluso si se realiza mediante sistemas robóticos, el número de clones que se pueden cribar es limitado [1-3]. Además, análisis estadísticos indican que se requieren ciclos de clonación repetidos para garantizar la clonalidad en un nivel aceptable. [4,5]. Por lo tanto, se requieren métodos más eficientes de selección y clonación de líneas celulares.

La citometría de flujo [6] se ha aplicado para la selección de células marcadas con informadores fluorescentes. Algunos de los aparatos de citometría de flujo pueden clasificar miles de células en pocos segundos y seleccionar células raras con frecuencias muy bajas (tan bajas como 10^{-6}) en toda la población [7]. Otra ventaja de la citometría de flujo es su capacidad, en alguno de los aparatos, para sembrar células únicas (clonar las células) en pocillos separados en placas de microtitulación [6, 8].

Sin embargo, la clasificación de las células por los citómetros de flujo requiere una señal fluorescente. Dado que el producto protéico de interés no es fluorescente en la mayoría de los casos, se requiere un producto génico informador fluorogénico, cuya expresión está estrechamente relacionada con el gen de interés (GOI, por sus siglas en ingés).

El producto génico informador se puede expresar en el citoplasma de la célula o se puede dirigir a la superficie celular [8, 9].

El gen informador puede ser fluorescente de manera natural tal como GFP [10]. Alternativamente, se puede teñir específicamente con un marcador fluorescente que penetra en las células tal como el metotrexato fluorescente (F-MTX) [11] o teñir con un marcador fluorescente que se une a él en la superficie de la célula [8, 9].

Se describió un caso interesante para anticuerpos producidos en un cultivo celular. Se observó que un anticuerpo secretado en sí mismo se puede utilizar como un informador y se puede detectar en la membrana de las células de hibridoma [12, 13] y células CHO [14]. La tinción con anticuerpos marcados fluorescentemente se utilizó para detectar los anticuerpos en la superficie celular.

Otro método conocido para el aislamiento de las células específicas deseadas se basa en perlas magnéticas. Las perlas magnéticas recubiertas con una proteína que se une específicamente a una proteína diana en la superficie de las células se describieron anteriormente [9].

También se publicaron otros métodos basados en la deteción directa de la POI secretada. Estos métodos incluyen la tecnología de microgotas de gel [15-17] y ensayos de secreción basados en matrices [18, 19].

Además, los sistemas automáticos para la selección de células también existen e incluyen análisis y procesamiento realizado por láser (LEAP) que destruye las células indeseadas [20, 21] y recolectores de colonias automatizados tales como ClonePix de Genetix y CellCelector™ de Aviso que seleccionan directamente los altos productores de acuerdo con sus niveles de secreción.

Además de las diversas ventajas y desventajas de cada método, su capacidad para el número de células que se pueden cribar es limitado, y significativamente menor que el obtenido mediante, por ejemplo, la clasificación de células activada por fluorescencia (FACS).

Compendio de la invención

La presente invención comprende el acoplamiento de la expresión de una proteína de interés (POI, por sus siglas en inglés) a la de un marcador de proteína/péptido de membrana de la superficie celular marcado con péptidos

miméticos de biotina o aceptores de biotina. Después de la tinción con una proteína unida a biotina marcada fluorescentemente, las células se clasifican mediante una técnica apropiada como se describe a continuación.

Detalladamente, la presente invención se refirere a los siguientes puntos:

1. Una molécula de ácido nucleico que comprende:

(a) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal, unido en su extremo C a

(b) una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido mimético de biotina (BMP, por sus siglas en inglés), unido en su extremo C a

(c) una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un tramo polipeptídico que permite el anclaje del BMP a una membrana celular,

en donde el BMP tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

2. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con el punto 1, en donde la primera y la segunda secuencias de ácidos nucleicos y/o la segunda y la tercera secuencias de ácidos nucleicos se unen mediante una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido enlazador.

3. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con los puntos 1 o 2, en donde el tramo polipeptídico que permite el anclaje del BMP a la membrana celular se selecciona del grupo que consiste en

(i) CD59a que tiene el aminoácido de SEQ ID NO: 9;

(ii) el péptido portador sintético que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 unida directamente a CD48-GPI que tiene el aminoácido de SEQ ID NO: 3; y

(iii) el péptido portador sintético que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 unida al péptido transmembranal IGF-1R-TM que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

4. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en donde el péptido señal es el péptido señal de la hormona del crecimiento humano o de DC59.

5. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en donde el tramo polipeptídico que permite el anclaje del BMP a la membrana celular está unido en su extremo C a un polipéptido que confiere resistencia de selección.

6. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con el punto 5, en donde el polipéptido que confiere la resistencia de selección se selecciona del grupo que consiste en una enzima que hidroliza antibióticos, una proteína eliminadora de antibióticos, una enzima metabólica y una enzima modificadora de antibióticos.

7. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con el punto 6, en donde la enzima que hidroliza antibioticos se selecciona del grupo que consiste en enzima hidrozante de puromicina, tal como la puromicina N-acetil transferasa (PAC) y una enzima hidrolizante de aminoglicósidos, tal como el aminoglicósido 3'-fosfotransferasa; la proteína eliminadora de antibióticos es un producto del gen Sh ble; y la enzima modificadora de antibióticos es una higromicina quinasa.

8. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con el punto 2, en donde el péptido enlazador consiste en la secuencia de aminoácidos de isoleucina y prolina o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4.

9. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con el punto 5, en donde el tramo polipeptídico que permite el anclaje del BMP a la membrana celular se une a un polipéptido que confiere resistencia de selección mediante un péptido enlazador.

10. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con el punto 1, que está operativamente unida a un promotor capaz de conducir la transcripción de la molécula de ácido nucleico, preferiblemente el promotor hCMV, y está operativamente unido antes a una secuencia EMCV IRES.

11. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, que comprende además cualquiera de las siguientes:

(i) secuencias de ácidos nucleicos que codifican péptidos portadores sintéticos que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 unida directamente al péptido transmembranal que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, el péptido señal de CD59 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y el PAC que tien la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;

(ii) secuencias de ácidos nucleicos que codifican el CD59a de ratón que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9, y el péptido señal del CD59a que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ

ID NO: 6;

(iii) secuencias de ácidos nucleicos que codifican el péptido portador sintético que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 unida directamente al péptido transmembranal que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y el péptido señal de CD59a que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; o

(iv) secuencias de ácidos nucleicos que codifican el péptido portador sintético que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 unida directamente al péptido de anclaje CD48-GPI que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3, y el péptido señal de CD59a que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

12. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con el punto 11, en donde la secuencia de ácidos nucleicos se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, y SEQ ID NO: 12.

13. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con el punto 1, que comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de interés (POI).

14. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con el punto 13, en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la POI se caracteriza por que

(i) está operativamente unida antes a una secuencia EMCV IRES o después a un promotor capaz de dirigir la transcripción de la molécula de ácido nucleico, o ambas; o

(ii) es una secuencia de ácido nucleico que codifica la POI que codifica para un único polipéptido; o

(iii) comprende dos secuencias de ácidos nucleicos que codifican la POI que codifican para diferentes subunidades de una POI.

15. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con el punto 14, en donde las subunidades son las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo.

16. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores.

17. Un método para la selección de células eucarióticas que secretan una proteína de interés (POI), que comprende identificar las células que presentan el BMP en sus superficies celulares, en donde el nivel de presentación del BMP en la superficie celular se correlaciona con la cantidad de POI secretada, el método comprende las etapas de:

(a) transfectar las células con un primer vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 12 y un segundo vector que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la POI; o

con un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 13 a 15,

estableciendo de este modo un conjunto estable de células transfectadas con BMP;

(b) marcar las células transfectadas con BMP con un resto de unión a biotina detectable; e

(c) identificar y aislar las células transfectadas marcadas con el resto de unión a biotina detectable.

18. El método de acuerdo con el punto 17, que comprende además propagar las células aisladas y repetir las etapas (b) a (c).

19. El método de acuerdo con el punto 18, que comprende además aislar una única célula marcada con el resto de unión a biotina detectable y propagar la célula para formar un clon.

20. El método de acuerdo con el punto 19, que comprende además detectar y cuantificar la proteína de interés secretada, seleccionando de este modo las células eucarióticas que secretan una proteína de interés.

21. El método de acuerdo con el punto 17, en donde dichas células presentan el BMP en su superficie celular.

22. El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 17 a 21, en donde las células marcadas se identifican y aíslan por medio de un FACS o perlas magnéticas.

23. El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 17 a 21, en donde las células eucarióticas seleccionadas presentan mayores cantidades de BMP en su superficie y secretan mayores cantidades de proteína de interés que las células transfectadas del grupo estable, preferiblemente en donde la cantidad de BMP en la

superficie de las células eucarióticas seleccionadas y la cantidad de proteína de interés secretada por las células eucarióticas seleccionadas son mayores por al menos un factor seleccionado del grupo que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, y hasta 30 veces mayor que las células transfectadas del grupo estable.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los vectores que contienen los nuevos genes informadores para el desarrollo del clon por FACS. Los vectores se construyeron para la evaluación de los genes informadores mediante la tecnología FACS. BMP-péptido mimético de biotina; SP- péptido señal; TM- dominio transmembranal; PAC- gen de resistencia a puromicina; C- motivo portador del péptido; CD48-glicosilfosfatidilinositol- secuencia GPI tomada del CD48. hGH-hormona del crecimiento humano; mCD59a- secuencia GPI tomada del CD59a de ratón; hCMV- promotor inicial inmediato del citomegalovirus humano; SV 40- promotor del virus 40 vacuolado del simio; IGF-1R- receptor del factor-1 de crecimiento similar a la insulina; EMCV- virus de la encefalomiocarditis; IRES- sitio de entrada de ribosomas internos; CD164-Fc- una fusión Fc de sCD164, GCSF- factor estimulante de colonias de granulocitos; IL6- interleucina 6.

Las Figuras 2A-C muestran las estructuras de las moléculas informadoras en la superficie celular. Ilustración del péptido mimético de biotina (BMP, panel A) y el péptido aceptor de biotina (BAP, panel B) unidos a su portador anclado a la membrana en la superficie celular. El anclaje a la membrana se obtiene mediante el glicosil fosfatidilinositol (GPI) o mediante un péptido transmembranal (TM). El BMP se marca directamente con estreptavidina fluorescente (F-SA). El BAP se biotinila primero por biotina proteína ligasa (Bir-A), seguido por tinción con F-SA. La Figura 2C muestra un péptido mimético de biotina (BMP) y una proteína de fusión (BMP-PAC) de puromicina N-acetil transferasa (PAC). El anclaje a la membrana se obtuvo mediante el péptido transmembranal (TM). La PAC se utiliza para la selección de puromicina y el BMP se marca directamente con estreptavidina fluorescente (F-SA) para la selección y el análisis por FACS.

Las Figuras 3A-B son una ilustración de un vector de expresión BMP-PAC (A) que comprende el gen informador BMP-PAC (B). El vector se construyó para la evaluación del gen informador BMP-PAC mediante la tecnología FACS. mCD59aSP- péptido señal de CD59a murino; BMP- péptido mimético de biotina; Portador sintético- un péptido portador de 60 aminoácidos; dominio IGF1-R-TM- dominio transmembranal del receptor de IGF1; PAC-Puromicina N-acetil transfersa; mAb- anticuerpo monoclonal; LC- cadena ligera; HC- cadena pesada, mCMVpr-promotores de los genes iniciales inmediatos CMV murinos.

La Figura 4 muestra la detección de BAP en la superficie celular con estreptavidina fluorescente (F-SA) mediante FACS. Células CHO-S, no transfectadas y no marcadas (———— , MFI – 66). Células CHO-S, no transfectadas, incubadas con BirA y marcadas con F-SA (· · ·, MFI – 69). CHO-S transfectadas con plásmidos que expresan un gen informador BAP-CD59a, no incubadas con BirA y marcadas con F-SA (- - -, MFI – 139). CHO-S transfectadas con plásmidos que expresan un gen informador BAP-CD59a, incubadas con BirA y marcadas con F-SA (- · -, MFI – 24364).

Las Figuras 5A-B muestran la detección de BMP en la superficie celular con F-SA mediante FACS. Células CHO-S, no transfectadas (· · ·, MFI – 27) o transfectadas (- · -, MFI – 10516) con plásmido que contiene BMP-CD59a directamente después del promotor hCMV y marcadas con F-SA (A). Células CHO-S, no transfectadas y no marcadas (——, MFI – 66), no transfectadas y marcadas con F-SA (· · ·, MFI – 36), transfectadas con plásmido que contiene BMP-CD59a después de EMCV IRES y o no marcadas (- - -, MFI – 63) o marcadas con F-SA (- · -, MFI – 1583) (B).

Las Figuras 6A-C muestran las células productoras que se clasifican con el sistema BMP-CD59/F-SA. Celulas estables transfectadas con un vector que contiene sCD164-Fc (el POI) y BMP-CD59a (el gen informador para la clasificación por FACS) (A), se clasificaron sucesivamente tres veces de acuerdo con sus niveles de BMP indicados por el F-SA (B), no marcados y no clasificados (———— , MFI – 102), marcado antes de las clasificaciones (···, MFI – 1734, PCD – 1,59), después de la primera clasificación (- - -, MFI – 8804, PCD – 4,60), después de la segunda clasificación (- · -, MFI – 16691, PCD – 5,79), y después de la tercera clasificación (-- ·· --, MFI – 18995, PCD – 7,34). La correlación entre la fluorescencia y la productividad se muestra en (C). MFI, intensidad media de fluorescencia; PCD (productividad específica), picogramo por célula por día; EMCV, virus de encefalomiocarditis; IRES, sitio interno de entrada al ribosoma; CD164-Fc, CD164 unido a la región Fc.

Las Figuras 7A-C muestran las células productoras CHO-S que se clasifican con el sistema BMP-CD59/F-SA. Las células estables transfectadas con un vector que contiene GCSF (el POI) y BMP-CD59a (el gen informador para la clasificación por FACS) (A), se clasificaron sucesivamente tres veces de acuerdo con sus niveles de BMP indicados por el F-SA (B), no marcados y no clasificados (———— , MFI – 104), marcados antes de las clasificaciones (···, MFI – 10406, PCD – 3,83), después de la primera clasificación (- - -, MFI – 16661, PCD – 6,03), después de la segunda clasificación (- · -, MFI – 16983, PCD – 6,67), y después de la tercera clasificación (-- ·· --, MFI – 17676, PCD – 6,63). La correlación entre la fluorescencia y la productividad se muestra en (C). GDSF – factor estimulante de la colonia de granulocitos (gen de interés).

Las Figuras 8A-C muestran las células productoras CHO-S que se clasifican con el sistema BMP-CD59/F. Las

células estables transfectadas con un vector que contiene el gen para IL-6 (el POI) y BMP-CD59a (el gen informador para la clasificación por FACS) (A), se clasificaron sucesivamente tres veces de acuerdo con sus niveles de BMP para el F-SA (B), no marcados y no clasificados (, MFI – 33), marcados antes de las clasificaciones (⋯, MFI – 246, PCD – 0,4), después de la primera clasificación (---, MFI – 1473, PCD – 1,2), después de la segunda clasificación (- · -, MFI – 2812, PCD – 1,7), y desués de la tercera clasificación (-- ·· --, MFI – 3642, PCD – 1,8). La correlación entre la fluorescencia y la productividad se muestra en (C). IL-6-interleucina-6 (gen de interés).

Las Figuras 9A-C muestran las células productoras CHO-S que se clasifican con el sistema BMP-P-GPI/F-SA. Las células estables tranfectadas con un vector que contiene CD164-Fc (el POI) y el portador del péptido BMP (C)-GPI (el gen informador para la clasificación por FACS) (A), se clasificaron sucesivamente tres veces de acuerdo con sus niveles de BMP indicados por el F-SA (B), no marcados y no clasificados (————, MFI – 33), marcados antes de las clasificaciones (⋯, MFI – 773, PCD – 0,8), después de la primera clasificación (- - -, MFI – 9748, PCD – 5,7), después de la segunda clasificación (- · -, MFI – 15492, PCD – 9,5), y después de la tercera clasificación (-- ·· --, MFI – 20908, PCD – 10,8). La correlación entre fluorescencia y productividad se muestra en (C).

Las Figuras 10A-C muestran las células productoras CHO-S que se clasifican con el sistema BMP-P-GPI/F-SA. Las células estables transfectadas con un vector que contiene GCSF (el POI) y el portador del péptido BMP (C)-GPI (el gen informador para la clasificación por FACS) (A), se clasificaron sucesivamente tres veces de acuerdo con sus niveles de BMP indicados por el F-SA (B), no marcados y no clasificados (————, MFI – 113), marcados antes de las clasificaciones (⋯, MFI – 2326, PCD – 3,0), después de la primera clasificación (- - -, MFI – 7866, PCD – 7,1), después de la segunda clasificación (- · -, MFI – 17497, PCD – 9,2), y después de la tercera clasificación (-- ·· --, MFI – 28679, PCD – 13,0). La correlación entre fluorescencia y productividad se muestra en (C).

Las Figuras 11A-C muestran las células productoras CHO-S que se clasifican con el sistema BMP-P-IGF-IR-TM/F-SA. Las células estables transfectadas con un vector que contiene CD164-Fc (el POI) y el portador del péptido BMP (C)-TM (el gen informador para la clasificación por FACS) (A), se clasificaron sucesivamente tres veces de acuerdo con sus niveles de BMP indicados por el F-SA (B), no marcados y no clasificados (————— , MFI – 33), marcados antes de las clasificaciones (· · ·, MFI – 680, PCD – 1,1), después de la primera clasificación (- - -, MFI – 4719, PCD – 7,0), después de la segunda clasificación (- · -, MFI – 7522, PCD – 9,9), y después de la tercera clasificación (-- ·· --, MFI – 9119, PCD – 12,0). La correlación entre fluorescencia y productividad se muestra en (C). TM - Péptido transmembranal.

