

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 136**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/65 (2006.01)

C12N 15/69 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.07.2014 PCT/IB2014/063517**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.02.2015 WO15015419**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2014 E 14753158 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 3027646**

54 Título: **Nuevos vectores de selección y métodos de selección de células hospedadoras eucariotas**

30 Prioridad:

31.07.2013 US 201361860439 P

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

08.11.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 689 136 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevos vectores de selección y métodos de selección de células hospedadoras eucariotas

Campo de la divulgación

5 La presente divulgación se refiere a un nuevo sistema de selección que se basa en el uso de un receptor de folato mutado como marcador seleccionable para la selección de células hospedadoras, en particular, células hospedadoras de mamífero, que expresan un polipéptido de interés. La invención proporciona vectores de expresión adecuados, células hospedadoras y métodos para la selección de células hospedadoras que expresan un polipéptido recombinante de interés con un alto rendimiento. Además, la presente invención se refiere a un método para producir de manera eficiente polipéptidos recombinantes con un alto rendimiento.

10 Antecedentes de la divulgación

15 La posibilidad de clonar y expresar los productos de interés tales como péptidos recombinantes y proteínas en grandes cantidades se ha vuelto cada vez más importante. La capacidad de purificar altos niveles de proteínas es importante en la industria farmacéutica humana y en el campo de la biotecnología, por ejemplo, para la producción de productos farmacéuticos de proteínas, así como en el ámbito básico de la investigación, por ejemplo, para la cristalización de proteínas para permitir la determinación de su estructura tridimensional. Las proteínas que, de otro modo, son difíciles de obtener en cantidad pueden sobreexpresarse en una célula hospedadora y, posteriormente, aislarse y purificarse.

20 La elección de un sistema de expresión para la producción de proteínas recombinantes depende de muchos factores, incluyendo las características de crecimiento celular, los niveles de expresión, la expresión intracelular y extracelular, las modificaciones posteriores a la traducción y la actividad biológica de la proteína de interés, así como temas regulatorios y consideraciones económicas en la producción de proteínas terapéuticas. Las principales ventajas de las células de mamífero frente a otros sistemas de expresión tales como bacterias o levaduras son la capacidad para llevar a cabo el plegamiento apropiado de la proteína, *N*-glicosilación compleja y *O*-glicosilación auténtica, así como un amplio espectro de otras modificaciones posteriores a la traducción. Debido a las ventajas
25 descritas, las células eucariotas y, en particular las células mamíferas son actualmente el sistema de expresión de elección para la producción de proteínas terapéuticas complejas tales como anticuerpos monoclonales.

30 El enfoque más común para obtener células hospedadoras de alta expresión (también llamadas altos productores) genera un vector de expresión apropiado para expresar el polipéptido de interés como un primer paso. El vector de expresión promueve la expresión del polinucleótido que codifica el polipéptido de interés en la célula hospedadora y proporciona al menos un marcador seleccionable para la generación de la estirpe celular recombinante.

35 Un procedimiento establecido para la obtención de estirpes celulares de alta producción que expresan el polipéptido de interés con alto rendimiento es la transfección estable de las células hospedadoras. El polipéptido de interés se secreta luego en el medio de cultivo y se puede obtener en grandes cantidades a partir del mismo. Sin embargo, la integración estable en el genoma es un evento raro y solo un pequeño subconjunto de células transfectadas de forma estable son altos productores.

40 Los marcadores seleccionables y sistemas de selección se usan ampliamente con el fin de obtener células hospedadoras que expresen un polipéptido de interés con alto rendimiento. Los sistemas respectivos también son útiles para generar e identificar clones transfectados de manera estable. El objetivo principal de usar respectivos marcadores seleccionables y sistemas de selección es introducir un gen seleccionable que, tras la exposición a condiciones de crecimiento selectivas, permita la identificación de células capaces de la producción de alto nivel de los productos recombinantes de interés. Los marcadores de selección establecidos incluyen, por ejemplo, la dihidrofolato reductasa (DHFR) o la glutamina sintetasa (GS).

45 Otro sistema de selección se basa en el sistema de selección por medio del transportador de folato reducido. El vehículo de folato reducido (RFC) es una glicoproteína de membrana expresada de forma ubicua que sirve como el principal transportador para la absorción de folatos reducidos, tales como 5-metil-THF y 5-formil-THF. Sin embargo, el RFC muestra una muy baja afinidad por el folato oxidado, el ácido fólico. Por lo tanto, las células en las que hay ausencia de expresión de RFC o han sido eliminadas en el locus genómico de RFC pueden servir como receptores para la transfección del marcador seleccionable gen RFC bajo condiciones en las que los folatos reducidos tales 5-formil-THF son privados gradualmente del medio de crecimiento forzando de este modo a las células a expresar
50 mayores niveles de este transportador de folato. Hay varias desventajas para el sistema de selección RFC: a) Se deben usar células receptoras nulas para RFC, en las que el locus RFC endógeno ha sido desactivado o inactivado por bloqueo de genes dirigido o por mutaciones de pérdida de función. b) El RFC tiene una afinidad de transporte extremadamente pobre para el ácido fólico y, por lo tanto, este folato oxidado no se puede usar para la selección. c) A diferencia del sistema basado en receptores de folato (véase más abajo), que es un sistema de absorción del

folato unidireccional, el RFC es un transportador de folato bidireccional que exhibe importación y exportación igualmente potente de folatos. Esto implica que, en condiciones de privación de folato, la sobreexpresión de RFC puede ser perjudicial para las células receptoras que exportan además folato a través del RFC sobreexpresado.

5 Un sistema de selección adicional que se propuso recientemente se basa en el uso de un receptor de folato tal como el receptor de folato alfa como marcador seleccionable. Este sistema se describe en el documento WO2009/080759. Este sistema tiene varias ventajas puesto que, para la selección, no se necesitan sustancias tóxicas y, además, el receptor de folato endógeno de la célula hospedadora no tiene que ser desactivado. Un sistema de selección adicional que se basa en el uso del receptor de folato como marcador seleccionable se describe en el documento WO 2010/097240.

10 Los receptores de folato y mutantes de los mismos se describen, por ejemplo, en Shen *et al* "Identification of amino acid residues that determine the differential ligand specificities of folate receptors alpha and beta" (*Biochemistry* 1997, 36, 6157-6163). También se describen mutaciones en el receptor de folato alfa asociadas con trastornos médicos. También se analizaron las posiciones de aminoácidos en los receptores de folato en Ramamoorthy *et al.*, "In silico analysis of functionally important residues in folate receptors" (*Bioinformation* 2 (4): 157-162 (2007)).

15 En Maziarz *et al.*, "Complete mapping of divergent amino acids responsible for differential ligand binding of folate receptors α and β " (*Journal of Biological Chemistry* 274 (16):11086-11091 (1999)), se proporciona una cartografía de los aminoácidos divergentes responsables de la unión a ligandos diferencial de los receptores de folato α y β .

20 Un sistema de selección de alto rigor es crucial para seleccionar y así enriquecer a las células con alta producción de la población transfectada. Cuanto mayor sea la rigurosidad del sistema de selección, menor será el número de bajos productores después del proceso de selección y mayor será la probabilidad de encontrar los clones de sobreproducción muy raros. Además, hay una gran necesidad de proporcionar un sistema de selección que permita obtener los clones de alta producción más rápidamente que los métodos de la técnica anterior.

25 El objetivo de la presente invención es proporcionar un sistema de selección riguroso para la selección de células hospedadoras que produzcan un polipéptido de interés con alto rendimiento, así como vectores de expresión adecuados y células hospedadoras. En particular, el objetivo de la presente invención es proporcionar un nuevo sistema de selección que tenga ciertas ventajas frente a los sistemas de selección de la técnica anterior mencionados anteriormente.

Sumario de la divulgación

La presente invención se puede definir por las reivindicaciones adjuntas.

30 Por consiguiente, la presente invención proporciona un vector de expresión o una combinación de al menos dos vectores de expresión que comprenden:

35 a) un polinucleótido que codifica un receptor de folato mutado como marcador seleccionable, en el que el receptor de folato mutado es un receptor de folato unido a membrana funcional que tiene una disminución de la afinidad de unión al folato en comparación con el receptor de folato de tipo silvestre, en el que el receptor de folato mutado codificado es un receptor de folato mutado alfa que comprende una sustitución de alanina a leucina en la posición estructuralmente correspondiente o por homología de la secuencia de aminoácidos al aminoácido 49 de la secuencia del receptor de folato humano alfa de tipo silvestre maduro mostrada como SEQ ID NO: 1; y

b) al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés,

40 en el que cuando dicho vector de expresión o combinación de al menos dos vectores de expresión se introduce en una célula hospedadora, el polipéptido de interés es secretado por dicha célula hospedadora.

45 Por consiguiente, la presente invención proporciona además una célula hospedadora cuya viabilidad depende de la absorción del folato de acuerdo con la reivindicación 9, un método para producir una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 13, un proceso para producir un polipéptido de interés de acuerdo con la reivindicación 17 y el uso de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 18.

50 La presente divulgación se refiere a un sistema de selección que es adecuado para seleccionar células hospedadoras que expresan un polipéptido de interés con un alto rendimiento. Dicho sistema de selección se basa en el uso de un receptor de folato unido a una membrana funcional mutado como un marcador seleccionable. Entre otras cosas, dicho sistema de selección permite una selección más rigurosa y rápida de altos productores que un sistema de selección que usa un receptor de folato unido a una membrana funcional de tipo silvestre correspondiente como un marcador seleccionable.

Se desvelan los siguientes aspectos: De acuerdo con un primer aspecto, la presente divulgación proporciona un vector de expresión o una combinación de al menos dos vectores de expresión que comprenden:

- 5 a) un polinucleótido que codifica un receptor de folato mutado como marcador seleccionable, en el que el receptor de folato mutado tiene una disminución de la afinidad de unión al folato en comparación con el receptor de folato de tipo silvestre; y
- b) al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés,

en el que cuando dicho vector de expresión o combinación de al menos dos vectores de expresión se introduce en una célula hospedadora, el polipéptido de interés es secretado por dicha célula hospedadora.

10 De acuerdo con un segundo aspecto, la presente divulgación se refiere a una célula hospedadora cuya viabilidad depende de la absorción del folato, que comprende:

- a) un polinucleótido introducido que codifica un receptor de folato mutado que tiene una disminución de la afinidad de unión al folato en comparación con el receptor de folato de tipo silvestre como marcador seleccionable;
- b) al menos un polinucleótido introducido que codifica un polipéptido de interés,

15 en el que dicho polipéptido de interés es secretado por dicha célula hospedadora.

De acuerdo con un tercer aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para producir una célula hospedadora de acuerdo con el segundo aspecto de la presente divulgación, que comprende la etapa de introducir en una célula hospedadora cuya viabilidad depende de la absorción del folato al menos

- 20 a) un polinucleótido que codifica un receptor de folato mutado que tiene una disminución de la afinidad de unión al folato en comparación con el receptor de folato de tipo silvestre como marcador seleccionable; y
- b) al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés, en el que el polipéptido de interés es secretado por dicha célula hospedadora.

De acuerdo con un cuarto aspecto, la presente divulgación proporciona un método para seleccionar al menos una célula hospedadora capaz de expresar un polipéptido de interés, que comprende:

- 25 a) proporcionar una pluralidad de células hospedadoras de acuerdo con el segundo aspecto;
- b) cultivar dicha pluralidad de células hospedadoras en un medio de cultivo selectivo que comprende folato en una concentración limitante; y
- c) obtener al menos una célula hospedadora que exprese el polipéptido de interés.

30 De acuerdo con un quinto aspecto, la presente divulgación se refiere a un proceso para producir un polipéptido de interés, que comprende:

- a) cultivar una célula hospedadora de acuerdo con el segundo aspecto y/o una célula hospedadora seleccionada de acuerdo con el cuarto aspecto bajo condiciones que permitan la expresión y secreción del polipéptido de interés;
- 35 b) aislar el polipéptido de interés a partir del medio de cultivo celular; y
- c) opcionalmente, procesar además el polipéptido aislado de interés.

De acuerdo con un sexto aspecto, la presente divulgación se refiere al uso de un polinucleótido que codifica:

- a) un receptor de folato mutado que comprende la siguiente secuencia:

IAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEXaaHKDVSYLYR
FNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERVNLVPLCKEDCEQW
WEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTHSYKVS
NYSRGSGRCIQMWFDPAAQGNPNEEVARFYA (SEQ ID NO 9)

en la que Xaa no es alanina y en la que la afinidad de unión a folato del receptor de folato mutado se reduce en comparación con el correspondiente receptor de folato de tipo silvestre en el que Xaa es alanina (SEQ ID NO 1),
o

5 b) un receptor de folato mutado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % con la secuencia mostrada como SEQ ID NO 9, y en la que Xaa no es alanina en dicho receptor de folato mutado y en la que la afinidad de unión a folato de dicho receptor de folato mutado se reduce en comparación con la secuencia del receptor de folato humano maduro alfa de tipo silvestre, en la que Xaa es alanina (véase SEQ ID NO 1),

10 como marcador seleccionable para la selección de células, cuya viabilidad es dependiente de la absorción del folato.

De acuerdo con un séptimo aspecto, la presente divulgación se refiere al uso de un polinucleótido que codifica:

a) un receptor de folato mutado que comprende la siguiente secuencia:

IAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEXaaHKDVSYL
YR
FNWNHCGEMAPACKRHFQDTCLYECSPNLGPWQQVDQSWRKERVNLVPLCKEDCEQW
WEDCRTSYTCKSNWHKGNWWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTSHSYKVS
N
YSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYA (SEQ ID NO 9)

15 en la que Xaa es leucina;
o

b) un receptor de folato mutado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % con la secuencia mostrada como SEQ ID NO 9 y en la que Xaa es leucina en dicho receptor de folato mutado de acuerdo con b);

20 como marcador seleccionable para la selección de células, cuya viabilidad es dependiente de la absorción del folato.

Como se muestra por los ejemplos, un receptor de folato mutado respectivo es un marcador seleccionable muy eficiente y riguroso, que también permite seleccionar células hospedadoras que expresan el marcador seleccionable respectivo más rápidamente que el receptor de folato de tipo silvestre.

25 Otros objetos, características, ventajas y aspectos de la presente solicitud se harán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción y reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

30 Las figuras 1 a 5 muestran las productividades de anticuerpos de clones celulares individuales que se obtuvieron por dilución limitante de las combinaciones de células policlonales que fueron previamente transfectadas con diferentes vectores de expresión y se obtuvieron usando diferentes condiciones de selección. Por lo tanto, se muestra la productividad de los clones obtenidos después de la selección. Para la clonación de una sola célula, las células fueron ya sea cultivadas en medio completo (con lo cual no se mantiene la presión de selección después de la selección) o en medio de selección (manteniendo así la presión de selección después de la selección).

Fig. 1: Clonación de una sola célula de transfectantes con V-DHFRref después de la selección (MTX 125 nM)

Fig. 2: Clonación de una sola célula de transfectantes con V-DHFRref después de la selección (MTX 250 nM)

35 **Fig. 3:** Clonación de una sola célula de transfectantes con V-wtFRalpha después de la selección (FA 15 nM)

Fig. 4: Clonación de una sola célula de transfectantes con V-mutFRalpha (5 nM). Como puede verse, se obtuvieron más clones celulares de alta expresión cuando se usó el receptor de folato mutado como marcador seleccionable en comparación con cuando se usó el receptor de folato de tipo silvestre como marcador seleccionable. Además, la tasa de expresión fue mayor que la observada con la selección que usó DHFR como marcador seleccionable.

40 **Fig. 5:** Clonación de una sola célula de la población de V-mutFRalpha / V-DHFRref cotransfectada (ácido fólico 50 nM (FA)/MTX 50 nM). Como puede verse, se obtuvieron significativamente más clones celulares y de mayor

expresión cuando se usó dicha estrategia de coselección.

Descripción detallada de la divulgación

La invención se puede definir por las reivindicaciones adjuntas.

Se encontró sorprendentemente que un sistema de selección que se basa en el uso de un receptor de folato como marcador seleccionable puede mejorarse considerablemente mediante el uso de una forma mutada de un receptor de folato. El marcador seleccionable mutado se puede usar como marcador seleccionable dominante para seleccionar células eucariotas, tales como células de mamífero. Dicho mutante tiene una afinidad de unión modulada a folato en comparación con el receptor de folato de tipo silvestre correspondiente. Se encontró que un receptor de folato mutado que tiene una disminución de la afinidad de unión al folato en comparación con el receptor de folato de tipo silvestre correspondiente tiene ventajas importantes como marcador seleccionable.

El novedoso sistema se puede usar para la selección acelerada, la detección y el establecimiento de clones celulares eucariotas, en particular, mamíferos, que expresen de manera estable y secreten polipéptidos recombinantes con altos rendimientos. La selección puede realizarse usando un medio de cultivo que comprenda una concentración limitante de folato, en particular, una concentración limitante de ácido fólico. El sistema de selección novedoso muestra, además de las ventajas generales que están asociadas con el uso de un receptor de folato como marcador seleccionable, varias ventajas importantes frente a los sistemas de selección disponibles en la técnica anterior y también frente al uso del receptor de folato de tipo silvestre como marcador seleccionable como será se explica a continuación.

1. Características mejoradas de rapidez y crecimiento. Como se muestra en los ejemplos, el uso de un receptor de folato mutante como marcador seleccionable permite una selección considerablemente más rápida en comparación con los sistemas de selección convencionales que se basan, por ejemplo, en el uso de DHFR como marcador seleccionable. Además, el sistema de selección de acuerdo con la presente divulgación es también más rápido que un sistema de selección que se basa en el uso del receptor de folato de tipo silvestre como marcador seleccionable. En particular, en comparación con el uso del receptor de folato de tipo silvestre como marcador seleccionable, las células que han incorporado el receptor de folato mutado de acuerdo con la presente divulgación como marcador seleccionable se dividen y recuperan más rápido cuando se cultivan en un medio de cultivo selectivo que comprende concentraciones de ácido fólico muy bajas. Esta rapidez lograda es una ventaja considerable que reduce la duración de un ciclo de selección. Una respectiva ventaja de crecimiento se observa incluso si se usan condiciones de selección muy estrictas y, por consiguiente, concentraciones de ácido fólico altamente limitantes en el medio de cultivo selectivo que incluso perjudican el crecimiento de células que fueron transfectadas con el receptor de folato de tipo silvestre como marcador seleccionable. Por lo tanto, se pueden usar condiciones de selección más rigurosas cuando se usa el receptor de folato mutado de acuerdo con la divulgación como marcador seleccionable. Esta ventaja del receptor de folato mutado de acuerdo con la presente divulgación frente al receptor de folato de tipo silvestre fue completamente inesperada. El folato tal como, preferentemente, el ácido fólico debe estar presente en el medio de cultivo y debe ser incorporado de manera eficiente en las células hospedadoras con el fin de sostener el crecimiento celular, la biosíntesis de nucleótidos de purina y pirimidina, la replicación del ADN y, por lo tanto, la proliferación celular. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se esperaba que las células transfectadas con un receptor de folato mutado que tienen una afinidad de unión a folato disminuida, no tengan una ventaja de crecimiento en comparación con las células que son transfectadas con el receptor de folato de tipo silvestre. Incluso se supone que las células transfectadas con dicho receptor de folato mutante como marcador seleccionable no podrían incluso tener una ventaja de crecimiento en comparación con las células no transfectadas que expresan endógenamente el receptor de folato de tipo silvestre que tienen la afinidad de unión completa a folato. Esto particularmente, tal como se sabía que la expresión del receptor de folato endógeno aumenta si las células no transfectadas se cultivan en un medio de cultivo que comprende una concentración limitante de folato (véase Zhu *et al.*, *Journal of Cellular Biochemistry* 81:205-219 (2001)). Por lo tanto, fue muy sorprendente cuando los inventores encontraron que un receptor de folato mutado que tiene una afinidad de unión disminuida de folato proporciona un marcador seleccionable eficiente que es incluso superior al receptor de folato de tipo silvestre.

2. Rigurosidad y productividad mejoradas. Las células que han incorporado el receptor de folato mutado de acuerdo con la presente divulgación como marcador seleccionable sorprendentemente toleran concentraciones de folato inferiores en el medio de cultivo selectivo que las células que comprenden el receptor de folato de tipo silvestre como marcador seleccionable. Esto permite usar condiciones de selección más estrictas. Por lo tanto, las células que tienen una alta tasa de productividad se pueden obtener más rápido cuando se usa el nuevo marcador seleccionable descrito en el presente documento. Esto fue completamente inesperado teniendo en cuenta el hecho de que la afinidad de unión a folato del receptor de folato mutado de acuerdo con la presente divulgación se disminuye en comparación con el tipo silvestre.

3. Fiabilidad mejorada. Se observa una dependencia lineal con la dosis de concentración de folato en el medio de cultivo cuando se usa el receptor de folato mutado de acuerdo con la presente divulgación como un marcador

seleccionable. Cuanto menor sea la concentración de folato en el medio de selección, mayor es la productividad resultante de las células seleccionadas. No se observa una dependencia respectiva de la misma manera cuando se usa el receptor de folato de tipo silvestre como marcador seleccionable. Esta dependencia lineal con la dosis facilita un control más fiable y la optimización de las condiciones de selección. Este hallazgo también fue completamente inesperado.

Por lo tanto, la selección novedosa basada en folato descrita en el presente documento que se basa en el uso de un receptor de folato mutado como marcador seleccionable que se ha comparado con el correspondiente receptor de folato de tipo silvestre en la que la afinidad de unión disminuida de folato es una excelente estrategia que está bien adaptada para la selección acelerada de células estables que expresan un polipéptido recombinante de interés con alto rendimiento. Los resultados beneficiosos descritos en el presente documento pueden lograrse a bajas concentraciones de folato en el medio de cultivo celular, e incluso en ausencia de una selección de fármaco citotóxico como se usa rutinariamente en otros diversos sistemas de selección.

Vector de expresión y combinación de vectores de expresión

De acuerdo con un primer aspecto, la presente divulgación proporciona un vector de expresión o una combinación de al menos dos vectores de expresión que comprenden:

a) un polinucleótido que codifica un receptor de folato mutado como marcador seleccionable, en el que el receptor de folato mutado tiene una disminución de la afinidad de unión al folato en comparación con el receptor de folato de tipo silvestre; y

b) al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés,

en el que cuando dicho vector de expresión o combinación de al menos dos vectores de expresión se introduce en una célula hospedadora, el polipéptido de interés es secretado por dicha célula hospedadora.

Un "vector" de acuerdo con la presente divulgación, en particular, se refiere a un polinucleótido capaz de transportar al menos un fragmento de polinucleótido. Un vector funciona como un vehículo molecular que entrega polinucleótidos en una célula hospedadora. Un vector de expresión puede comprender al menos un casete de expresión que comprenda secuencias reguladoras para la expresión adecuada de un polinucleótido incorporado en el mismo. Los polinucleótidos (por ejemplo, que codifican el polipéptido de interés o un marcador seleccionable) que se introducirán en la célula se pueden insertar en el/los casete/s de expresión del vector con el fin de ser expresados a partir del mismo. Cuando se introduce en una célula hospedadora, un casete de expresión, entre otras cosas, es capaz de dirigir la maquinaria celular para transcribir un polinucleótido incorporado que codifica un polipéptido de interés en ARN, que es entonces, por lo general, procesado adicionalmente, y finalmente traducido en el polipéptido de interés. El vector puede estar presente en forma circular o lineal(izada). El término "vector" también comprende cromosomas artificiales, vectores víricos o polinucleótidos respectivos similares que permitan la transferencia de fragmentos de ácido nucleico foráneo.

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

Posteriormente, se describen realizaciones del vector de expresión y la combinación de al menos dos vectores de expresión de acuerdo con la presente divulgación. El polinucleótido que codifica el receptor de folato mutado y el polinucleótido que codifica un polipéptido de interés pueden estar ubicados en el mismo vector de expresión o en vectores de expresión separados si se usa una combinación de al menos dos vectores de expresión. Si se usa una combinación de al menos dos vectores de expresión, en la que un vector de expresión comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido de interés y el otro vector de expresión comprende el polinucleótido que codifica el receptor de folato mutado, dicha combinación es cotransfectada en las mismas células hospedadoras para permitir la selección. Respectivas estrategias de cotransfección son bien conocidas por el experto y también se describen en los ejemplos. Posteriormente, se describen realizaciones y ventajas específicas predominantemente en conjunción con la realización en la que ambos polinucleótidos se encuentran en el mismo vector de expresión. Sin embargo, dicha divulgación mutatis mutandis que aplica a la realización, en la que se usa una combinación de al menos dos vectores de expresión que son cotransfectados en las células. Cuando sea apropiado, se describen ventajas asociadas con el vector de expresión o combinación de al menos dos vectores de expresión en conjunción con el uso de dicho/s vector/es de expresión para la selección de células hospedadoras que expresan el polipéptido de interés con alto rendimiento.

Receptor de folato mutado

Un "receptor de folato", como se usa en el presente documento, se refiere a un receptor que es funcional y, por lo

tanto, capaz de importar o absorber un folato o derivado del mismo en una célula eucariota, en particular, una célula de mamífero. Preferentemente, el receptor de folato es capaz de la importación o absorción unidireccional de folato o derivado del mismo en una célula hospedadora eucariota, en particular, una célula de mamífero. Además, un receptor de folato como se usa en el presente documento está unido a membrana. Por lo tanto, los receptores de folato descritos en el presente documento son receptores de folato funcionales unidos a membrana. Esto se aplica al receptor de folato mutado, así como al receptor de folato de tipo silvestre. El anclaje a la membrana puede lograrse, por ejemplo, mediante un anclaje de transmembrana o un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Se prefiere un anclaje GPI, ya que se corresponde con el entorno natural de un receptor de folato. Los receptores de folato (FR) son glicoproteínas de unión a folato de alta afinidad. Están codificados por tres genes distintos FR alfa, FR beta y FR gamma. FR alfa también se conoce como la Proteína de Unión a Folato Adulta o FDP, como Receptor de Folato 1 o FOLR (en ratones folbp1), y como Antígeno Asociado a Cáncer de Ovario. FR beta también se conoce como FOLR2 (fetal) y como FBP / PL-1 (placenta). FR gamma también se conoce como FOLR3 y como FR-G (revisado por M. D Salazar y M. Ratnam, *Cancer Metastasis Rev.* 2007 26(1), pág.141-152). Los FR maduros, que están bien caracterizados, son proteínas homólogas con ~70-80 % de identidad de aminoácidos, y contienen 229 a 236 aminoácidos, así como de dos a tres sitios de N-glicosilación. FR alfa y beta FR son proteínas unidas a membrana. FR alfa y FR beta son glicoproteínas de superficie celular ancladas a GPI, mientras que FR gamma carece de un anclaje de GPI y es una proteína secretada. Sin embargo, se puede alterar genéticamente para incluir un dominio de transmembrana o un anclaje GPI. Dicha forma alterada de un FR gamma que incluye un anclaje a membrana también se considera como receptor de folato de tipo silvestre si es capaz de la importación o absorción de un folato o derivado del mismo en una célula eucariota tal como se ha descrito anteriormente. FR alfa y FR beta muestran una alta afinidad por el ácido fólico (Kd = 0,1-1 nM), ácido 5,10-didesazatetrahidrofólico (DDATHF; lometrexol; Ki = 0,4 a 1,3 nM usando ácido fólico³H] como un sustrato) y BGC945 (que es un inhibidor de la timidilato sintasa basado en ciclopenta[g]quinazolina transportado específicamente únicamente a través de FR alfa y no a través del vehículo de folato reducido) (Kd = 1 nM), pero una afinidad mucho menor para MTX (Kd > 100 nM). La absorción del folato y antifolatos dependiente de FR procede a través de un mecanismo clásico de la endocitosis mediada por el receptor.