Las Figuras 12A-C muestran las células productoras que se clasifican con el sistema BMP-P-IGF-IR-TM/F-SA. Las células estables transfectadas con un vector que contiene GCSA (el POI) y el portador del péptido BMP (C)-TM (el gen informador para la clasificación por FACS) (A), se clasificaron sucesivamente tres veces de acuerdo con sus niveles de BMP indicados por el F-SA (B), no marcados y no clasificados (————— , MFI – 113), marcados antes de las clasificaciones (· · ·, MFI – 4449, PCD – 3,1), después de la primera clasificación (- - -, MFI – 15764, PCD – 7,1), después de la segunda clasificación (- · -, MFI – 26289, PCD – 8,5), y después de la tercera clasificación (-- ·· --, MFI – 17367, PCD – 12,0). La correlación entre fluorescencia y productividad se muestra en (C). TM – Péptido transmembranal.

La Figura 13 muestra la productividad de los grupos transfectados con un plásmido que contiene BMP–PAC (el gen informador para la clasificación por FACS); y mAb anti-IL22RA (el POI). Las células CHO-S, transfectadas con un vector que contiene BMP-PAC y mAb anti-IL22RA en ProCHO5 se seleccionaron en 20 µg/ml de puromicina y MSX 25 µM. Se tomaron muestras para determinar la productividad.

La Figura 14 muestra las células productoras que se clasifican con BMP-PAC. Las células estables (3 replicas) transfectadas con un vector que contiene mAb anti-IL22RA (el POI) y BMP-PAC en ProCHO5 (el gen informador para la clasificación por FACS); se seleccionaron en 20 µg/ml de puromicina y MSX 25 mM y se combinaron para grupos unidos. Los grupos unidos se clasificaron sucesivamente tres veces de acuerdo con sus niveles de BMP indicados por F-SA. Los grupos no marcados y no ~~clasificad~~os (, MFI – 67), marcados antes de las clasificaciones (· · ·, MFI – 4449, PCD – 3,1), después de la primera clasificación (- - -, MFI – 15764, PCD – 7,1), después de la segunda clasificación (- · -, MFI – 26289, PCD – 8,5), y después de la tercera clasificación (-- ·· --, MFI – 17367, PCD – 12,0).

La Figura 15 muestra los títulos obtenidos en clones transfectados con un vector que contiene BMP-PAC en un medio que contiene ProCHO5. Se acumularon los títulos de MAb anti IL22RA (el POI) después de la clonación en placas de 96 pocillos. La clonación se realizó en un 80% de C6366 + 20% de ProCHO5 y las muestras se tomaron para determinar el título 13-15 días después de la clonación.

La Figura 16 muestra la productividad específica de los clones transfectados con un vector que contiene BMP-PAC en medio ProCHO5. Las celdas se sembraron a $0{,}5x10^6$ células/ml ($10x10^6$ células) en medio ProCHO5 en tubos de 50 ml para las mediciones de productividad por ELISA. PCD – pg/célula/día.

La Figura 17 muestra la productividad específica de los clones transfectados con un vector que contiene BMP-PAC en medio ProCHO5 en presencia de MSX 25 µM. Las celdas se sembraron con $0{,}5x10^6$ células/ml ($10x10^6$ células) en medio ProCHO5 que contiene MSX 25 µM en tubos de 50 ml para las mediciones de productividad por ELISA.

Las Figuras 18A-B representan el SDS PAGE/transferencia de Western de mAb secretado por los clones cadidatos en el medio de cultivo celular ProCHO5 crudo. Se separaron las muestras en crudo de los clones candidatos (100 ng de mAb por carril por ELISA) mediante SDS PAGE (10% Bis Tris) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La detección se realizó con IgG anti-humana de cabra-peroxidasa de rábano (HRP) (A), y cadena ligera Kappa antihumana de cabra (B). ECL fue el sustrato para el HRP. Los pesos moleculares de los marcadores (kDa) se muestran a la izquierda. La identificación de las muestras en los geles es la siguiente 1, MW marcador; 2, muestra de referencia anti-IL22RA MSB0010074/C12; 3, Clon 2418-11; 4, Clon 2418-14; 5, Clon 2418-15; 6, Clon 2418-39; 7, Clon 2418-45.

Descripción detallada de la invención

La clasificación celular mediante citometría de flujo, por ejemplo FACS, requiere una señal de fluorescencia. Dado que una proteína de interés (POI) generalmente no es fluorescente, se necesita un producto génico informador fluorogénico, cuya expresión está relacionada con la expresión del gen de interés (GOI).

El sistema biotina-estreptavidina para marcar el marcador de superficie celular es ventajoso por varias razones: 1) el sistema es aplicable a muchos tipos de células con escasos antecedentes; 2) la afinidad y especificidad de la unión de biotina a la estreptavidina es muy alta; y 3) el sistema cumple con las condiciones de “libre de componentes animales”, y no necesita el uso de anticuerpos que puedan requerir un archivo separado para las autoridades reguladoras.

Dado que la biotina no es una proteína o un péptido y por lo tanto no puede codificarse mediante una secuencia de DNA específica, se tomaron dos estrategias: 1) la utilización de un péptido que mimetiza a la biotina en su capacidad para unirse a la estreptavidina (BMP) [22, 23], y 2) el empleo de un péptido aceptor de biotina sintético (BAP) [24] que se puede biotinilar específicamente por una biotina proteína ligasa (BPL), tal como BirA, derivado de origen bacteriano [25, 26] que se transfecta a las células como un DNA codificador [27, 29] o se añade como una proteína a la mezcla enzimática [24, 30, 31]. La secuencia BAP sintética [24] es específicamente biotinilada de manera similar a la secuencia natural más larga [26] por la enzima BPL [26]. Las construcciones informadoras que comprenden BAP se describen en la técnica, véase por ejemplo, Predonzani A. y colaboradores, “In vivo site-specific biotinylation of proteins within the secretory pathway using a single vector system”, BMC BIOTECHNOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD. LONDON, GB, vol. 8, no. 1, 18 Abril 2008, página 41.

Para permitir la detección del informador con el F-SA en la superficie celular, después de procesarse a través de la misma maquinaria de secreción utilizada por las células para el procesamiento y secreción de la POI, el informador se diseñó para unirse a una proteína de membrana celular, procesada por la via secretora en el sistema de ER y Golgi. Dado que BMP y BAP no tienen secuencias de unión a membrana, se emplean secuencias unidas a membranas que son relativamente cortas, pueden ser fácilmente expresadas, no se expresan normalmente en células CHO, no se conoce que sean citotóxicas y no tienen ningún efecto biológico negativo conocido en la célula.

La predicción de las secuencias de dominio transmembranal es bien conocida en la técnica. Se puede llevar a cabo, por ejemplo, utilizando el servidor TMHMM v.2.0 [32] o para la secuencia de anclaje GPI utilizando la predicción del sitio de modificación GPI [33-36].

Solo para el ejemplo, se eligieron dos anclajes de membrana. Uno fue la proteína de membrana murina CD59a que incluye glicosil fosfatidilinositol (GPI), una pequeña proteína de 124 aminoácidos [37] que se informó que se expresó bien en células CHO y se detectó por FACS [38]. Informes adicionales en la bibliografía sobre su bioactividad en la protección de células del efecto lítico del complemento [39] no indican riesgo de citotoxicidad. Se ancla al lado externo de la membrana celular por GPI [40] y no tiene un dominio citoplásmico interno que pueda desencadenar procesos de transducción de señales.

Una proteína anclada a la membrana adicional se basa en una secuencia peptídica sintética de 60 aminoácidos y dos sitios de N-glicosilación potenciales cerca de su extremo C, y una secuencia de anclaje GPI, o una secuencia transmembranal (TM).

En un aspecto, la presente descripción describe una molécula de ácido nucleico que comprende: (a) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal unido en su extremo C a (b) una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido mimético de biotina (BMP) o un péptido aceptor de biotina (BAP) unido a su extremo C a (c) una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un tramo polipeptídico que permite el anclaje del BMP o BAP a una membrana celular.

En una realización de la descripción, las secuencias de ácidos nucleicos de (a) y (b) y/o (b) y (c), respectivamente, se unen mediante una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un enlazador de péptido.

En una realización adicional de la descripción, el tramo polipeptídico que permite el anclaje del BMP o BAP a la membrana celular es CD59a que incluye su GPI.

En otra realización de la descripción, el tramo polipeptídico que permite el anclaje del BMP o el BAP a una membrana celular es el péptido portador sintético del aminoácido SEQ ID NO: 1 unido directamente a CD48-GPI.

En otra realización más de la descripción, el tramo polipeptídico que permite el anclaje del BMP o el BAP a una membrana celular es el péptido portador sintético del aminoácido SEQ ID NO: 1 unido directamente a un péptido transmembranal.

En una realización preferida de la descripción, el péptido transmembranal es el péptido transmembranal de IGF-1R de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

Como se mencionó anteriormente, el BMP o BAP está unido en su extremo N, opcionalmente mediante un enlazador de péptidos, a un péptido señal. El péptido señal puede tener cualquier secuencia de aminoácidos que dirija al informador a la membrana celular, una membrana de orgánulo o al exterior de la célula. La secuencia se puede predecir fácilmente, por ejemplo mediante el uso de algoritmos como se enseña en la bibliografía [41, 42].

Por tanto, en una realización de la descripción, el BMP o BAP está unido en su extremo N a un péptido señal mediante un péptido enlazador, y el péptido señal es un péptido señal de una proteína seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo, una citoquina, una hormona, un factor de crecimiento, un neurotransmisor, una enzima, un ligando de receptor, una toxina, o una fracción funcional de los mismos. El péptido señal puede ser también un péptido señal nativo o endógeno de la proteína de interés o el de la hormona de crecimiento humano o de CD59.

La capacidad de bio-seleccionar para las células transfectadas, clasificar las células que expresan los niveles más altos de un gen informador y de seleccionar las células que producen los niveles más altos de la proteína de interés se puede mejorar fusionando un péptido que confiera resistencia de selección al informador de esta manera, la correlación entre la resistencia de las células al agente de selección de elección, la expresión del informador y la expresión de la proteína de interés aumenta. Además, la bio-selección se aplica poco tiempo después de la trasfección y antes de la clasificación, y esto asegura que la mayoría de la población resistente expresaría el gen de resistencia de selección, el gen informador y el GOI.

Por tanto, en una realización adicional de la descripción, el tramo polipeptídico que permite el anclaje del BMP a una membrana celular se une en su extremo carboxilo a un polipéptido que le confiere resistencia a la selección. Este polipéptido se selecciona del grupo que consiste en una enzima que hidroliza antibióticos, una proteína eliminadora de antibióticos, por ejemplo el producto del gen Sh ble que se une a e inhibe la actividad de la Zeocina, y una enzima modificadora de antibióticos tal como una quinasa. Alternativamente, la selección se puede realizar mediante la introducción de enzimas metabólicas que están ausentes en las células o que existen a muy bajos niveles y la eliminación de estos metabolitos o las fuentes de los metabolitos del medio de crecimiento. Dos ejemplos conocidos son los sistemas de la dihidrofolato reductasa (DHFR) [43] y la glutamina sintetasa (GS) [44]. El aumento de la presión y amplificación de selección que resulta en la sobreproducción se obtiene en los ejemplos anteriores mediante la adición al medio de crecimiento de metotrexato para el sistema DHFR [45] o metionina sulfoximina para el sistema GS [46].

En una realización de la descripción, el tramo polipéptidico que permite el anclaje del BMP o BAP a una membrana celular se une a una enzima que hidroliza los antibióticos mediante un péptido enlazador.

En otra realización de la descripción, la enzima inactivadora de antibióticos se selecciona del grupo que consiste en una enzima inactivadora de puromicina, tal como puromicina N-acetil transferasa (PAC) y una enzima que hidroliza un aminoglicósido (por ejemplo, Geneticina), tal como aminoglicosido 3'-fosfotransferasa; la proteína eliminadora de antibióticos es un producto del gen Sh ble; y la enzima modificadora de antibióticos es una higromicina quinasa.

El enlace entre el BMP o BAP al tramo polipéptidico que permite su anclaje a una membrana celular, el enlace entre el BMP o BAP y sus secuencias señal y el enlace entre el tramo polipéptidico y el polipéptido que confiere la resistencia a la selección puede ser directo o mediante un péptido enlazador.

En una realización preferida de la descripción, el péptido enlazador consiste en la secuencia de aminoácidos de isoleucina y prolina o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 $((G_4S)n(G4)_m$, en donde n es un número seleccionado de 1, 2, 3, 4, o 5, en particular es 2 o 4; y m es un número seleccionado de cero o 1.

En otra realización de la descripción, la molécula de ácido nucleico de la presente descripción está operativamente unida a un promotor, tal como hCMV, capaz de dirigir la transcripción de la molécula de ácido nucleico, y se une opcionalmente operativamente después a una secuencia EMCV IRES.

Como se muestra más adelante en los ejemplos, se construyeron varios plásmidos con diferentes genes de interés (GOIs), y los genes para los informadores BMP o BAP se unieron a los portadores anclados en la membrana. Los GOIs y los genes informadores se unieron mediante un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). En esos plásmidos la expresión de GOI es dirigida por el potente promotor humano CMV (hCMV) y el gen informador se localiza después del IRES. La expresión de GOI puede ser dirigida también por cualquier promotor fuerte, además de hCMV, tal como, pero no limitado a CMV IE1 murino o CMV IE2 murino, que se utilizaron aquí a continuación para dirigir la expresión de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo IgG. Esta arquitectura bicistrónica dicta la transcripción de ambos genes en el mismo mRNA [47].

Para biotinilar la secuencia BAP, las células se co-transfectaron con el vector de expresión bacteriano BirA [27] para

obtener la biotinilación por las mismas células transfectadas [27-29, 31, 48], o el BAP se biotiniló externamente mediante la adición de biotina y BirA en un tampón de reacción específico [30, 49].

Las células eucarióticas, tales como las células CHO-S se transfectaron con los plásmidos y se seleccionaron los grupos estables. La expresión específica de BAP y BMP en las células transfectadas detectadas con estreptavidina fluorescente (F-SA) se demostró sin antecedentes significativos. Además, con el BMP como informador se realizaron tres clasificaciones consecutivas por FACS para altos expresadores y se obtuvo una mejora significativa en el nivel de expresión de los GOIs.

En una realización preferida de la descripción, el plásmido, es decir, la molécula de ácido nucleico de la descripción, comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un BMP, en particular un BMP que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y específicamente a BMP de SEQ ID NO: 5.

En una realización de la descripción, la molécula de ácido nucleico comprende además secuencias de ácidos nucleicos (plásmido MB-098) que codifican el péptido portador sintético de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 unida directamente al péptido transmembranal de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, el péptido señal de CD59a de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y el PAC de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. En particular, esta molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8, que codifica para el BMP unido en su extremo carboxilo directamente al péptido portador sintético que se une directamente en su extremo carboxilo al péptido transmembranal que se une en su extremo carboxilo mediante una secuencia $(G_4S)_4$ a PAC, y dicho BMP se une en su extremo amino mediante un péptido enlazador de isoleucina-prolina al péptido señal de CD59a de ratón.

En otra realización de la descripción, la molécula de ácido nucleico comprende además secuencias de ácidos nucleicos (plásmidos MB-070-MB-072) que codifican (además del BMP de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5) para el CD59a de ratón de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, y el péptido señal de CD59a de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En particular, esta molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 10, que codifica para el BMP unido en su extremo carboxilo mediante una secuencia $(G_4S)_2G_4$ (SEQ ID NO: 4) a CD59a de ratón y en su extremo amino mediante un péptido enlazador de isoleucina-prolina al péptido señal análogo de CD59a.

En otra realización más de la descripción, la molécula de ácido nucleico comprende secuencias de ácido nucleico adicionales (plásmidos MB-073 y MB-075) que codifican (además del BMP de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5) para el péptido portador sintético de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 unida directamente al péptido transmembranal de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, y el péptido señal de CD59a de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En particular, esta molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, que codifica para el BMP unido en su extremo carboxilo directamente al péptido portador sintético que se une directamente en su extremo carboxilo al péptido transmembranal y dicho BMP se une en su extremo amino mediante un péptido enlazador de isoleucina-prolina a un péptido señal de CD59a de ratón.

En otra realización más de la descripción, la molécula de ácido nucleico comprende secuencias de ácidos nucleicos adicionales (plásmidos MB-074 y 076) que codifican (además del BMP de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5) para el péptido portador sintético de la secuencia de aminácidos de SEQ ID NO:1 unida directamente al péptido de anclaje CD48-GPI de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y el péptido señal de CD59a de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En particular, esta molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 12, que codifica para un BMP unido directamente en su extremo carboxilo a un péptido portador sintético que se une directamente en su extremo carboxilo a un péptido de anclaje CD48-GPI y dicho BMP se une en su extremo amino mediante un péptido enlazador de isoleucina-prolin a un péptido señal de CD59a de ratón.

De acuerdo con la presente descripción, el producto del gen informador y la proteína de interés se pueden codificar por ácidos nucleicos en plásmidos separados, o se pueden codificar por ácidos nucleicos en el mismo plásmido.

Cuando el producto del gen informador y la POI se codifican por ácidos nucleicos en plásmidos separados, las células se contransforman con ambos, el plásmido que contiene el gen informador y el segundo plásmido que incluye el gen que codifica la POI.

Cuando se emplea un plásmido, la presente descripción proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende (a) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal; (b) un segundo ácido nucleico que codifica un péptido mimético de biotina (BMP) o un péptido aceptor de biotina (BAP); (c) un tercer ácido nucleico que codifica un tramo polipeptídico que permite el anclaje del BMP o BAP a la membrana celular; y (d) una secuencia de ácido nucleico que codifica la POI.

En una realización de la descripción, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la POI está operativamente unida antes a una secuencia EMCV IRES o después a un promotor capaz de dirigir la transcripción de la molécula de ácido nucleico, o ambas.

De acuerdo con otra realización de la descripción, varias secuencias de ácidos nucleicos que codifican la POI

pueden estar presentes codificando varias subunidades diferentes de una proteína de múltiples subunidades. Así, por ejemplo, una citoquina de interés estaría codificada por una única secuencia de ácidos nucleicos que codifica la POI mientras un IgG o IgM estaría codificado por dos o tres secuencias de ácidos nucleicos que codifican la POI, respectivamente.

En una realización de la descripción, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la POI es una secuencia de ácido nucleico que codifica la POI que codifica un único polipéptido, mientras que en otra realización de la descripción, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la POI comprende dos secuencias de ácidos nucleicos que codifican para diferentes subunidades de un anticuerpo. En muchos casos la proteína de interés se debe secretar al medio, y por tanto en esos casos se debe unir en su extremo amino, opcionalmente mediante un péptido enlazador, a un péptido señal.

La proteína de interés puede ser cualquier proteína que se pueda expresar en una célula eucariótica. Como ejemplos no limitantes, y para aclarar que proteínas se pueden considerar como proteínas de interés, la proteína de interés se selecciona del grupo que consiste en un producto de fusión Fc, un anticuerpo, una citoquina, una hormona, un factor de crecimiento, un neurotransmisor, una enzima, un ligando receptor, una sialomucina, una proteína nuclear, una proteína reguladora y una toxina, o una fracción funcional de las mismas, es decir, una fracción de la proteína que es a su vez un anticuerpo (por ejemplo un Fab), una citoquina, una hormona, un neurotransmisor, una enzima, un ligando receptor, una sialomucina o una toxina. Un producto de fusión Fc es una proteína expresada como una fusión a un péptido señal y el fragmento Fc de inmunoglobulina como el copartícipe de fusión en el extremo N o el extremo C, que facilita la expresión y la secreción de altos niveles de muchos diferentes tipos de POIs, como se describió anteriormente. El dominio Fc ayuda a mejorar la solubilidad de proteínas hidrofóbicas y proporciona un control para la fácil detección y purificación de las proteínas de fusión; y puede escindirse mediante tratamiento con proteasa, si se desea.

Se ha encontrado de acuerdo con la presente invención que las células altamente productoras que expresan varias proteínas de interés, tales como un producto de fusión Fc (sCD164-Fc), un anticuerpo (anti-IL22RA mAb), una hormona de crecimiento (factor estimulante de la colonia de granulocitos (GCSF)) o citoquina (IL6) y expresar altos niveles de estas proteínas pueden aislarse eficazmente por selección de células que expresan altos niveles de BMP en su superficie.

En otro aspecto más, la presente descripción describe un método para la selección de células eucarióticas que secretan una proteína de interés (POI), que comprende identificar células que presentan BMP en su superficie celular, en donde el nivel de la presentación de BMP en la superficie celular se correlaciona con la cantidad de POI secretada, el método comprende las etapas de:

(a) transfectar células con un vector que comprende

(i) una molécula de ácido nucleico que comprende la primera, segunda y tercera secuencias de ácidos nucleicos anteriores y una segunda molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la POI; o

(ii) una molécula de ácido nucleico que comporende ambas moléculas de ácido nucleico en el (i) anterior,

estableciendo así un conjunto estable de células transfectadas con BMP;

(b) marcar las células transfectadas con BMP con un resto unido a biotina detectable; e

(c) identificar y aislar las células transfectadas marcadas con el resto unido a biotina detectable.

En ciertas realizaciones de la descripción, cada una de dicha al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica la POI está unida operativamente antes a una secuencia EMCV IRES y después a un promotor capaz de dirigir la transcripción de la molécula de ácido nucleico, o ambas.

Las células utilizadas para la producción de la proteína de interés pueden ser cualquier célula eucariótica susceptible a manipulaciones genéticas, tales como células de mamíferos, plantas, insectos o levaduras. Las células mamíferas pueden ser células de ovario de hámster chino (CHO), células NS0 de mieloma de ratón bebé, células de riñón de hámster (BHK), células de riñón embrionario humano (HEK), células de la retina humana, células COS, células SP2/0, células W138, células MRCS, células Per.C6. Las células vegetales pueden ser células de tabaco, zanahoria y arroz. En una realización de esta descripción, las células son células CHO.

En ciertas realizaciones de la descripción, las células se marcan poniéndolas en contacto con una proteína o resto de unión a biotina detectable seleccionada del grupo que consiste en avidina fluorescente y estreptavidina fluorescente y las células marcadas se identifican y aíslan después por medio de un FACS. Sin embargo, cualquier método se podría utilizar para identificar y aislar las células marcadas, por ejemplo, pero no limitado a, un método que utilice perlas recubiertas con restos de unión a biotina.

El método de la presente descripción proporciona una alta correlación entre la cantidad de producto del gen

informador expresado en la superficie de las células y la cantidad de proteína de interés expresada y secretada, y así permite la selección de células altamente productoras para el aislamiento de células que muestran altos niveles del producto del gen informador. En particular, las células eucarióticas seleccionadas presentan mayores cantidades de BMP en su superficie y secretan mayores cantidades de proteínas de interés que las células transfectadas del conjunto estable. En ciertas realizaciones de la descripción, las cantidades de BMP en la superficie de las células eucarióticas seleccionadas y las cantidades de la proteína de interés secretada por las células eucarióticas seleccionadas son mayores en un factor que varía entre 2 y 30 veces, es decir, al menos en un factor seleccionado del grupo que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10, 11, 12, 13, 14, 15 y hasta 30 veces más que las células transfectadas del conjunto estable.

Las moléculas informadoras unidas a la membrana de la presente invención se han encontrado, como se muestra más adelante, que son eficientes para la clasificación de células altamente productoras mediante FACS. Varias importantes conclusiones se derivan de los resultados: las proteínas informadoras de BMP y BAP podrían detectarse específicamente en las células transfectadas; se encontró que los antecedentes de tinción de las células transfectadas no marcadas eran despreciables y por lo tanto estos informadores son adecuados para la selección de las células requeridas (Ejemplo 3); La invención proporciona la capacidad para clasificar las células que expressan los niveles más altos de un gen informador y por eso para seleccionar las células que producen los niveles más altos de la POI. El método se demostró con varios andamios anclados a la membrana y varios GOIs. La productividad aumentó de la etapa de agrupación al conjunto después de tres rondas de ciclos de clasificación 1,7-13,5 veces (véase tabla 1) con diferentes proteínas y diferentes estructuras informadoras. Ciclos de clasificación adiconales junto con la etapa de clonación hecha por FACS de acuerdo con los mismos niveles de expresión de los informadores puede incluso aumentar más los niveles de productividad de la POI en los clones seleccionados. Estos resultados refuerzan la validez del sistema. La estructura informadora facilita el conveniente marcaje con estreptavidina fluorescente. La estreptavidina fluorescente utilizada en estos experimentos se confirmó que era de origen no derivado de animales lo que facilita el uso de este reactivo en un proceso de desarrollo de clones. Un desarrollo importante de la plataforma básica fue la fusión de la molécula informadora unida a la membrana al gen de selección PAC; esta construcción se encontró que era muy eficiente para la bioselección y clasificación de las células altamente productoras por FACS. Es importante señalar lo siguiente: se encontró que el gen de resistencia a la selección de PAC era activo como una proteína unida a la membrana aunque, naturalmente la enzima se localiza en el citoplasma; la productividad aumentó durante los ciclos de clasificación hasta 3 veces en los conjuntos (~ 11 PCD) en comparación con en el inicio de los ciclos de clasificación. Se obtuvo un aumento adicional en clones con valores de hasta 6 veces en medio ProCHO (26 PCD). Estos resultados indican que la expresión del informador está estrechamente vinculada a la de la POI.

La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos no limitantes:

Ejemplos

Materiales y Métodos

Células. Células CHO-S (GibcoBRL, Cat. # 11619) adaptadas a CHO DHFR$^-$. Polvo medio, SAFC (Biosciences Cat. # C6614).

Reactivos

AccuPrime Pfx Invitrogen DNA polimerasa Cat No. 12344-024

Ácido acético (glacial) Merck Cat. # K28351556 (Alemania).

Geles de acrilamida -NuPAGE; 10% Tris gel, Cat. # NP0301BOX, Invitrogen (USA).

Agarosa IBI Cat. # IB70042

Ampicilina – Sigma Cat. # A9518

Anticuerpos para ELISA: Captura: IgG antihumana de cabra (H + L), Cat. # 109-005-088 Jackson Immuno Research (USA). Detección: IgG antihumana de cabra Fab HRP, Cat. # 109-036-098 Jackson Immuno Research (USA).

Anticuerpos para la transferencia de Western: Marcaje: A) IgG antihumana de cabra Fc HRP, Jackson Cat. # 109-036-098; B) cadena ligera Kappa antihumana de cabra, SouthernBiotech Cat. # 2060-01 seguido por HRP de asno anti cabra, Jackson Cat. # 705-015-147.

Papel secante GB002 Cat. # 426677 Schleicher and Schuell (USA).

Albúmina sérica bovina (BSA), Bovostar. Bovogen Cat. # BSAS.01

Albúmina sérica bovina (BSA), Sigma Cat. # A-4503

Bromofenol azul, Merck, Cat. # 2126169.

Sulfato de dextrano (Sigma, Cat. # D4911),

DH5α bacteria competente, Life-Technologies Cat. # 18263-012

DMSO, Merck, Cat. # K31630931

Escalera de DNA: escalera de 1kb para DNA, Biolabs Cat No. # 3232L

Escalera de DNA: escalera de 100 pares de bases para DNA, Biolabs Cat No. # 3231L

Tampón de muestra de electroforesis LDS, Invitrogen, Cat. # NP0007, (USA).

Etanol, Merck Cat. 00983.1000.

FACS Accudrop Beads, BD, Cat.# MAB345249

Glucosa, Sigma, cat. # G7021

Glutamina, Sigma, cat. # G5972

Hispeed plasmid Maxi Kit, Quiagen GmbH, Germany, Cat. # 12663

HT Biological Industries Cat. # 03-085-1C

Ácido clorhídrico 37%, Merck, Cat. # 1.00314.

Ácido clorhídrico, Merck, cat. # UN-1789 1.00314.2500

LB + placas de ampicilina – Hy-Labs Cat. # PD178

Medio LB para crecimiento bacteriano – Hy-Labs Cat. # BP302/400S.

Reactivo LipofectAmine, Gibco BRL Cat. # 18324-020.

L-Metionina sulfoximina (MSX), Sigma Cat. # M5379

Sustrato luminogénico: ECL Amersham kit, Cat. # RPN2109.

Metanol Merck Cat. # 1.06009.2500

Mgc12- 1M, SIGMA, Cat. # M1028

Tampón de ejecución NuPAGE MOPS, X20, Invitrogen Cat. # NP0001

Tampón de transferencia NuPage, Invitrogen Cat. # NP0006-1

Tampón de ejecución NuPAGE Tris Glicina, X10, Invitrogen Cat. #LC2675

Fenol rojo, Sigma, Cat. # P0290

Plurónico F-68, Sigma Cat. # P5556

Monolaurato de polioxietilensorbitan (Tween 20), Sigma Cat. # P-1379

Proteína estándar marcadora pre-marcada Cat. # LC5925, Invitrogen

Combinado inhibidor de proteasa, Sigma Cat. # P8340

Membrana de nitrato de celulosa pura BA-85, Schleicher & Schuell, 78x90 mm, Cat. # 401184.

Puromicina, InvivoGen Cat. # ant-pr-1

Las muestras de referencia Anti-IL22RA (MSB0010074/C12) se obtuvieron a partir de EMD (GVA) 5,9 mg/ml en PBS, pH 6,0).

Las enzimas de restricción se adquirieron en New England Biolabs.

Estreptavidina conjugada con R-ficoeritrina (SA-PE), 0,2 mg/ml, BioLegend, Cat. # 405203 (véase CoO en 9,3 y CoA en 9,4).

Leche desnatada en polvo, Fluka Cat. # 70166

Bicarbonato de sodio, Merck Cat. # 6329

Carbonato de sodio, Merck Cat. # 6392

Fosfato de sodio, Sigma, Cat. # S-3264

SYBR Safe DNA gel stain, Invitrogen, Cat. # S33102, 3 1/Gel

TMB Savion diagnostics, Cat. # 1928

Tween20 (Monolaurato de polioxietilen-sorbitan)- Sigma Cat. # P-1379

Agua R. O. (ITL)

Whatman 3 mm, Whatman Cat. # 3030917

Soluciones

Bleach 1% - FACSClean, Becton Dickinson Cat. # 340345.

PBS (preparación ITL, BR R0450V01)

PBS con 0,1% de ácido plurónico.

Medios de cultivo

Medio de clonación CHO DHFR, SAFC Bioscinces Cat. # C6366, suplementado con L-Glutamina 4 mM y 15 mg/L de fenol rojo, Sigma, Cat. # P0290.

Medio ProCHO5, Lonza Cat. # BE12-766Q, suplementado con L-Glutamina 4 mM y 15 mg/L de fenol rojo, Sigma, Cat. # P0290.

Medio mínimo esencial de Eagle, Sigma, Cat. # M2279.

Métodos

Construcción de los vectores de expresión de DNA. Todos los vectores se construyeron utilizando técnicas de biología molecular estándar como se enseña por ejemplo en F. M. Ausubel y colaboradores. [F. M. Ausbel, 2009 # 132].

Preparación del DNA del plásmido. El DNA del plásmido se aisló utilizando el kit Hispeed plasmid Maxi de QIAGEN de acuerdo con el procedimiento descrito por el fabricante.

Secuenciación de DNA. Los fragmentos de DNA preparados por una empresa contratista (GeneArt, Germany) y clonado en el vector mediante procedimientos estándar se secuenciaron en Hy-Labs, Israel. La secuenciación de DNA se llevó a cabo mediante el analizador genético 16 Capillary ABI Prism 3100 completamente automatizado. La secuencia se analizó internamente utilizando el software Sci-Ed General (Clone manager software, versión 7.01 y Align plus 5, versión 5.01).

Transfección de las células CHO-S. Las células CHO-S se descongelaron y se cultivaron en un medio libre de suero ProCHO5 (Lonza, Cat. # BE12-766Q) suplementado con hipoxantina 13,61 mg/L y timidina 3,88 mg/L (HTx1, Biological Industries Cat. # 03-085-1B). Las células se hicieron crecer en suspensión en un Bioreactor de tubos de filtro de 50 ml (TPP, Cat. # 87050), 37ºC, se humidificaron y se agitaron a 320 RPM. Dos días antes de la transfección, las células se sembraron en una concentración de 0,2 x 10^6 células/ml en un Erlenmeyer, 500 ml, con tapa (Corning, Cat. # 431145). Las células se transfectaron con LipofectAmine (GibcoBRL Cat. # 18324-020). En el día de la transfección, las células se lavaron; se resuspendieron y las 10 x 10^6 células se sembraron en 4 ml de MEM (Sigma, Cat. # M2279) en un Erlenmeyer de 125 ml con tapa de filtro (Corning, Cat. # 431143). Para cada transfección con un único plásmido, se utilizaron 20 µg de un vector linearizado (MB-098). El volumen final de DNA se ajustó a 100 µl en MEM. Posteriormente, 100 µl de LipofectAmine se añadieron y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente. La mezcla DNA-LipofectAmine se añadió después a las células y se incubó durante 4 horas a 37ºC, 5% de CO_2 en una incubadora de agitación a 45 RPM. Al final de este periodo de incubación las células se centrifugaron y el medio se reemplazó con 20 ml de ProCHO5 fresco (Lonza, Cat # BE12-766Q) suplementado con Hipoxantina 27,22 mg/L y Timidina 7,76 mg/L (HTx2, Biological Industries Cat. # 03-085-1B) en un Erlenmeyer de 125 ml con tapa de filtro (Corning, Cat. # 431143). El matraz se incubó a 37ºC en una incubadora con agitación a 125 RPM durante 72 horas.

Setenta y dos horas después de la trasfección, se recogieron las células, se centrifugaron y se resuspendieron en 20 ml de medio ProCHO5 suplementado con 20 µg/ml de Puromicina (Invivogen, Cat. # ant-pr-1), MSX 25 µM (Sigma, Cat. # M5379) y 100 µg/ml de sulfato de dextrano (Sigma, Cat. # D4911). En estas condiciones selectivas, solo las células que expresan el gen PAC podrían sobrevivir.