Un "receptor de folato mutado que tiene una disminución de la afinidad de unión al folato en comparación con el receptor de folato de tipo silvestre" o expresiones similares usadas en el presente documento, en particular, se refieren a un receptor de folato mutado que comparado con el receptor de folato de tipo silvestre correspondiente tiene una afinidad de unión reducida con al menos un folato seleccionado de entre el grupo de folatos reducidos y folatos oxidados. Dicha expresión, en particular, se refiere a los receptores de folato mutados que tienen en comparación con el correspondiente receptor de folato de tipo silvestre una disminución de la afinidad de unión al folato a un folato específico. La afinidad de unión al folato a otros folatos, es decir, folatos diferentes de dicho ácido folato específico, puede ser alterada. De acuerdo con una realización, el receptor de folato mutado que tiene una afinidad de unión al folato disminuida comprende al menos una mutación que en comparación con el correspondiente receptor de tipo silvestre, disminuye la afinidad de unión a al menos un folato seleccionado entre el grupo de folatos reducidos y folatos oxidados. De acuerdo con una realización, el receptor de folato mutado muestra en comparación con el correspondiente receptor de folato de tipo silvestre una afinidad de unión disminuida a un folato reducido. De acuerdo con una realización, el receptor de folato mutado muestra en comparación con el correspondiente receptor de folato de tipo silvestre, una afinidad de unión reducida con el diastereoisómero 6S de 5-metiltetrahidrofolato. De acuerdo con una realización, el receptor de folato mutado tiene un valor Cl₅₀ para un folato reducido, de preferencia al diastereoisómero 6S de 5-metiltetrahidrofolato, que es al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces o por lo menos 55 veces mayor que el valor Cl₅₀ del receptor de folato de tipo silvestre correspondiente. Debido al valor de Cl₅₀ significativamente mayor, tiene una afinidad de unión significativamente reducida con dicho folato reducido en comparación con el receptor de folato de tipo silvestre. De acuerdo con una realización, el receptor de folato mutado muestra una unión reducida a ácido fólico.

La al menos una mutación que resulta en una disminución de la afinidad de unión al folato puede ser, por ejemplo, una sustitución, eliminación o inserción de aminoácidos. De acuerdo con una realización, la al menos una mutación está presente en el bolsillo de unión de folato putativo. De acuerdo con una realización, dicha mutación es una sustitución en el bolsillo de unión de folato putativo.

El receptor de folato mutado que se usa de acuerdo con la presente divulgación como marcador seleccionable tiene una afinidad de unión a folato disminuida en comparación con el correspondiente receptor de folato de tipo silvestre. Como se ha descrito anteriormente y como se muestra por los ejemplos, es ventajoso usar un receptor de folato mutado que tenga en comparación con el correspondiente receptor de folato de tipo silvestre al menos una afinidad de unión reducida con el diastereoisómero 6S de 5-metiltetrahidrofolato. Una disminución de la afinidad de unión al folato puede lograrse mediante la introducción de una o más mutaciones en la secuencia de tipo silvestre. Los ejemplos adecuados se describen a continuación. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que debido a la afinidad de unión al folato reducida, las células transfectadas con el/los vector/es de expresión de acuerdo con la presente divulgación necesitan expresar más del receptor de folato mutado para lograr una tasa de absorción del folato suficiente con el fin de sobrevivir bajo condiciones selectivas de privación de folato. Por lo tanto, también el polipéptido de interés se expresa a un nivel superior por la población superviviente. Como se muestra en los ejemplos, cuando se usa el receptor de folato mutado como se describe en el presente documento como marcador seleccionable, la productividad aumenta si la concentración de folato en el medio de cultivo selectivo se reduce. No

se observa una correlación respectiva de la misma manera cuando se usa el receptor de folato de tipo silvestre como marcador seleccionable. Además, cuando se usa el receptor de folato mutado como marcador seleccionable, es posible reducir aún más la concentración de folato en el medio de cultivo selectivo y, por lo tanto, aumentar aún más la presión de selección en las células transfectadas. De este modo, se proporciona un sistema de selección muy riguroso y rápido, que es superior a un sistema de selección que usa el receptor de folato de tipo silvestre como marcador seleccionable. Esto fue inesperado y muy sorprendente teniendo en cuenta el hecho de que la afinidad de unión a folato del receptor de folato mutado de acuerdo con la presente divulgación se disminuye en comparación con el receptor de folato de tipo silvestre. Además, se encontró sorprendentemente que las células que fueron transfectadas con el transportador de folato mutado mostraron características superiores y, en particular, se recuperaron antes de las condiciones de selección, incluso cuando se usaron condiciones de selección altamente rigurosas.

Preferentemente, el receptor de folato mutado que se usa como marcador seleccionable comprende al menos una mutación en el bolsillo de unión de folato, en el que dicha mutación tiene el efecto de que la afinidad de unión a folato se reduce en comparación con el receptor de folato de tipo silvestre correspondiente. Las mutaciones adecuadas se describen posteriormente. La incorporación de una mutación en el bolsillo de unión de folato es un enfoque muy eficaz para reducir la afinidad de unión al folato. Solo las células que sobreexpresan el receptor de folato altamente mutado introducido pueden incorporar cantidades suficientes de folato desde el medio de cultivo para mantener el crecimiento celular, la replicación del ADN y, por lo tanto, la proliferación celular. Sorprendentemente, a pesar de que las células han incorporado un receptor de folato mutado que tiene una afinidad disminuida al folato como marcador seleccionable, las células transfectadas muestran un crecimiento acelerado sustancialmente en comparación con las células que fueron transfectadas con el receptor de folato tipo silvestre o comparación con las células que fueron transfectadas con un marcador seleccionable convencional tal como DHFR. Este crecimiento acelerado es una ventaja significativa ya que esto reduce el tiempo que es necesario para realizar la selección.

El receptor de folato mutado utilizado de acuerdo con la presente divulgación puede ser derivado de un receptor de folato de cualquier especie, siempre y cuando sea funcional dentro de la presente divulgación, es decir, que sea compatible con la célula hospedadora que se utiliza y cuando se expresa a partir de la célula hospedadora transfectada, incorpora folato, en particular, ácido fólico, del medio de cultivo en la célula hospedadora.

En general, el receptor de folato mutado que se introduce en la célula hospedadora eucariota y se utiliza como marcador seleccionable puede ser homólogo o heterólogo a un receptor de folato endógeno de la célula hospedadora (si un receptor de folato endógeno está presente, lo que es preferido). Si es homólogo, se deriva de la misma especie que la célula hospedadora. Si es heterólogo, se deriva de otra especie diferente de la célula hospedadora. Por ejemplo, se puede usar un receptor de folato de origen humano como marcador seleccionable para una célula hospedadora de roedor, por ejemplo, una célula CHO. Preferentemente, se usa un receptor de folato derivado de una especie de mamífero, por ejemplo, derivado de un roedor, tal como ratón, rata o hámster, o, más preferentemente, derivado de un ser humano. De acuerdo con una realización, se usa un receptor de folato mutado derivado del receptor de folato humano alfa como marcador seleccionable.

El receptor de folato mutado se puede seleccionar del grupo que consiste en un receptor de folato alfa, un receptor de folato beta y un receptor de folato gamma. El receptor de folato mutado puede ser derivado de un receptor de folato de tipo silvestre que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO 1, 3, 4, 6, 7 y 8 a continuación, en el que, sin embargo, dicho receptor de folato mutado comprende al menos una mutación que produce una afinidad de unión al folato disminuida en comparación con el receptor de folato de tipo silvestre correspondiente. Preferentemente, el receptor de folato mutado se deriva de un receptor de folato alfa, en particular, el receptor de folato humano alfa.

El receptor de folato humano maduro de tipo silvestre alfa comprende la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO 1, código de 1 letra, se muestra en la dirección desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal):

```
IAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQAHKDVSYLRFN
WNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWQQVDQSWRKERVNLVPLCKEDCEQWW
EDCRTSYTCKSNWHKGNWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTHSYKVSNY
SRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYA
```

El receptor de folato alfa está anclado de forma natural a la membrana celular mediante un anclaje GPI. La secuencia de señal para un anclaje GPI no se muestra en SEQ ID NO 1. De acuerdo con una realización, el receptor de folato mutado alfa que se deriva de SEQ ID NO 1 comprende una señal de anclaje GPI en el extremo C-terminal. Se puede usar cualquier señal adecuada de anclaje GPI. La secuencia de señal de anclaje GPI natural del receptor de folato humano alfa es como sigue (SEQ ID NO 2, código de 1 letra, mostrada en la dirección del extremo N-

terminal al extremo C-terminal):

AAMSGAGPWAAWPFLLSLALMLLWLLS

5 El anclaje de membrana puede alternativamente lograrse mediante el uso de un anclaje de membrana, por ejemplo, un anclaje de transmembrana. En esta realización, el receptor de folato mutado comprende un anclaje de membrana en su extremo C-terminal. Los anclajes adecuados son conocidos en la técnica anterior.

El receptor de folato mutado alfa que se deriva de SEQ ID NO 1 puede comprender una secuencia líder en el extremo N-terminal. Se puede usar cualquier secuencia líder adecuada que garantice la expresión funcional del receptor de folato mutado.

10 La secuencia completa de aminoácidos que incluye la secuencia líder natural (en el extremo N-terminal, subrayado) y la secuencia natural de la señal de anclaje GPI (en el extremo C-terminal, subrayado) del receptor alfa de folato humano tipo silvestre es la siguiente (SEQ ID NO 3, código de 1 letra, mostrada en la dirección desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal):

MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGEAQTRIAWARTELLNVCMNAAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPW
RKNACCSTNTSQEAHKDVSYLRFNWNHCGEMAPACKRHFQDTCLYECSPNLGPWIIQQV
DQSWRKERVNLVPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGNWWTSGFNKCAVGAACQP
FHFYFPTPTVLCNEIWTSHYSYKVSNYSRGSGRCIQMWFDPAAQGNPNEEVARFYAAAMSGAG
PWAAWPFLLSLALMLLWLLS

15 La secuencia de tipo silvestre del receptor de folato humano maduro beta tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO 4, código de 1 letra, mostrada en la dirección desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal):

QDRDLLNVCMDAKHHKTKPGPEDKLHDQCSPWKKNACCTASTSQELHKDTSRLYNFNW
 DHCGKMEPACKRHFQDTCLYECSPNLGPWIIQQVNQWTWRKERFLDVPLCKEDCQRWWED
 CHTSHTCKSNWHRGWDWTSGVKNCPAGALCRTFESYFPTPAALCEGLWSHSYKVSNYSR
 GSGRCIQMWFDSAQGNPNEEVARFYA

20 El receptor de folato beta está anclado de forma natural a la membrana mediante un anclaje GPI. La secuencia de señal para un anclaje GPI no se muestra en SEQ ID NO 4. De acuerdo con una realización, el receptor de folato mutado beta que se deriva de SEQ ID NO 4 comprende una señal de anclaje GPI en el extremo C-terminal. Se puede usar cualquier señal adecuada de anclaje GPI. La secuencia de señal de anclaje GPI natural del receptor de folato humano beta es como sigue (SEQ ID NO 5, código de 1 letra, mostrada en la dirección del extremo N-terminal al extremo C-terminal):

AAMHVNAGEMLHGTGGLLSLALMLQLWLLG

25 El anclaje de membrana puede lograrse mediante el uso de un anclaje de membrana, por ejemplo, un anclaje de transmembrana. En esta realización, el receptor de folato mutado comprende un anclaje de membrana en su extremo C-terminal. Los anclajes adecuados son conocidos en la técnica anterior.

30 El receptor de folato mutado beta que se deriva de SEQ ID NO 4 puede comprender una secuencia líder en el extremo N-terminal. Se puede usar cualquier secuencia líder adecuada que garantice la expresión funcional del receptor de folato mutado.

La secuencia completa de aminoácidos que incluye la secuencia líder (en el extremo N-terminal, subrayado) y la secuencia natural de la señal de anclaje GPI (en el extremo C-terminal, subrayado) del receptor beta de folato humano de tipo silvestre es la siguiente (SEQ ID NO 6, código de 1 letra, mostrada en la dirección desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal):

MVWKWMPLLLLLVCVATMCSAQDRDLLNVCMDAKHHKTKPGPEDKLHDQCSPWKKNAC
 CTASTSQELHKDTSRLYNFNWDHCGKMEPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIIQQVNQTWR
 KERFLDVPLCKEDCQRWWEDCHTSHTCKSNWHRGWDWTSGVKNCPAGALCRTFESYFP
 TPAALCEGLWSHSYKVSNSYRSGRGIQMWFDQAQGNPNEEVARFYAAAMHVNAGEMLH
GTGGLLSLALMLQLWLLG

Además, se puede usar un receptor de folato, que no está unido a membrana de forma natural. Dicho receptor de folato no unido a membrana puede ser alterado con el fin de llegar a ser unido a membrana. Por ejemplo, se puede proporcionar un anclaje de membrana, y dicho receptor de folato se puede expresar como una proteína de fusión que comprende el receptor de folato y un anclaje de membrana de otro polipéptido. Además, la secuencia puede ser modificada para incorporar una secuencia señal de anclaje GPI. Las secuencias señal de anclaje GPI adecuadas se han descrito anteriormente y también se conocen en la técnica anterior. De este modo, el receptor de folato puede anclarse a la membrana celular mediante un anclaje GPI. Del mismo modo, se pueden usar otras variantes que serían fácilmente disponibles para el experto en la materia. Los ejemplos preferidos a este respecto sería un receptor de folato mutado que se basa en el receptor de folato gamma, preferentemente, el receptor de folato humano gamma, que fue alterado genéticamente para comprender un anclaje a la membrana. Aquí, la secuencia gamma de receptor de folato podría mutarse de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación para mostrar una afinidad de unión al folato disminuida.

El receptor de folato soluble humano de tipo silvestre gamma tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO 7, código de 1 letra, mostrado en la dirección desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal):

QPR SARARTDLLNVC MNAKHHKTQP SPEDELYGQCSPWKKNACCTASTSQELHKDTSRLY
 NFNWDHCGKMEPTCKRHF IQDSCLYECSPNLGPWIRQV NQSWRKERILNVPLCKEDCERW
 WEDCRTSYTCKSNWHK GWNWTSGINECPAGALCSTFESYFPTPAALCEGLWSHSFKVSN
 YSRGSGRGIQMWFDQAQGNPNEEVAKFYAAAMNAGAPSRGIIDS

Además, un receptor de folato mutado gamma que se deriva de SEQ ID NO 7 puede comprender una secuencia líder en el extremo N-terminal. Se puede usar cualquier secuencia líder adecuada que garantice la expresión funcional del receptor de folato mutado.

La secuencia de aminoácidos completa, incluyendo la secuencia líder del receptor de folato humano de tipo silvestre gamma (subrayado) es como sigue (SEQ ID NO 8, código de 1 letra, mostrada en la dirección desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal):

MDMAWQMMQLLLLLALVTAAGSAQPR SARARTDLLNVC MNAKHHKTQP SPEDELYGQCSP
 WKKNACCTASTSQELHKDTSRLYNFNWDHCGKMEPTCKRHF IQDSCLYECSPNLGPWIRQ
 VNQSWRKERILNVPLCKEDCERW WEDCRTSYTCKSNWHK GWNWTSGINECPAGALCSTF
 ESYFPTPAALCEGLWSHSFKVSNYRSGRGIQMWFDQAQGNPNEEVAKFYAAAMNAGA
 PSRGIIDS

Un receptor de folato mutado de acuerdo con la presente divulgación que se basa en el receptor de folato gamma comprende al menos una mutación en la secuencia respectiva para proporcionar un receptor de folato mutado que tenga una afinidad de unión al folato disminuida. Preferentemente, la mutación está en el bolsillo de unión de folato.

De acuerdo con una realización, el receptor de folato mutado se deriva de un receptor de folato alfa o beta. De acuerdo con una realización, un receptor de folato mutado se obtiene proporcionando una secuencia de aminoácidos quimérica que se deriva del receptor de folato alfa y beta. En el receptor de folato alfa y beta, las posiciones de aminoácidos importantes que intervienen en la unión del ligando son, en referencia a la correspondiente secuencia de aminoácidos del receptor de folato maduro (véase, por ejemplo SEQ ID NO 1 y 4), las posiciones 49, 104 y 166 (véase también Ramamoorthy *et al.*, 2007). De acuerdo con una realización, el receptor de folato mutado comprende al menos una sustitución en una posición de aminoácido que corresponde estructuralmente o por homología de secuencia de aminoácidos a una posición de aminoácido seleccionada entre la posición 49, 104 y 166 de la correspondiente secuencia de tipo silvestre. También, se puede sustituir más de un aminoácido en el receptor de folato mutado en las posiciones respectivas. Una sustitución en una o más de estas posiciones de aminoácidos tiene un fuerte impacto en la afinidad de unión al folato. La sustitución disminuye preferentemente la afinidad de unión al folato del receptor de folato mutado en comparación con el receptor de folato

de tipo silvestre correspondiente. De acuerdo con una realización, el receptor de folato mutado resultante muestra en comparación con el correspondiente receptor de folato de tipo silvestre, una afinidad de unión reducida con el diastereoisómero 6S de 5-metiltetrahidrofolato. De acuerdo con una realización, el receptor de folato mutado resultante muestra una unión reducida a ácido fólico. De acuerdo con una realización, el aminoácido de origen natural en la secuencia de tipo silvestre correspondiente se sustituye por un aminoácido no conservador, en donde dicha sustitución disminuye la afinidad de unión a folato del receptor de folato mutado. De acuerdo con una realización, el aminoácido de origen natural en la secuencia de tipo silvestre correspondiente se sustituye por un aminoácido conservativo. En un intercambio conservativo, un aminoácido se sustituye por otro aminoácido dentro de un grupo con propiedades similares. Los ejemplos de grupos correspondientes son:

- 5
- 10 - Aminoácidos que tienen cadenas laterales no polares: A, G, V, L, I, P, F, W, M
- Aminoácidos sin carga que tienen cadenas laterales polares: S, T, G, C, Y, N, Q
- Aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas: F, Y, W
- Aminoácidos con carga positiva: K, R, H
- Aminoácidos con carga negativa: D, E
- 15 - Los aminoácidos de tamaño o peso molecular similares, en los que el peso molecular de los aminoácidos de reemplazo se desvía por un máximo de +/- 25 % (o +/- 20 %, +/- 15 %, +/- 10 %) con respecto al peso molecular del aminoácido inicial.

Es evidente, que los grupos también incluyen aminoácidos modificados y aminoácidos no naturales con el respectivo perfil de cadena lateral, tal como, por ejemplo, homoarginina en el caso del grupo que representa cadenas laterales cargadas positivamente. De acuerdo con una realización, el aminoácido de origen natural en la secuencia de tipo silvestre está sustituido por un L-aminoácido natural con el fin de proporcionar el receptor de folato mutado.

Preferentemente, el receptor de folato mutado es un receptor de folato alfa. Este puede derivarse de un roedor tal como ratón, rata o hámster, o puede ser derivado de un receptor de folato humano alfa. Preferentemente, el receptor de folato mutado se deriva de un receptor de folato humano alfa. De acuerdo con una realización, el receptor de folato mutado de acuerdo con la presente divulgación se deriva del receptor de folato humano de tipo silvestre alfa que tiene la SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 3 mostrada anteriormente, en la que, sin embargo, dicho receptor de folato mutado alfa comprende al menos una mutación que produce una afinidad de unión al folato disminuida en comparación con el receptor de folato de tipo silvestre. De acuerdo con una realización, el receptor de folato mutado resultante muestra en comparación con el correspondiente receptor de folato de tipo silvestre, una afinidad de unión reducida con el diastereoisómero 6S de 5-metiltetrahidrofolato. De acuerdo con una realización, el receptor de folato mutado resultante muestra alternativa o adicionalmente una afinidad de unión reducida al ácido fólico.

Preferentemente, el receptor de folato mutado de acuerdo con la presente divulgación comprende una sustitución en la posición de aminoácido que corresponde estructuralmente o por homología de secuencia de aminoácidos al aminoácido 49 de la secuencia del receptor de folato humano de tipo silvestre maduro alfa como se muestra en SEQ ID NO 1. Una mutación en la posición 49 de la secuencia de tipo silvestre madura del receptor de folato alfa introduce una mutación en el bolsillo de unión de folato y, por tanto, tiene un fuerte impacto en la afinidad de unión al folato. Esta alanina en la posición 49 de la secuencia de tipo silvestre se encuentra en el ser humano, así como en la correspondiente secuencia del receptor de folato de tipo silvestre alfa de ratón. Por supuesto, el receptor de folato mutado de acuerdo con la presente divulgación puede comprender mutaciones adicionales en otras posiciones, siempre que el receptor de folato mutado sea funcional. De acuerdo con una realización, la al menos una mutación que disminuye la afinidad de unión al folato en comparación con el receptor de folato tipo silvestre es una sustitución de la alanina presente en la posición 49 de la secuencia del receptor de folato maduro tipo silvestre alfa por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en leucina, glicina, valina, isoleucina, histidina y ácido aspártico. Preferentemente, la alanina se sustituye por leucina. Los inventores sorprendentemente encontraron que la sustitución A49L en la secuencia del receptor de folato alfa proporciona un receptor de folato mutado alfa que tiene propiedades superiores como marcador seleccionable en comparación con el correspondiente receptor de folato de tipo silvestre alfa. Un receptor de folato mutado alfa que comprende una respectiva sustitución A49L muestra en comparación con el correspondiente receptor de folato de tipo silvestre, una afinidad de unión reducida a un folato, a saber, el diastereoisómero 6S de 5-metiltetrahidrofolato. Además, como se muestra en los ejemplos, el mutante A49L del receptor de folato humano alfa muestra ventajas significativas cuando se esté usando como marcador de selección para identificar y seleccionar células hospedadoras de mamífero transfectadas con éxito. Por lo tanto, éste se usa preferentemente como marcador de selección para identificar células hospedadoras que expresen un polipéptido recombinante de interés con alto rendimiento.

De acuerdo con una realización, el receptor de folato mutado maduro comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 % o al menos 98 % o al menos 99 % con la secuencia de tipo silvestre madura del receptor de folato humano alfa (SEQ ID NO 1), en la que, sin embargo, la secuencia de aminoácidos del receptor de folato mutado maduro comprende al menos una mutación que disminuye la afinidad de unión al folato en comparación con el receptor de folato humano de tipo silvestre alfa. Como se ha descrito anteriormente, la al menos una mutación que disminuye la afinidad de unión al folato en comparación con el receptor de folato de tipo silvestre es preferentemente

una sustitución de la alanina presente en la posición 49 de la secuencia del receptor de folato maduro de tipo silvestre alfa (véase SEQ ID NO. 1) por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en leucina, glicina, valina, isoleucina, histidina y ácido aspártico. Preferentemente, la alanina en la posición 49 se sustituye por leucina. Dicho receptor de folato mutado muestra, en comparación con el correspondiente receptor de folato de tipo silvestre, una afinidad de unión reducida al diastereoisómero 6S de 5-metiltetrahidrofolato y características mejoradas como marcador seleccionable.

De acuerdo con una realización, el primer polinucleótido codifica un receptor de folato mutado, en la que dicho receptor de folato mutado tiene las siguientes características:

a) el receptor de folato mutado maduro comprende la siguiente secuencia:

IAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEXaaHKDVSYL
 YR FNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERVNLVPLCKEDCEQW
 WEDCRTSYTCKSNWHKGNWWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTHSYKVS
 N YSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYA (SEQ ID NO 9)

en la que Xaa no es alanina y en la que, preferentemente, Xaa es un aminoácido seleccionado a partir de leucina, glicina, valina, isoleucina, histidina y ácido aspártico, y en la que Xaa es más preferentemente leucina; o

b) el receptor de folato mutado maduro comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 % o al menos 98 % o al menos 99 % con secuencia mostrada como SEQ ID NO 9, y en la que Xaa no es alanina en dicho receptor de folato mutado y, preferentemente, Xaa es un aminoácido seleccionado de leucina, glicina, valina, isoleucina, histidina y ácido aspártico, y más preferentemente, Xaa es leucina, y en la que la afinidad de unión a folato de dicho receptor de folato mutado se reduce en comparación con la secuencia del receptor de folato humano de tipo silvestre maduro alfa en la que Xaa es alanina (véase SEQ ID NO 1). De acuerdo con una realización, dicho receptor de folato mutado muestra en comparación con el correspondiente receptor de folato de tipo silvestre, una afinidad de unión reducida con el diastereoisómero 6S de 5-metiltetrahidrofolato. De acuerdo con una realización, el receptor de folato mutado resultante muestra además o alternativamente una unión reducida al ácido fólico. El receptor de folato mutado de acuerdo con b) puede ser visto como una variante funcional de a) y puede comprender una o más mutaciones adicionales de aminoácidos en comparación con el receptor de folato mutado de acuerdo con a). Por ejemplo, puede comprender una o más sustituciones adicionales, eliminaciones y/o adiciones de uno o más aminoácidos, siempre y cuando la función como receptor de folato no se elimine. También se incluyen las proteínas de fusión, que comprenden una secuencia respectiva del receptor de folato mutado.