Biotinilación *in vitro*. Las células cultivadas en medio libre de componente animal (ACFM) se lavaron en PBS (tampón salino con fosfato) con 0,1% de ácido Plurónico F-68 (Sigma, Cat. # P5556) y $MgCl_2$ 5mM (Sigma, Cat. # M1028) y después 2 x 10^6 células se incubaron en PBS con 0,1% de ácido Plurónico F-68 (Sigma, Cat. # P5556), MgCl2 5mM (Sigma, Cat. # M1028), BirA 0,06 mM (Avidity, Cat. # BirA500), ATP 1 mM (Sigma, Cat. # A6419), y biotina 10 mM (Sigma, Cat. # B4639) durante una hora a temperatura ambiente. Después de la incubación las células se lavaron con PBS con 0,1% de ácido Plurónico F-68 (Sigma, Cat. # P5556) y MgCl2 5mM (Sigma, Cat. # M1028).

Marcado con estreptavidina fluorescente (F-SA). Las células (2 x 10^6) que expresan BAP que fueron biotiniladas *in vivo* o *in vitro* o las células que expresan BMP, se lavaron con PBS con 0,1% de ácido Plurónico F-68 (Sigma, Cat. # P5556) y después se incubaron en PBS + 0,1% de ácido Plurónico F-68 + Estreptavidina conjugada con R-ficoeritrina (SA-PE) (Jackson, Cat. # 016-110-084) (F-SA) diluida 1:100 e incubada durante 30 minutos a 37ºC con agitación a 80 RPM. Las células se lavaron después en PBS con 0,1% de ácido Plurónico F-68 y se cargaron en el FACSAria para el análisis.

Análisis por FACS. Las células (2 x 10^6) que expresan BMP se lavaron con PBS que contiene 0,1% de ácido Plurónico F-68 (Sigma, Cat. P5556) y se incubaron después en PBS + 0,1% de ácido Plurónico F-68 + Estreptavidina conjugada con R-ficoeritrina (BioLegend, Cat. # 405203) (F-SA) diluida 1:100 e incubada durante 30 minutos a 37ºC con agitación a 80 RPM. Las células se lavaron después en PBS con 0,1% de ácido Plurónico F-68 y se cargaron en el FACSAria para su análisis.

Propagación celular. Los cultivos celulares se mantuvieron en ACFM como sigue: las células se sembraron en tubos de 50 ml a una concentración de 0,2 x 10^6 células/ml en un volumen de 25 ml y se incubaron a 37ºC en un agitador orbitálico Φ 25 mm a 320 rpm. Dos veces a la semana, se midieron el número de células y la viabilidad. El cultivo se sometió a pases por centrifugación a 100 g durante 5 minutos a 4ºC y el sedimento celular se resuspendió en ACFM fresco precalentado.

Propagación celular y productividad en ACFM

Mantenimiento del cultivo celular. Los cultivos celulares se mantuvieron en ACFM como sigue: Las células se sembraron en matraces T-80 a una concentración de 0,2 x 10^6 células/ml y se incubaron a 37ºC en un agitador orbitálico a 45 rpm. Dos veces a la semana, se midieron el número de células y la viabilidad. El cultivo se sometió a pases por centrifugación a 100 g durante 5 minutos a 4ºC y el sedimento celular se resuspendió después en ACFM fresco precalentado.

Los matraces de cultivo tisular de 25 cm^2 se sembraron con 8-10 ml de medio y se incubaron en un agitador orbitálico de f25 mm a 55 rpm. Los matraces de cultivo tisular de 80 cm^2 se sembraron con 20-30 ml de medio y se incubaron en un agitador orbitálico de f25 mm a 45 rpm.

Productividad celular en ACFM. Para la productividad específica (PCD) en ACFM, las células se sembraron en el ACFM especificado en una concentración de 0,5 x 10^6 células/ml, en un tubo de 50 ml y se incubaron a 37ºC en un agitador orbitálico (320 rpm) durante 24 horas. Después se tomaron muestras del medio y la concentración del producto se determinó mediante ELISA. El cálculo se realizó dividiendo los títulos de 24 horas por la concentración promedio de las células en la siembra y después de 24 horas del experimento.

$$PCD = \frac{T}{\frac{Ci + Ce}{2}}$$

PCD- pg/célula/día

T- título (pg/ml)

Ci- concentración celular en la siembra (células/ml)

Ce- concentración celular después de 24 horas (células/ml)

Clasificación celular. Para la clasificación por FACS se utilizaron células transfectadas de conjuntos unidos en medio ProCHO5 suplementado con 20 µg/ml de puromicina y MSX 25 µM. Para cada clasificación, aproximadamente 60 x 10^6 células se cultivaron y se marcaron con F-SA. Las células para clasificar se marcaron con PBS conteniendo 0,1% de ácido plurónico F-68 y F-SA diluido 1:100 a una concentración de 4 x 10^6 células/ml en matraces T80 y se incubaron, 1 hora, a 37ºC en un incubador con agitación a 80 rpm. Después del marcado, las células se recogieron, se lavaron dos veces en PBS + 0,1% de ácido Plurónico F-68, y se resuspendieron a una concentración final de 10 x 10^6 células/ml en PBS + 0,1% de ácido Plurónico F-68 para la clasificación del crudo. Las células fluorescentes superiores del 4% se cerraron en un gráfico de puntos FSC/PE para la clasificación con el citómetro de flujo FACSAria en el modo de precisión de “célula única”. Las células clasificadas se sembraron en medio ProCHO5

suplementado con 20 µg/ml de puromicina y MSX 25 µM y se permitió crecer hasta que la viabilidad de la célula fue >=90% y el número de células viables fue ≥ 70 x 10^6. En esta etapa se realizaron análisis de fluorescencia y el siguiente ciclo de clasificación. En general, se hicieron tres clasificaciones sucesivas.

Clonación por FACS ACDU. La clonación se realizó mediante el dispositivo de Unidad de Deposición Celular Automatizada (ACDU) del clasificador celular FACSAria, de células en crecimiento en ProCHO5 que contiene 20 µg/ml de puromicina y MSX 25 µM. 2 x 10^6 células se recogieron, se lavaron dos veces en PBS + 0,1% de ácido plurónico y se marcaron en 0,5 ml de SA-PE (BioLegend) a una concentración de 2 µg/ml (dilución 1:100). Las células se incubaron en una placa de 24 pocillos durante 30 minutos a 80 rpm a 37ºC. Después el marcaje, las células se recogieron, se lavaron dos veces en PBS + 0,1% de ácido Plurónico, se resuspendieron en 4 ml de PBS + 0,1% ácido Plurónico (concentración celular de ~ 0,1-0,2 células/ml). Las células fluorescentes superiores al 2,5% se clonaron por el ACDU, en el modo de precisión "célula única", en placas de 96 pocillos que contienen 180 µl/pocillo de una mezcla ACFM del 80% de C6366 de Sigma y 20% de ProCHO5 para células que se cultivaron en ProCHO5. Las placas se analizaron mediante Cellavista en el día 0 y después cada 2-3 días para la detección de pocillos con una colonia única. Dos semanas después de la clonación, los sobrenadantes de los pocillos en los que se detectó el crecimiento de la colonia, se muestrearon y se ensayaron por ELISA. Los pocillos que contienen > 1 colonia por pocillo se omitieron. Las células se recogieron de los pocillos con los títulos más altos y se transfirieron primero a matraces T25 conteniendo 4 ml de una mezcla de 50% de C6366 de Sigma y 50% de medio ProCHO5 sin agitación. De tres a cinco días después se añadieron 2-4 ml del 100% del medio ProCHO5 a los matraces T25 y las células se incubaron con agitación. De uno a tres días después se añadieron 8 ml de ProCHO5 y la suspensión se transfirió a matraces T80 (total de 87,5% de ProCHO5 y 12,5% de C6366). De uno a dos días después se añadieron 10 ml de medio fresco a las células. Las células se sembraron en 25 ml de medio fresco a 0,2 x 10^6 células/ml para otro ciclo de crecimiento. Para determinar la productividad específica de las células se sembraron a una concentración de 0,5 x 10^6 células/ml durante 24 horas a 37ºC en 50 tubos de filtro a 320 rpm.

ELISA para sCD164-Fc. Se empleó el siguiente procedimiento:

1. Placas de microtitulación se recubrieron con 0,5 mg/ml con un anticuerpo monoclonal para CD164 en PBS y se incubaron durante una noche a ~ 4ºC.

2. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (PBS que contiene 0,05% de Tween 20).

3. Las placas se bloquearon con un tampón de bloqueo (PBS que contiene 0,5% de I-Block), 200 µl/pocillo, durante 1 hora a 37ºC con agitación.

4. Después del bloqueo, las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado y 100 ml de alícuotas de muestras ensayadas, curva estándar (0,78-50 ng/ml) y muestras de control en el tampón de ensayo (PBS que contiene 0,25% I-Block y 0,05% de Tween 20), se añadieron a las placas y se incubaron durante 60 minutos a 37ºC con agitación.

5. Las placas se lavaron otra vez tres veces con tampón de lavado, y 100 ml del segundo anticuerpo se añadió a la fracción Fc (fragmento F(ab')2 antihumano de cabra conjugado con HRP diluido 1:40.000 en el tampón de ensayo) en cada pocillo.

6. Las placas se incubaron durante 60 minutos a 37ºC con agitación.

7. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado y 100 ml de solución de sustrato (TMB) se añadieron a cada pocillo y las placas se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente (sin agitación).

8. La reacción se paró por la adición de 50 µl/pocillo de solución de parada (HCl 4N).

9. La aborbancia se midió a 492 nm en un lector de ELISA.

10. Las soluciones estándar se prepararon mediante diluciones en serie del Std. SCD164-Fc de 293 células HEK para proporcionar un intervalo de curva estándar de 0,78 a 50 ng/ml (el intervalo lineal estaba entre 0,78-12,5 ng/ml) en un tampón de ensayo. Una muestra de la recolección del crudo del conjunto de SCD164-Fc se diluyó con tampón de ensayo para obtener ~ 10 ng/ml y se utilizó como muestra de control.

11. Los resultados de los datos de densidad óptica se procesaron y los resultados se calcularon mediante el software Magelan.

12. La dilución de las muestras, preparación de las series de dilución de la curva estándar, y distribución de las muestras en las placas se llevó a cabo mediante un procesador de muestras robótico.

ELISA para GCSF. Se empleó el siguiente procedimiento:

1. Placas de microtitulación se recubrieron con 1 µg/ml con un anticuerpo monoclonal para GCSF en PBS y se incubaron durante una noche a ~ 4ºC.

2. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (PBS que contiene 0,05% de Tween 20).

3. Las placas se bloquearon con tampón de bloqueo (PBS que contiene 1% BSA), 200 µl/pocillo, durante 1 hora a 37ºC con agitación.

4. Después del bloqueo, las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado y 100 ml de alícuotas de muestras ensayadas, curva estándar y muestras de control se añadieron a las placas y se incubaron durante 60 minutos a 37ºC con agitación.

5. Las placas se lavaron otra vez tres veces con tampón de lavado, y 100 ml de solución de detección GCSF de anticuerpo antihumano biotinilado se añadieron a cada pocillo.

6. Las placas se incubaron durante 60 minutos a 37ºC con agitación.

7. Las placas se incubaron con un segundo anticuerpo, Estreptavidina HRP, siguiendo el mismo procedimiento descrito en las etapas 5-6 anteriores.

8. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado.

9. 100 ml de solución de sustrato (TMB) se añadieron a cada pocillo y las placas se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente (sin agitación).

10. La reacción se paró mediante la adición de 50 µl/pocillo de solución de parada (HCl 3N).

11. La absorbancia se midió a 492 nm en un lector de ELISA.

12. Las soluciones estándar se prepararon mediante diluciones en serie del GCSF recombinante humano estándar para proporcionar una curva estándar de 1,56-100 ng/ml (el intervalo lineal estaba entre 3-50 ng/ml).

13. Los resultados de los datos de densidad óptica se procesaron y los resultados se calcularon mediante el software Magelan.

14. Un procesador de muestras robótico realizó la dilución de las muestras, la preparación de las series de dilución de la curva estándar, y la distribución de las muestras en la placa.

ELISA para IL-6. Se empleó el siguiente procedimiento:

1. Placas de microtitulación se recubrieron con 1 mg/ml con un anticuerpo monoclonal para IL-6 en PBS y se incubaron durante una noche a ~4ºC.

2. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (PBS que contiene 0,05% de Tween 20).

3. Las placas se bloquearon con tampón de bloqueo (PBS que contiene 1% de BSA), 200 µl/pocillo, durante 1 hora a 37ºC con agitación.

4. Después del bloqueo, las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado y 100 ml de alícuotas de muestras ensayadas, muestras de curvas estándar y muestras de control se añadieron a las placas y se incubaron durante 60 minutos a 37ºC con agitación.

5. Las placas se lavaron otras tres veces con tampón de lavado, y 100 ml de anticuerpo de detección: anti-IL6 biotinilada, se añadieron a cada pocillo.

6. Las placas se incubaron durante 60 minutos a 37ºC con agitación.

7. Las placas se incubaron con un segundo anticuerpo, Avidina-HRP, siguiendo el mismo procedimiento descrito en las etapas 5-6 anteriores.

8. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado.

9. 100 ml de solución de sustrato (TMB) se añadieron a cada pocillo y las placas se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente (sin agitación).

10. La reacción se paró mediante la adición de 50 µl/pocillo de solución de parada (HCl 3N).

11. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector de ELISA.

12. Las soluciones estándar se prepararon mediante diluciones en serie del estándar de referencia IL6 para proporcionar una curva estándar de 31,75-2.000 pg/ml (el intervalo lineal estaba entre 31,75-500 pg/ml).

13. Los resultados de los datos de densidad óptica se procesaron y los resultados se calcularon mediante el software Magelan. Un procesador robótico realizó las diluciones de las muestras, la preparación de las series de

dilución de la curva estándar, y la distribución de las muestras en la placa.

Recogida de la cosecha del cultivo celular Anti-IL22AR para análisis. Las células productoras (0,5 x 10^6) se sembraron en 20 ml de medio ProCHO5 en 50 tubos de filtro y se cultivaron durante 24 horas a 37ºC en un agitador a 320 rpm. La cosecha se centrifugó y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm. El sobrenadante clarificado se analizó mediante el ensayo de ELISA seguido por el ensayo de transferencia de Western.

ELISA para Anti-IL22. Se empleó el siguiente procedimiento:

1. Placas de microtitulación se recubrieron con 100 µl por pocillo de 2,0 µg/ml de IgG antihumano de cabra (H+L) en un tampón de recubrimiento y se incubaron durante una noche a ~4ºC en una caja húmeda. Las placas se almacenaron a -20ºC durante 3 meses después de la incubación de una noche.

2. Las placas se lavaron cuatro veces con tampón de lavado (PBS que contiene 0,05% de Tween 20).

3. Las placas se bloquearon con tampón de bloqueo (1% de BSA en PBS-T al 5%), 200 µl/pocillo, durante 1 hora a temperatura ambiente.

4. Después del bloqueo, las placas se lavaron cuatro veces con tampón de lavado y 100 ml de alícuotas de muestras ensayadas, la curva estándar (1,56-100 ng/ml) y las muestras de control en el tampón de ensayo (1% de leche en PBSx1). Las placas se cubrieron con un sellador de placas y se incubaron durante 60 minutos a 37ºC sin agitaión.

5. Las placas se lavaron otra vez cuatro veces con tampón de lavado, y 100 µl del segundo anticuerpo IgG antihumano de cabra Fab HRP diluido 1:100.000 en un tampón de ensayo) se añadieron a cada pocillo.

6. Las placas se incubaron durante 60 minutos a 37ºC.

7. Las placas se lavaron cuatro veces con tampón de lavado y 100 µl de solución sustrato (TMB) se añadieron a cada pocillo y las placas se incubaron 15-20 minutos a temperatura ambiente (sin agitación).

8. La reacción se paró mediante la adición de 100 µl/pocillo de solución de parada (HCl 1N).

9. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector ELISA.

10. Las disoluciones estándar se prepararon mediante diluciones en serie del Std. Anti IL22RA MSB0010074/C12 en PBS, pH 6,0 para proporcionar un intervalo de curva estándar de 1,56 a 100 ng/ml (el intervalo lineal estaba entre 1,56 a 50 ng/ml) en el tampón de ensayo. Una muestra de la recolección del crudo del conjunto relevante se diluyó con tampón de ensayo para obtener ~25 ng/ml y se utilizó como una muestra de control.

11. Los resultados de los datos de densidad óptica se procesaron y los resultados se calcularon mediante el software Magelan.

12. La dilución de las muestras, preparación de las series de dilución de la curva estándar, y la distribución de las muestras en la placa se llevó a cabo mediante un procesador de muestras robótico.

Análisis SDS-PAGE/transferencia de Western. Las muestras de los sobrenadantes clarificados de los clones anti-IL22RA en medio ProCHO5 se diluyeron en un tampón de muestra SDS PAGE. Las muestras de clones anti-IL22RA (0,1 µg por carril para ELISA) se separaron en geles de SDS-PAGE al 10% Bis Tris bajo condiciones no reductoras. El estándar de proteína MW premarcado (15 mcl) se cargó también en el gel. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante (100 V) durante ~2 horas con un sistema de electroforesis Novex Xcell SureLock Mini-Cell. Al final de la ejecución del SDS PAGE las proteínas se transfirieron desde el gel a una membrana de nitrocelulosa en un módulo de transferencia con un tampón de transferencia utilizando un suministro de potencia ajustado a 35 voltios durante 1 hora. La membrana se lavó con PBS-0,05% de Tween 20 durante 5 minutos, seguido por la incubación con tampón de bloqueo durante una noche a 4ºC. La membrana se incubó con los siguientes anticuerpos diluidos en tampón de trabajo, durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación: a) IgG Fc HRP antihumano de cabra b) cadena ligera kappa antihumana de cabra seguido por HRP de asno anti-cabra. La membrana se lavó después en PBS-0,05% Tween 20 tres veces durante 5 minutos cada vez. Las bandas se visualizaron por incubación en reactivo ECL durante 1 minuto seguido por la exposición de una película en un revelador “Mini-Medical” del procesador de película de rayos X AFP. Después de desarrollar la película se escaneó.

Ejemplo 1. Diseño de Plataforma

El diseño de la plataforma para la evaluación de los niveles de expresión de BMP y BAP en la superficie celular se creó primero con la proteína informadora localizada en un casete de expresión individual para asegurar una suficiente expresión y permitir la evaluación de la expresión (Fig. 1; vectores MB-065, MB-066 & MB-067). Después de la verificación de la expresión de la proteína informadora y la detección en la superficie celular por FACS, nuevos vectores que contienen BMP se construyeron con un enlace estrecho entre los genes informadores basados en BMP y los GOI en un mRNA bicistrónico. Los plásmidos estaban compuestos de los GOIs dirigidos por el potente

promotor humano de CMV (hCMV) y el gen informador estaba localizado después del EMCV IRES. Esta arquitectura dispone la transcripción de ambos genes en el mismo mRNA [47] (Fig. 1; vectores MB-070, MB-076).

La molécula informadora contenía una proteína o péptido unida a la membrana y un resto informador (BMP o BAP). La primera proteína unida a la membrana estaba compuesta por el CD59a de ratón, que es una pequeña proteína de 101 aminoácidos [27] anclada a través de su C terminal al lado externo de la membrana celular por glicosil fosfatidilinositol (GPI) [40] (vectores MB065, MB066, MB-070-MB072 en la Fig. 1). La secuencia de ácidos nucleicos de la construcción BMP-CD59a es como se expone en SEQ ID NO: 10. Alternativamente, se creó un péptido sintético de 60 aminoácidos (SEQ ID NO: 1), con dos sitios potenciales de N-glicosilación, que estaba anclado a la membrana celular a través del dominio TM del receptor IGF-1 de ratón (SEQ ID NO: 2; vector MB-073 & MB-075; Fig. 1) o un dominio de anclaje GPI de CD48 (los restos Cis se reemplazaron por Ser; SEQ ID NO: 3; vectores MB-074 & MB-076; Fig. 1). La predicción de la secuencia del dominio TM se realizó mediante el servidor TMHMM v.2.0, [32] y la secuencia de anclaje GPI se realizó mediante la predicción de sitios de modificación GPI [33, 36]. El extremo N de la proteína o péptido de membrana o la señal de anclaje GPI se unen mediante un enlazador a la BMP que codifica la secuencia de aminoácidos de CHPQGPPC [22, 23] (SEQ ID NO: 5) o la BAP que codifica la secuencia de aminoácidos de GLNDIFEAQKIEWHE [24] (SEQ ID NO:13).

Las células transfectadas con vectores que contienen BMP se marcaron directamente con estreptavidina marcada fluorescentemente (F-SA, Fig. 2A). Se requirió el marcaje de las células que expresan BAP antes de la biotinilación de este péptido informador. Esto se logró mediante la cotransfección de las células con secuencia BirA optimizada con CHO [27] para obtener la biotinilación *in vivo* por la propia célula (datos no mostrados) [27-29, 31, 48] o por biotinilación *in vitro* de BAP en la superficie celular por la adición de la enzima bacteriana BirA exógenamente [30, 49] (Fig. 2B).

La plataforma se amplió con el fin de seleccionar de manera estricta las células que producen altos niveles del gen de interés mediante la fusión de BMP con el gen de resistencia PAC. El BMP-PAC permite la selección de puromicina después de la transfección seguida de la selección FACS de acuerdo con los niveles de BMP. Se construyó un plásmido para la expresión de un anticuerpo modelo, compuesto de dos casetes de expresión uno para la cadena pesada y uno para la cadena ligera. La expresión de la cadena pesada es dirigida por el potente promotor CMV IE2 murino (mCMV IE2) y el gen informador se localiza después en un EMCV IRES. La expresión de la cadena ligera es dirigida por el promotor CMV IE1 murino (mCMV IE1) y un marcador de selección QSy (glutamina sintetasa) se localiza después en otro EMCV IRES. Esta arquitectura dicta la transcripción de la cadena pesada y los genes BMP-PAC en un único mRNA y la transcripción de la cadena ligera y el QSy en otro mRNA [47] (Fig. 3; vector MB98).

La molécula de selección del informador contiene: la BMP precedida por un péptido señal derivado de una molécula CD59a murina. La BMP se une en su C terminal a un péptido sintético de 60 aminoácidos, con dos sitios potenciales de N-glicosilación. Este portador sintético se une a un dominio TM del receptor IGF-I de ratón. El dominio TM se une al gen de resistencia de selección PAC mediante un enlazador corto (Fig. 2C, Fig. 3; vector MB-098). La predicción de la secuencia del dominio TM se realizó mediante el servidor TMHMM v.2.0. La BMP está codificada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

El PAC en esta construcción específica está unido a la membrana celular. Por lo tanto, el PAC debe contener una actividad de N acetilación eficiente como una proteína unida a membrana, que es diferente de su estado citoplásmico natural.

Ejemplo 2. Construcción de los vectores de expresión

Para este proyecto se construyeron tres conjuntos de vectores en diferentes estados del proyecto:

En el primer conjunto el péptido mimético de biotina (BMP), el péptido aceptor de biotina (BAP) y los genes BirA se clonaron en vectores directamente después del promotor hCMV. Estos vectores se utilizaron inicialmente para probar el nivel de expresión de BMP y BAP en la superficie celular y la capacidad para detectar estos marcadores con estreptavidina fluorescente (F-SA) por FACS, y en experimentos posteriores como vectores de control. El segundo conjunto de vectores contenía el casete BMP-CD59-GPI después del EMCV IRES uniendo así el marcador de selección FACS al GOI de una manera más estrecha y directa que en los vectores utilizados anteriormente. El tercer conjunto contenía un portador peptídico sintético en lugar del CD59a de ratón (que incluye GPI), anclado a la membrana celular a través de los dominios GPI o TM (Fig. 1). Como un marcador de selección, el gen PAC se insertó en el vector después del promotor SV40, dando como resultado un PAC citosólico en las células transfectadas.

Todos los vectores se construyeron de acuerdo con procedimientos conocidos como se muestra por ejemplo en F. M. Ausubel y colaboradores [50].

Ejemplo 3. Evaluación de las moléculas informadoras para la clasificación de células altamente productoras POI.

3.1 Expresión y detección de las moléculas informadoras en la superficie celular.

La generación de células que expresan GOI y BMP o GOI y BAP o GOI y BAP y BirA se realizó por las transfecciones de plásmidos LipofectAmine en células CHO-S seguido por la selección con puromicina o puromicina y zeocina en células cotransfectadas con plásmido que contienen BirA.

Los conjuntos estables se analizaron para los niveles de expresión de los genes informadores. El nivel de BAP se analizó después de la biotinilación por el BirA añadido exógenamente y marcado después con F-SA (Fig. 4) o biotinilación intracelularmente en aquellas células cotransfectadas con BirA, seguido de marcaje con F-SA (datos no mostrados).

El nivel de BMP se analizó directamente mediante la unión de F-SA. Los resultados muestran la señal de fluorescencia específica de las moléculas informadoras en las células transfectadas sin antecedentes significativos en las células no transfectadas y no marcadas (Fig. 5A).

En la Fig. 5, las células CHO-S, no transfectadas y transfectadas con plásmidos que contienen BMP-CD59a directamente después del promotor hCMV (A) o después de EMCV IRES (B) se marcaron, o no se marcaron con F-SA y se analizaron para sus niveles de marcado fluorescente por FACS. El nivel de fluorescencia de la BMP marcada con estreptavidina (Fig. 5) es menor que la de BAP marcada con estreptavidina (Fig. 4).

La posible razón para la diferencia en la intensidad del marcaje fluorescente de las células marcadas con BMP y BAP podría residir en la afinidad significativamente menor del péptido mimético de biotina por la estreptavidina frente a la biotina natural en el caso del BAP (varios ordenes de magnitud). A pesar de esta diferencia, se obtuvo una alta intensidad de marcaje de las células que expresan BMP, significativamente por encima de los antecedentes para permitir la clasificación de las células marcadas por FACS.

Dos picos con baja y alta fluorescencia se ven en las células transfectadas y marcadas (Figs. 5A-B; curvas --··--). Estos dos picos probablemente indican expresadores de BMP bajos y altos. Se especula que los expresadores bajos expresan también bajos niveles de PAC incluso aunque el PAC se localice en casetes de expresión separados. Sin embargo el nivel de PAC es suficiente para que las células sobrevivan bajo la presión de selección de puromicina.

3.2 Clasificación y generación de células altamente productoras. Las células se transfirieron con un vector que contiene tres diferentes GOIs (sCD164-Fc, GCSF, IL-6) y la quimera de BMP-CD59a (vectores MB-070, MB-071, MB-072), el portador GPI del péptido BMP (vectores MB-074 & MB-076) o el portador TM del péptido BMP (vectores MB-073 & MB-075) (Figs. 6-12) donde el GOI y BMP se localizan en el mismo casete de expresión bicistrónico separado por un EMCV IRES. Los conjuntos estables generados po bio-selección con puromicina (expresado en un casete diferente) se analizaron para los niveles de expresión de las moléculas informadoras por FACS y los GOIs por ELISA específico.

Los dos picos con fluorescencia baja y alta se ven en células transfectadas y marcadas (Figs. 6-12; curvas -- · · --). Esos dos picos indican expresadores de BMP bajos y altos. Se especula que los expresadores expresan también bajos niveles de PAC. Es probable que el nivel de PAC sea suficiente para que las células sobrevivan bajo la presión de selección de puromicina pero la expresión de BMP y posiblemente también el nivel de POI de esas células es baja.

En todos los casos (Figs. 6-12) se detectaron los niveles significativos de BMP así como de GOIs. Las células se marcaron con F-SA y las células con fluorescencia más alta del 4% se clasificaron. Las células clasificadas se propagaron y analizaron para determinar los niveles de BMP y GOIs. El procedimiento de clasificación y los análisis se repitieron sucesivamente tres veces. En todas las clases, la mayor población expresada de BMP se enriqueció, y como consecuencia, el nivel de productividad del GOI fue elevado (Se observó una correlación positiva entre los niveles de expresión de GOI y BMP) (Fig. 6 a Fig. 12).

Ejemplo 4. Construcción de los vectores de expresión que codifican para un producto de fusión PAC informador.

4.1 Construcción del vector MB-098 (Fig 3) – El vector MB-098 se construyó de acuerdo con procedimientos conocidos como se muestra por ejemplo en F. M. Ausubel y colaboradores. [50].

4.2 Generación de conjuntos estables que contienen BMP-PAC informadores, evaluación de la actividad de PAC y análisis de la productividad. Las células CHO-S transfectadas en ProCHO5 con el vector que contiene BMP-PAC se sometieron a la selección con 20 µg/ml de Puromicina (Invivogen, Cat. # ant-pr-1) y MSX 25 µM (Sigma Cat. # M5379). Bajo estas condiciones surgieron células estables que indican que el PAC está activo en la forma unida a la membrana. Los conjuntos estables expresan el mAb anti-IL22RA con una productividad específica de 8,5-9,4 de PCD (Fig. 13).

4.3 Clasificación y generación de conjuntos productores altos que contienen BMP-PAC informadores. Las células estables se analizaron y clasificaron por FACS en medio ProCHO5 (Fig. 14). Losl análisis muestran que se detecta BMP en los conjuntos transfectados. Se ven dos subpoblaciones antes de las clasificaciones, que expresan los niveles de BMP altos y bajos. Las clasificaciones consecutivas realizadas mediante la selección de las células expresoras de BMP superiores al 4% dieron como resultado una elevación de PCD que se correlacionó con los

niveles de BMP. El resumen de los resultados se ven en la Tabla 1.

Tabla 1: Resumen de los resultados de clasificación utilizando BMP y BMP-PAC*.

Informador	GOI	MFI antes de las clasificaciones	MFI después de las clasificaciones	PCD antes de las clasificaciones	PCD después de las clasificaciones
BMP-CD59**	sCD164-Fc	1.734	18.995	1,6	7,3
BMP-CD59**	GCSF	10.406	17.676	3,8	6,6
BMP-CD59**	IL-6	246	3.642	0,3	6,6
BMP-IGF1-R-TM**	GCSF	4.449	47.367	3,1	12,0
BMP-CD48-GPI**	GCSF	2.326	28.679	3,0	13,0
BMP-IGF1-R-TM**	sCD164-Fc	680	9.113	1,1	12,0
BMP-CD48-GPI**	sCD164-Fc	773	20.908	0,8	10,8
BMP-IGF1-R-TM-PAC**	Anti-IL22RA mAb	4.449	17.367	3,1	12,0

*Se muestran los resultados de la intensidad de fluorescencia media (MFI) y los niveles de POI antes y después de tres clasificaciones.

**Las células transfectadas se cultivaron en medio ProCHO5

Las células estables (3 réplicas) transfectadas con un vector que contenía mAb anti-IL22RA y BMP-PAC en ProCHO5 (Fig. 14) se seleccionaron en 20 µg/ml de Puromicina y MSX 25 mM y se combinaron en conjuntos unidos. Las células se analizaron para el nivel de BMP (línea roja). Los conjuntos se clasificaron sucesivamente tres veces de acuerdo con sus niveles de BMP marcados con F-SA. Después de cada ciclo de clasificación las células se recuperaron y se determinó la fluorescencia así como la productividad. Los valores del nivel de fluorescencia y productividad se muestran en la breve descripción de la Fig. 14.

3.5. Clonación de los conjuntos clasificados por el dispositivo FACS ACDU – aislamiento de clones.

Después de los tres ciclos de clasificación consecutivos, las células fluorescentes superiores a ~ 4% de anti-IL22RA mAb que producen los conjuntos # 2418UN-Hx3 en ProCHO5 se clonaron por medio del dispositivo de Unidad de Deposición Celular Automatizada (ACDU) del FACSAria, que permite la clonación de células únicas en placas de 96 pocillos. La clonación de las células cultivadas en ProCHO5 + 20 mg/ml de puromicina y 25 µM/ml de MSX se realizó en placas de 96 pocillos que contienen un 80% de medio C6366 y 20% de C6614. Las colonias se detectaron por Cellavista el día de la siembra y después cada 2-3 días. Los pocillos con más de una colonia se descartaron. Desde la clonación en adelante los medios de cultivo no contenían puromicina.

Se tomaron muestra de los sobrenadantes de 358 pocillos y se analizaron para la productividad (título) mediante ELISA (Fig. 15). Cuarenta clones derivados del conjunto con los títulos más altos se transfirieron primero a matraces T25 y después a tubos de 25 ml para evaluar la productividad específica (Fig. 16). Los mejores 15 clones derivados de ambos conjuntos se cultivaron con MSX 25 µM para la evaluación de la productividad en tubos de 50 ml (Fig. 17).

3.6 Identificación del producto proteico en el medio de cultivo celular crudo por SDS PAGE/ transferencia de Western. Los clones candidato se cultivaron en medio ProCHO-5. El producto producido por estos clones en el medio de cultivo celular crudo se analizó (Fig. 18) por SDS PAGE/transferencia de Western. La detección de los productos se realizó con anticuerpos para Fc humano y para las subunidades de cadena kappa ligera de mAb anti-IL22RA (A y B respectivamente).

Los resultados muestran que el producto intacto (heterodímero), con el peso molecular aparente de ~ 150 kDa se identificó para ambos anticuerpos. Además, la cadena ligera libre secretada por todos los clones candidatos (monómero y dímero de acuerdo con el peso molecular aparente) se observó en las transferencias de Western marcada con el anti-LC (Figs. 18B y 19B).

El peso molecular del heterodímero en el medio de cultivo celular crudo de todos los clones se ajusta al del producto purificado de la muestra de referencia de mAb anti-IL22RA. No se encontró diferencia significativa en los pesos

moleculares aparentes de los productos de los diferentes clones. Las múltiples bandas pueden representar la micro heterogeneidad de la glicosilación.