Como se ha analizado anteriormente, preferentemente, Xaa es leucina. Como se muestra en los ejemplos, la mutación de la alanina comprendida en la posición 49 de la secuencia de tipo silvestre del receptor de folato alfa frente a la leucina proporciona un receptor de folato mutado que se ha comparado con las características superiores de secuencia de tipo silvestre correspondientes como un marcador seleccionable. Como se muestra por los ejemplos, las células que comprenden como marcador seleccionable un receptor de folato mutado que porta una mutación en la posición correspondiente a la posición 49 de la secuencia de tipo silvestre madura del receptor de folato alfa muestran, después de la selección, una alta productividad del polipéptido de interés que es a menudo incluso considerablemente más alta que la productividad que se logra cuando se usa el receptor de folato de tipo silvestre correspondiente como marcador seleccionable y que también es superior a la productividad que se logra con otras formas del receptor mutado. Además, las células se recuperan más rápido de la selección. Estas ventajas importantes hacen del receptor de folato mutado A49L particularmente adecuado como marcador seleccionable. Dicho receptor de folato mutado alfa se describe y se caracteriza en Shen *et al.*, 1997. Allí, se mostró que dicha versión mutada muestra una afinidad de unión reducida al diastereoisómero 6S de 5-metiltetrahidrofolato como puede verse por el valor de CI_{50} (nM) que aumenta desde el receptor de folato de tipo silvestre alfa (2,9) en casi 60 veces a (179,0).

El receptor de folato mutado está unido a membrana y puede comprender, por ejemplo, un anclaje GPI o un anclaje de transmembrana. Como se ha descrito anteriormente, el receptor de folato alfa y beta están anclados de manera natural por un anclaje GPI a la membrana celular. Cuando se usa un anclaje GPI para el anclaje de membrana, el polinucleótido de codificación debe proporcionar la secuencia señal apropiada para la fijación de un anclaje GPI. Las secuencias de señal adecuadas para el anclaje de GPI se conocen en la técnica anterior y también se han descrito anteriormente. Como se ha explicado anteriormente, las respectivas secuencias señal de anclaje GPI se proporcionan en el extremo C-terminal y se pueden usar en conjunción con la presente divulgación.

De acuerdo con una realización, el receptor de folato mutado prematuro comprende la secuencia líder del receptor

de folato humano alfa funcional de tipo silvestre como se muestra en la siguiente (SEQ ID NO 10, código de 1 letra, mostrado en la dirección desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal):
MAQRMTTQLLLLLLVVAVVGEAQTR.

5 Las secuencias líder de los receptores de folato humano de tipo silvestre beta y gamma se muestran posteriormente (SEQ ID NO 11 y 12, código de 1 letra, mostradas en la dirección desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal):

MVWKWMPLLLLLVCVATMCSA (SEQ ID NO 11)
MDMAWQMMQLLLLLLVTAAGSA (SEQ ID NO 12).

10 De acuerdo con una realización, el primer polinucleótido codifica un receptor de folato mutado, en el que dicho receptor de folato mutado tiene las siguientes características:

a) el receptor de folato mutado comprende la siguiente secuencia

IAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEXaaHKDVSYLYR
FNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERVNLVPLCKEDCEQW
WEDCRTSYTCKSNWHKGNWWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTHSYKVS
YSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAMSGAGPWAAWPFLLSLALMLLWLLS
(SEQ ID NO 13)

en la que Xaa es leucina;

o

15 b) el receptor de folato mutado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % con la secuencia mostrada como SEQ ID NO 13, en la que Xaa es leucina en dicho receptor de folato mutado de acuerdo con b) y en la que la afinidad de unión de dicho receptor de folato mutado para el diastereoisómero 6S de 5-metiltetrahidrofolato se reduce en comparación con la secuencia del receptor de folato humano de tipo silvestre maduro alfa en la que Xaa es alanina (véase SEQ ID NO 1).

20

El polipéptido de interés

El vector de expresión o combinación de vector de expresión comprende al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés. Cuando dicho vector de expresión o combinación de vector se introduce en una célula hospedadora dependiente del folato tal como, por ejemplo, una célula de mamífero como se describe en el presente documento, el polipéptido de interés se secreta desde dicha célula hospedadora. Por lo tanto, el polipéptido de interés es un polipéptido secretado. El polinucleótido puede codificar un polipéptido que se secreta de forma natural o se puede modificar para que se secrete al proporcionar una secuencia líder secretora apropiada. La mayoría de los polipéptidos secretados posee un péptido líder de extremo amino (también conocido como secuencia líder secretora o péptido señal) que se escinde del polipéptido precursor naciente durante la biosíntesis. Los péptidos líder secretores, por lo general, tienen una longitud de 5 a 60 aminoácidos. Esta secuencia es necesaria y suficiente para la secreción. Numerosos ejemplos de secuencias líder secretoras son bien conocidos en la técnica anterior y, por tanto, no necesitan ninguna descripción detallada en el presente documento. El análisis de un gran número de estos péptidos líder secretores ha revelado un motivo estructural común que se produce en ausencia de homología de secuencia significativa de aminoácidos [Von Heijne, 1981; Perlman *et al*, 1983, Bird *et al*, 1990]. En general, una secuencia líder secretora consiste en un extremo amino cargado positivamente (n), un núcleo hidrófobo (h) y un extremo carboxilo más polar (c) que define el sitio de escisión de la peptidasa señal. La interrupción de la región h por eliminación o por la sustitución de restos hidrófobos con aminoácidos hidrófilos o de carga conduce a la pérdida de la función de señal, mientras que las alteraciones a la región "n" tiene poco efecto. El término carboxilo, o región de escisión, normalmente tiene 6 aminoácidos de longitud aproximadamente. Esta región está implicada en el reconocimiento y en la escisión de la peptidasa señal, que se requiere generalmente para lograr el plegado final y la secreción de la proteína.

25

30

35

40

El polipéptido de interés puede ser un compuesto farmacéutica o terapéuticamente activo, o una herramienta de investigación para ser utilizada en ensayos y similares. El polipéptido de interés puede ser de cualquier tipo. El término "polipéptido" se refiere a una molécula que comprende un polímero de aminoácidos unidos entre sí por uno o varios enlaces peptídicos. Los polipéptidos incluyen polipéptidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas (por ejemplo, que tienen más de 50 aminoácidos) y péptidos (por ejemplo, 2-49 aminoácidos). Los polipéptidos incluyen proteínas y/o péptidos de cualquier actividad, función o tamaño, y pueden incluir, por ejemplo, enzimas (por ejemplo, proteasas, quinasas, fosfatasa), receptores, transportadores, proteínas bactericidas y/o de unión a endotoxinas,

45

polipéptidos estructurales, glicoproteínas, proteínas globulares, polipéptidos inmunes, toxinas, antibióticos, hormonas, factores de crecimiento, factores hematológicos, vacunas o similares. El polipéptido se puede seleccionar del grupo que consiste en hormonas peptídicas, interleucinas, activadores de plasminógeno de tejido, citoquinas, inmunoglobulinas, en particular, anticuerpos o fragmentos funcionales de anticuerpos, o variantes de los mismos, y proteínas de fusión Fc. El polipéptido de interés que se expresa de acuerdo con las enseñanzas descritas en el presente documento también puede ser una subunidad o un dominio de un polipéptido, tal como, por ejemplo, una cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento funcional, o derivado del mismo. La expresión "polipéptido de interés" puede referirse a dicha subunidad individual o dominio o la proteína final que se compone de las subunidades o los dominios respectivos, dependiendo del contexto. En una realización preferida, el polipéptido de interés es una molécula de inmunoglobulina, más preferentemente, un anticuerpo, o una subunidad o un dominio del mismo, tal como, por ejemplo, la cadena pesada o ligera de un anticuerpo. El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento se refiere, en particular, a una proteína que comprende al menos dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras unidas por enlaces de disulfuro. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos de origen natural, así como todas las formas recombinantes de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos humanizados, anticuerpos completamente humanos y anticuerpos quiméricos. Cada cadena pesada se compone usualmente de una región variable de cadena pesada (VH) y una región constante de cadena pesada (CH). Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (VL) y una región constante de cadena ligera (CL). El término "anticuerpo", sin embargo, también incluye otros tipos de anticuerpos, tales como anticuerpos de dominio sencillo, anticuerpos de cadena pesada, es decir, los anticuerpos que solo se componen de uno o más, en particular, dos cadenas pesadas, y nanocuerpos, es decir, anticuerpos solamente compuestos por un único dominio variable monomérico. Como se ha analizado anteriormente, el polinucleótido que codifica el polipéptido de interés también puede codificar una o más subunidades o dominios de un anticuerpo, por ejemplo, una cadena pesada o una cadena ligera o un fragmento funcional o derivado del mismo, tal como polipéptido de interés. Dichas subunidades o dominios pueden expresarse ya sea desde los mismos o diferentes casetes de expresión. Un "fragmento funcional o derivado" de un anticuerpo, en particular, se refiere a un polipéptido que se deriva de un anticuerpo y es capaz de unirse al mismo antígeno, en particular, al mismo epítipo que el anticuerpo. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa o derivados del mismo. Ejemplos de fragmentos o derivados de un anticuerpo incluyen (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten en la región variable y el primer dominio constante de cada cadena pesada y cadena ligera; (ii) fragmentos F(ab)₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmentos Fd que constan de la región variable y el primer dominio constante CH1 de la cadena pesada; (iv) fragmentos Fv que consisten en la región variable de cadena pesada y cadena ligera de un solo brazo de un anticuerpo; (v) fragmentos scFv, fragmentos Fv que consisten en una única cadena de polipéptido; (vi) (Fv)₂ fragmentos que constan de dos fragmentos Fv covalentemente unidos entre sí; (vii) un dominio variable de cadena pesada; y (viii) multicuerpos que constan de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera covalentemente unidos entre sí de tal manera que la asociación de las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera solo puede ocurrir intermolecular pero no intramolecular.

Marcadores seleccionables adicionales

De acuerdo con una realización, el vector de expresión o combinación de al menos dos vectores de expresión de acuerdo con la presente divulgación comprende además uno o más polinucleótidos que codifican un marcador seleccionable adicional. Un marcador seleccionable permite bajo condiciones de cultivo selectivas apropiadas, la selección de células hospedadoras que expresan dicho marcador seleccionable. Un marcador seleccionable proporciona el vehículo de dicho marcador en condiciones selectivas con una ventaja de supervivencia y/o crecimiento. Por lo general, un gen marcador seleccionable confiere resistencia a un agente de selección tal como un fármaco, por ejemplo, un antibiótico u otro agente tóxico, o compensa un defecto metabólico o catabólico en la célula hospedadora. Puede ser un marcador de selección positivo o negativo. Para la selección de células hospedadoras transfectadas con éxito, se puede usar un medio de cultivo para cultivar las células hospedadoras que comprenda un agente de selección que permita la selección del marcador seleccionable usado. En otras realizaciones, el marcador de selección permite a la célula hospedadora sobrevivir y proliferar en ausencia o reducción de un compuesto que es esencial para la supervivencia y/o proliferación de las células hospedadoras que carecen del marcador de selección. De acuerdo con una realización, el marcador seleccionable es un marcador de resistencia a fármacos que codifica una proteína que confiere resistencia a condiciones de selección que implican a dicho fármaco. Una variedad de genes de marcadores de selección es bien conocida por el experto y ha sido descrita en la literatura (véanse, por ejemplo, los documentos WO 92/08796, WO 94/28143, WO2004/081167, WO2009/080759, WO2010/097240). El marcador seleccionable puede ser, de acuerdo con una realización, un marcador seleccionable amplificable. Los genes marcadores seleccionables usados comúnmente con las células de mamífero incluyen los genes para la aminoglucósido fosfotransferasa (APH), la higromicina fosfotransferasa (hyg), la dihidrofolato reductasa (DHFR), la timidina quinasa (tk), la glutamina sintetasa, la asparagina sintetasa y los genes que codifican la resistencia a la neomicina (G418), puromicina, higromicina y zeocina. Dichos marcadores seleccionables se pueden usar además del receptor de folato mutado.

De acuerdo con una realización, el vector de expresión o combinación de vectores de expresión comprende un polinucleótido adicional que codifica un marcador seleccionable que participa en el metabolismo del folato y en el

que la actividad de dicho marcador seleccionable está al menos parcialmente influenciada por la actividad del receptor de folato mutado. La característica de que la actividad del marcador seleccionable adicional esté al menos parcialmente influenciada por la actividad del receptor de folato mutado, en particular, significa que la actividad de dicho marcador seleccionable adicional está influenciada por y/o depende, al menos en cierta medida, directa o indirectamente de la actividad o función del receptor de folato mutado. Esta dependencia/interacción del receptor de folato mutado y el marcador seleccionable adicional se puede usar para aumentar considerablemente la presión de selección sobre las células hospedadoras bajo condiciones de cultivo selectivas.

De acuerdo con una realización, el marcador seleccionable adicional es una enzima que procesa un sustrato que es un folato, un derivado de ácido fólico y/o un producto que se puede obtener por el proceso del ácido fólico tal como DHF o THF, o una variante funcional o derivada de lo anterior. Los respectivos sustratos son importantes para la producción de ácidos nucleicos. Preferentemente, el marcador seleccionable adicional es una dihidrofolato reductasa (DHFR) o una enzima que opera aguas abajo de o en conjunción con DHFR tales como la timidilato sintasa (TS) y serina hidroximetiltransferasa (SHMT). Preferentemente, el marcador seleccionable adicional es una DHFR. La DHFR se puede expresar también como parte de una proteína de fusión.

El uso de una respectiva combinación de marcadores seleccionables, es decir, el receptor de folato mutado de acuerdo con la presente divulgación y un marcador seleccionable adicional implicado en el metabolismo del folato como se ha descrito anteriormente, preferentemente DHFR, proporciona un sistema de selección muy riguroso para la obtención y el enriquecimiento de células de elevada producción de la población de células hospedadoras transfectadas. Este concepto de usar un receptor de folato como marcador seleccionable en combinación con un marcador seleccionable adicional implicado en el metabolismo del folato tal como, preferentemente, DHFR y ventajas asociadas se desvela en el documento WO 2010/097240. Como lo demuestran los ejemplos, el alto rigor del sistema de selección de acuerdo con dicha realización reduce considerablemente el número de productores bajos en la población obtenida después de la selección y, por lo tanto, aumenta la probabilidad de encontrar los infrecuentes clones sobreproductores. Además, una población más homogénea de células muy productoras se obtiene después de la selección, lo que reduce los esfuerzos de detección. Esto simplifica la clonación de células individuales de células con producción alta. Como se muestra en los ejemplos, usando el receptor de folato mutado como se describe en el presente documento en combinación con un marcador seleccionable adicional implicado en el metabolismo del folato como se ha descrito anteriormente, preferentemente DHFR, da lugar a mejores resultados en comparación con cuando se usa el receptor de tipo folato silvestre en combinación con dicho marcador seleccionable. Por lo tanto, también cuando se usa una combinación de los respectivos marcadores seleccionables, la presente divulgación proporciona ventajas significativas debido al uso de un receptor de folato mutado.

Como se ha analizado anteriormente, el marcador seleccionable adicional es preferentemente una enzima DHFR. Varias enzimas DHFR adecuadas y, por consiguiente, genes son conocidos en la técnica anterior, que se pueden usar como marcador seleccionable en conjunción con la presente divulgación. Los términos "dihidrofolatoreductasa" o "DHFR" se refieren a DHFR de tipo silvestre, así como a las enzimas DHFR que tienen uno o más intercambios de secuencias de aminoácidos (por ejemplo, eliminaciones, sustituciones o adiciones) con respecto a la secuencia de aminoácidos de la correspondiente enzima DHFR de tipo silvestre, proteínas de fusión que comprenden una enzima DHFR y enzimas DHFR que han sido modificadas para proporcionar una estructura y/o función adicional, así como fragmentos funcionales de los anteriores, que todavía tienen al menos una función de una enzima DHFR. Dichas realizaciones son bien conocidas en la técnica anterior y, por tanto, no necesitan ser descritas en detalle. Por ejemplo, se puede usar una enzima DHFR como un marcador seleccionable que sea más o menos sensible a antifolatos tales como MTX que la enzima DHFR de tipo silvestre y/o la enzima DHFR expresada de manera endógena por la célula hospedadora en caso de ser expresada. Las respectivas enzimas DHFR son bien conocidas en la técnica anterior y, por ejemplo, se describen en el documento EP 0 246 049 y otros documentos. La enzima DHFR se puede derivar de cualquier especie, siempre y cuando sea funcional dentro de la presente invención, es decir, compatible con la célula hospedadora de mamífero utilizada. Por ejemplo, se ha usado ampliamente una DHFR de ratón mutante con una resistencia mayor a MTX como marcador seleccionable dominante en células de mamífero. Una enzima DHFR se puede usar como un marcador seleccionable que sea menos susceptible a un inhibidor de DHFR tal como MTX que la enzima DHFR expresada de manera endógena en una célula hospedadora + (más) DHFR y, de este modo, una célula hospedadora que comprende un gen DHFR endógeno funcional. De acuerdo con una realización, un intrón o un fragmento del mismo se coloca en el extremo 3' del marco de lectura abierto del gen de DHFR. El intrón usado en el casete de expresión de DHFR está conduciendo a una variante más pequeña, no funcional del gen DHFR (Grillari *et al.*, 2001, *J. Biotechnol.* 87, 59-65). De este modo, el nivel de expresión del gen de DHFR se baja, lo que aumenta aún más la rigurosidad de la selección. Métodos alternativos que hacen uso de un intrón para reducir el nivel de expresión del gen de DHFR se describen en el documento EP 0 724 639 y también se podrían usar.

El polinucleótido que codifica el marcador seleccionable adicional puede estar situado en el mismo vector de expresión como el polinucleótido que codifica el receptor de folato mutado y/o el al menos un polinucleótido que codifica el polipéptido de interés o puede ser situado en un vector de expresión por separado si se usa una combinación de vectores de expresión. En este caso la combinación de vectores de expresión que comprenden todos los polinucleótidos (que codifican el receptor de folato mutado, el polipéptido de interés y el marcador

seleccionable adicional) debería cotransfectarse en las células hospedadoras para permitir la selección.

De acuerdo con una realización preferida, el vector de expresión o la combinación de vectores de expresión comprende

- 5 - un polinucleótido que codifica un receptor de folato mutado que comprende al menos una mutación estructuralmente correspondiente o por la posición del aminoácido al aminoácido 49 de la secuencia de tipo silvestre madura del receptor de folato humano alfa (véase SEQ ID NO 1), en el que dicha mutación disminuye la afinidad de unión del folato en comparación con el receptor de folato de tipo silvestre alfa, en el que preferentemente, la alanina presente en la secuencia de tipo silvestre en dicha posición se sustituye por leucina, y
- 10 - un polinucleótido que codifica una DHFR que es menos sensible a MTX que la enzima DHFR de tipo silvestre y/o la enzima DHFR expresada de manera endógena por la célula hospedadora como marcador seleccionable adicional. Dicha DHFR preferentemente también comprende un intrón como se ha descrito anteriormente. Una combinación de marcadores respectiva es particularmente preferida si las células DHFR + (más) se usan como células hospedadoras. Las células DHFR +(más) expresan una DHFR endógena. Como se muestra en los
- 15 ejemplos, los clones celulares de muy alta producción se pueden seleccionar eficazmente cuando se usa un vector respectivo o combinación de vectores de expresión.

El vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión de acuerdo con la presente divulgación pueden comprender además uno o más polinucleótidos adicionales que codifican un marcador seleccionable. Dicho marcador seleccionable adicional puede estar presente además del receptor de folato mutado y el marcador seleccionable adicional implicado en el metabolismo del folato, que preferentemente es DHFR.

Además de marcadores seleccionables eucariotas adicionales que permitan la selección de células hospedadoras eucariotas, también pueden estar presentes marcadores seleccionables procariotas en el vector de expresión o combinación de vectores de expresión. Esto, por ejemplo, permite la amplificación del/de los vector/es en procariotas. Un "marcador seleccionable procariota" es un marcador seleccionable que permite la selección en células hospedadoras procariotas bajo condiciones de selección apropiadas. Los ejemplos de los respectivos marcadores seleccionables procariotas son marcadores que proporcionan una resistencia a los antibióticos, tales como, por ejemplo, ampicilina, kanamicina, tetraciclina y/o cloranfenicol.

Elementos del vector y realizaciones del/de los vector/es de expresión adicionales

El vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión puede comprender además otros elementos vectoriales. Por ejemplo, puede estar comprendido al menos un polinucleótido adicional que codifica un polipéptido adicional de interés. Como se ha explicado anteriormente y como se hace evidente a partir de los ejemplos descritos de polipéptidos que se pueden expresar, el polipéptido final que va a ser producido y secretado por la célula hospedadora también puede ser una proteína que se componga de varias subunidades o dominios individuales. Un ejemplo preferido de una proteína respectiva es una molécula de inmunoglobulina, en particular, un anticuerpo que comprenda, por ejemplo cadenas pesadas y ligeras. Existen varias opciones para producir una proteína respectiva que se compone de diferentes subunidades o dominios individuales, y los diseños de vectores apropiados son conocidos en la técnica. De acuerdo con una realización, dos o más subunidades o dominios de dicha proteína se expresan desde un casete de expresión. En dicha realización, se obtiene una transcripción larga a partir del respectivo casete de expresión que comprende las regiones de codificación de las subunidades individuales o dominios de la proteína. De acuerdo con una realización, al menos un elemento IRES (sitio de entrada ribosomal interno) está funcionalmente situado entre las regiones codificantes de las subunidades o dominios individuales, y cada región de codificación va precedida por una secuencia líder secretora. De este modo, se asegura que los productos de traducción separados se obtienen a partir de dicho producto de transcripción, y que la proteína final pueda ser correctamente ensamblada y secretada. Se conocen las respectivas tecnologías en la técnica anterior y, por tanto, no necesitan ninguna descripción detallada en el presente documento.

Sin embargo, está también dentro del alcance de la presente divulgación y para algunas realizaciones tales como la expresión de anticuerpos que se expresen incluso preferentemente las subunidades individuales o dominios de diferentes casetes de expresión. De acuerdo con una realización, el casete de expresión usado para expresar el polipéptido de interés es un casete de expresión monocistrónico. Preferentemente, todos los casetes de expresión comprendidos en el vector de expresión o combinación de vectores de expresión son monocistrónicos. De acuerdo con una realización, por consiguiente, cada casete de expresión comprende un polinucleótido que codifica una subunidad o un dominio de la proteína que se expresa como polipéptido de interés. Por ejemplo, en el caso de los anticuerpos, un casete de expresión codifica la cadena ligera de un anticuerpo y otro casete de expresión codifica la cadena pesada del anticuerpo. Después de la expresión de las subunidades/los dominios individuales a partir de los casetes de expresión individuales, la proteína final tal como un anticuerpo se ensambla a partir de dichas subunidades o dominios y se secretada desde la célula hospedadora. Esta realización es particularmente adecuada para expresar moléculas de inmunoglobulina, tales como anticuerpos. En este caso, un primer polinucleótido que codifica un polipéptido de interés codifica, por ejemplo, la cadena pesada o cadena ligera de una molécula de

inmunoglobulina y un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido de interés codifica la otra cadena de la molécula de inmunoglobulina. De acuerdo con una realización, el vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión comprende al menos un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica la cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina o un fragmento funcional del mismo y al menos un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica la cadena ligera de una molécula de inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma. Dichos polinucleótidos pueden estar situados en el mismo o en diferentes vectores de expresión en caso de que se use una combinación de al menos dos vectores de expresión. Tras la expresión de dichos polinucleótidos en la célula hospedadora transfectada, se obtiene una molécula de inmunoglobulina funcional y se secreta desde la célula hospedadora.

Los vectores de expresión usados para la expresión de productos recombinantes de interés, por lo general, contienen como elementos de un casete expresión, elementos de control transcripcionales adecuados para promover la transcripción tales como por ejemplo promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, señales que detienen o terminan la transcripción como elemento de un casete de expresión. Preferentemente, se incluyen elementos de control de la traducción adecuados tales como, por ejemplo, regiones no traducidas 5' que conducen a estructuras de caperuza 5' para el reclutamiento de ribosomas y codones de parada para terminar el proceso de traducción. Los productos de la transcripción resultantes del/de los gen/es marcador/es seleccionable/s y aquel del polipéptido de interés albergan elementos de traducción funcionales que facilitan niveles sustanciales de expresión de la proteína (es decir, la traducción) y terminación de la traducción apropiada. Una unidad de expresión funcional, capaz de conducir adecuadamente la expresión de un polinucleótido incorporado también se conoce como un "casete de expresión" en el presente documento. El/los polinucleótido/s que codifica/n el polipéptido de interés que se va a secretar y los polinucleótidos que codifican el/los marcador/es seleccionable/s como se describe en el presente documento se componen preferentemente de un casete de expresión. Varias realizaciones son adecuadas, por ejemplo, cada uno de dicho/s polinucleótido/s puede estar comprendido en un casete de expresión separado. Sin embargo, al menos dos de los respectivos polinucleótidos también pueden estar comprendidos en un casete de expresión. De acuerdo con una realización, al menos un elemento de sitio interno de entrada ribosomal (IRES) está funcionalmente situado entre los polinucleótidos que se expresan a partir del mismo casete de expresión. De este modo, se garantiza que los productos de traducción separados se obtienen a partir de dicho producto de transcripción. Las respectivas tecnologías de expresión basadas en IRES y otros sistemas bi- y policistronicos son bien conocidos y, por lo tanto, no necesitan describirse más detalladamente en el presente documento.

Como se ha descrito, el vector de expresión o la combinación de vectores de expresión de acuerdo con la presente divulgación pueden comprender al menos un promotor y/o elemento promotor/potenciador como elemento de un casete de expresión. Los promotores se pueden dividir en dos clases, los que funcionan constitutivamente y los que están regulados por inducción o desrepresión. Ambos son adecuados en conjunción con las presentes enseñanzas. Los promotores usados para la producción de alto nivel de proteínas en células de mamíferos deben ser fuertes y preferentemente activos en una amplia gama de tipos de células. Los promotores constitutivos fuertes que dirigen la expresión en muchos tipos de células incluyen, pero sin limitación, el promotor tardío principal de adenovirus, promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano, el SV40 y el promotor del virus del sarcoma de Rous, y el promotor de la 3-fosfoglicerato quinasa murina, EF1a. De acuerdo con una realización, el promotor y/o potenciador se obtiene bien sea a partir de CMV y/o SV40. Los promotores de la transcripción se pueden seleccionar del grupo que consiste en un promotor SV40, un promotor CMV, un promotor EF1alfa, un promotor RSV, un promotor BROAD3, un promotor rosa 26 murino, un promotor pCEFL y un promotor β -actina.

De acuerdo con una realización, el al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés, el polinucleótido que codifica el receptor de folato mutado y/o el polinucleótido que codifica un segundo marcador seleccionable están bajo el control de promotores de la transcripción separados. Los promotores separados de transcripción que promueven la expresión desde los polinucleótidos pueden ser iguales o diferentes.

De acuerdo con una realización, un promotor más fuerte y/o potenciador se usa para impulsar la expresión de al menos un polinucleótido que codifica el polipéptido de interés que para impulsar la expresión del polinucleótido que codifica el receptor de folato mutado y/o uno o más marcadores seleccionables adicionales. Esta disposición tiene el efecto de que se genera más transcripción para el polipéptido de interés que para los marcadores seleccionables. Es ventajoso que la producción del polipéptido de interés sea dominante frente a la producción de los marcadores seleccionables, ya que la capacidad celular individual para producir productos heterólogos no es ilimitada y, por lo tanto, debe enfocarse al polipéptido de interés. Además, el proceso de selección solo se produce en las etapas iniciales del establecimiento de una estirpe celular de expresión, que luego produce constantemente el polipéptido de interés. Por lo tanto, es ventajoso enfocar los recursos de las células para la expresión/producción del polipéptido de interés. Además, si se usa un promotor menos fuerte para expresar el marcador seleccionable en comparación con el usado para expresar el polipéptido de interés se aumenta aún más la presión de selección sobre las células hospedadoras transfectadas.

De acuerdo con una realización, el promotor que dirige la expresión del/ de los polinucleótido/s que codifican el polipéptido de interés es un promotor de CMV y el promotor que dirige la expresión del polinucleótido que codifica el receptor de folato mutado es un promotor SV40. El promotor de CMV es conocido por ser uno de los promotores

más fuertes disponibles para la expresión de mamíferos y conduce a una muy buena tasa de expresión. Se considera para proporcionar significativamente más transcripción que el promotor SV40. Sin embargo, también se pueden usar otros promotores.

5 De acuerdo con una realización adicional, el al menos un polinucleótido que codifica el polipéptido de interés y el polinucleótido que codifica el receptor de folato mutado y/o el polinucleótido que codifica un marcador seleccionable, si está presente, están bajo el control del mismo promotor de transcripción. Los promotores adecuados se describen anteriormente. En dicha realización, se obtiene una larga transcripción a partir del casete de expresión respectivo que está bajo el control de dicho promotor de transcripción. De acuerdo con una realización, al menos un elemento IRES está funcionalmente situado entre los polinucleótidos que se expresan a partir del mismo casete de expresión.

10 El vector de expresión o combinación de al menos dos vectores de expresión puede comprender un sitio de terminación de la transcripción adecuado como elemento de un casete de expresión. Esto, puesto que la transcripción continua de un promotor aguas arriba a través de una segunda unidad de transcripción puede inhibir la función del promotor aguas abajo, un fenómeno conocido como oclusión del promotor o interferencia de la transcripción. Los sitios de terminación de la transcripción están bien caracterizados y su incorporación en los
15 vectores de expresión se ha demostrado que tiene múltiples efectos beneficiosos sobre la expresión génica.

Los casetes de expresión pueden comprender un sitio de poliadenilación. Existen varias señales poli A eficientes que se pueden usar en vectores de expresión mamíferos, incluidos los derivados de la hormona de crecimiento bovina (BGH), beta-globina de ratón, la unidad de transcripción temprana SV40 y el gen de la timidina quinasa del virus del Herpes simple. Sin embargo, también se conocen sitios de poliadenilación sintéticos (véase, por ejemplo, el
20 vector de expresión pCI-neo de Promega que se basa en Levitt *et al.*, 1989, *Genes Dev.* 3, (7): 1019-1025). El sitio de poliadenilación puede seleccionarse del grupo que consiste en el sitio de SV40polyA, tal como el SV40 tardío y el sitio poli-A temprano (véase, por ejemplo, el plásmido pSV2-DHFR como se describe en Subramani *et al.*, 1981, *Mol. Cell. Biol.* 854-864), un sitio poliA sintético (véase, por ejemplo, el vector de expresión pCI-neo de Promega que se basa en Levitt *et al.*, 1989, *Genes Dev.* 3 (7): 1019-1025) y un sitio bgh poliA (hormona de crecimiento bovina).

25 Además, un casete de expresión puede comprender al menos un intrón. Por lo general, los intrones se colocan en el extremo 5' del marco de lectura abierto, pero también pueden colocarse en el extremo 3'. Por consiguiente, un intrón puede estar comprendido en el casete de expresión para aumentar la tasa de expresión. Dicho intrón puede estar situado entre el promotor y/o elemento/s de promotor/potenciador y el extremo 5' del marco de lectura abierto del polinucleótido que se expresa. Se conocen varios intrones adecuados en el estado de la técnica que se pueden usar
30 en conjunción con la presente divulgación. De acuerdo con una realización, el intrón usado en los casetes de expresión para expresar el polipéptido de interés es un intrón sintético tal como el intrón SIS o RK. El intrón RK consiste en el sitio de corte y empalme del intrón donante del promotor de CMV y el sitio aceptor de corte y empalme de la región variable de cadena pesada IgG de ratón (véase, por ejemplo, Eaton *et al.*, 1986, *Biochemistry* 25, 8343-8347, Neuberger *et al.*, 1983, *EMBO J.* 2 (8), 1373-1378; se puede obtener del vector pRK-5 (BD Pharmingen)) y se
35 coloca preferentemente antes del codón de inicio ATG del gen de interés.

El vector de expresión o combinación de vectores de acuerdo con la presente divulgación puede transfectarse en la célula hospedadora en su forma circular o en una forma linealizada. La linealización del vector de expresión antes de la transfección suele mejorar la eficiencia de una transfección estable. Esto también puesto que el punto de linealización se puede controlar si el vector de expresión se linealiza antes de la transfección. Los diseños
40 adecuados para dicho sitio de linealización se describen, por ejemplo, en el documento WO 2009/080720. El/los vector/es de expresión también puede/n comprender un origen de replicación procariota.

El vector de expresión o la combinación de vectores de expresión de acuerdo con la presente divulgación pueden comprender elementos adicionales para permitir la combinación del método de selección de acuerdo con la presente divulgación que se basa en el uso del receptor de folato mutado con otros sistemas de selección conocidos en la
45 técnica anterior.

Un método de selección establecido conocido en la técnica anterior se basa en el uso de citometría de flujo, en particular, la clasificación celular activadas por fluorescencia (FACS) con el fin de seleccionar células hospedadoras de alta expresión. Los métodos de selección que emplean citometría de flujo tienen la ventaja de que se pueden seleccionar grandes números de células rápidamente para el rendimiento de expresión característico deseado. En
50 un método de selección que es particularmente útil para identificar clones celulares de alta expresión, una porción del polipéptido de interés, por ejemplo, un anticuerpo, se expresa como polipéptido de fusión unido a membrana. De este modo, una porción del producto se muestra como polipéptido de fusión en la superficie celular. Como la cantidad de polipéptido de fusión producida se correlaciona con la tasa de expresión global, las células hospedadoras pueden seleccionarse a través de citometría de flujo con base en la cantidad de polipéptido de fusión
55 que aparece en la superficie celular. Esto permite la rápida selección de células hospedadoras de alta producción. El sistema de selección de acuerdo con la presente divulgación se puede combinar ventajosamente con métodos de selección respectivos que se basan en el uso de la citometría de flujo. Para permitir la selección eficiente usando FACS, preferentemente se usa un casete de expresión especial para expresar el polipéptido de interés. Así pues, de

acuerdo con una realización, el polinucleótido que codifica el polipéptido de interés está comprendido en un casete de expresión que está diseñado de manera que una porción del polipéptido expresado de interés comprende un anclaje de transmembrana. Existen varias opciones para alcanzar ese resultado.

5 De acuerdo con una realización, dicho casete de expresión para expresar el polipéptido de interés comprende al menos

- (i) el polinucleótido que codifica el polipéptido de interés,
- (ii) al menos un codón de parada aguas abajo del polinucleótido que codifica el polipéptido de interés, e
- (iii) un polinucleótido adicional aguas abajo del codón de parada que codifica un anclaje de membrana y/o una señal para un anclaje de membrana.

10 La transcripción del polinucleótido que codifica el polipéptido de interés comprendido en el casete de expresión descrito anteriormente resulta en un producto de transcripción que comprende en orden consecutivo al menos

- (i) un polinucleótido, en el que la traducción de dicho polinucleótido resulta en el polipéptido de interés;
- (ii) al menos un codón de parada aguas abajo de dicho polinucleótido;
- (iii) un polinucleótido adicional aguas abajo del codón de parada que codifica un anclaje de membrana y/o una

15 señal para un anclaje de membrana.

Una porción de la transcripción se traduce en un polipéptido de fusión que comprende el polipéptido de interés y el anclaje de membrana por medio de ultralectura de traducción de al menos un codón de parada. Este diseño del casete de expresión que tiene el efecto que los procesos de ultralectura de traducción (el codón de parada es "permeable") una porción del polipéptido de interés se produce como un polipéptido de fusión que comprende un anclaje de membrana. El resto se expresa como polipéptido de interés secretado. El polipéptido de fusión se muestra en la superficie celular, y las células que muestran altos niveles de polipéptido de fusión anclado a la membrana se pueden seleccionar por citometría de flujo, preferentemente mediante FACS, por ejemplo, usando técnicas apropiadas de tinción de superficie celular. De este modo, se seleccionan células hospedadoras que tienen una alta tasa de expresión. Detalles y realizaciones preferidas de esta tecnología basada en el codón de parada se describen en los documentos WO2005/073375 y WO2010/022961. Se hace referencia a dicha divulgación.

25

De acuerdo con una realización, el casete de expresión comprende, además, (iv) un polinucleótido que codifica un indicador, tal como, por ejemplo, GFP. Dicho polinucleótido que codifica el indicador está situado aguas abajo del codón de parada. Tras la ultralectura del codón de parada, se obtiene un polipéptido de fusión que comprende el indicador, permitiendo de este modo la selección por citometría de flujo basada en las características del indicador expresado como, por ejemplo, su fluorescencia. Preferentemente, el polinucleótido que codifica el indicador se encuentra aguas abajo del polinucleótido que codifica un anclaje de membrana.

30

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

- (i) el polinucleótido que codifica el polipéptido de interés,
- (ii) un intrón que comprende un sitio donante de corte y empalme en 5' y un sitio aceptor de corte y empalme en 3' y que comprende un codón de parada de la traducción marco y una señal de poliadenilación; y
- (iii) un polinucleótido aguas abajo del intrón que codifica un anclaje de membrana y/o una señal para un anclaje de membrana.

35

Este diseño del casete de expresión tiene el efecto de que, a través de la transcripción y el procesamiento de transcripción se obtienen al menos dos ARNm maduros distintos (ARNm-POI) y (ARNm-POI-ANCLAJE), a partir del casete de expresión. La traducción de ARNm-POI da lugar al polipéptido de interés. La traducción de ARNm-PDI-ANCLAJE da lugar a un polipéptido de fusión que comprende el polipéptido de interés (POI) y un anclaje de membrana. Como resultado, este polipéptido de fusión se muestra de nuevo en la superficie celular y se pueden seleccionar células que muestran altos niveles de polipéptido de fusión anclado a la membrana por citometría de flujo, preferentemente FACS. De este modo, se seleccionan células hospedadoras que tienen una alta tasa de expresión. Detalles y realizaciones preferidas de esta tecnología basada en intrones se describen en el documento WO2007/131.774. Se hace referencia a dicha divulgación. De acuerdo con una realización, el casete de expresión comprende, además, (iv) un polinucleótido que codifica un indicador, tal como, por ejemplo, GFP. Dicho polinucleótido que codifica el indicador está situado aguas abajo del intrón. De este modo, se obtiene un polipéptido de fusión que comprende el indicador, permitiendo de este modo la selección por citometría de flujo basada en las características del indicador tales como, por ejemplo, su fluorescencia. Preferentemente, el polinucleótido que codifica el indicador se encuentra aguas abajo del polinucleótido que codifica un anclaje de membrana. De este modo, el indicador está ubicado dentro de la célula hospedadora.

40

45

50

De acuerdo con una realización, el casete de expresión se construye de manera que se obtiene aproximadamente $\leq 50\%$, $\leq 25\%$, $\leq 15\%$, $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 2,5\%$, $\leq 1,5\%$, $\leq 1\%$ o menos de $\leq 0,5\%$ de polipéptido de fusión. La

porción restante se produce como la forma de polipéptido secretada que no comprende el anclaje de membrana. El anclaje de membrana puede ser de cualquier tipo siempre que permita el anclaje del polipéptido de interés a la membrana celular y, por lo tanto, permita la visualización del polipéptido de fusión en la superficie celular. Las realizaciones adecuadas incluyen, pero sin limitación, un anclaje de GPI o un anclaje de transmembrana. Se prefiere un anclaje de transmembrana para asegurar una unión fuerte del polipéptido de fusión a la superficie celular y evitar el desprendimiento de la proteína de fusión. En particular, se prefiere, particularmente cuando se expresan anticuerpos como polipéptido de interés, el uso de un ancla de transmembrana de inmunoglobulina. Otros anclajes de membrana y realizaciones preferidas de un anclaje de transmembrana de inmunoglobulina se describen en los documentos WO2007/131774, WO2005/073375 y WO 2010/022961.

De acuerdo con una realización, el polipéptido de interés es una molécula de inmunoglobulina tal como un anticuerpo. El polinucleótido que codifica la cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina y el polinucleótido que codifica la cadena ligera de una molécula de inmunoglobulina pueden estar comprendidos en el mismo casete de expresión o, preferentemente, están comprendidos en casetes de expresión separados, como se ha descrito anteriormente. Cuando se usa un diseño de casete de expresión como se ha descrito anteriormente, en el que una porción del polipéptido de interés se produce como el polipéptido de fusión anclado a membrana mediante una ultralectura de traducción o corte y empalme alternativo, dicho diseño del casete de expresión se usa para expresar la cadena pesada del anticuerpo.

Las células hospedadoras

De acuerdo con un segundo aspecto, la presente divulgación proporciona una célula hospedadora cuya viabilidad depende de la absorción del folato, que comprende al menos

a) un polinucleótido introducido que codifica un receptor de folato mutado que tiene una disminución de la afinidad de unión al folato en comparación con el receptor de folato de tipo silvestre como marcador seleccionable;

b) un polinucleótido introducido que codifica un polipéptido de interés,

en la que dicho polipéptido de interés es secretado por dicha célula hospedadora.

Un "polinucleótido introducido" se refiere a una secuencia de polinucleótido que se ha introducido en una célula hospedadora, por ejemplo, mediante el uso de técnicas recombinantes, tales como la transfección. La célula hospedadora puede o no comprender un polinucleótido endógeno correspondiente funcionalmente o que sea idéntico al polinucleótido introducido. Preferentemente, la introducción se consigue usando un vector de expresión que comprenda un casete de expresión que comprenda el polinucleótido que se va a introducir, por ejemplo, que codifica el polipéptido de interés o que codifica un receptor de folato mutado. Los ejemplos preferidos de vectores de expresión y la combinación de vectores de expresión de acuerdo con la presente divulgación se han descrito anteriormente en relación con el primer aspecto de la presente divulgación. La introducción puede conseguirse, por ejemplo, mediante la transfección de un vector de expresión adecuado que puede integrarse en el genoma de la célula hospedadora (transfección estable). Si el polinucleótido no se inserta en el genoma, se puede perder en la fase tardía, ej., cuando las células experimentan la mitosis (transfección transitoria). También podrían mantenerse vectores adecuados en la célula hospedadora sin integrar en el genoma, por ejemplo, mediante la replicación episomal. Se prefiere la transfección estable para la generación de clones celulares de alta expresión que sean adecuados para la producción de un polipéptido de interés a escala industrial. Hay varios métodos apropiados conocidos en la técnica anterior para la introducción de un polinucleótido como un vector de expresión en células hospedadoras eucariotas. Los respectivos métodos incluyen, pero sin limitación, la transfección con fosfato de calcio, electroporación, nucleofección, lipofección, biolística y transferencia de genes mediada por polímeros y similares. Además de los métodos tradicionales basados en la integración aleatoria también se pueden usar enfoques mediados por recombinación para transferir el polinucleótido que se va a introducir en el genoma de la célula hospedadora. Como los métodos respectivos son bien conocidos en la técnica anterior, estos no necesitan ninguna descripción detallada en el presente documento. Sin embargo, también se conocen otras técnicas en la técnica anterior para la introducción de un polinucleótido en una célula hospedadora que se describen con mayor detalle a continuación.

De acuerdo con una realización, la célula hospedadora comprende un vector de expresión o combinación de al menos dos vectores de expresión de acuerdo con el primer aspecto que se ha descrito en detalle anteriormente y en las reivindicaciones. Nos referimos a dicha divulgación que también se aplica en el presente documento. Preferentemente, dicho vector de expresión o combinación de vectores de expresión se integra de forma estable en el genoma.

Para permitir la selección con el sistema de acuerdo con la presente divulgación, la viabilidad celular de la célula hospedadora debe ser dependiente de la absorción del folato, preferentemente de la absorción de ácido fólico. Las

células eucariotas adecuadas pueden seleccionarse del grupo que consiste en células de mamífero, células de insecto, células de levadura, células vegetales y células de hongos. Las células de hongos y las células de vegetales pueden ser prototróficas para folatos (es decir, dichas células pueden sintetizar de manera autónoma sus propios folatos necesarios para su viabilidad celular, es decir, el crecimiento celular y la proliferación). La presente divulgación abarca dichas células de hongos y células vegetales que son o se han vuelto auxotróficas para los folatos. Esto puede deberse, por ejemplo, a la manipulación genética, es decir, las células son entonces incapaces de sintetizar cantidades suficientes de folatos necesarios para su viabilidad celular. Preferentemente, la célula hospedadora es una célula de mamífero. Todas las células de mamíferos son dependientes de la absorción del folato y, por consiguiente, se pueden usar en conjunción con el sistema de selección descrito en el presente documento. De acuerdo con una realización, la célula de mamífero se selecciona del grupo que consiste en una célula de roedor, una célula humana y una célula de mono. Particularmente, se prefiere una célula de roedor, que se pueda seleccionar del grupo que consiste en una célula CHO, una célula BHK, una célula NS0, una célula de fibroblastos de ratón 3T3, y una célula SP2/0. Una célula de roedor particularmente preferida es una célula CHO. También se pueden usar células humanas y se pueden seleccionar del grupo que consiste en una célula HEK293, una célula MCF-7, una célula PerC6, una célula CAP y una célula HeLa. Las células de mono se pueden seleccionar del grupo que consiste en una célula COS-1, una célula COS-7 y una célula Vero.

De acuerdo con una realización, la célula hospedadora es deficiente de la actividad completa de al menos un receptor de folato endógeno. Las respectivas estirpes celulares se pueden obtener a través de procesos de selección/detección o mediante técnicas de ingeniería genética, por ejemplo, con el fin de generar estirpes celulares desactivadas. Por lo tanto, también se proporciona una célula hospedadora, en la que el sistema de transporte de folato funcional unidireccional endógeno, por ejemplo, que comprende al menos un receptor de folato endógeno, está carente de la actividad completa, es decir, se atenúa. Dicha atenuación se puede proporcionar, por ejemplo, por cualquier tipo de mutagénesis del sistema de transporte de folato endógeno en cuestión, por ejemplo, el receptor de folato endógeno, por ejemplo, por mutación puntual, disrupción génica, y similares. La atenuación puede ser una parcial o completa. En este caso la célula hospedadora de acuerdo con la presente divulgación no comprende un sistema endógeno funcional unidireccional de transporte de folato, por ejemplo, un receptor de folato endógeno.

De acuerdo con una realización preferida, sin embargo, la célula hospedadora de acuerdo con la presente divulgación comprende al menos un sistema de transporte de folato endógeno funcional unidireccional además del receptor de folato mutado que se introduce en dicha célula hospedadora, por ejemplo, a través del vector de expresión o combinación de la expresión vectores descritos anteriormente, en particular, uno o más receptores de folato endógeno. Por lo tanto, las células genéticamente no alteradas se pueden usar para la transfección con el vector de expresión o combinación de vectores de expresión de acuerdo con la presente divulgación. Es una ventaja de la presente divulgación que el sistema de selección descrito en el presente documento se pueda usar incluso en presencia de dicho sistema endógeno unidireccional funcional de transporte de folato, es decir, donde se retiene dicho sistema endógeno. Esto es ventajoso, ya que el uso de las respectivas células hospedadoras para la posterior producción del polipéptido de interés que se produce bajo condiciones no selectivas para el folato es más fácil de manejar si el sistema se mantiene endógeno y, por lo tanto, funcional. Como se ha descrito anteriormente, se prefieren células hospedadoras de mamífero.

Por consiguiente, también se proporciona una célula hospedadora que comprende al menos un sistema de transporte de folato endógeno unidireccional funcional, en el que dicho sistema de transporte de folato endógeno funcional unidireccional comprende preferentemente al menos un receptor de folato endógeno. En una realización preferida de la misma, el receptor de folato endógeno se selecciona del grupo que consiste en receptor de folato alfa y receptor de folato beta.

De acuerdo con una realización, la célula hospedadora comprende además un polinucleótido introducido que codifica un marcador seleccionable adicional que está implicado en el metabolismo del folato. Se han descrito anteriormente realizaciones en relación con el primer aspecto y se hace referencia a la divulgación anterior. Preferentemente, dicho marcador seleccionable adicional es una DHFR. En conjunción con dicha realización, por ejemplo, las células hospedadoras (por ejemplo, las células CHO) que carecen del gen DHFR (por ejemplo, por eliminación genómica dirigida, también llamadas células hospedadoras DHFR- (menos) pueden usarse como receptores para la cotransfección del gen DHFR como marcador seleccionable. Sin embargo, también es posible y se prefiere usar células hospedadoras que expresen DHFR de manera endógena (células hospedadoras DHFR+ (más)), al realizar una selección de DHFR. En este caso, preferentemente, se usa una enzima DHFR como marcador seleccionable que es menos sensible a MTX que la enzima DHFR endógena expresada por la célula hospedadora DHFR+ (más).

De acuerdo con una realización, el metabolismo del folato endógeno o la maquinaria de la célula hospedadora no se alteran genéticamente antes de introducir los polinucleótidos por transfección.

El al menos un polinucleótido que codifica el polipéptido de interés, el polinucleótido que codifica el receptor de folato mutado y, opcionalmente, el polinucleótido que codifica el marcador seleccionable adicional implicado en el metabolismo del folato (que preferentemente es DHFR) y, opcionalmente, otros polinucleótidos como se ha descrito

anteriormente en conjunción con el primer aspecto se pueden introducir de forma estable en dicha célula hospedadora. La introducción estable respectivamente transfección es ventajosa para el establecimiento de estirpes celulares de expresión y, en particular, para la producción a gran escala de un polipéptido secretado de interés, tal como un anticuerpo.

5 Método para la producción de células hospedadoras recombinantes

De acuerdo con un tercer aspecto, se desvela un método para producir una célula hospedadora de acuerdo con el segundo aspecto que comprende introducir en una célula hospedadora cuya viabilidad depende de la absorción del folato al menos

- 10 a) un polinucleótido que codifica un receptor de folato mutado que tiene una disminución de la afinidad de unión al folato en comparación con el receptor de folato de tipo silvestre como marcador seleccionable; y
- b) al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés, en el que el polipéptido de interés es secretado por dicha célula hospedadora.

15 Hay varios métodos apropiados conocidos en la técnica anterior para la introducción de polinucleótidos y vectores de expresión en una célula hospedadora, incluyendo células hospedadoras eucariotas tales como las células hospedadoras de mamífero. Métodos respectivos son conocidos en la técnica anterior y también se describieron anteriormente. Además de los métodos basados en la integración aleatoria tradicionales también se pueden usar enfoques mediados de recombinación para transferir el polinucleótido que codifica el polipéptido de interés, el polinucleótido que codifica el receptor de folato mutado y, opcionalmente, el polinucleótido que codifica un marcador seleccionable adicional (y/u otros polinucleótidos) en el genoma de la célula hospedadora. Dichos métodos de recombinación pueden incluir el uso de recombinasas específicas del sitio como Cre, Flp o ΦC31 (véase, Oumard *et al.*, *Cytotechnology* (2006) 50: 93-108) que pueden mediar la inserción dirigida de transgenes. Como alternativa, se podría usar el mecanismo de recombinación homóloga para insertar dichos polinucleótidos (revisado en Sorrell *et al.*, *Biotechnology Advances* 23, (2005) 431-469). La inserción génica basada en la recombinación permite minimizar el número de elementos que deben incluirse en el ácido nucleico heterólogo que se transfiere/introduce en la célula hospedadora. Por ejemplo, se puede usar un sitio de inserción que proporcione promotor y sitio poli-A (exógeno o endógeno) de modo que solo los elementos restantes necesiten ser transferidos/transfectados a la célula hospedadora. Los detalles relacionados con el polipéptido de interés, el receptor de folato mutado y el uno o más marcadores seleccionables (si se usan), así como combinaciones de los mismos se describen en detalle anteriormente; nos referimos a la divulgación anterior. De acuerdo con una realización, se introduce un vector de expresión o una combinación de vectores de expresión de acuerdo con el primer aspecto en la célula hospedadora. El vector de expresión y la combinación de vectores de expresión se describen en detalle anteriormente y en las reivindicaciones. Esto se cita en la respectiva divulgación. Además, también se describieron ejemplos adecuados de células hospedadoras cuya viabilidad depende de la absorción del folato; esto se cita en la respectiva divulgación.

Método de selección

- 35 De acuerdo con un cuarto aspecto, la presente divulgación proporciona un método para seleccionar al menos una célula hospedadora capaz de expresar un polipéptido recombinante de interés con alto rendimiento, que comprende
- a) proporcionar una pluralidad de células hospedadoras de acuerdo con el segundo aspecto de la presente divulgación;
- 40 b) cultivar dicha pluralidad de células hospedadoras en un medio de cultivo selectivo que comprende una concentración limitante de folato; y
- c) obtener al menos una célula hospedadora que exprese el polipéptido de interés.

45 El término "seleccionar" o "selección", como se usa en el presente documento, en particular, se refiere a un proceso de uso de un marcador seleccionable y condiciones selectivas de cultivo para seleccionar y, por consiguiente, obtener células hospedadoras que han incorporado los polinucleótidos que se van a introducir tales como el vector de expresión o combinación de vectores de acuerdo con la presente divulgación. Se pueden obtener células hospedadoras transfectadas con éxito, por ejemplo, mediante el aislamiento y/o enriquecimiento a partir de una población de células hospedadoras transfectadas. Las células hospedadoras transfectadas con éxito son capaces de sobrevivir a las condiciones de selección y expresar el polipéptido de interés. El método de selección es un método *ex vivo*.