Listado de secuencias

<110> MERCK SERONO S.A
Daniel, HELMAN
Mira, TOISTER-ACHITUV
Meirav, BAR-SHIMON
Moshe, SMOLARSKY

<120> Nuevas moléculas informadoras unidas a la membrana para clasificar altos productores

<130> P 10/270 WO

<150> 210093
<151> 2010-12-19

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1
<211> 58
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 1

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asn Ala
1               5                   10                  15

Thr Gly Thr Ser Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Thr Gly Ser
            20                  25                  30

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asn Ala Thr Gly Gly Thr Thr
        35                  40                  45

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Thr Gly Ser
    50                  55
```

<210> 2
<211> 34
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 2

```
Glu Asn Phe Met His Leu Ile Ile Ala Leu Pro Val Ala Ile Leu Leu
1               5                   10                  15

Ile Val Gly Gly Leu Val Ile Met Leu Tyr Val Phe His Arg Lys Arg
            20                  25                  30

Asn Asn
```

<210> 3
<211> 38
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 3

```
Asn Asp Thr Val Tyr Phe Thr Leu Pro Cys Asp Leu Ala Arg Ser Ser
1               5                   10                  15

Gly Val Cys Trp Thr Ala Thr Trp Leu Val Val Thr Thr Leu Ile Ile
            20                  25                  30

His Arg Ile Leu Leu Thr
        35
```

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> sintética

<220>
<221> REPETICIÓN
<222> (1)..(5)
<223> La secuencia de los restos 1-5 puede repetirse de 1 a 5 veces antes de la secuencia GGGG

<220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(9)
<223> Los restos 6 a 9 pueden estar ausentes o presentes una vez.

<400> 4

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1               5
```

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 5

```
Cys His Pro Gln Gly Pro Pro Cys
1               5
```

<210> 6
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 6

```
Met Arg Ala Gln Arg Gly Leu Ile Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Val
1               5                   10                  15

Phe Cys Ser Thr Ala Val Ser
            20
```

<210> 7
<211> 198

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 7

```
Thr Glu Tyr Lys Pro Thr Val Arg Leu Ala Thr Arg Asp Asp Val Pro
1               5                  10                  15

Arg Ala Val Arg Thr Leu Ala Ala Ala Phe Ala Asp Tyr Pro Ala Thr
            20                  25                  30

Arg His Thr Val Asp Pro Asp Arg His Ile Glu Arg Val Thr Glu Leu
        35                  40                  45

Gln Glu Leu Phe Leu Thr Arg Val Gly Leu Asp Ile Gly Lys Val Trp
    50                  55                  60

Val Ala Asp Asp Gly Ala Ala Val Ala Val Trp Thr Thr Pro Glu Ser
65                  70                  75                  80

Val Glu Ala Gly Ala Val Phe Ala Glu Ile Gly Pro Arg Met Ala Glu
                85                  90                  95

Leu Ser Gly Ser Arg Leu Ala Ala Gln Gln Gln Met Glu Gly Leu Leu
            100                 105                 110

Ala Pro His Arg Pro Lys Glu Pro Ala Trp Phe Leu Ala Thr Val Gly
        115                 120                 125

Val Ser Pro Asp His Gln Gly Lys Gly Leu Gly Ser Ala Val Val Leu
    130                 135                 140

Pro Gly Val Glu Ala Ala Glu Arg Ala Gly Val Pro Ala Phe Leu Glu
145                 150                 155                 160

Thr Ser Ala Pro Arg Asn Leu Pro Phe Tyr Glu Arg Leu Gly Phe Thr
                165                 170                 175

Val Thr Ala Asp Val Glu Val Pro Glu Gly Pro Arg Thr Trp Cys Met
            180                 185                 190

Thr Arg Lys Pro Gly Ala
        195
```

<210> 8
<211> 1032
<212> ADN
<213> Secuencia articial

<400> 8

atgagagctc agaggggact catcttactc ctgctgcttc tggctgtgtt ctgttccaca 60
gctgttagca tcccctgtca cccacaggga cctccttgtg gaggggggcgg aagcggagga 120
gggggaagtg ggagtgggag taacgctacc gggacctccg ggtccggcgg cagtggaagc 180
ggaggaacag gaagtggagg agggggaagt gggagtggaa gcaatgcaac cgggggaacc 240
acgtccgggg gcgggtccgg cggcacgggt agtgagaact tcatgcatct gatcattgct 300
ctgccggttg ccatcctgct gatcgttggg gggctggtta tcatgctgta tgtcttccat 360
agaaagagaa ataacggagg tggcgggagt ggtggtggcg gctctggcgg tggtgggtcc 420
ggtggaggtg gcagtaccga gtacaagccc acggtgcgcc tcgccacccg cgacgacgtc 480
ccccgggccg tacgcaccct cgccgccgcg ttcgccgact accccgccac gcgccacacc 540
gtcgacccgg accgccacat cgagcgggtc accgagctgc aagaactctt cctcacgcgc 600
gtcgggctcg acatcggcaa ggtgtgggtc gcggacgacg gcgccgcggt ggcggtctgg 660
accacgccgg agagcgtcga agcgggggcg gtgttcgccg agatcggccc gcgcatggcc 720
gagttgagcg gttcccggct ggccgcgcag caacagatgg aaggcctcct ggcgccgcac 780
cggcccaagg agcccgcgtg gttcctggcc accgtcggcg tctcgcccga ccaccagggc 840
aagggtctgg gcagcgccgt cgtgctcccc ggagtggagg cggccgagcg cgccggggtg 900
cccgccttcc tggagacctc cgcgccccgc aacctccct tctacgagcg gctcggcttc 960
accgtcaccg ccgacgtcga ggtgcccgaa ggaccgcgca cctggtgcat gacccgcaag 1020
cccggtgcct ga 1032

<210> 9
<211> 100
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 9

Leu Thr Cys Tyr His Cys Phe Gln Pro Val Val Ser Ser Cys Asn Met
1 5 10 15

Asn Ser Thr Cys Ser Pro Asp Gln Asp Ser Cys Leu Tyr Ala Val Ala
20 25 30

Gly Met Gln Val Tyr Gln Arg Cys Trp Lys Gln Ser Asp Cys His Gly
35 40 45

Glu Ile Ile Met Asp Gln Leu Glu Glu Thr Lys Leu Lys Phe Arg Cys
50 55 60

Cys Gln Phe Asn Leu Cys Asn Lys Ser Asp Gly Ser Leu Gly Lys Thr
65 70 75 80

Pro Leu Leu Gly Thr Ser Val Leu Val Ala Ile Leu Asn Leu Cys Phe
85 90 95

Leu Ser His Leu
100

<210> 10
<211> 485

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 10
ggtaccgccc gacgcgtgcc accatgagag ctcagagggg actcatctta ctcctgctgc 60

ttctggctgt gttctgttcc acagctgtta gcatcccctg tcacccacag ggacctcctt 120

gtggcggagg gggatccgga ggagggggaa gtgggggcgg cggactcaca tgctatcact 180

gtttccaacc ggtggtttct tcatgcaata tgaacagcac ttgctctcct gaccaggatt 240

cctgtctcta tgctgtagcc ggaatgcaag tgtatcaaag gtgttggaaa caatcagatt 300

gtcatggtga gatcattatg gaccaattag aagagacaaa attaaaattc agatgttgtc 360

agtttaactt gtgtaacaaa agtgacggat ccttggggaa gacaccattg ctggggacct 420

cggttctggt ggccattttg aatctttgtt tcttaagtca tctctaaaga tatcgcatca 480

agctt 485

<210> 11
<211> 418
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 11
ggtaccccaa cgcgtgccac catgagagct cagaggggac tcatcttact cctgctgctt 60

ctggctgtgt tctgttccac agctgttagc atcccctgtc acccacaggg acctccttgt 120

ggaggggcg gaagcggagg aggggaagt gggagtggga gtaacgctac cgggacctcc 180

ggatccggcg gcagtggaag cggaggaaca ggaagtggag gaggggaag tgggagtgga 240

agcaatgcaa ccgggggaac cacgtccggg ggcgggtccg gcggcacggg tagtgagaac 300

ttcatgcatc tgatcattgc tctgccggtt gccatcctgc tgatcgttgg ggggctggtt 360

atcatgctgt atgtcttcca tagaaagaga ataactaat gagatatcgg ataagctt 418

<210> 12
<211> 430
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético
<400> 12
ggtaccccaa cgcgtgccac catgagagct cagaggggac tcatcttact cctgctgctt 60

ctggctgtgt tctgttccac agctgttagc atcccctgtc acccacaggg acctccttgt 120

ggaggggcg gaagcggagg aggggaagt gggagtggga gtaacgctac cgggacctcc 180

ggatccggcg gcagtggaag cggaggaaca ggaagtggag gaggggaag tgggagtgga 240

agcaatgcaa ccgggggaac cacgtccggg ggcgggtccg gcggcacggg tagtaacgac 300

acagtgtact tcactctacc ttgtgatcta gccagatctt ctggagtatg ttggactgca 360

acttggctag tggtcacaac actcatcatt cacaggatcc tgttaaccta atgagatatc 420

ggataagctt 430

<210> 13
<211> 15

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 13

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico que comprende:

(a) una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido señal, unido en su extremo C a

(b) una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido mimético de biotina (BMP), unido en su extremo C a

(c) una tercera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un tramo polipeptídico que permite el anclaje del BMP a una membrana celular,

en donde el BMP tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

2. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la primera y la segunda secuencias de ácidos nucleicos y/o la segunda y la tercera secuencias de ácidos nucleicos están unidas por una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido enlazador.

3. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el tramo polipeptídico que permite el anclaje del BMP a una membrana celular se selecciona del grupo que consiste en

(i) CD59a que tiene el aminoácido de SEQ ID NO: 9;

(ii) el péptido portador sintético que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 unida directamente a CD48-GPI que tiene el aminoácido de SEQ ID NO: 3; y

(iii) el péptido portador sintético que tiene la secuencia de amioácidos de SEQ ID NO: 1 unida al péptido transmembranal IGF-1R-TM que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

4. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el péptido señal es el péptido señal de una hormona del crecimiento humano o de CD59.

5. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tramo polipeptídico que permite el anclaje del BMP a la membrana celular está unido en su extremo C a un polipéptido que confiere resistencia de selección.

6. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el polipéptido que confiere resistencia de selección se selecciona del grupo que consiste en una enzima que hidroliza antibióticos, una proteína eliminadora de antibióticos, una enzima metabólica y una enzima modificadora de antibióticos.

7. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la enzima que hidroliza antibióticos se selecciona del grupo que consiste en una enzima que hidroliza puromicina, tal como puromicina N-acetil transferasa (PAC) y una enzima que hidroliza aminoglicósidos, tal como aminoglicósido 3'-fosfotransferasa; la proteína que elimina antibióticos es un producto génico Sh ble; y la enzima que modifica antibióticos es una higromicina quinasa.

8. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el péptido enlazador consiste en la secuencia de aminoácidos de isoleucina y prolina o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

9. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el tramo polipeptídico que permite el anclaje del BMP a la membrana celular se une al polipéptido que confiere resistencia de selección mediante un péptido enlazador.

10. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, que está operativamente unida a un promotor capaz de dirigir la transcripción de la molécula de ácido nucleico, preferiblemente el promotor hCMV, y está operativamente unida antes a una secuencia EMCV IRES.

11. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además cualquiera de las siguientes:

(i) secuencias de ácidos nucleicos que codifican el péptido portador sintético que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 unida directamente al péptido transmembranal que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, el péptido señal de CD59a que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y la PAC que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;

(ii) secuencias de ácidos nucleicos que codifican CD59a de ratón que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, y el péptido señal de CD59a que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;

(iii) secuencias de ácidos nucleicos que codifican el péptido portador sintético que tiene la secuencia

de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 unida directamente al péptido transmembranal que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y el péptido señal de CD59a que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; o

(iv) secuencias de ácidos nucleicos que codifican el péptido portador sintético que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 unida directamente al péptido de anclaje CD48-GPI que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y el péptido señal de CD59a que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

12. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la secuencia de ácidos nucleicos se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, SEQ Id NO: 10, SEQ ID NO: 11, y SEQ ID NO: 12.

13. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de interés (POI).

14. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la POI se caracteriza en que

(i) está operativamente unida antes a una secuencia EMCV IRES o después a un promotor capaz de dirigir la transcripción de la molécula de ácido nucleico, o ambas; o

(ii) es una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la POI que codifica para un único polipéptido; o

(iii) comprende dos secuencias de ácidos nucleicos que codifican la POI que codifican diferentes subunidades de una POI.

15. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 14, en donde las subunidades son las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo.

16. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

17. Un método para la selección de células eucarióticas que secretan una proteína de interés (POI), que comprende identificar las células que presentan BMP en su superficie celular, en donde el nivel de presentación de BMP en la superficie celular se correlaciona con la cantidad de la POI secretada, el método comprende las etapas de:

(a) transfectar células con un primer vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y un segundo vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la POI; o

con un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15,

estableciendo así un conjunto estable de células transfectadas con BMP;

(b) marcar las células transfectadas con BMP con un resto unido a biotina detectable; y

(c) identificar y aislar las células transfectadas marcadas con el resto unido a biotina detectable.

18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, que comprende además propagar las células aisladas y repetir las etapas (b) a (c).

19. El método de acuerdo con la reivindicación 18, que comprende además aislar una célula única marcada con un resto unido a biotina detectable y propagar la célula para formar un clon.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 19, que comprende además detectar y cuantificar la proteína de interés secretada, seleccionando así células eucarióticas que secretan una proteína de interés.

21. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde dichas células presentan BMP en su superficie celular.

22. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, en donde las células marcadas se identifican y aíslan por medio de un FACS o perlas magnéticas.

23. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, en donde las células eucarióticas seleccionadas presentan cantidades mayores de BMP en su superficie y secretan cantidades mayores de la proteína de interés que las células transfectadas del conjunto estable, preferiblemente en donde la cantidad de BMP en la superficie de las células eucarióticas seleccionadas y la cantidad de proteína de interés secretada por las células eucarióticas seleccionadas son mayores en al menos un factor seleccionado del grupo que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y hasta 30 veces más que las células transfectadas del conjunto estable.

Fig. 1

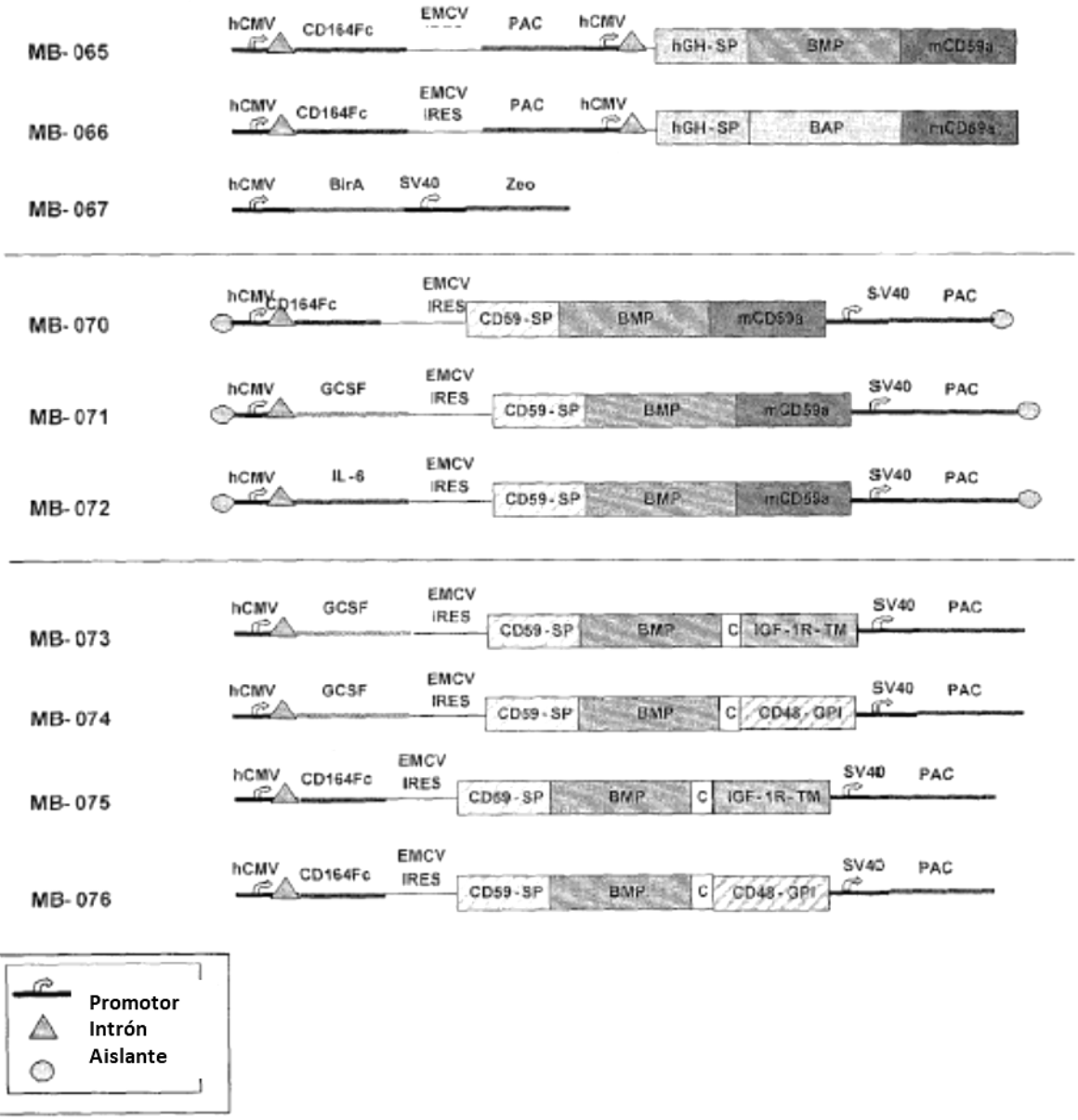

MB-065
hCMV
CD164Fc
EMCV
PAC
hCMV
hGH-SP
BMP
mCD59a
MB-066
hCMV
CD164Fc
EMCV
IRES
PAC
hCMV
hGH-SP
BAP
mCD59a
MB-067
hCMV
BirA
SV40
Zeo
MB-070
hCMV
CD164Fc
EMCV
IRES
CD59-SP
BMP
mCD59a
SV40
PAC
MB-071
hCMV
GCSF
EMCV
IRES
CD59-SP
BMP
mCD59a
SV40
PAC
MB-072
hCMV
IL-6
EMCV
IRES
CD59-SP
BMP
mCD59a
SV40
PAC
MB-073
hCMV
GCSF
EMCV
IRES
CD59-SP
BMP
C
IGF-1R-TM
SV40
PAC
MB-074
hCMV
GCSF
EMCV
IRES
CD59-SP
BMP
C
CD48-GPI
SV40
PAC
MB-075
hCMV
CD164Fc
EMCV
IRES
CD59-SP
BMP
C
IGF-1R-TM
SV40
PAC
MB-076
hCMV
CD164Fc
EMCV
IRES
CD59-SP
BMP
C
CD48-GPI
SV40
PAC
Promotor
Intrón
Aislante

Fig. 2A

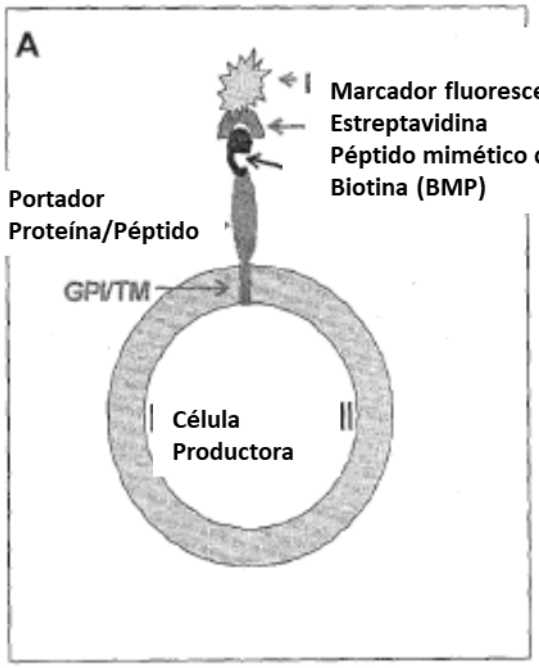


Fig. 2B

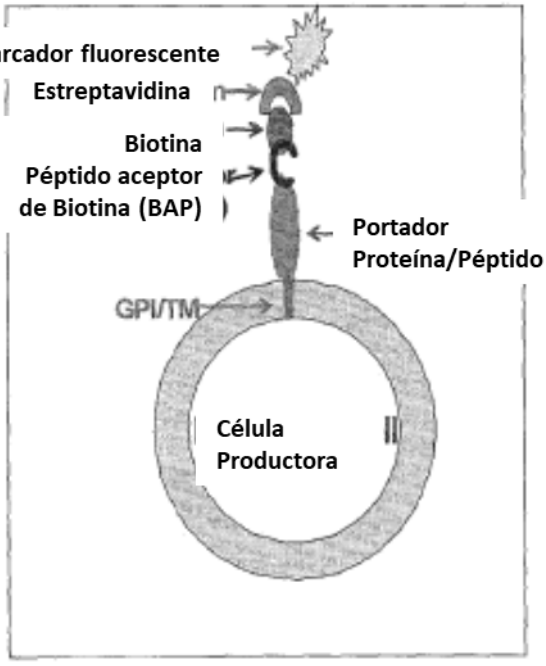


Fig. 2C

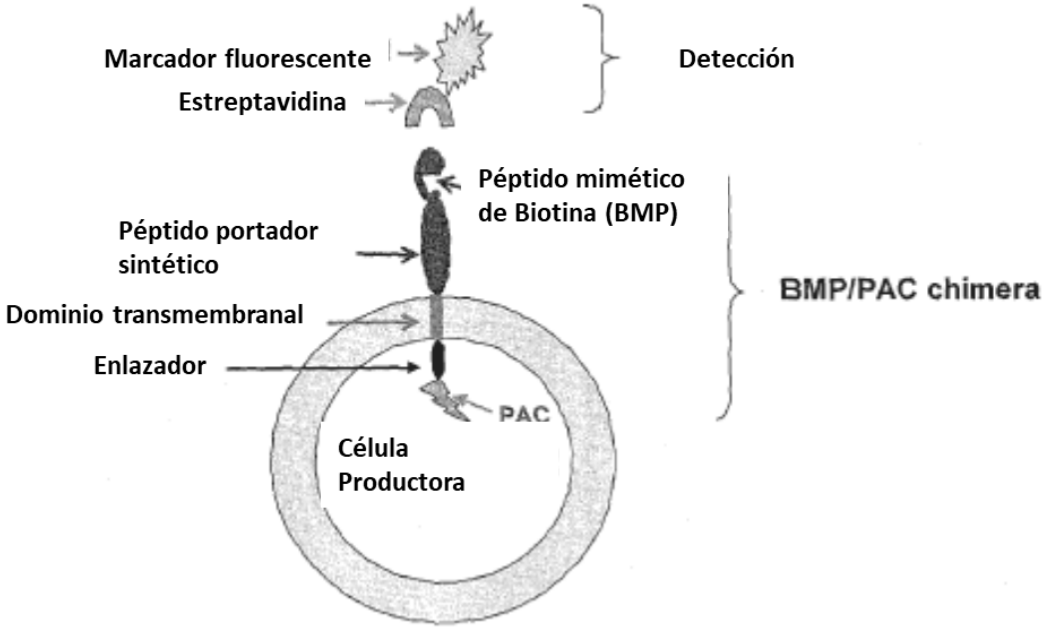


Fig. 3A

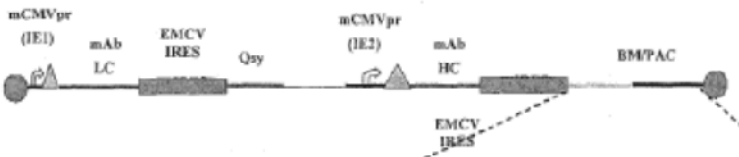


Fig. 3B

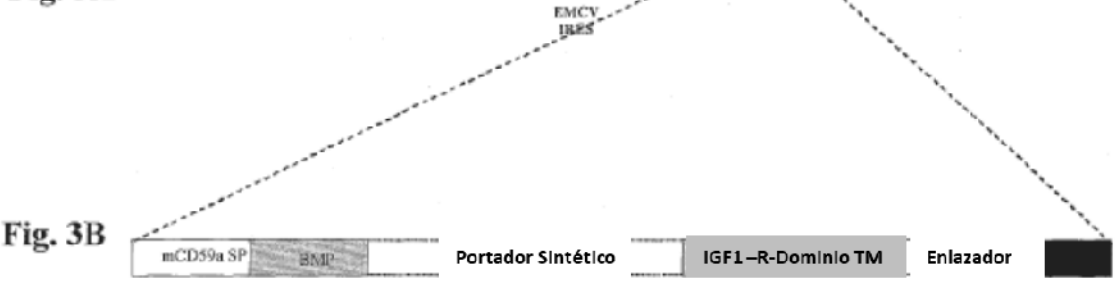


Fig. 4

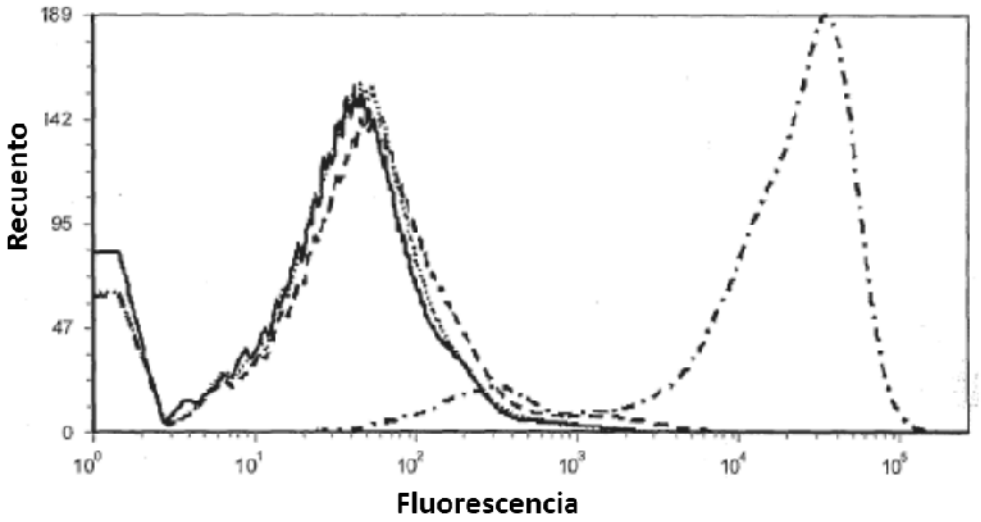


Fig. 5A

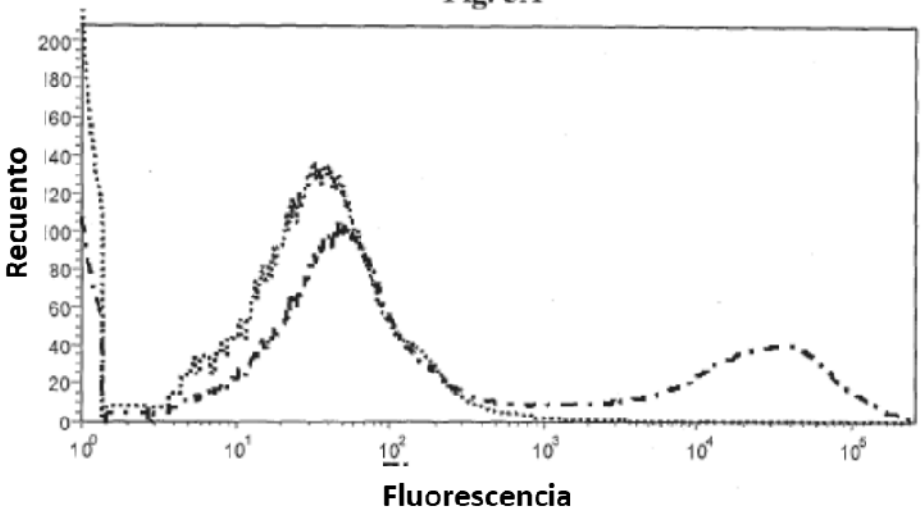

Recuento
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
Fluorescencia

Fig. 5B

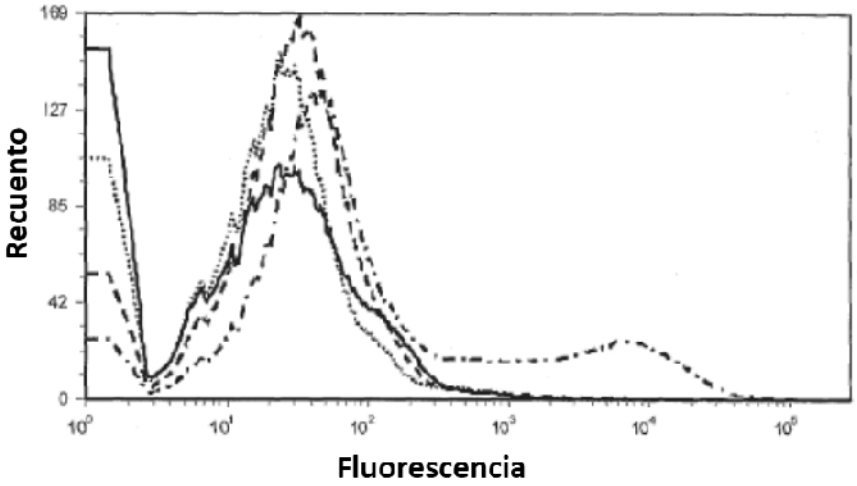

Recuento
169
127
85
42
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
Fluorescencia