50 Una "concentración de folato limitante", como se usa en el presente documento, en particular, se refiere a una concentración de folato/s en el medio de cultivo selectivo que proporciona una presión selectiva sobre la célula hospedadora. Por consiguiente, los folatos no están comprendidos en el medio de cultivo selectivo en abundancia, y

esta limitación de folato/s en el medio de cultivo proporciona una presión de selección sobre las células hospedadoras. En dichas condiciones de selección, básicamente solo las células hospedadoras que han incorporado el receptor de folato como marcador seleccionable, crecen y/o se proliferan. Las células hospedadoras que no han incorporado con éxito los polinucleótidos que se van a introducir tales como el vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión y, por tanto, no expresan el receptor de folato mutado como marcador seleccionable o en las que la expresión es baja no pueden proliferar, crecer y/o morir bajo las condiciones de cultivo selectivas que proporcionan una concentración limitante de folato. En contraste, las células hospedadoras que han incorporado con éxito el vector de expresión o la combinación de vectores de acuerdo con la presente divulgación y que expresan el receptor de folato mutado como marcador seleccionable (y, por consiguiente, expresan el polipéptido de interés cointroducido) con suficiente rendimiento son resistentes a, o son menos afectadas por, la presión de selección y, por lo tanto, pueden, durante la selección, enmascarar las células hospedadoras que no fueron transfectadas con éxito o en las que el sitio de integración en el genoma de la célula no es favorable en el caso de la transfección estable.

El folato comprendido en el medio de cultivo selectivo en una concentración limitante es capaz de ser absorbido y procesado por la célula hospedadora, en particular por las células hospedadoras que han incorporado el receptor de folato mutado que se usa como marcador seleccionable. Los folatos y, en particular, los derivados de folato que no son procesados o que no pueden ser procesados por la célula hospedadora no contribuyen a la presión de selección que se ejerce para seleccionar células hospedadoras que han incorporado el receptor de folato como marcador seleccionable y, por consiguiente, no contribuyen a la concentración limitante de folato. Sin embargo, los folatos respectivos, tales como, por ejemplo, antifolatos, pueden estar presentes e incluso están presentes preferentemente, por ejemplo, si una selección combinada con DHFR como marcador seleccionable adicional se realiza como se describe en el presente documento. El folato presente en el medio de cultivo selectivo en una concentración limitante puede, por ejemplo, ser un folato oxidado o un folato reducido, o un derivado del mismo. Los folatos oxidados, tales como el ácido fólico, así como los derivados reducidos de ácido fólico, conocidos como folatos o tetrahidrofolatos reducidos (THF), son un grupo de vitaminas B9 que son cofactores esenciales y/o coenzimas para la biosíntesis de purinas, timidilato y ciertos aminoácidos en células de mamíferos. Los ejemplos de folatos reducidos incluyen ácido 5-metil-tetrahidrofólico, ácido 5-formil-tetrahidrofólico, ácido 10-formil-tetrahidrofólico y ácido 5,10-metilen-tetrahidrofólico. En general, un folato es útil siempre y cuando dicho folato sea capaz de ser absorbido y procesado por la célula hospedadora para mantener el crecimiento y la proliferación. Preferentemente, el folato que está comprendido en una concentración limitante en el medio de cultivo selectivo es el ácido fólico. Los intervalos de concentración adecuados para proporcionar una concentración limitante de ácido fólico se describen a continuación.

Durante la selección, las células hospedadoras que han incorporado con éxito vector/es de expresión de acuerdo con la presente divulgación se pueden enriquecer como una combinación de la población de células hospedadoras transfectadas. Esta combinación puede entonces, por ejemplo, analizarse para identificar células hospedadoras comprendidas que expresen el polipéptido de interés y, por ejemplo, que tengan particularmente buenas tasas de expresión, características de crecimiento y/o propiedades de estabilidad. También las células hospedadoras individuales se pueden aislar como clones individuales de la población de células hospedadoras transfectadas y seleccionadas (por ejemplo, por selección clonal o selección FACS). Las realizaciones adecuadas de procedimientos de selección con el fin de obtener clones individuales transfectados con éxito de la población de células hospedadoras supervivientes obtenidas después de la selección (por ejemplo, por clasificación FACS o dilución limitada) son bien conocidas en la técnica anterior y, por consiguiente, no necesitan descripción detallada.

Las realizaciones adecuadas y preferidas de las células hospedadoras, el marcador seleccionable mutado, los marcadores seleccionables adicionales y las combinaciones de marcadores, los vectores de expresión y las combinaciones de vectores se describen en detalle anteriormente y se conocen en la divulgación anterior.

Como se ha descrito, el método de selección de acuerdo con la presente divulgación se basa en la disponibilidad limitada de folato, preferentemente ácido fólico, en el medio de cultivo celular. El sistema es ampliamente aplicable y, en particular, se puede usar para seleccionar células eucariotas cuya viabilidad celular depende de la absorción del folato, en particular, del ácido fólico, tal como en células de mamífero particulares. Los ejemplos de células de mamíferos se han descrito anteriormente. Esta selección basada en ácido fólico en combinación con el uso del receptor de folato mutado como marcador seleccionable es una estrategia excelente que está bien adaptada para la sobreexpresión acelerada, estable y de alto nivel de polipéptidos en células de mamífero cultivadas. Como se muestra en los ejemplos, el método de acuerdo con la presente divulgación, en el que un receptor de folato mutado se usa como marcador seleccionable, permite una selección acelerada, detección y el establecimiento de células hospedadoras, en particular, células hospedadoras de mamífero, que sobreexpresan altos niveles de productos recombinantes tales como anticuerpos. Los resultados se mejoraron con el uso de un receptor de folato de tipo silvestre como marcador seleccionable.

El sistema de selección de acuerdo con la presente divulgación, como se describe anteriormente, no requiere una supresión genómica o la atenuación de los genes del receptor de folato endógeno antes de la transfección y, por lo tanto, se puede aplicar a cualquier célula receptora incluso si la expresión del gen del receptor de folato endógeno está presente. Esta ventaja clave se basa en el hecho de que, tras la transfección del receptor de folato mutado

como marcador seleccionable, las células pueden ser expuestas a una privación brusca y grave de folatos (por ejemplo, ácido fólico) del medio de crecimiento. Aquí, cuando se usa el receptor de folato mutado que tiene una afinidad de unión a folato inferior, se pueden usar concentraciones incluso más bajas de folato en el medio de cultivo selectivo en comparación con un sistema de selección que usa el receptor de folato de tipo silvestre. Solo las células transfectantes que expresan cantidades significativas del receptor de folato mutado como marcador seleccionable pueden transportar suficiente folato en la célula hospedadora para sostener la replicación del ADN y la proliferación celular. Esto incluso se produce en ausencia de cualquier aumento significativo en la expresión del gen del receptor endógeno de folato alfa durante el ciclo de selección. Además, el sistema de selección de acuerdo con la presente divulgación aparentemente no sufre la pérdida de la rigurosidad de selección debido a la mitigación de la presión selectiva a través de una mayor expresión de rutas alternativas de la absorción del folato incluyendo el aumento de la expresión de RFC endógeno. Esta ventaja es importante debido al hecho de que, mientras que el receptor de folato alfa tiene una afinidad excepcional para el ácido fólico ($K_d = 0,1 \text{ nM}$), la RFC muestra una afinidad extremadamente pobre para el ácido fólico ($K_m = 0,2-0,4 \text{ mM}$).

Las células obtenidas como resultado del procedimiento de detección/selección rigurosa de la presente divulgación pueden ser aisladas y enriquecidas a partir de células no seleccionadas de la población celular original. Estas pueden ser aisladas y cultivadas como células individuales o combinaciones de células. Las células hospedadoras obtenidas también se pueden usar en una o más series de selección, opcionalmente, para el análisis cualitativo o cuantitativo adicional, o se pueden usar, por ejemplo, en el desarrollo de una estirpe celular clonal para la producción de proteínas. De acuerdo con una realización, se usa una población enriquecida de células hospedadoras productoras seleccionadas como se ha descrito anteriormente directamente como población para la producción del polipéptido de interés con un buen rendimiento.

Preferentemente, se selecciona una célula hospedadora que se expresa de forma estable y, por lo tanto, segrega el polipéptido de interés. Las ventajas de una transfección/expresión estable se describen en detalle anteriormente. Nos referimos a la divulgación anterior. Preferentemente, se establece una estirpe celular clonal a partir de una célula hospedadora seleccionada que expresa la proteína de interés con el alto rendimiento deseado.

El medio de cultivo selectivo que se usa en al menos una etapa de selección b) puede comprender uno o más tipos de folato. El folato comprendido en el medio de cultivo selectivo en una concentración limitante es capaz de ser absorbido y procesado por las células hospedadoras transfectadas para permitir la supervivencia y permitir preferentemente mantener el crecimiento y la proliferación celular. El medio de cultivo selectivo que se usa en la etapa b) puede comprender una o más de las siguientes características:

(a) comprende una concentración limitante de folato, en el que dicho folato es preferentemente ácido fólico, en una concentración seleccionada de aproximadamente 2.000 nM o menos, aproximadamente 1.750 nM o menos, aproximadamente 1.500 nM o menos, aproximadamente 1.000 nM o menos, aproximadamente 500 nM o menos, aproximadamente 350 nM o menos, aproximadamente 300 nM o menos, aproximadamente 250 nM o menos, aproximadamente 150 nM o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 75 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 40 nM o menos, aproximadamente 35 nM o menos, aproximadamente 30 nM o menos, aproximadamente 25 nM o menos, aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente 15 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 5 nM o menos y/o aproximadamente 2,5 nM o menos y; y/o

(b) comprende ácido fólico en una concentración seleccionada de aproximadamente 2.000 nM o menos, aproximadamente 1.750 nM o menos, aproximadamente 1.500 nM o menos, aproximadamente 1.000 nM o menos, aproximadamente 500 nM o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 75 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 40 nM o menos, aproximadamente 35 nM o menos, aproximadamente 30 nM o menos, aproximadamente 25 nM o menos, aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente 15 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 5 nM o menos y/o aproximadamente 2,5 nM o menos.

Las concentraciones preferidas de folato y, en particular, ácido fólico en el medio de cultivo selectivo se pueden seleccionar entre:

- (a) aproximadamente 2.000 nM-0,1 nM;
- (b) aproximadamente 1.750 nM-0,1 nM;
- (c) aproximadamente 1.500 nM-0,1 nM;
- (d) aproximadamente 1.250 nM-0,1 nM;
- (e) aproximadamente 1.000 nM- 0,1 nM;
- (f) aproximadamente 750 nM-0,1 nM;
- (g) aproximadamente 500 nM-0,1 nM;
- (h) aproximadamente 250 nM-0,1 nM; preferentemente aproximadamente 250 nM-1 nM o aproximadamente 250 nM-2,5 nM;
- (i) aproximadamente 150 nM-0,1 nM; preferentemente aproximadamente 150 nM-1 nM o aproximadamente 150 nM-2,5 nM;

- (j) aproximadamente 100 nM–0,5 nM; preferentemente aproximadamente 100 nM-1 nM o aproximadamente 100 nM–2,5 nM;
- (k) aproximadamente 75 nM–0,5 nM, preferentemente aproximadamente 75 nM-1 nM o aproximadamente 75 nM–2,5 nM;
- (l) aproximadamente 50 nM-1 nM; preferentemente aproximadamente 50 nM-2,5 nM o aproximadamente 50 nM-5 nM;
- (m) aproximadamente 35 nM-0,5 nM; y
- (n) aproximadamente 25 nM-1 nM o aproximadamente 25 nM-2,5 nM, aproximadamente 20 nM-3 nM aproximadamente 15 nM-4 nM o 10 nM-5 nM.

10 De acuerdo con una realización, el ácido fólico es el único folato comprendido en el medio de cultivo selectivo que contribuye a la concentración limitante de folato.

15 Las concentraciones y los intervalos de concentración descritos anteriormente son particularmente adecuados para células en suspensión de crecimiento rápido, como las células CHO, que es un fenotipo preferido para las estirpes celulares de producción comercial. El folato comprendido en el medio de cultivo selectivo es preferentemente ácido fólico. Sin embargo, diferentes estirpes celulares pueden tener diferentes propiedades consumo de ácido fólico. Las concentraciones adecuadas, sin embargo, pueden ser determinadas experimentalmente con facilidad por el experto. Como se muestra en los ejemplos, el uso de un receptor de folato mutado como marcador seleccionable permite usar concentraciones de folato más bajas en el medio de cultivo selectivo.

20 De acuerdo con una realización, las células hospedadoras se cultivaron previamente en un medio de cultivo libre de folato o en un medio de cultivo que comprende una concentración limitante de folato antes de la etapa de transfección y/o selección b). De esta manera, las células se ven obligadas a usar sus depósitos de folato internos. Concentraciones limitantes adecuadas de folato se describen anteriormente. Preferentemente, dicho medio de cultivo para el cultivo previo de células hospedadoras comprende folato, en particular, ácido fólico en una concentración de 100 nM o menos, 75 nM o menos, 50 nM o menos, preferentemente 25 nM o menos, 15 nM, más preferentemente 15 nM o menos, lo más preferentemente 10 nM o menos, o incluso puede estar libre de folato. De acuerdo con una realización, se crea un banco de células, por ejemplo, un banco de células maestro o un banco de células de trabajo, a partir de tales células hospedadoras cultivadas previamente en concentraciones limitantes de folato, por ejemplo, ácido fólico. Esto tiene la ventaja de un tiempo de preparación más corto para la transfección y generación de la estirpe celular.

30 De acuerdo con una realización preferida, el receptor de folato mutado que se usa como marcador seleccionable de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación se usa en combinación con un marcador seleccionable adicional como se ha descrito anteriormente. Como se ha analizado anteriormente, dicho marcador seleccionable adicional participa preferentemente en el metabolismo del folato, y preferentemente es una DHFR. De acuerdo con una realización, en la que las células son transfectadas adicionalmente con un marcador seleccionable adicional, el medio de cultivo selectivo que se usa en la etapa b) comprende al menos un inhibidor adecuado para dicho marcador seleccionable adicional. La concentración usada de dicho inhibidor en el medio de cultivo selectivo (que también puede aumentarse gradualmente), contribuye a la rigurosidad de las condiciones de selección. Además, con el fin de mantener la presión de selección, el medio de cultivo no debe comprender cantidades suficientes de metabolitos que permitan eludir la actividad del marcador seleccionable adicional. Por ejemplo, si se usa DHFR como marcador seleccionable adicional que participa en el metabolismo del folato es ventajoso que el medio de cultivo selectivo no comprenda los nucleótidos relevantes. En general, los metabolitos u otros aditivos que interfieren con la estrategia de selección elegida deberán ser controlados, por ejemplo, evitados en el medio de selección.

45 Las condiciones de selección para el receptor de folato mutado (que limita la concentración de folato) y para el marcador seleccionable adicional (por ejemplo, un inhibidor de DHFR, si se usa DHFR como marcador seleccionable) se pueden aplicar simultáneamente en la etapa b) mediante el uso de un medio de cultivo selectivo apropiado. Esto aumenta la presión selectiva y permite un procedimiento de selección más eficiente, reduciendo así el tiempo para la obtención de estirpes celulares adecuadas que expresan un polipéptido de interés con alto rendimiento. Para la combinación del marcador seleccionable del receptor de folato mutado/DHFR un medio de cultivo selectivo se usa preferentemente en la etapa b), que comprende una concentración limitante de folato (concentraciones adecuadas y ejemplos de folato se describen anteriormente) y que comprende, además, un inhibidor de DHFR, tal como un antifolato. Un inhibidor de DHFR, en particular, se refiere a un compuesto que inhibe la actividad de la dihidrofolato reductasa (DHFR). Un inhibidor respectivo puede, por ejemplo, competir con el sustrato de DHFR para la unión a DHFR. Los inhibidores de DHFR adecuados son, por ejemplo, antifolatos tales como metotrexato (MTX). Otros ejemplos incluyen, pero sin limitación, glucuronato de trimetrexato (neutrexina), trimetoprim, pirimetamina y pemetrexed. Por lo tanto, de acuerdo con una realización, el medio de cultivo selectivo usado en la etapa b) comprende además al menos un inhibidor de DHFR, preferentemente un antifolato tal como MTX.

Así pues, de acuerdo con una realización, las células hospedadoras proporcionadas en la etapa a) comprenden además un polinucleótido introducido que codifica un marcador seleccionable que es una DHFR y, en la etapa b), se

usa un medio de cultivo selectivo que comprende un antifolato en una concentración de 1.500 nM o menos, 1.250 nM o menos, 1.000 nM o menos, 750 nM o menos, 500 nM o menos, 250 nM o menos, 200 nM o menos, 150 nM o menos, 125 nM o menos, 100 nM o menos o 75 nM o menos. De acuerdo con una realización, el medio de cultivo selectivo comprende MTX como antifolato. Preferentemente, el medio de cultivo selectivo comprende MTX en una concentración de aproximadamente 350 nM o menos, 200 nM o menos, preferentemente aproximadamente 150 nM o menos, 125 nM o menos, 100 nM o menos, 75 nM o menos, o 50 nM o menos. Como se muestra en los ejemplos, es una ventaja particular que concentraciones muy bajas de MTX se puedan usar en conjunción con el método de la presente divulgación. Las concentraciones preferidas de antifolato y, en particular, MTX se pueden seleccionar entre:

- 5 (a) aproximadamente 500 nM-1 nM;
- (b) aproximadamente 350 nM-2,5 nM;
- (c) aproximadamente 200 nM-5 nM;
- (d) aproximadamente 150 nM-7,5 nM;
- 10 (e) aproximadamente 100 nM-10 nM; y
- 15 (f) aproximadamente 75 nM-10 nM.

Las concentraciones preferidas y los intervalos de concentración para el folato y antifolato descritos anteriormente se pueden combinar entre sí. En una realización, se usa una concentración de folato de aproximadamente 0,1 nM-100 nM, preferentemente 1 nM - 75 nM, más preferentemente 5 nM-50 nM en combinación con una concentración de antifolato de 2,5 nM-150 nM, preferentemente de 5 nM a 125 nM, más preferentemente de 7,5 nM a 100 nM, más preferentemente de 10 nM a 50 nM en el medio de cultivo de selección. Como se ha descrito, preferentemente el ácido fólico se usa como folato y MTX como antifolato.

Además, también se encontró que las concentraciones de folato y antifolato usadas pueden influir entre sí. Así pues, además de la concentración absoluta de los folatos y antifolatos, la relación también puede ser un factor para proporcionar condiciones de selección adecuadas. La concentración de antifolatos (preferentemente MTX), puede ser de hasta 20 veces aproximadamente la concentración de folato (ácido fólico preferentemente). La concentración de antifolato (preferentemente MTX) puede ser de 10 veces aproximadamente la concentración de folato (ácido fólico preferentemente). Preferentemente, el medio de cultivo selectivo comprende un folato y un antifolato en una relación de concentración de 1:10 a 10:1, preferentemente en una relación de concentración de 1:5 a 5:1. Se obtienen muy buenos resultados si se usan concentraciones equimolares aproximadas de folato y antifolato. Como se muestra en los ejemplos, estas relaciones proporcionan condiciones de cultivo selectivas muy adecuadas para obtener células hospedadoras de alta producción si se usa la combinación deseada de marcadores seleccionables.

Esta realización de acuerdo con la presente divulgación, en la que el receptor de folato mutado se usa en combinación con un marcador seleccionable que participa en el metabolismo del folato, preferentemente DHFR, para la selección tiene la ventaja de que la productividad de la población de células supervivientes a la selección se aumenta notablemente. En particular, la productividad media se aumenta notablemente como se muestra por los ejemplos, si este principio se usa en conjunción con el receptor de folato mutado de acuerdo con la presente divulgación. Los ejemplos han mostrado que las células hospedadoras obtenidas después del método de selección producen el polipéptido de interés con un alto rendimiento particular. Así pues, se mejoran las posibilidades de encontrar un alto productor de clones con pocos esfuerzos de detección. Por lo tanto, el sistema de selección de acuerdo con la presente divulgación es superior a los sistemas de selección usados en la técnica anterior.

Además, se encontró que las tasas de productividad se pueden aumentar incluso aún más, si la etapa de selección b) se lleva a cabo al menos dos veces, y en el que, entre cada etapa de selección b), las células transfectadas se cultivan en un medio de cultivo que comprende concentraciones de folato no limitantes o al menos limitantes y preferentemente sin inhibidor de DHFR y, por tanto, por ejemplo, sin antifolato. Por lo tanto, entre cada etapa de selección b) se prefiere cultivar las células en condiciones no selectivas. Se encontró que una respectiva selección repetida, en la que a las células se les permitió recuperarse entre las etapas de selección o ciclos de selección, proporciona células hospedadoras que expresan la proteína de interés con un particular alto rendimiento y, además, el número de altos productores se aumentó significativamente.

Como se ha descrito anteriormente, también se puede usar uno o más marcadores seleccionables además del receptor de folato mutado y además del marcador seleccionable que participa en el metabolismo del folato. Las condiciones selectivas para dicho marcador seleccionable adicional se pueden aplicar antes de la (por ejemplo, una etapa de selección previa que se realiza en medio de las etapas a) y b)) o simultáneamente con la aplicación en la etapa b), las condiciones selectivas para el receptor de folato mutado y, opcionalmente, el marcador seleccionable que participa en el metabolismo del folato. Por ejemplo, en caso de usarse el gen de neomicina fosfotransferasa (neo) como marcador seleccionable adicional, las células se pueden cultivar primero en un medio, por ejemplo, que contenga G418 con el fin de seleccionar previamente células que han incorporado el vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión de acuerdo con la presente divulgación. Entonces, se seleccionan las células de elevada expresión a partir de dicha población de células seleccionadas previamente, usando la selección basada en el receptor de folato mutado, de acuerdo con una realización ventajosa en

combinación con una selección basada en DHFR.

Además, como se ha descrito anteriormente, el método de selección de acuerdo con la presente divulgación se puede combinar con métodos de selección de citometría de flujo conocidos basados en la técnica anterior. Así pues, de acuerdo con una realización, se realiza una etapa de selección que implica la citometría de flujo tras la selección de las células hospedadoras de acuerdo con el método de la presente divulgación y, por lo tanto, después de la etapa c). Esto se puede hacer con el fin de seleccionar las células hospedadoras de la población superviviente que expresan el polipéptido de interés con un alto rendimiento. Dicho enfoque hace que las etapas de clonación manuales (por ejemplo, dilución limitada) queden obsoletas. Para este fin, preferentemente al menos una porción del polipéptido de interés se expresa como un polipéptido de fusión anclado a membrana que se muestra en la superficie celular de la célula hospedadora. Basada en la cantidad de polipéptido de fusión que se muestra, las células hospedadoras pueden seleccionarse usando citometría de flujo, preferentemente usando FACS, que expresan el polipéptido de interés con alto rendimiento. Los casetes de expresión adecuados para expresar el polinucleótido que codifica el polipéptido de interés que permiten una selección respectiva se han descrito anteriormente. Esto se cita en la respectiva divulgación. Para la selección, las células hospedadoras se cultivan para permitir la expresión del polipéptido de interés de manera que al menos una porción del polipéptido de interés se expresa como un polipéptido de fusión que comprende el anclaje a la membrana, en la que dicho polipéptido de fusión se muestra en la superficie de dicha célula hospedadora, y en la que al menos una célula hospedadora se selecciona basándose en la cantidad del polipéptido de fusión que aparece en la superficie celular. Aquí, se puede usar un compuesto de detección marcado que se une a la porción extracelular de la proteína de fusión. Por ejemplo, se pueden usar compuestos de detección marcados con fluorescencia. Como alternativa, la proteína de fusión puede comprender además un indicador tal como GFP, que marca la célula, permitiendo así la selección directa basada en las características del indicador. Preferentemente, el indicador se encuentra aguas abajo de un anclaje de transmembrana y, por lo tanto, situado intracelularmente. Como se ha analizado anteriormente, las células hospedadoras pueden seleccionarse para basarse en el rendimiento de expresión mediante citometría de flujo, en particular, FACS.

Método para producir un polipéptido de interés

De acuerdo con un quinto aspecto, se proporciona un procedimiento para producir un polipéptido recombinante de interés, que comprende la etapa de cultivar una célula hospedadora de acuerdo con la presente divulgación y/o una célula hospedadora seleccionada de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación en condiciones que permitan la expresión y secreción del polipéptido de interés. El uso de las células hospedadoras de acuerdo con la presente divulgación para producir un polipéptido de interés tiene la ventaja de que el polipéptido de interés se puede producir con alto rendimiento. Esto es, en particular, al realizar el método de selección de acuerdo con la presente divulgación para la selección de células hospedadoras apropiadas para la expresión. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un método mejorado para producir un polipéptido de interés. Las células hospedadoras adecuadas se han descrito anteriormente; nos referimos a la divulgación anterior.

El polipéptido se secreta en el medio de cultivo y se puede obtener del mismo. Para este fin, un péptido líder secretor apropiado se proporciona en el polipéptido de interés. Los ejemplos se han descrito anteriormente. De este modo, se pueden producir y obtener/aislar polipéptidos recombinantes de manera eficiente con un alto rendimiento. De acuerdo con una realización, dichas células hospedadoras se cultivan en condiciones libres de suero.

El método para producir el polipéptido de interés puede comprender al menos una de las siguientes etapas:

- aislar el polipéptido de interés a partir de dicho medio de cultivo celular; y/o
- procesar el polipéptido aislado de interés.

El polipéptido de interés producido de acuerdo con la divulgación también puede someterse a otras etapas de procesamiento tales como, por ejemplo, etapas de purificación y/o modificación con el fin de producir el polipéptido de interés en la calidad deseada. Por ejemplo, el producto puede ser recuperado del medio nutritivo por procedimientos convencionales incluyendo, pero sin limitación, centrifugación, filtración, ultrafiltración, extracción o precipitación. La purificación se puede realizar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrófoba, cromatografía de exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, enfoque isoelectrico preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato amónico) o extracción. El polipéptido aislado de interés puede ser formulado como composición farmacéutica.

Los ejemplos para el polipéptido de interés se describieron anteriormente en relación con el primer aspecto y se refiere a la respectiva divulgación. La célula de mamífero puede o no comprender un polinucleótido endógeno correspondiente a, respectivamente siendo idéntica, al polinucleótido que codifica el polipéptido de interés. De acuerdo con una realización, la célula de mamífero no comprende un gen endógeno correspondiente al polipéptido de interés. También se proporciona un polipéptido obtenido por un método de acuerdo con la presente divulgación como se define anteriormente y en las reivindicaciones. Dicho polipéptido puede ser, en particular, una molécula de

inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma.

Usos

Un sexto aspecto de la presente divulgación se refiere al uso de un polinucleótido que codifica

a) un receptor de folato mutado que tiene o que comprende la secuencia siguiente

IAWARTELLNVCMNAAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEXaaHKDVSYL
 YR FNWNHCGEMAPACKRHFQDTCLYECSPNLGPWQQVDQSWRKERVNLVPLCKEDCEQW
 WEDCRYSYTCKSNWHKGNWWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTSHYKVS
 N YSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYA (SEQ ID NO 9)

5

en la que Xaa no es alanina y en la que la afinidad de unión a folato del receptor de folato mutado se reduce en comparación con el correspondiente receptor de folato de de tipo silvestre en el que Xaa es alanina (SEQ ID NO 1);

o

10 b) un receptor de folato mutado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % con la secuencia mostrada como SEQ ID NO 9, y en la que Xaa no es alanina en dicho receptor de folato mutado y en la que la afinidad de unión a folato de dicho receptor de folato mutado se reduce en comparación con la secuencia alfa del receptor de folato maduro de tipo silvestre en el que Xaa es alanina (véase SEQ ID NO 1),

15

como marcador seleccionable. Dicho marcador seleccionable se puede usar para la selección de células hospedadoras transfectadas con éxito cuya viabilidad es dependiente de la absorción del folato tales como, en particular, células de mamífero. En particular, se puede usar como marcador de selección para identificar células hospedadoras que expresan un polipéptido recombinante de interés con alto rendimiento. Preferentemente, dicho receptor de folato mutado está comprendido en un vector de expresión. Los detalles, combinaciones y ventajas de usar un receptor de folato mutado respectivamente como marcador seleccionable y vectores de expresión apropiados se han descrito anteriormente, refiriéndose a la divulgación anterior. En particular, se prefiere el uso en los métodos de la presente divulgación. Como se ha descrito anteriormente, Xaa es preferentemente un aminoácido seleccionado de leucina, glicina, valina, isoleucina, histidina y ácido aspártico. Lo más preferentemente, Xaa es leucina. Preferentemente, el receptor de folato mutado está anclado a GPI. De acuerdo con una realización, dicho marcador seleccionable se usa en combinación con DHFR como marcador seleccionable adicional. Los detalles de esta realización y condiciones de selección apropiados se han descrito anteriormente, refiriéndose a la divulgación anterior.

20

25

Un séptimo aspecto de la presente divulgación se refiere al uso de un polinucleótido que codifica

30 a) un receptor de folato mutado que comprende la siguiente secuencia:

IAWARTELLNVCMNAAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEXaaHKDVSYL
 YR FNWNHCGEMAPACKRHFQDTCLYECSPNLGPWQQVDQSWRKERVNLVPLCKEDCEQW
 WEDCRYSYTCKSNWHKGNWWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTSHYKVS
 N YSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYA (SEQ ID NO 9)

o

IAWARTELLNVCMNAAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEXaaHKDVSYL
 YR FNWNHCGEMAPACKRHFQDTCLYECSPNLGPWQQVDQSWRKERVNLVPLCKEDCEQW
 WEDCRYSYTCKSNWHKGNWWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTSHYKVS
 N YSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAMSGAGPWAAWPFLLSLALMLLWLLS
 (SEQ ID NO 13)

en la que Xaa es leucina;
o

5 b) un receptor de folato mutado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % con la secuencia mostrada como SEQ ID NO 9 o SEQ ID NO 13, y en la que Xaa es leucina en dicho receptor de folato mutado de acuerdo con b),

10 como marcador seleccionable. Dicho marcador seleccionable se puede usar para la selección de células cuya viabilidad es dependiente de la absorción del folato tales como, en particular, células de mamífero. En particular, se puede usar como marcador de selección para identificar células hospedadoras que expresan un polipéptido recombinante de interés con alto rendimiento. Preferentemente, dicho receptor de folato mutado que se usa como
15 marcador seleccionable está comprendido en un vector de expresión. Los detalles, combinaciones y ventajas de usar un receptor de folato mutado (mutante A49L) como marcador seleccionable y de vectores de expresión apropiados se han descrito anteriormente, y también se describen en los ejemplos. Esto se cita en la respectiva divulgación. En particular, se prefiere el uso en los métodos de la presente divulgación. Preferentemente, el receptor de folato mutado está anclado a GPI. De acuerdo con una realización, dicho marcador seleccionable se usa en combinación con DHFR como marcador seleccionable adicional. Los detalles de esta realización y condiciones de selección apropiados se han descrito anteriormente, refiriéndose a la divulgación anterior. Las realizaciones preferidas de este séptimo aspecto se describen de nuevo en lo siguiente.

20 De acuerdo con una realización del séptimo aspecto, se usan un vector de expresión o una combinación de al menos dos vectores de expresión comprendiendo:

a) un polinucleótido que codifica un receptor de folato mutado como marcador seleccionable, en el que

i) dicho receptor de folato mutado comprende la siguiente secuencia

IAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEXaaHKDVSYL
YRFNWNHCGEMAPACKRHFQDTCLECSNLPWQVQDQSWRKERVNLVPLCKED
CEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGNWWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWT
HSYKVSNSYRSGRGIQMWFDPAQGNPNEEVARFYA (SEQ ID NO 9)

o

IAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEXaaHKDVSYL
YRFNWNHCGEMAPACKRHFQDTCLECSNLPWQVQDQSWRKERVNLVPLCKED
CEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGNWWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWT
HSYKVSNSYRSGRGIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAMSGAGPWAAWPFLLSLAL
25 MLLWLLS (SEQ ID NO 13)

en la que Xaa es leucina;
o

30 ii) dicho receptor de folato mutado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % con la secuencia mostrada como SEQ ID NO 9 o SEQ ID NO 13, y en la que Xaa es leucina en dicho receptor de folato mutado de acuerdo con ii);

b) al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés.

35 Preferentemente, el polinucleótido que codifica el receptor de folato mutado y el polinucleótido que codifica el polipéptido de interés están comprendidos en casetes de expresión separados. Los detalles de realizaciones adecuadas y preferidas de casetes de expresión y vectores de expresión se han descrito anteriormente, y refiriéndose a la divulgación anterior. Preferentemente, el polipéptido de interés es un polipéptido secretado. Los detalles se describen anteriormente en relación con el primer aspecto. De acuerdo con una realización, el vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión comprende además un polinucleótido que codifica un marcador seleccionable que participa en el metabolismo del folato, preferentemente una dihidrofolato

reductasa. Las realizaciones adecuadas y preferidas se han descrito anteriormente, refiriéndose a la divulgación anterior. Dicho marcador seleccionable, que es preferentemente DHFR, está comprendido preferentemente en un casete de expresión separado.

5 De acuerdo con una realización de este aspecto, también se proporciona una célula hospedadora cuya viabilidad depende de la absorción del folato, que comprende

a) un polinucleótido introducido que codifica un receptor de folato mutado, en el que

i) dicho receptor de folato mutado comprende la siguiente secuencia

IAWARTELLNVC MNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEXaaHKDVSYL
YRFNWNHCGEMAPACKRHF IQDTCLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERV LNVP LCKED
CEQWWEDCRTSYTCKSNWHK GWNWTS GFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWT
HSYKVS NYSRGSGRCIQMWFDP AQGNPNEEV ARFYA (SEQ ID NO 9)

o

IAWARTELLNVC MNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEXaaHKDVSYL
YRFNWNHCGEMAPACKRHF IQDTCLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERV LNVP LCKED
CEQWWEDCRTSYTCKSNWHK GWNWTS GFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWT
HSYKVS NYSRGSGRCIQMWFDP AQGNPNEEV ARFYAAAMSGAGPWAAWPFLLSLAL
10 MLLWLLS (SEQ ID NO 13)

en la que Xaa es leucina;

o

15 ii) dicho receptor de folato mutado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % con la secuencia mostrada como SEQ ID NO 9 o SEQ ID NO 13, y en la que Xaa es leucina en dicho receptor de folato mutado de acuerdo con ii) y

b) al menos un polinucleótido introducido que codifica un polipéptido de interés, en el que el polipéptido de interés es secretado por dicha célula hospedadora.

20 Preferentemente, dicha célula hospedadora comprende un vector de expresión o una combinación de al menos dos vectores de expresión como se ha descrito anteriormente. De acuerdo con una realización, la célula hospedadora es una célula de mamífero. Preferentemente, es una célula de roedor, más preferentemente una célula CHO. De acuerdo con una realización, la célula hospedadora de mamífero expresa un receptor de folato endógeno. De acuerdo con una realización, la célula hospedadora de mamífero comprende un polinucleótido introducido que codifica un marcador seleccionable que participa en el metabolismo del folato, que preferentemente es una dihidrofolato reductasa. Las realizaciones adecuadas y preferidas se han descrito en detalle anteriormente, así como métodos para producir una célula hospedadora respectiva. Esto se cita en la respectiva divulgación.
25

De acuerdo con una realización de este aspecto, también se proporciona un método para seleccionar al menos una célula hospedadora capaz de expresar un polipéptido recombinante de interés con un rendimiento deseado, que comprende

30 a) proporcionar una pluralidad de células hospedadoras cuya viabilidad depende de la absorción del folato, que comprende

aa) un polinucleótido introducido que codifica un receptor de folato mutado, en el que

i) dicho receptor de folato mutado comprende la siguiente secuencia

IAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEXaaHKDVSYL
YRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERVNLVPLCKED
CEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWT
HSYKVSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYA (SEQ ID NO 9)

o

IAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEXaaHKDVSYL
YRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERVNLVPLCKED
CEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWT
HSYKVSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAMSGAGPWAAWPFLLSLAL
MLLWLLS (SEQ ID NO 13)

en la que Xaa es leucina;

o

ii) dicho receptor de folato mutado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % con la secuencia mostrada como SEQ ID NO 9 o SEQ ID NO 13, y en la que Xaa es leucina en dicho receptor de folato mutado de acuerdo con ii) y

bb) al menos un polinucleótido introducido que codifica un polipéptido de interés.

b) cultivar dicha pluralidad de células hospedadoras en un medio de cultivo selectivo que comprende folato en una concentración limitante; y

c) obtener al menos una célula hospedadora que exprese el polipéptido de interés.

El medio de cultivo selectivo usado en la etapa b) comprende una concentración limitante de folato, en el que dicho folato es preferentemente ácido fólico, en una concentración seleccionada de aproximadamente 2.000 nM o menos, aproximadamente 1.750 nM o menos, aproximadamente 1.500 nM o menos, aproximadamente 1.000 nM o menos, aproximadamente 500 nM o menos, aproximadamente 350 nM o menos, aproximadamente 300 nM o menos, aproximadamente 250 nM o menos, aproximadamente 150 nM o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 75 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 40 nM o menos, aproximadamente 35 nM o menos, aproximadamente 30 nM o menos, aproximadamente 25 nM o menos, aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente 15 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 7,5 nM o menos, aproximadamente 5 nM o menos y aproximadamente 2,5 nM o menos. Preferentemente, el ácido fólico se usa como folato. Preferentemente, la célula hospedadora es una célula de mamífero. De acuerdo con una realización, la célula hospedadora de mamífero comprende además un polinucleótido introducido que codifica un marcador seleccionable que es una dihidrofolato reductasa. En dicha realización, el medio de cultivo selectivo usado en la etapa b) comprende además de acuerdo con una realización, un antifolato en una concentración seleccionada de 1.500 nM o menos, 1.000 nM o menos, 750 nM o menos, 500 nM o menos, 200 nM o menos, 150 nM o menos, 125 nM o menos, 100 nM o menos, 75 nM o menos, 50 nM o menos, 25 nM o menos, 20 nM o menos, 15 nM o menos, 12 nM o menos y 10 nM o menos. De acuerdo con una realización, después de la etapa c), las células se cultivan en un medio de cultivo que comprende una concentración no limitante de folato y luego se cultivan de nuevo de acuerdo con la etapa b) y se obtienen de acuerdo con la etapa c). Más detalles de los medios de cultivo selectivos preferidos y adecuados, y realizaciones del método de selección se han descrito anteriormente en relación con el cuarto aspecto, refiriéndose a la respectiva divulgación.

De acuerdo con una realización adicional de este aspecto, también se proporciona un procedimiento para producir un polipéptido de interés, que comprende

a) cultivar una célula hospedadora como se describe en los párrafos precedentes de este aspecto y/o una célula hospedadora seleccionada de acuerdo con el método descrito en los párrafos precedentes de este aspecto en condiciones que permitan la expresión y secreción del polipéptido de interés;

b) aislar el polipéptido de interés a partir del medio de cultivo celular; y

c) opcionalmente, procesar el polipéptido aislado de interés.

Los detalles relativos a un método de producción correspondiente, así como las realizaciones adecuadas y preferidas del polipéptido de interés también se han descrito anteriormente, refiriéndose a la divulgación anterior. Preferentemente, el polipéptido de interés es un polipéptido terapéuticamente activo tal como un anticuerpo.

5 La presente invención no está limitada por los ejemplos de métodos y materiales desvelados en el presente documento. Los intervalos numéricos descritos en el presente documento incluyen los números que definen el intervalo. Los encabezamientos proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la presente invención, que pueden leerse como referencia a la memoria descriptiva en conjunto. De acuerdo con una realización, la materia objeto descrita en el presente documento como aquella que comprende ciertos elementos también se refiere a la materia objeto que consiste en los elementos respectivos. En particular, los polinucleótidos descritos en el presente documento como aquellos que comprenden ciertas secuencias también pueden consistir en las respectivas secuencias. Se prefiere seleccionar y combinar realizaciones preferidas descritas en el presente documento, y la materia objeto específica que surge de una combinación respectiva de las realizaciones preferidas también pertenece a la presente divulgación.

15 Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente divulgación sin limitar en modo alguno el alcance de la misma. En particular, los ejemplos se refieren a realizaciones preferidas de la presente divulgación.

Ejemplos

En los experimentos posteriores, se usaron los siguientes vectores. El vector de referencia "V-DHFRref" compuesto por los siguientes casetes de expresión principales: Un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica DHFR como marcador de selección; un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica la cadena ligera de un anticuerpo; un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica la cadena pesada de un anticuerpo y un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica una fosfotransferasa de neomicina. Todos los casetes de expresión estaban orientados en la misma dirección. Un anticuerpo completo se expresa a partir de dicho vector de referencia. Un diseño de vector adecuado también se describe en el documento WO 2009/080720.

25 Los vectores que comprenden un receptor de folato como marcador de selección se diseñaron basándose en el vector de referencia mediante el intercambio del polinucleótido que codifica DHFR como marcador seleccionable en contra de un polinucleótido que codifica un receptor de folato como marcador seleccionable. Por lo demás, los casetes de expresión siguen siendo los mismos. El vector "V-wtFRalpha" comprende el receptor de folato alfa humano de tipo silvestre como marcador de selección. El vector "V-mutFRalpha" comprende el receptor de folato alfa humano mutante que comprende la mutación A49L.

Ejemplo 1: Transfecciones individuales

Para transfecciones individuales, se introdujeron el receptor del ácido fólico alfa humano de tipo silvestre (vector: V-wtFRalpha) o un receptor del folato alfa humano mutante (vector: V-mutFRalpha) como marcadores de selección en células CHO. Este experimento tiene el fin de analizar la función del sistema de selección de receptor de folato, que, en contraste con el sistema DHFR/MTX, no se basa en una inhibición tóxica del crecimiento celular, sino en una inhibición del crecimiento debido a la privación de ácido fólico en el medio de cultivo. El ácido fólico es la forma oxidada de la vitamina B9. El ácido fólico es biológicamente activo en su forma reducida, tetrahidrofolato (THF). El ácido fólico se reduce en la célula en su forma biológicamente activa tetrahidrofolato (THF) a través del dihidrofolato (DHF) en una reacción dependiente de NADPH por la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR). La absorción de ácido fólico es esencial para las células de mamífero con el fin de sostener el crecimiento celular y la proliferación celular.

Solo las células que integran el vector transfectado en el genoma y expresan ya sea el receptor de folato alfa de tipo silvestre (V-wtFRalpha) o el receptor de folato alfa mutado (V-mutFRalpha) con una alta eficiencia pueden sobrevivir a las condiciones de selección que se basan en una concentración limitante de ácido fólico en el medio de cultivo. Estas células son capaces de incorporar una cantidad suficiente de ácido fólico del medio de cultivo en las células a fin de sostener la proliferación en el crecimiento celular a pesar de que el medio de cultivo comprenda una concentración limitante de ácido fólico. Debido a que los vectores de expresión también introducen los polinucleótidos que codifican una proteína de interés (en estos experimentos, la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo) en las células, es posible seleccionar líneas celulares estables de alta producción usando la tecnología de selección basada en el receptor de folato.

50 Con el fin de determinar la influencia de la concentración de ácido fólico en el crecimiento de las células, se probaron diferentes medios de cultivo selectivo. El medio de cultivo patrón comprende 11,7 μM de ácido fólico (medio completo). Se encontró que las condiciones de selección más rigurosas se lograron al usar ≤ 50 nM de ácido fólico en el medio de cultivo. Además, no se observaron diferencias en las tasas de crecimiento cuando se usaron diferentes concentraciones de ácido fólico. Cuanto menos ácido fólico en el medio de cultivo, más lento fue el crecimiento de las células.

En primer lugar, los depósitos de ácido fólico internos de las células CHO se redujeron y se evitó un cotransferencia de ácido fólico a partir del medio de cultivo patrón (medio completo) en el medio de selección. Por lo tanto, antes de la transfección, las células destinadas para la selección con una concentración de ácido fólico limitante se lavaron tres veces con PBS y se inocularon en medio libre de ácido fólico. El control de referencia (vector V-DHFRref) se pasó con la misma densidad que en las células en medio completo. El crecimiento de las células se analizó antes de la transfección y se encontró, que el cultivo que se cultivó en medio completo (5×10^6 LZ/ml) creció aproximadamente 2 veces mejor que el cultivo que se cultivó en medio de selección ($2,5 \times 10^6$ LZ/ml).

Los vectores se transfectaron en las células usando nucleofección. Las células vitales 5×10^6 (LZ/ml) fueron transfectadas con $3 \mu\text{g}$ de vector de ADN. Las células CHO que comprenden los vectores V-wtFRalpha, V-mutFRalpha y los controles negativos (V-DHFRref y sin ADN) se transfirieron al medio de selección; las transfecciones de referencia se transfirieron a medio completo. Las transfecciones individuales realizadas se resumen en la Tabla 1. La selección comenzó 48 horas después de la transfección, permitiendo así que las células se recuperaran de la nucleofección y para iniciar la expresión de los vectores de expresión introducidos. Las células que comprenden los marcadores de selección que se van a ensayar fueron expuestas a concentraciones limitadas de ácido fólico. En paralelo, el marcador de selección DHFR (V-DHFRref) se expuso a diferentes medios de cultivo que comprendían MTX, así como a diferentes medios de selección que contenían ácido fólico (FA). Un cultivo sin ADN adicional sirvió como control negativo.

Tabla 1: Información general sobre las transfecciones individuales realizadas

Transfección	Vector	Significado	Medio antes/después de la transfección	El medio de selección después de 48 h
1 – 4	V-DHFRref	control de referencia	medio completo	MTX $2 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, 500 nM , 250 nM o 125 nM , medio completo
5 – 8	V-DHFRref	control negativo	medio selectivo	FA 50 nM , 45 nM , 35 nM , 25 nM , 15 nM o 5 nM
9 – 12	sin ADN	control negativo	medio selectivo	FA 50 nM , 45 nM , 35 nM , 25 nM , 15 nM o 5 nM
13 – 16	V-wtFRalpha	FR alfa de tipo silvestre	medio selectivo	FA 50 nM , 45 nM , 35 nM , 25 nM , 15 nM o 5 nM
17 – 20	V-mutFRalpha	FR alfa mutante	medio selectivo	FA 50 nM , 45 nM , 35 nM , 25 nM , 15 nM o 5 nM

La eficiencia de la transfección se determinó después de 48 h a través de un control de GFP. La siguiente Tabla 2 proporciona una visión general sobre la densidad de las células viables alcanzada en el día 12 de la selección a base de ácido fólico.

Tabla 2: Información general sobre la densidad celular (LZ/ml) a 12 días de selección basada en el ácido fólico (FA)

	Sin ADN	V-DHFRref (DHFR)	V-wtFRalpha (FR α)	V-mutFRalpha (FR α^*)
FA 50 nM	$2,10 \times 10^6$	$1,74 \times 10^6$	$2,34 \times 10^6$	$4,37 \times 10^6$
FA 45 nM	$1,66 \times 10^6$	$1,58 \times 10^6$	$1,44 \times 10^6$	$3,31 \times 10^6$
FA 35 nM	$1,06 \times 10^6$	$9,53 \times 10^5$	$7,29 \times 10^5$	$2,39 \times 10^6$
FA 25 nM	$2,55 \times 10^5$	$1,66 \times 10^5$	$2,38 \times 10^5$	$6,75 \times 10^5$
FA 15 nM	$1,09 \times 10^5$	$1,39 \times 10^5$	$2,72 \times 10^5$	$7,57 \times 10^5$
FA 5 nM	$1,02 \times 10^4$	$3,73 \times 10^4$	$3,73 \times 10^4$	$3,63 \times 10^5$

La Tabla 2 muestra la densidad celular [LZ/ml] de las combinaciones de células transfectadas con los controles (V-DHFRref; sin ADN), V-wtFRalpha y V-mutFRalpha, y seleccionadas usando diferentes concentraciones de ácido fólico. Como puede verse, el crecimiento se reduce cuando la concentración de ácido fólico en el medio de selección se reduce. Las combinaciones de células que fueron transfectadas con el receptor de folato alfa mutado como marcador de selección muestran un crecimiento de las células en el medio de selección que comprende concentraciones limitantes de ácido fólico, que es aproximadamente dos veces más alto o incluso mayor que el crecimiento de las células que se observa en las otras combinaciones. Al día 12, las células transfectadas con el receptor de folato alfa de tipo silvestre no muestran todavía una ventaja de crecimiento. Estas crecieron aproximadamente igual de bien que las poblaciones que comprenden V-DHFRref o los controles negativos. Sin embargo, se observa una ventaja de crecimiento con el receptor de folato alfa de tipo silvestre en una etapa de diseño posterior que comienza - dependiendo de la concentración de ácido fólico usada - aprox. del día 16 al 20. Por lo tanto, ambos tipos de receptores de folato (de tipo silvestre y mutante) son adecuados para la selección de células

en base a una concentración limitante de ácido fólico en el medio de cultivo. Sin embargo, el uso de un receptor de folato alfa mutado como marcador seleccionable tal como se enseña en la presente divulgación es más ventajoso debido a que se observa antes una ventaja de crecimiento de las células transfectadas exitosamente que con el receptor de folato alfa de tipo silvestre. Además, el receptor de folato mutado permitió una selección con concentraciones de ácido fólico inferiores, tales como 15 nM e incluso 5 nM. Por lo tanto, se pueden usar condiciones de selección más rigurosas cuando se usa un receptor de folato mutado de acuerdo con la divulgación como marcador de selección.

Al analizar la viabilidad de las combinaciones de células el día 12 de la selección, la viabilidad observada fue aproximadamente la misma a concentraciones de ácido fólico de 35-50 nM (viabilidad de las combinaciones de células > 90 %). Debido a la alta viabilidad, fue posible el paso de las poblaciones en este día.

Sin embargo, a concentraciones más bajas de ácido fólico, se redujo la viabilidad. En los medios selectivos de ácido fólico más bajos, solo la población de V-mutFRalpha transfectada mostró una viabilidad relativamente alta del 76 %.

Además, se analizó el tiempo necesario para la selección. El tiempo total que se necesita para la selección es importante cuando se establece un nuevo marcador de selección. Cuando se cultivan células CHO, se puede completar una etapa de selección individual selección DHFR-MTX dependiendo de las condiciones de selección usadas dentro de 15 a 16 días. La amplificación de genes de varias etapas, sin embargo, por lo general, tarda mucho más. Durante este período de tiempo, las células deben recuperarse de la crisis que es inducida por la presión de selección. La Tabla 3 muestra el número de días de la selección hasta el siguiente paso, es decir, el período de tiempo que se necesita para que las células consigan una viabilidad de más del 90 % y, en consecuencia, lograr que las células se puedan usar para una selección de la titulación de anticuerpos.

Tabla 3: Curso temporal de la selección en días

	Sin ADN	V-DHFRref (DHFR)	V-wtFRalpha (FR α)	V-mutFRalpha (FR α^*)
FA 50 nM	12	12	12	12
FA 45 nm	12	12	12	12
FA 35 nM	12	12	12	12
FA 25 nM	16	55	20	16
FA 15 nM	55	55	20	16
FA 5n M	55	55	55	16

La Tabla 3 muestra el número de días de la selección hasta el siguiente paso, es decir, el marco de tiempo necesitado por las células para superar la crisis de selección y lograr una viabilidad de más del 90 %. Como se puede observar, al principio, todas las combinaciones de células se recuperan cuando se cultivan en un medio selectivo que comprende ácido fólico 50, 45 o 35 nM. Sin embargo, las concentraciones de ácido fólico inferiores ponen una presión de selección más alta en las células, de modo que solo el uso de V-mutFRalpha permitió una buena recuperación y, por lo tanto, la viabilidad después de 16 días en estas condiciones muy rigurosas. Aquí, la población transfectada con V-mutFRalpha se recuperó y mostró una viabilidad de más del 90 % en un medio de selección que comprendía solamente ácido fólico 5 nM a 25 nM. Las células transfectadas con V-wtFRalpha necesitaban más tiempo, y no pudieron recuperarse a las concentraciones de ácido fólico muy bajas.