Fig. 6A

Fig. 6B

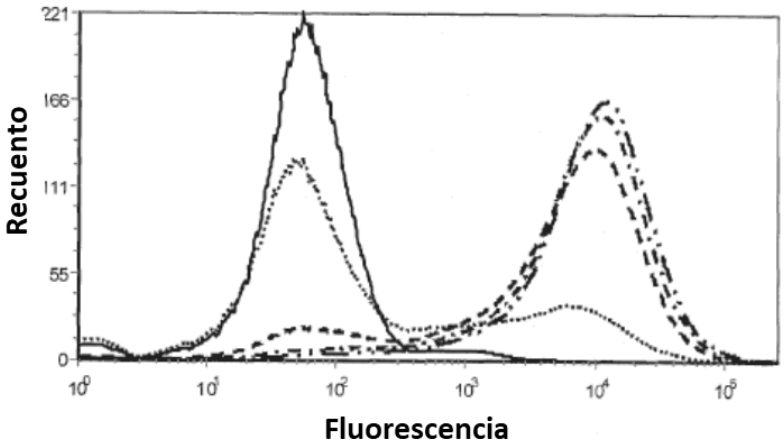


Fig. 6C

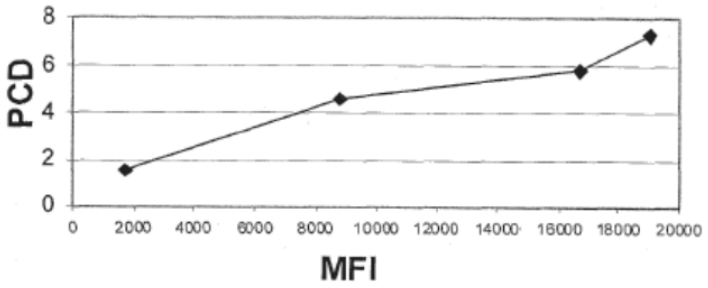


Fig. 7A

Fig. 7B

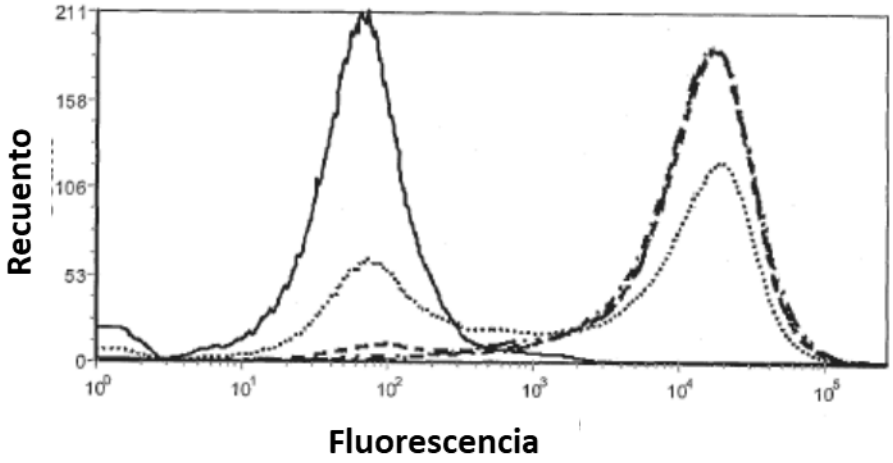


Fig. 7C

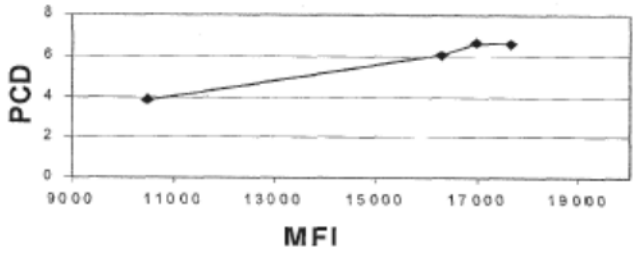


Fig. 8A

Fig. 8B

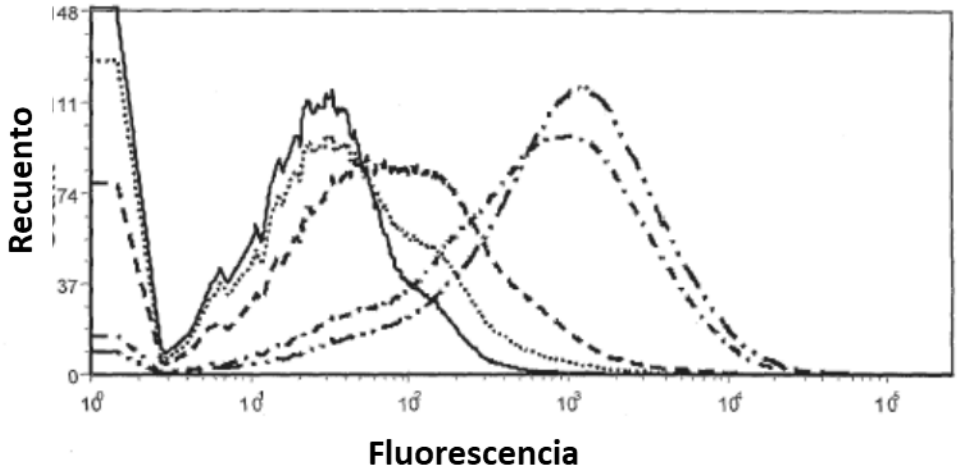


Fig. 8C

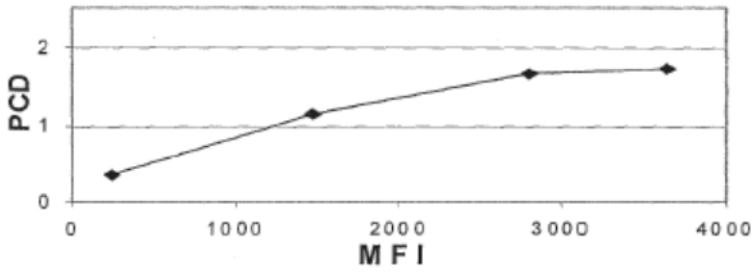


Fig. 9A

Fig. 9B

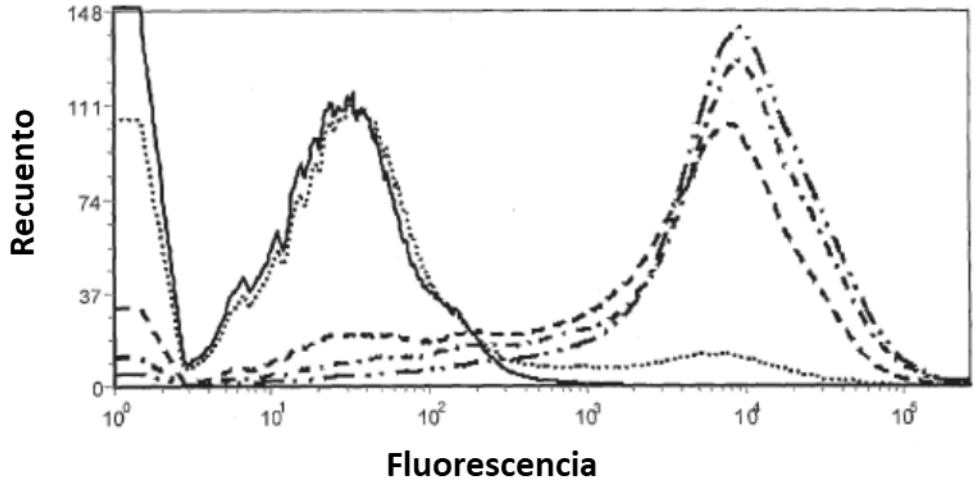


Fig. 9C

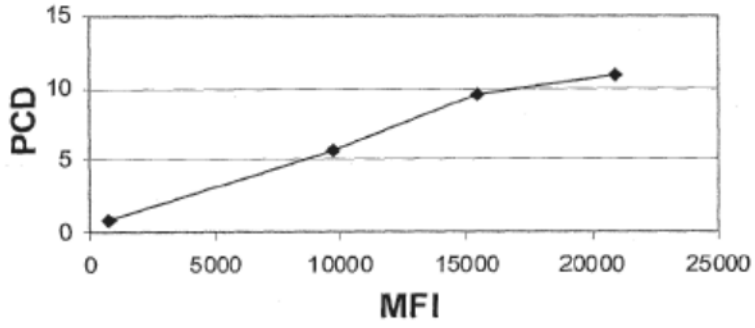


Fig. 10A

Fig. 10B

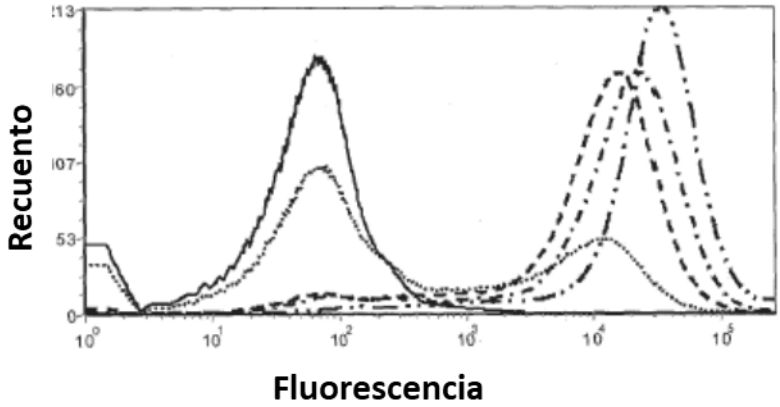


Fig. 10C

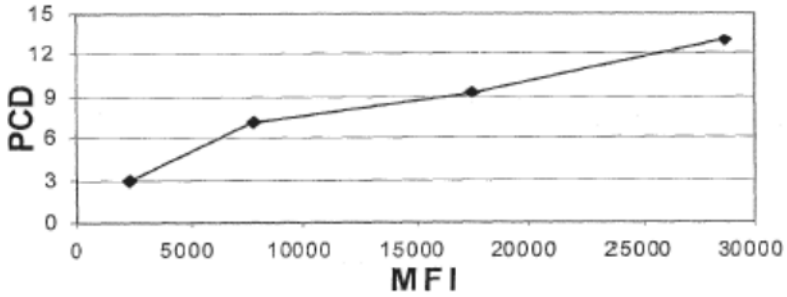


Fig. 11A

Fig. 11B

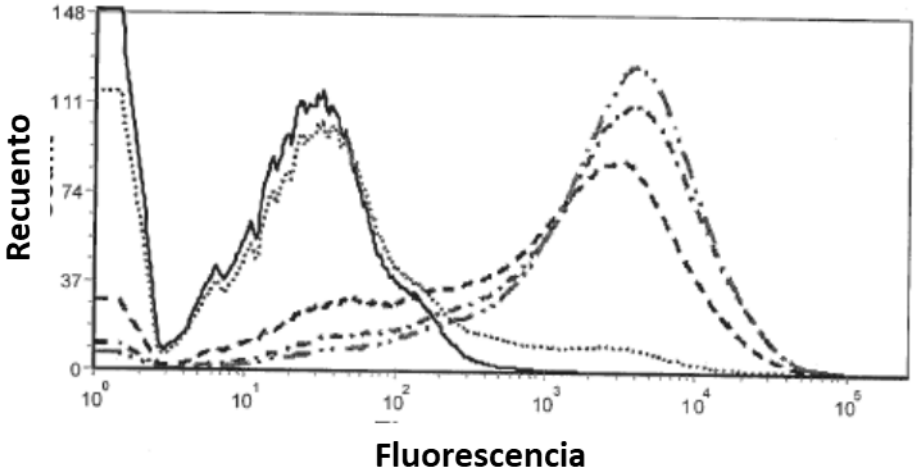


Fig. 11C

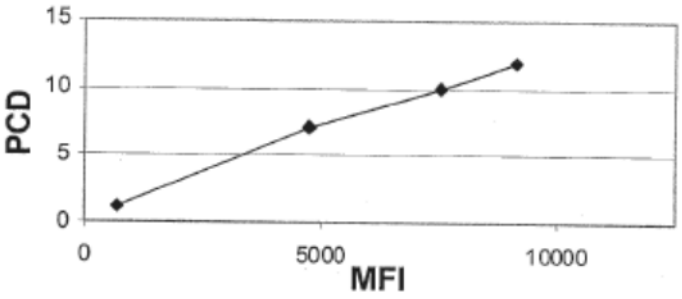


Fig. 12A

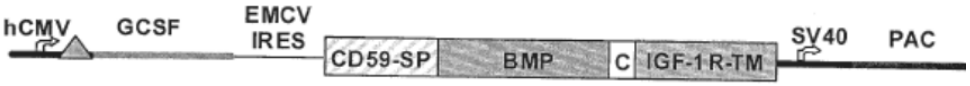


Fig. 12B

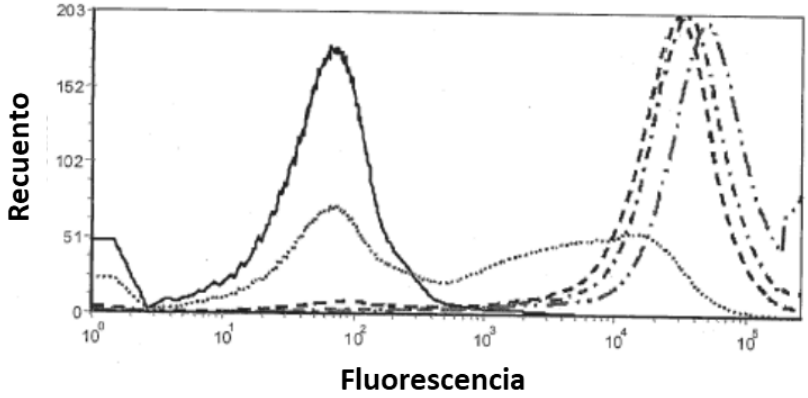


Fig. 12C

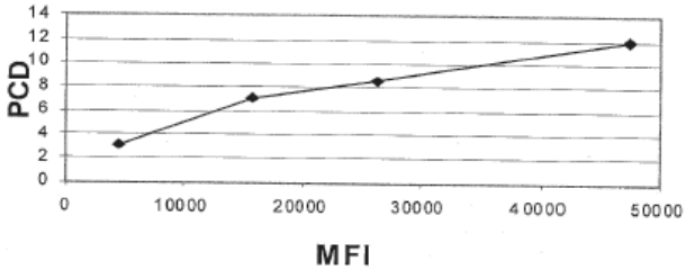


Fig. 13

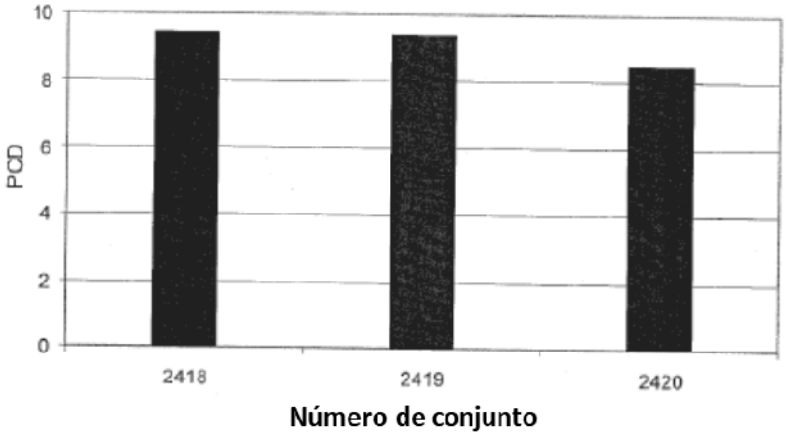

10
8
6
4
2
0
PCD
2418
2419
2420
Número de conjunto

Fig. 14

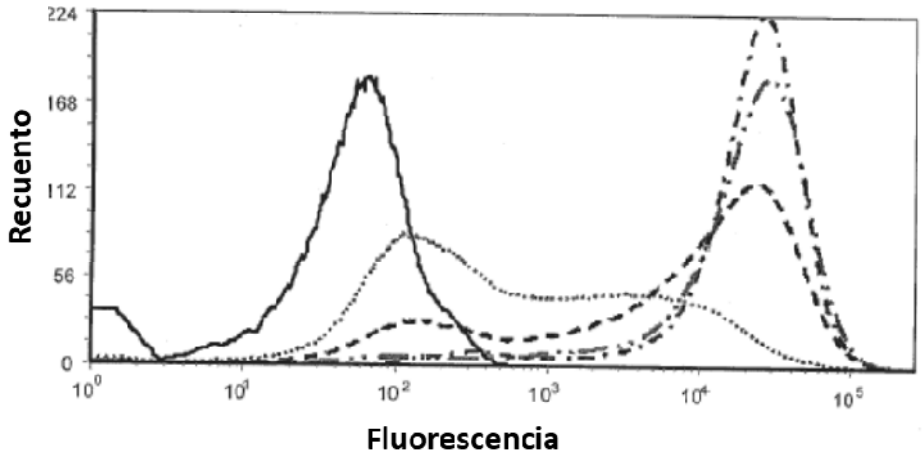

224
168
112
56
0
Recuento
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
Fluorescencia

Fig. 15

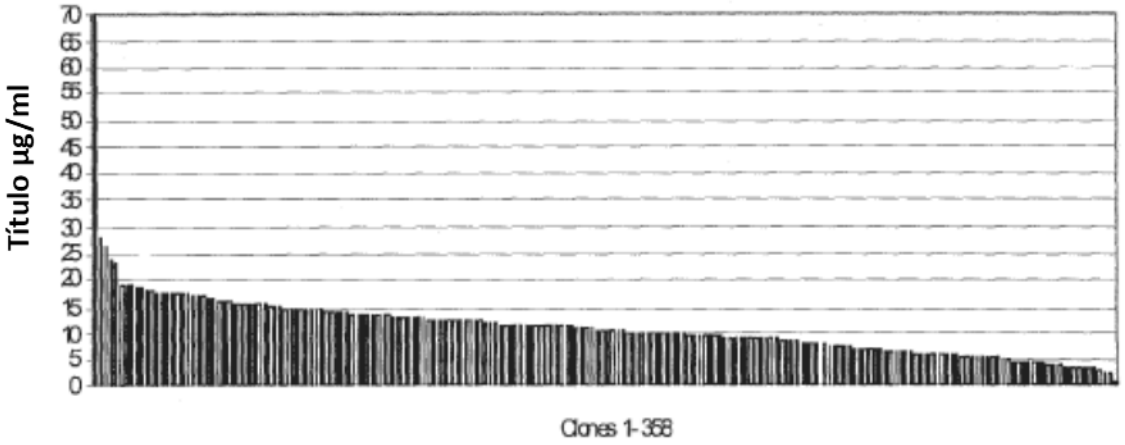

Título µg/ml
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Clones 1-368

Fig. 16

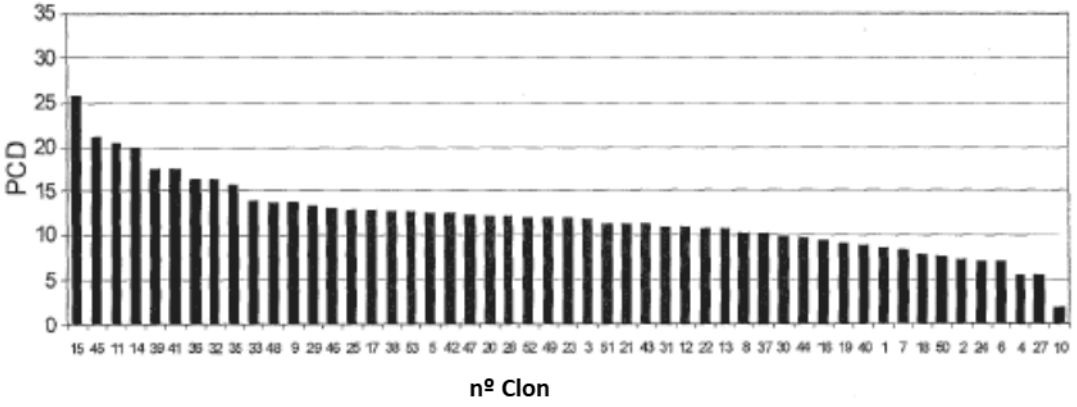

PCD
35
30
25
20
15
10
5
0
15 45 11 14 39 41 36 32 35 33 48 9 29 46 25 17 38 53 5 42 47 20 28 52 49 23 3 51 21 43 31 12 22 13 8 37 30 44 16 19 40 1 7 18 50 2 24 6 4 27 10
nº Clon

Fig. 17

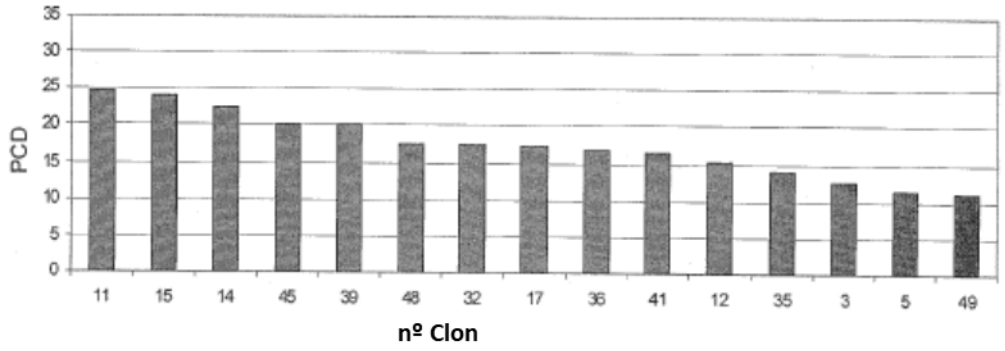
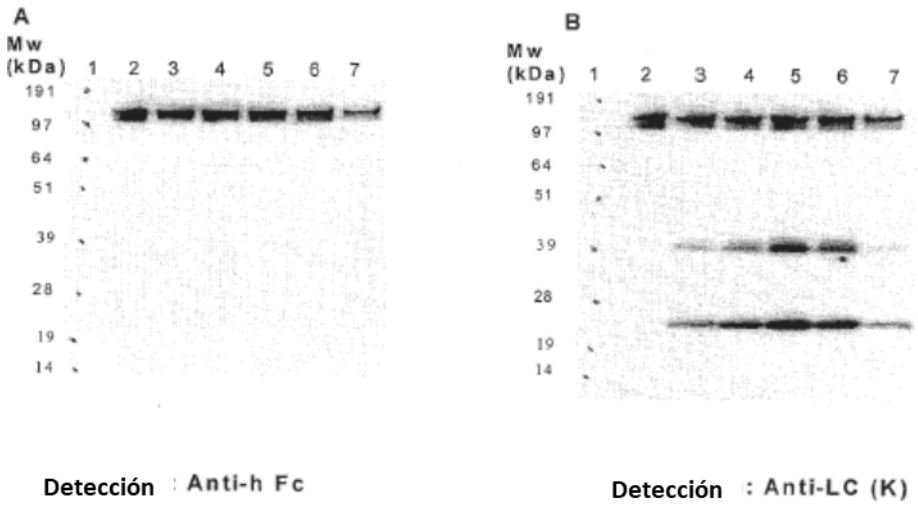

PCD
35
30
25
20
15
10
5
0
11
15
14
45
39
48
32
17
36
41
12
35
3
5
49
nº Clon

Fig. 18


A
Mw
(kDa)
1
2
3
4
5
6
7
191
97
64
51
39
28
19
14
Detección : Anti-h Fc
B
Mw
(kDa)
1
2
3
4
5
6
7
191
97
64
51
39
28
19
14
Detección : Anti-LC (K)