Ejemplo 2: Determinación de la productividad de los anticuerpos

Con el fin de analizar el éxito de la transfección y selección basada en la expresión del gen de interés (en este caso, un anticuerpo de referencia), las células obtenidas, es decir, seleccionadas de acuerdo con el ejemplo 1, se cultivaron como cultivos discontinuos en matraces de agitación durante 13 días a fin de determinar la productividad de las células después de la selección. Las células tenían una viabilidad de más del 90 %. En el día 13, se determinó la concentración de anticuerpo en el sobrenadante del cultivo usando cromatografía de afinidad de proteína A [mg/l]. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Concentración de anticuerpo (Anticuerpo monoclonal) en el sobrenadante del cultivo en lotes (mg/l)

Vector	Selección	Título de anticuerpos monoclonales (mg/l)
V-DHFRref	MTX 125 nM	28
	FA 11 μ M	6,6
	FA 50 nM	6,9

Vector	Selección	Título de anticuerpos monoclonales (mg/l)
	FA 45 nM	6,9
	FA 35 nM	10,1
Sin ADN	FA 50 nM	8,2
	FA 45 nM	8,3
	FA 35 nM	6,4
	FA 25 nM	6,7
V-wtFRalpha	FA 50 nM	7,1
	FA 45 nM	8,6
	FA 35 nM	9
	FA 25 nM	7
	FA 15 nM	24
V-mutFRalpha	FA 50 nM	9,4
	FA 45 nM	11
	FA 35 nM	13,9
	FA 25 nM	17,2
	FA 15 nM	22,1
	FA 5 nM	26,6

El anticuerpo expresado a partir de los vectores de expresión introducidos se pudo detectar en todas las poblaciones celulares. Como también se determinaron bajas cantidades de anticuerpo en las combinaciones que no fueron transfectadas con el ADN, solo se determinaron valores de más de 9 mg/l como significativos. La población de referencia en MTX 125 nM (sistema de selección DHFR/MTX convencional) produjo 28 mg/l. Los resultados de las cuatro poblaciones de células transfectadas con V-wtFRalpha estaban a las concentraciones más altas de ácido fólico en el intervalo de referencia. Sin embargo, cuando se redujo la concentración de ácido fólico en el medio de cultivo a 15 nM, la expresión de anticuerpo fue aproximadamente igualmente alta (24 mg/l) que con el control de referencia V-DHFRref en MTX 125 nM (28 mg/l). Esto confirma el hallazgo anterior de que el receptor de folato de de tipo silvestre puede servir como marcador de selección y lograr una eficiencia comparable al sistema DHFR/MTX establecido, a pesar de no usarse agentes tóxicos para la selección. Las combinaciones de células que fueron transfectadas con V-mutFRalpha mostraron un aumento lineal en el título del anticuerpo, que era dependiente de la concentración de ácido fólico en el medio de cultivo. Cuanto menor fue la concentración de ácido fólico en el medio de cultivo, más alta fue la tasa de expresión del anticuerpo resultante.

Por lo tanto, el uso del receptor de folato mutado de acuerdo con la divulgación como marcador de selección tiene ventajas frente al uso de un receptor de folato de de tipo silvestre como marcador de selección.

Como el número de transgenes integrados tiene una influencia importante en la tasa de expresión, el número de copias de los elementos más importantes, a saber, las cadenas ligeras y pesadas (LC, HC) del anticuerpo expresado, así como el número de copias del receptor de folato (mutado o de de tipo silvestre) se determinó usando PCR cuantitativa basándose en el ADN genómico de las combinaciones de células.

Con respecto al título medido del anticuerpo, el número de copias puede proporcionar indirectamente una visión con respecto a la cuestión de si el lugar de la integración en el genoma era responsable de una expresión fuerte o débil. El análisis de PCR cuantitativo tal como se realiza en el presente documento proporciona un valor medio de los números de copias del transgén, ya que no hay clones de células individuales; sin embargo, se analizó una población de diferentes células que sobrevivieron a la selección. (

Tabla 5: Determinación del número de copias mediante PCR cuantitativa

		número de copias por genoma haploide (corregido con proporción de folato)		
		número de copias	número de copias	
		HC	LC	FR α /FR α *
CHO precursora	Medio completo	0,0	0,0	1,48
V-DHFRref	MTX 125 nM	2,26	2,27	1,33
	FA 35 nM	5,50	6,82	1,45
sin ADN	FA 25 nM	0,00	0,00	1,66
V-wtFRalpha	FA 50 nM	0,40	0,38	1,95
	FA 45 nM	0,89	0,90	2,48
	FA 35 nM	1,00	0,99	2,83
	FA 25 nM	0,25	0,25	1,66
	FA 15 nM	0,88	0,75	2,62
V-mutFRalpha	FA 50 nM	1,65	1,98	2,32
	FA 45 nM	2,99	2,99	3,02
	FA 35 nM	2,47	2,86	2,91
	FA 25 nM	3,20	4,02	3,11
	FA 15 nM	5,42	6,83	4,56
	FA 5 nM	6,20	7,33	5,18

La Tabla 5 muestra los resultados del análisis PCR cuantitativo de transfectantes V-wtFRalpha y V-mutFRalpha después de la selección. A partir de las combinaciones de control, se analizó una combinación que había sobrevivido a la mayor rigurosidad de selección (V-DHFRref: MTX 125 nM, ácido fólico 35 nM, sin ADN: ácido fólico 25 nM). Además, las células no transfectadas cultivadas con CHO sin presión de selección se analizaron como control negativo. La Tabla 5 muestra el número de copias para la cadena ligera y la cadena pesada, así como el número de copias para el receptor de folato que se usó como marcador de selección. Los valores se refieren al tamaño teórico del genoma de las células CHO. La Tabla 5 muestra que en las células CHO no transfectadas, como se esperaba, no se pudieron determinar secuencias de anticuerpo. Además, únicamente se determinaron las copias del receptor fólico alfa de tipo silvestre endógeno. El control de referencia V-DHFRref seleccionado con MTX 125 nM muestra en promedio una integración doble de los transgenes de anticuerpos. Al mirar la población V-DHFRref seleccionada con ácido fólico 35 nM, se puede ver una integración mucho mayor de las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo. Se detectaron 5,5 copias de la cadena pesada y 6,8 copias de la cadena ligera. El número de copias de los genes FR alfa es comparable a las células CHO parentales y es atribuible a los alelos endógenos.

Las combinaciones que se transfectaron con V-wtFRalpha mostraron sólo algunas copias de HC y LC en comparación con los controles con V-DHFRref. No se observaron diferencias dependientes de la concentración. El número de copias del receptor de folato se aumentó de 50 nM a 35 nM de ácido fólico en 2,8 copias, pero después se disminuyó a 25 nM. Además, la combinación que fue seleccionada con ácido fólico 15 nM había incorporado en promedio 2,6 copias de las cadenas de anticuerpos. En contraste, las combinaciones de células transfectadas con V-mutFRalpha mostraron un aumento casi lineal en las copias de genes de las cadenas de anticuerpo que eran en paralelo a la reducción del ácido fólico en el medio de selección. Por lo tanto, cuanto menor fue la concentración de ácido fólico en el medio de selección, se detectó un mayor número de copias de los genes de LC y HC en las células seleccionadas. El número de copias del gen del receptor de folato alfa mutado mostraron una tendencia comparable. La combinación que fue seleccionada usando ácido fólico 5 nM que tenía aproximadamente tres veces más copias del anticuerpo integrado que el control de referencia V-DHFRref seleccionado con MTX 125 nM.

Ejemplo 3: Clonación de células individuales

Para desarrollar una estirpe celular que produzca de forma estable un gen de interés con alto rendimiento, es necesario seleccionar de la población obtenida de las diferentes células productoras que sobrevivieron a la selección de acuerdo con el ejemplo 1 los mejores clones celulares que muestran una expresión alta de anticuerpos tasa y buen crecimiento celular. Con este fin, se generaron estirpes celulares a partir de células individuales mediante dilución limitante. La dilución limitante permite obtener una población celular monoclonal a partir de la masa policlonal de las células que sobrevivieron a la selección de acuerdo con el ejemplo 1. Esto se consigue mediante la creación de una serie de diluciones crecientes del cultivo celular precursor (policlonal). Se prepara una suspensión de las células precursoras. Luego, se realizan las diluciones apropiadas, dependiendo del número de células en la población de partida. Tras producir las diluciones finales, se coloca una única célula en el pocillo de una placa de cultivo celular y se crea un clon a partir de ella. El establecimiento de una población de células monoclonales garantiza una expresión de anticuerpo estable durante un período prolongado de tiempo. Las poblaciones de células seleccionadas V-wtFRalpha (ácido fólico 15 nM), V-mutFRalpha (ácido fólico 5 nM), V-DHFRref (MTX 125 nM) y V-DHFRref (MTX 250 nM - de una transfección diferente) se clonaron respectivamente. La clonación se realizó en un medio completo y, además, en un medio de selección correspondiente que se usó previamente para la selección. Por lo tanto, en este último caso, se mantuvo la presión de selección durante la clonación de células individuales. Después de un crecimiento con éxito, los clones que estaban en una confluencia de más del 70 % se transfirieron a placas de 24 pocillos y se ensayaron en un cultivo en lotes (duración 10 días) para su producción de anticuerpos. Durante el cultivo de lotes de nuevo se usó ya sea medio completo (sin presión de selección) o medio de selección (presión de selección mantenido). Los clones fueron alineados (dependiendo del medio) desde el nivel más alto hasta el nivel más bajo de expresión. Los resultados se muestran en las figuras 1 a 4.

Se muestran los resultados de clonación obtenidos, ya sea en medio completo (sin mantener la presión de selección después de la selección) y un medio de selección (se mantuvo la presión de selección después de la selección). Aquí, se ve el desarrollo típico de un procedimiento de clonación manual. Se encontraron de 1 a 5 clones de células de alta producción, y tras ello, la curva desciende rápidamente a poca o incluso ninguna expresión en los clones celulares. Además, dentro de los clones celulares de baja producción, se observó un amplio espectro de productividades de células, en el que, sin embargo, la mayoría era inferior al umbral de 9 mg/l.

La clonación de las células transfectadas con V-DHFRref (seleccionado con MTX 125 nM) en medio completo y medio de selección dio como resultado 86 clones (53 en medio completo, 33 en medio de selección) de las placas de 6 x 96 pocillos. El clon de producción más alta se cultivó en medio de selección y produjo 28,4 mg/l en el lote de 24 pocillos. En el matraz de agitación de 250 ml (50 ml en total), la combinación policlonal original también alcanzó un título de 28 mg/l. La clonación de las células transfectadas con V-DHFRref (seleccionado con MTX 250 nM) en medio completo y medio de selección permitió aislar 76 clones (41 en medio completo y 35 en medio selectivo). Los tres mejores clones fueron aislados a partir de células cultivadas en medio completo después de la selección, por lo demás, las células cultivadas en el medio selectivo mostraron una mayor productividad general que los clones en medio completo. La combinación policlonal de partida tuvo un título de 27 mg/l, el clon de células de mayor producción llegó a 42 mg/l en 24 pocillos. Ambos controles de referencia muestran que no necesariamente la concentración más alta de MTX usada durante la selección dio lugar al título más alto. Con el fin de ser capaz de aislar el mejor clon, es necesario analizar un número elevado de clones de células.

Las células transfectadas con el vector V-wtFRalpha que comprende el receptor de folato alfa de tipo silvestre como marcador seleccionable (seleccionado con ácido fólico 15 nM) también se clonaron ya sea en medio completo (no se mantiene la presión de selección después de la selección) o en medio de selección (de ese modo se mantiene la presión de selección durante la clonación). Los dos clones que produjeron los clones más altos fueron aislados en medio selectivo. El mejor clon llegó a 53 mg/l en un formato de 24 pocillos. Fue notable que solo 7 clones sobrevivieran en este medio selectivo. En el medio completo, sobrevivieron 49 clones. La combinación original tenía, en un matraz de agitación de 250 ml, una concentración de anticuerpo de aproximadamente 24 mg/l.

Las células transfectadas con el vector V-mutFRalpha que comprende el receptor de folato alfa mutado como marcador seleccionable (seleccionado con ácido fólico 5 nM) también se clonaron ya sea en medio completo (no se mantiene la presión de selección después de la selección) o en medio de selección (de ese modo se mantiene la presión de selección después de la selección durante la clonación). Los dos mejores clones se aislaron del medio completo, así como también del medio selectivo. El clon de producción más alto tenía un título de 42 mg/l en el sobrenadante. En total, se pudieron transferir cien clones a las placas de 24 pocillos, así 52 en medio completo y 48 en medio selectivo. Aquí, los resultados similares se obtuvieron en medio selectivo y completo. La Tabla 6 resume los índices de productividad de los clones con mejor producción.

Tabla 6: Información general acerca de los clones con mayor producción (Acm [mg/l]) después de la dilución de punto final

V-wtFRalpha FA 15 nM	53,5
V-mutFRalpha FA 5 nM	42,1
V-DHFRref MTX 125 nM	28,4
V-DHFRref MTX 250 nM	41,6

La Tabla 6 muestra que la selección con los dos marcadores seleccionables receptor de folato alfa de tipo silvestre (V-wtFRalpha) y receptor de folato alfa mutado (V-mutFRalpha) proporcionó, después de la clonación de células individuales, clones que alcanzaron en el experimento de clonación resultados al menos igual de buenos que el marcador seleccionable de referencia DHFR. Experimentos adicionales (véase más adelante) muestran que también las altas tasas globales de productividad se pueden obtener al usar el receptor de folato mutado de acuerdo con la presente divulgación como marcador seleccionable.

Ejemplo 4: Experimentos de cotransfección

Con el fin de analizar la rigurosidad de la selección y la eficiencia de una presión de selección doble en forma de una privación de ácido fólico en el medio de selección y adición de MTX, las células fueron cotransfectadas con V-DHFRref y V-mutFRalpha. Todos los vectores transfectados comprendían los mismos genes de anticuerpos que las proteínas de interés. Se cotransfectaron dos vectores de expresión separados, en los que cada vector comprende los casetes de expresión para expresar la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo. Antes de la transfección, las células CHO (excepto para las células que se usaron para el control de referencia DHFR) se lavaron tres veces con PBS con el fin de reducir las transferencias ácido fólico del medio completo y se pasaron a medio selectivo para la transfección. El paso de las células CHO usadas para la transfección del control de referencia V-DHFRref se realizó en medio completo.

Los vectores se transfectaron en las células usando nucleofección. En contraste con las transfecciones de vectores individuales, la doble cantidad de células (1×10^7 LZ/ml) y la doble cantidad de ADN (3 μ g por vector) se transfectaron para la cotransfección. A nivel celular, la cantidad de ADN transfectada fue, sin embargo, la misma. Las células CHO que fueron transfectadas con V-DHFRref/V-mutFRalpha y los controles se transfirieron a un medio selectivo; las transfecciones de referencia se transfirieron a medio completo. La selección comenzó 48 horas después de la transfección. Tres transfecciones por entorno de prueba se combinaron después de 48 h, se centrifugaron y se volvieron a suspender en 9 ml de medio de selección o medio completo y se dividieron como tripletes a los tres medios de selección. Los tres lotes de combinaciones de células cotransfectadas y los controles fueron expuestos a tres concentraciones diferentes de ácido fólico/MTX para la selección. En paralelo a la misma, el control de referencia se realizó con el vector V-DHFRref usando una selección G418/MTX. Aquí, las células se cultivaron en medio completo que comprende ácido fólico en abundancia. Para iniciar el ciclo de selección, se añadieron entonces los agentes selectivos para inducir la presión de selección. Como control negativo se realizó una transfección sin la adición de ADN. La transfección realizada y medios de cultivo usados se resumen en la siguiente tabla 7.

Tabla 7: Información general sobre las transfecciones individuales realizadas

Vector	Significado	Medio antes/después de la transfección	Condiciones de selección
V-mutFRalpha + V-DHFRref	FRmut + DHFR	Medio selectivo de ácido fólico	FA/MTX [nM]: 50/50, 50/100 o 12.5/50
sin ADN	control negativo	Medio selectivo de ácido fólico	FA/MTX [nM]: 50/50, 50/100 o 12,5/50
V-DHFRref	control positivo	medio completo	0,8 mg/ml de G-418, seguido de 500 nM y MTX 1 μ M

Después de completar la selección, se prepararon cultivos en lotes a partir de las células seleccionadas con el fin de determinar la tasa de expresión de los genes de anticuerpos integrados. Durante el cultivo en lotes, las poblaciones celulares se cultivaron en medio completo. En todas las poblaciones celulares, las concentraciones de anticuerpo se determinaron después de 13 días de cultivo en lotes para la cotransfección y la transfección de referencia usando cromatografía de afinidad de la proteína. Con el fin de determinar la expresión de anticuerpos. Los resultados se muestran en la tabla 8, en la que los cultivos en lotes se nombran de acuerdo con su origen en el medio de selección, es decir, llevan el nombre de la selección realizada (50/50, 50/100, 12.5/50 [nM FA/nM MTX] o V-DHFRref-G418-MTX - realizado en tripletes). No se muestran las combinaciones de células que no sobrevivieron. Una vez más, debido al método de medición usado, solo los valores por encima de 9 mg/l se consideran significativos.

Tabla 8: Concentración de anticuerpo (Anticuerpo monoclonal) en el sobrenadante de cultivo en lotes en [mg/l]

Transfecciones de vectores y condiciones de selección	Acm mg/l
V-mutFRalpha/V-DHFRref - FA/MTX [nM]: 50/50 (combinación de células 1)	17,7
V-mutFRalpha/V-DHFRref - FA/MTX [nM]: 50/50 (combinación de células 2)	25,6
V-mutFRalpha/V-DHFRref - FA/MTX [nM]: 50/50 (combinación de células 3)	21,5

Transfecciones de vectores y condiciones de selección	Acm mg/l
V-mutFRalpha/V-DHFRref - FA/MTX [nM]: 50/100 (combinación de células 1)	35,8
V-mutFRalpha/V-DHFRref - FA/MTX [nM]: 50/100 (combinación de células 2)	15,4
V-mutFRalpha/V-DHFRref - FA/MTX [nM]: 12,5/50 (combinación de células 1)	34,4
V-mutFRalpha/V-DHFRref - FA/MTX [nM]: 12,5/50 (combinación de células 2)	24,7
V-mutFRalpha/V-DHFRref - FA/MTX [nM]: 12,5/50 (combinación de células 3)	5,9
V-DHFRref - G418-MTX (combinación celular 1)	55
V-DHFRref - G418-MTX (combinación celular 2)	21
V-DHFRref - G418-MTX (combinación celular 3)	57,2

Como se puede ver en la tabla 8, las combinaciones del método de referencia DHFR producidas después de las tres etapas de selección (0,8 mg/ml G418 - MTX 500 nM – MTX 1 μ M) hasta 58 mg/l de título de anticuerpo. A partir de la cotransfección usando V-mutFRalpha/V-DHFRref, casi todas combinaciones de células sobrevivieron cuando las células se transfirieron después de la selección en medio completo. Las combinaciones de V-mutFRalpha/V-DHFRref procedentes del medio de la selección 50/50 produjo hasta 25 mg/l, las combinaciones- las poblaciones 50/100 y 12,5/50 produjeron títulos de hasta 36 mg/l.

Se usaron tres ciclos de selección consecutivos en el método de referencia de DHFR, debido a que una selección G418 fue seguida de dos ciclos de selección de MTX (MTX 500 nM y 1 μ M). Por lo tanto, se probó además si las tasas de expresión se pueden aumentar cuando se realizan dos ciclos de selección usando una concentración limitante de ácido fólico y MTX en el medio de cultivo celular. Por lo tanto, después de realizar el primer ciclo de selección usando una concentración limitante de ácido fólico y MTX (con respecto a las concentraciones usadas véase más arriba), las células se transfirieron a un medio completo para permitir la recuperación. Después, las células se expusieron de nuevo en un segundo ciclo de selección al mismo medio selectivo y, por lo tanto, a la misma presión de selección. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9: Concentración de anticuerpo (Acm) en el sobrenadante del cultivo en lotes en [mg/l] después de realizar dos ciclos de selección

Transfecciones de vectores y condiciones de selección	Acm mg/l
V-mutFRalpha/V-DHFRref - FA/MTX [nM]: 50/50 (combinación de células 1)	388,5
V-mutFRalpha/V-DHFRref - FA/MTX [nM]: 50/50 (combinación de células 2)	72,4
V-mutFRalpha/V-DHFRref - FA/MTX [nM]: 50/50 (combinación de células 3)	667,9
V-mutFRalpha/V-DHFRref - FA/MTX [nM]: 50/100 (combinación de células 1)	132,3
V-mutFRalpha/V-DHFRref - FA/MTX [nM]: 12,5/50 (combinación de células 1)	230,3
V-mutFRalpha/V-DHFRref - FA/MTX [nM]: 12,5/50 (combinación de células 2)	105,4
V-mutFRalpha/V-DHFRref - FA/MTX [nM]: 12,5/50 (combinación de células 3)	8,6

La Tabla 9 muestra que cuando las células transfectadas con V-mutFRalpha/V-DHFRref fueron expuestas de nuevo a la presión de selección después de 35-38 días, las células mostraron un muy alto aumento significativo en la producción desde 21 hasta 670 mg/l. Este es un aumento de treinta veces en el título de anticuerpos. También la otra población en el medio de selección 50/50 producida bajo presión de selección se repite 20 veces más que el cultivo realizado en medio completo. Además, los resultados obtenidos fueron significativamente mejores que con el método de referencia de DHFR (véase la tabla 8), en el que se realizaron tres ciclos de selección. Por lo tanto, este principio de selección, en el que se llevan a cabo dos ciclos de selección usando un medio selectivo que comprende una concentración limitante de ácido fólico y un antifolato con una etapa de cultivo intermedio en medio no selectivo produjo extraordinarios títulos de alta expresión.

Ejemplo 5: Clonación de células individuales

A fin de generar estirpes celulares con un vector de expresión estable, las poblaciones de células obtenidas de acuerdo con el Ejemplo 4 fueron clonadas después de que se completó la selección. Después de la selección, se clonó una combinación de transfección policlonal 50/50 usando dilución limitante en medio completo (con lo que no se mantiene la presión de selección durante la clonación) y medio de selección (manteniendo así la presión de selección durante la clonación) en placas de 6 x 96 pocillos. Después de un crecimiento exitoso de los clones, los clones se transfirieron en una confluencia de más del 70 % en placas de 24 pocillos y se ensayaron durante 10 días

5 de cultivo por lotes para su productividad de anticuerpos. Los resultados obtenidos cuando se clona la población cotransfectada y seleccionada de V-mutFRalpha/V-DHFRref se muestran en la Fig. 5. Como se muestra en la Fig. 5, la clonación de las células V-mutFRalpha/V-DHFRref en medio completo y medio de selección dio lugar a 65 clones (55 de medio completo, 10 de medio selectivo que comprende FA 50 nM/MTX 50 nM) de las placas de 6 x 96 pocillos. Los clones fueron alineados (dependiendo del medio) desde el nivel más alto hasta el nivel más bajo de expresión. El clon de producción más alto se aisló de la clonación en el medio completo y produjo 450 mg/l en el lote de 24 pocillos. En el matraz de agitación de 250 ml (50 ml en total), la combinación original logró un título de 670 mg/l.

10 Como referencia, se realizó una clonación de dilución limitante del vector de DHFR V-DHFRref después de realizar previamente selección G418-MTX. Los resultados respectivos se obtuvieron de un experimento anterior y se llevaron a cabo bajo condiciones similares. La clonación se realizó en el medio de selección, manteniendo así la presión de selección durante la clonación. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Clonación de la combinación de referencia transfectada con V-DHFRref

Clon	Acm (mg/l)
2F1	51
2E8	29
1C11	17
1E10	16
2H8	12
1B10	10
2C3	10
1G7	7
2E3	7
2E10	6
1C9	4
1C10	4
1D1	4
1D5	4
1D10	4
1E3	4
1E7	4
1F1	4
1F7	4
1G6	4
2A2	4
2B6	4
2C5	4
2C8	4
2D6	4
2D9	4
2F6	4
2F8	4
2F9	4
2F10	4
2G2	4
2G7	4
2G9	4

15 Aquí, se realizó una selección gradual con G-418 y MTX 500 nM-MTX 1 µM. La Tabla 10 muestra los resultados de una dilución de punto final de la población en medio de selección (MTX 1 µM). Los clones se alinearon desde el nivel más alto hasta el nivel más bajo de expresión. El clon de producción más alto de esta referencia alcanzó 51 mg/l en el lote de 20 pocillos. Se consiguió un amplio espectro de productividades celulares, que, sin embargo, permaneció en su mayoría bajo el umbral de 9 mg/l.

Los resultados mostrados en la Fig. 5 y en la Tabla 10 muestran que una cotransfección con V-mutFRalpha/V-DHFRref dio lugar a productividades significativamente más altas y, además, se aumentó el número de clones de células con alta producción aislados significativamente. Más del 50 % de los clones aislados a partir de la población policlonal seleccionada alcanzó un título que fue superior a 300 mg/l. La cotransfección bajo la más alta rigurosidad de selección logró un aumento de nueve veces en la concentración de anticuerpos dentro de los principales clones celulares producidos de V-mutFRalpha, V-DHFRref (diferentes métodos de selección) y V-mutFRalpha/V-DHFRref. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11: Resumen de los clones con mayor producción

V-mutFRalpha/V-DHFRref (50/50)	449,3
V-mutFRalpha (FA 5 nM)	42,1
V-DHFRref (MTX 125 nM)	28,4
V-DHFRref (MTX 250 nM)	41,6
V-DHFRref (MTX 1 μ M)	51

La Tabla 11 muestra la concentración de anticuerpos (Acm [mg/l]) de los mejores productores de las selecciones realizadas después de la clonación. Como puede verse, la cotransfección de V-mutFRalpha/V-DHFRref y la selección en un medio de selección que comprende una concentración limitada de ácido fólico y que comprende además un antifolato proporcionó los mejores resultados.

Los resultados anteriores muestran que una selección que se basa en el uso de un receptor de folato mutado como marcador seleccionable permitió la supervivencia de las células transfectadas con éxito cuando se usó un medio de selección que comprendía una cantidad limitante de folato, ácido fólico en este caso. La selección mediante el receptor del folato alfa mutado como marcador de selección fue más rápida que cuando se usó el receptor de folato alfa de tipo silvestre como marcador de selección. Debido a que el receptor de folato alfa de tipo silvestre se une con una alta afinidad al ácido fólico (KD = 0,1 nM), la presión de selección es alta por debajo de la concentración umbral de ácido fólico tolerado en las que también las células transfectadas sin ADN podrían sobrevivir. Esto también se refleja en la concentración de anticuerpo determinada. Las células que fueron transfectadas con el receptor de folato mutado podrían sobrevivir en todos los medios selectivos probados. Además, se observó un crecimiento relativamente homogéneo. En los tres medios de cultivo más concentrados, las células podrían pasarse después de 12 días; en los tres medios con la concentración de ácido fólico más baja la recuperación se alcanzó el día 16. En estos casos, la presión de selección sobre las células se comparó con el receptor de folato de tipo silvestre aumentado aún más. Debido a que la sobreexpresión del receptor de folato mutado se correlaciona con la expresión de la proteína de interés, el título de anticuerpos determinado es inversamente proporcional a la concentración de ácido fólico en el medio de selección.

Ejemplo 6: La transfección de vectores con dhfr, FoIR de tipo silvestre y FoIR A49L como marcadores seleccionables

En este ejemplo, se ensayaron y se compararon diferentes condiciones de selección. Las células CHO fueron transfectadas con los vectores V-DHFRref, V-wtFRalpha y V-mutFRalpha (A49L mutante). Se usó una concentración limitante de ácido fólico en el medio de selección para crear una presión de selección en las células hospedadoras, lo que, en el presente documento, también se denomina privación de ácido fólico.

El cultivo de la célula, la transfección y la detección se llevaron a cabo en matraces de agitación usando células CHO que crecen en suspensión en un medio de cultivo químicamente definido. Las células fueron transfectadas por electroporación (nucleofección). Para la selección basada en la privación de ácido fólico, las células se pasaron a un medio libre de ácido fólico 3 días antes de la transfección y se transfectaron en medio libre de ácido fólico para reducir los depósitos internos de ácido fólico. Dependiendo de la viabilidad celular, la selección se inició 24-48 h después de la transfección añadiendo el medio selectivo a las células. Las células transfectadas con V-wtFRalpha y V-mutFRalpha fueron seleccionadas usando 6 concentraciones diferentes de ácido fólico (117.00, 150, 50, 5, 0,5 y 0 nM), mientras que en el caso de las células transfectadas de V-DHFRref, se ensayaron 6 concentraciones de MTX diferentes como referencia (2.000, 1.000, 500, 250, 125 y 0 nM transfectadas).

Después de que las células se recuperaron a una viabilidad de más del 80 % después de la selección, se analizó la productividad de la población de células supervivientes. La productividad de las poblaciones de células seleccionadas se analizó después de la selección a través de cultivos en lotes en matraz de agitación con sobrecrecimiento en un medio completo que contenía 11,7 mM de ácido fólico. Los cultivos discontinuos se sembraron en matraces de agitación (125) con 50 ml de volumen de trabajo y se cultivaron en una cabina de agitación (no humidificada) a 150 rpm y CO₂ al 10 %. La densidad de células de siembra fue de 2 x 10⁵ c/ml. La determinación del título tuvo lugar en el día 13. Los títulos de anticuerpos en el sobrenadante del cultivo celular se determinaron por la proteína-A HPLC 13 días después de comenzar el cultivo.

Los resultados del experimento se describen a continuación. Para evaluar la rigurosidad de selección de ambas variantes del receptor de folato bajo concentraciones de ácido fólico limitante, se ensayó una variedad de concentraciones de ácido fólico que varía de 11.700 nM (medio de referencia, medio completo) a 0 nM para seleccionar células que sobreexpresaran anticuerpos. En paralelo, se ensayaron diferentes concentraciones de MTX con el vector DHFR de referencia para comparar el rendimiento. Se pudieron recuperar todas las poblaciones de células transfectadas. Las de ácido fólico 0 nM presumiblemente contenían algunas trazas de ácido fólico que se llevó a partir del medio de precultivo. Estas cantidades residuales de ácido fólico fueron aparentemente suficientes para promover la supervivencia de una subporción de las células. Sin embargo, el suministro posterior de ácido fólico que contenía medio era necesario para recuperar esas poblaciones. La productividad se evaluó como se ha descrito anteriormente. La Tabla 12 resume los resultados de productividad.

Tabla 12: Productividad de las poblaciones de células después de la selección

Ácido fólico (nM)	Acm (mg/l)		MTX (nM)	Acm (mg/l)
	V-wtFRalpha	V-mutFRalpha		V-DHFRref
11700,00	7	10	2000,0	17
150,00	11	12	1000,0	15
50,00	11	19	500,0	37
5,00	28	27	250,0	37
0,50	17	32	125,0	18
0,00	11	136	0,0	8

La Tabla 12 muestra los resultados para las células transfectadas seleccionados a diferentes concentraciones de ácido fólico o de MTX que fueron analizadas en cultivos discontinuos en matraces agitados. Al día 13 del cultivo, se tomaron y analizaron muestras del medio de cultivo para determinar el contenido de anticuerpo mediante HPLC de proteína A. Se encontró que todas las poblaciones de células producen anticuerpos. Con V-wtFRalpha, se logró un máximo de productividad cuando se seleccionó en ácido fólico 5 nM. Esta concentración de ácido fólico es menor que la concentración observada en los experimentos anteriores y es probablemente atribuible al hecho de que algo de ácido fólico se llevó a lo largo del medio de cultivo inicial en este ejemplo. Esto explicaría también las tasas de recuperación y producción alcanzadas en ácido fólico 0 nM. La reducción adicional de ácido fólico no condujo a una mayor productividad cuando se usó el receptor de folato de tipo silvestre. En contraste, con V-mutFRalpha, se consigue una mayor productividad con la concentración de ácido fólico más baja durante la selección. La productividad alcanzada con el mutante es significativamente más alta que la productividad alcanzada con el receptor de folato de tipo silvestre y es también significativamente superior a la alcanzada con DHFR/MTX.

Además, al analizar la recuperación de las células durante la selección, se encontró que las células transfectadas con V-mutFRalpha se recuperaron significativamente más rápido en las concentraciones de ácido fólico muy bajas, en particular, <25 nM. Por lo tanto, las tasas de recuperación más rápidas descritas anteriormente también se confirmaron en este experimento.

Los ejemplos 1 a 6 descritos anteriormente demuestran las ventajas que se logran con las enseñanzas de la presente divulgación, en la que se usa un receptor de folato mutado para la selección. Por ejemplo, en los ejemplos descritos anteriormente, se determinó la población de referencia (DHFR) una secreción de anticuerpo de 28 mg/l, con la mayor rigurosidad de selección de supervivencia de células transfectadas V-wtFRalpha, se obtuvo 24 mg/l y con células transfectadas de V-mutFRalpha se obtuvo 26,6 mg/l. Por lo tanto, las tasas de productividad determinadas en el respectivo experimento estaban en un intervalo similar, lo que demuestra que el receptor del folato alfa de tipo silvestre, así como el receptor del folato alfa mutado logra como marcadores seleccionables resultados comparables al sistema de selección de DHFR/MTX establecido que puede ser percibido como la "mejor opción". Además, al comparar los períodos de tiempo necesario para la selección se observó que es posible una selección significativamente más rápida con un sistema de selección basado en receptor de folato mutado como se proporciona por la presente divulgación. Incluso las células transfectadas con el vector V-wtFRalpha en ácido fólico 15 nM y ácido fólico 25 nM que necesitaron una fase de recuperación más larga que las células transfectadas V-mutFRalpha a la misma concentración (16 días) mostraron con 20 días una clara ventaja frente al control de referencia (DHFR), que en este momento todavía estaban en crisis. El uso del receptor de folato mutado de acuerdo con la presente divulgación, por lo tanto, permite, en comparación con el sistema DHFR/MTX, ahorrar tiempo durante la fase de selección en el desarrollo de estirpes celulares y también es más rápido que el sistema de selección basado en el tipo silvestre. Los resultados también indican que el uso del receptor de folato mutado proporciona a las células una ventaja en comparación con el uso del receptor de folato de tipo silvestre en el medio selectivo ensayado, porque las células sobreviven una ventana de concentración de ácido fólico mayor y, en particular, pueden sobrevivir a concentraciones de ácido fólico inferiores, permitiendo de este modo condiciones de selección más rigurosas. Además, la crisis de selección se recupera significativamente antes con el receptor de folato mutado que en el caso con las células que fueron transfectadas con el receptor de folato de tipo silvestre. Los resultados muestran que el uso de un receptor de folato mutado como el descrito en el presente documento tiene

ventajas importantes.

Por otra parte, también los experimentos en los que se realizó una doble selección contra el receptor de folato y DHFR como marcadores seleccionables usando un medio de selección que comprende folato en una concentración limitante y que comprende, además, un antifolato, mostraron claras ventajas para el receptor de folato mutado. La mutación en el receptor de folato aparentemente tiene un efecto positivo frente al crecimiento celular bajo dicha presión de selección doble. Sin estar limitado por la teoría, podría ser que la afinidad con anti-folatos tales como MTX se reduce en el mutante, de modo que se incorpora menos MTX a las células. Además, se encontró que es ventajoso repetir la selección y transferir las células en un medio completo entre dos ciclos de selección con el fin de permitir que las células se recuperen después de la primera ronda de selección. Después de volver a transferir las células en el medio de selección, fue posible enriquecer las células que habían integrado ambos vectores en su genoma y, por lo tanto, eran capaces de sobrevivir la presión de selección doble. Se encontró que la productividad se aumentó en comparación con el medio completo hasta de veinte a treinta veces. Esto es una ventaja significativa. En comparación con el control de referencia después de una selección multi-etapa de G418/MTX convencional, todavía se observó un aumento de seis a trece veces en la productividad. Por lo tanto, el sistema de selección de acuerdo con la presente divulgación en el que se usa un receptor de folato mutado en combinación con DHFR tiene claras ventajas frente al sistema de selección de la técnica anterior. Además, usando esta estrategia de doble selección, se podría escoger más del 50 % de los clones altamente productores que tienen una concentración superior a 300 mg/ml. Por lo tanto, la búsqueda de clones con producción alta fue menos engorrosa, lo que es una mejora significativa frente a las tecnologías de detección existentes, en particular, a los efectos de la producción de proteína industrial.

El receptor de folato mutado de acuerdo con la presente divulgación usado como marcador de selección, es muy ventajoso porque las poblaciones transfectadas sobreviven a la crisis de crecimiento más rápido que los sistemas de selección de referencia. Además, las poblaciones de células que fueron transfectadas con el receptor de folato mutante mostraron después de la selección en diferentes medios selectivos una expresión del receptor y el anticuerpo que era inversamente proporcional a la concentración de ácido fólico. Esta correlación se podría demostrar usando análisis biológico molecular del ADN genómico (número de copia), así como en el nivel de ARN. Además, se encontró que el uso de un receptor de folato mutado como descrito en el presente documento es muy ventajoso cuando se aplica una coselección con DHFR/MTX. Los controles usados (transfecciones individuales de FRwt, FRmut y DHFR) no podrían sobrevivir el efecto letal de una combinación rigurosa de la privación de ácido fólico y MTX. No obstante, la alta rigurosidad de este sistema de selección también tuvo el efecto de que algunas de las poblaciones cotransfectadas no se seleccionaron. Sin embargo, mediante la adición de ácido fólico como etapa intermedia y la realización de una segunda serie de selección, se lograron muy buenos resultados con el principio de cotransfección cuando se usó un principio de doble selección con FRmut/DHFR. Se demostró que este método permite una detección más rápida y menos engorrosa de los mejores clones productores (arriba). La clonación de células individuales de la población de células con mayor producción (670 mg/l en 50 ml de volumen de cultivo) dio como resultado un 50 % de recuperación aproximada de clones de células de producción alta que produjeron más de 300 mg/l. En comparación con una transfección simple y la referencia, la clonación de la población cotransfectada logró una productividad media de 240 mg/l, que es un aumento de 40 veces en la productividad. El clon celular de producción más alto logró 450 mg/l en el lote de 24 pocillos. Estos resultados confirman que la presente divulgación que se basa en el uso de un receptor de folato mutado como marcador de selección hace una contribución significativa a los sistemas de selección existentes.

Ejemplo 7: Transfección de un vector de expresión que comprende dos marcadores seleccionables

En este ejemplo, se transfectaron células CHO (nucleofección) con un vector de expresión que comprendía un casete de expresión que comprendía un polinucleótido que codificaba un receptor de folato alfa humano mutado (mutante A49L - mutFRalpha, véase más arriba) y un casete de expresión que comprendía un polinucleótido que codificaba DHFR (V -mutFRalpha/DHFRref). Por lo tanto, ambos marcadores seleccionables mutFRalpha y DHFR estaban en el mismo vector de expresión. Además, el vector de expresión estaba compuesto de un casete de expresión que comprendía un polinucleótido que codificaba la cadena ligera de un anticuerpo y un casete de expresión que comprendía un polinucleótido que codificaba la cadena pesada de un anticuerpo. En este experimento, se expresó un anticuerpo diferente que en los ejemplos anteriores. Se ensayaron cinco condiciones de selección diferentes usando ácido fólico (FA) 50 nM y diferentes concentraciones de MTX. Los medios de selección se resumen en la Tabla 13 posterior. Después de la selección, las fuentes de células seleccionadas fueron transferidas a un medio completo y mantenidas como cultivos discontinuos en matraces de agitación. El día 13 del cultivo, se tomaron y analizaron muestras del medio de cultivo para determinar el contenido de anticuerpo mediante HPLC de proteína A. Los resultados también se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13: Productividad de las combinaciones obtenidas con el vector de expresión V-mutFRalpha/DHFRref usando diferentes condiciones de selección

Condición de selección	Concentración de anticuerpo [mg/l]
FA 50 nM/MTX 50 nM	1.360
FA 50 nM/MTX 10 nM	1.250
FA 50 nM/MTX 5 nM	180
FA 50 nM/MTX 1 nM	80
FA 50 nM/sin MTX	80

5 Como puede verse, una concentración de MTX ya tan baja como 5 nM proporciona una ventaja de selección significativa cuando se usa el vector de expresión de V-mutFRalpha/DHFRref que comprende un receptor de folato mutado y DHFR como marcador seleccionable. Esto confirma las ventajas de usar el receptor de folato mutado en combinación con DHFR para la selección que también se muestra en los otros ejemplos. Las productividades de anticuerpos se aumentan significativamente y además, las concentraciones más bajas de MTX se pueden usar durante la selección, lo que es una ventaja significativa teniendo en cuenta que MTX es un agente tóxico.

Ejemplo 8: Transfección con tratamiento previo simplificado de las células CHO precursoras

10 Con el fin de probar si es posible evitar la centrifugación de células/etapas de lavado en el procedimiento, las células CHO precursoras fueron tomadas en cultivo usando medios de cultivo que contenían una concentración limitante de ácido fólico 50 nM, ya sea a partir de células criopreservadas en un medio completo o medio con ácido fólico 50 nM. Después de varias pasadas en este medio, las células se transfectaron usando el método de nucleofección y el vector de expresión V-mutFRalpha/DHFRref que codificaba un anticuerpo monoclonal. Esta transfección y el cultivo posterior se realizaron usando el mismo medio con ácido fólico 50 nM. Entonces, 48 h después de la transfección, se aumentó la presión de selección añadiendo MTX 10 nM al cultivo. La productividad de los cultivos recuperados de la selección se evaluó en cultivos discontinuos en matraces agitadores usando medio completo. Los resultados se muestran en la Tabla 14. Como se muestra en la Tabla 14, dichos protocolos simplificados para los procedimientos de transfección y selección resultan en productividades comparables a los procedimientos en los ejemplos anteriores (por ejemplo, Tabla 13).

Tabla 14: Productividad de las combinaciones obtenidas con el vector de expresión V-mutFRalpha/DHFRref usando diferentes condiciones de selección

Fuente de células precursoras	Concentración de Acm (mg/l) (promedio de 2 repeticiones)
Células precursoras congeladas en medio completo	1.326
Células precursoras congeladas en medio que contiene ácido fólico 50 nM	1.232

Listado de secuencias

25 <110> Novartis AG

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

30 <130> PAT055303-WO-PCT

<150> US 61/860.439

<151> 31-07-2013

<160> 13

35 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 205

40 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 689 136 T3

Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys
 1 5 10 15

His His Lys Glu Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys
 20 25 30

Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu
 35 40 45

Ala His Lys Asp Val Ser Tyr Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys
 50 55 60

Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys
 65 70 75 80

Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp
 85 90 95

Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu
 100 105 110

Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys
 115 120 125

Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys
 130 135 140

Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro
 145 150 155 160

Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn
 165 170 175

Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala
 180 185 190

Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala
 195 200 205

<210> 2
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

5

ES 2 689 136 T3

Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala Ala Trp Pro Phe Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu Ser
 20 25

5

<210> 3
 <211> 257
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 689 136 T3

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

Ser

5 <210> 4
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4

ES 2 689 136 T3

Gln Asp Arg Thr Asp Leu Leu Asn Val Cys Met Asp Ala Lys His His
 1 5 10 15

Lys Thr Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu His Asp Gln Cys Ser Pro
 20 25 30

Trp Lys Lys Asn Ala Cys Cys Thr Ala Ser Thr Ser Gln Glu Leu His
 35 40 45

Lys Asp Thr Ser Arg Leu Tyr Asn Phe Asn Trp Asp His Cys Gly Lys
 50 55 60

Met Glu Pro Ala Cys Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr
 65 70 75 80

Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asn Gln Thr
 85 90 95

Trp Arg Lys Glu Arg Phe Leu Asp Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys
 100 105 110

Gln Arg Trp Trp Glu Asp Cys His Thr Ser His Thr Cys Lys Ser Asn
 115 120 125

Trp His Arg Gly Trp Asp Trp Thr Ser Gly Val Asn Lys Cys Pro Ala
 130 135 140

Gly Ala Leu Cys Arg Thr Phe Glu Ser Tyr Phe Pro Thr Pro Ala Ala
 145 150 155 160

Leu Cys Glu Gly Leu Trp Ser His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser
 165 170 175

Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Ser Ala Gln Gly
 180 185 190

Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala
 195 200

5 <210> 5
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 5

ES 2 689 136 T3

Asp Ala Lys His His Lys Thr Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu His
 35 40 45
 Asp Gln Cys Ser Pro Trp Lys Lys Asn Ala Cys Cys Thr Ala Ser Thr
 50 55 60
 Ser Gln Glu Leu His Lys Asp Thr Ser Arg Leu Tyr Asn Phe Asn Trp
 65 70 75 80
 Asp His Cys Gly Lys Met Glu Pro Ala Cys Lys Arg His Phe Ile Gln
 85 90 95
 Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln
 100 105 110
 Gln Val Asn Gln Thr Trp Arg Lys Glu Arg Phe Leu Asp Val Pro Leu
 115 120 125
 Cys Lys Glu Asp Cys Gln Arg Trp Trp Glu Asp Cys His Thr Ser His
 130 135 140
 Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Arg Gly Trp Asp Trp Thr Ser Gly Val
 145 150 155 160
 Asn Lys Cys Pro Ala Gly Ala Leu Cys Arg Thr Phe Glu Ser Tyr Phe
 165 170 175
 Pro Thr Pro Ala Ala Leu Cys Glu Gly Leu Trp Ser His Ser Tyr Lys
 180 185 190
 Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe
 195 200 205
 Asp Ser Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala
 210 215 220
 Ala Ala Met His Val Asn Ala Gly Glu Met Leu His Gly Thr Gly Gly
 225 230 235 240
 Leu Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Gln Leu Trp Leu Leu Gly
 245 250 255

<210> 7
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 7

ES 2 689 136 T3

Gln Pro Arg Ser Ala Arg Ala Arg Thr Asp Leu Leu Asn Val Cys Met
 1 5 10 15

Asn Ala Lys His His Lys Thr Gln Pro Ser Pro Glu Asp Glu Leu Tyr
 20 25 30

Gly Gln Cys Ser Pro Trp Lys Lys Asn Ala Cys Cys Thr Ala Ser Thr
 35 40 45

Ser Gln Glu Leu His Lys Asp Thr Ser Arg Leu Tyr Asn Phe Asn Trp
 50 55 60

Asp His Cys Gly Lys Met Glu Pro Thr Cys Lys Arg His Phe Ile Gln
 65 70 75 80

Asp Ser Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Arg
 85 90 95

Gln Val Asn Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Ile Leu Asn Val Pro Leu
 100 105 110

Cys Lys Glu Asp Cys Glu Arg Trp Trp Glu Asp Cys Arg Thr Ser Tyr
 115 120 125

Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp Thr Ser Gly Ile
 130 135 140

Asn Glu Cys Pro Ala Gly Ala Leu Cys Ser Thr Phe Glu Ser Tyr Phe
 145 150 155 160

Pro Thr Pro Ala Ala Leu Cys Glu Gly Leu Trp Ser His Ser Phe Lys
 165 170 175

Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe
 180 185 190

Asp Ser Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Lys Phe Tyr Ala
 195 200 205

Ala Ala Met Asn Ala Gly Ala Pro Ser Arg Gly Ile Ile Asp Ser
 210 215 220

5 <210> 8
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 8

ES 2 689 136 T3

Met Asp Met Ala Trp Gln Met Met Gln Leu Leu Leu Leu Ala Leu Val
1 5 10 15

Thr Ala Ala Gly Ser Ala Gln Pro Arg Ser Ala Arg Ala Arg Thr Asp
20 25 30

Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Thr Gln Pro Ser
35 40 45

Pro Glu Asp Glu Leu Tyr Gly Gln Cys Ser Pro Trp Lys Lys Asn Ala
50 55 60

Cys Cys Thr Ala Ser Thr Ser Gln Glu Leu His Lys Asp Thr Ser Arg
65 70 75 80

Leu Tyr Asn Phe Asn Trp Asp His Cys Gly Lys Met Glu Pro Thr Cys
85 90 95

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

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

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

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

Asn Trp Thr Ser Gly Ile Asn Glu Cys Pro Ala Gly Ala Leu Cys Ser
165 170 175

Thr Phe Glu Ser Tyr Phe Pro Thr Pro Ala Ala Leu Cys Glu Gly Leu
180 185 190

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

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

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

Gly Ile Ile Asp Ser

245

ES 2 689 136 T3

<210> 9
 <211> 205
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Receptor de folato mutado maduro

10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (49)..(49)
 <223> Xaa es cualquier aminoácido a excepción de Ala

15

```

Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys
 1          5          10          15

His His Lys Glu Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys
 20          25          30

Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu
 35          40          45

Xaa His Lys Asp Val Ser Tyr Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys
 50          55          60

Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys
 65          70          75          80

Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp
 85          90          95

Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu
 100         105         110

Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys
 115         120

Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys
 130         135         140

Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro
 145         150         155         160

Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn
 165         170         175
    
```

ES 2 689 136 T3

Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala
 180 185 190

Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala
 195 200 205

5 <210> 10
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

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

10 Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg
 20 25

15 <210> 11
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

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

20 Thr Met Cys Ser Ala
 20

<210> 12
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 12

Met Asp Met Ala Trp Gln Met Met Gln Leu Leu Leu Leu Ala Leu Val
 1 5 10 15

Thr Ala Ala Gly Ser Ala
 20

30 <210> 13
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Receptor de folato mutado

<400> 13

ES 2 689 136 T3

Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys
1 5 10 15

His His Lys Glu Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys
20 25 30

Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu
35 40 45

Leu His Lys Asp Val Ser Tyr Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys
50 55 60

Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys
65 70 75 80

Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp
85 90 95

Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu
100 105 110

Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys
115 120 125

Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys
130 135 140

Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro
145 150 155 160

Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn
165 170 175

Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala
180 185 190

Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met
195 200 205

Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala
210 215 220

Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu Ser
225 230

REIVINDICACIONES

1. Un vector de expresión o una combinación de al menos dos vectores de expresión que comprende:

- 5 a) un polinucleótido que codifica un receptor de folato mutado como marcador seleccionable, en el que el receptor de folato mutado es un receptor de folato unido a membrana funcional que tiene una disminución de la afinidad de unión al folato en comparación con el receptor de folato de tipo silvestre, en el que el receptor de folato mutado codificado es un receptor de folato mutado alfa que comprende una sustitución de alanina a leucina en la posición estructuralmente correspondiente o por homología de la secuencia de aminoácidos al aminoácido 49 de la secuencia del receptor de folato humano alfa de tipo silvestre maduro mostrada como SEQ ID NO: 1; y
- 10 b) al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés,

en el que, cuando dicho vector de expresión o combinación de al menos dos vectores de expresión se introduce en una célula hospedadora, el polipéptido de interés es secretado por dicha célula hospedadora.

2. El vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una o más de las siguientes características:

- 15 a) el receptor de folato mutado codificado comprende una secuencia de aminoácidos que se deriva de la secuencia de aminoácidos del receptor de folato humano de tipo silvestre maduro alfa mostrado como SEQ ID NO 1, en el que la secuencia de aminoácidos del receptor de folato mutado comprende más de una mutación que disminuye la afinidad de unión al folato en comparación con el receptor de folato humano de tipo silvestre maduro alfa mostrado como SEQ ID NO 1; y/o
- 20 b) el receptor de folato mutado codificado comprende al menos una sustitución en una posición de aminoácido que corresponde estructuralmente o por la homología de la secuencia de aminoácidos con una posición de aminoácido seleccionada entre la posición 104 y 166 de una secuencia del receptor de folato humano de tipo silvestre maduro.

3. El vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el receptor de folato mutado tiene una afinidad de unión disminuida hacia el diastereoisómero 6S de 5-metiltetrahidrofolato en comparación con el receptor de folato de tipo silvestre y/o en el que el receptor de folato mutado tiene una afinidad de unión disminuida hacia el ácido fólico en comparación con el receptor de folato de tipo silvestre.

4. El vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el receptor de folato mutado codificado comprende una sustitución de aminoácido en la posición que corresponde estructuralmente o por la homología de secuencia de aminoácidos con el aminoácido 49 de la secuencia del receptor de folato humano de tipo silvestre maduro alfa mostrada en SEQ ID NO 1, en el que la alanina presente en la secuencia de tipo silvestre en la posición 49 está sustituida por leucina.

5. El vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el receptor de folato mutado codificado tiene las siguientes características:

- 40 a) el receptor de folato mutado maduro comprende la siguiente secuencia
IAWARTELLNVCMNAAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEXaaHKDVSYL
YR
FNWNHCGEMAPACKRHFQDTCLYECSPNLGPWQQVDSWRKERVNLVPLCKEDCEQW
WEDCRTSYTCKSNWHKGNWWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTHSYKVS
45 YSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYA, mostrada como SEQ ID NO 9,
en la que Xaa es leucina;
o
- b) el receptor de folato mutado maduro comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % con la secuencia mostrada como SEQ ID NO 9, y en el que Xaa no es alanina en dicho receptor de folato mutado y, en el que la afinidad de unión hacia el folato de dicho receptor de folato mutado se reduce en comparación con la secuencia del receptor de folato humano de tipo silvestre maduro alfa en la que Xaa es alanina, mostrada como SEQ ID NO 1, y en el que Xaa es leucina en dicho receptor de folato mutado.

6. El vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el receptor de folato mutado codificado tiene las siguientes características:

- a) comprende la secuencia
IAWARTELLNVCMNAAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEXaaHKDVSYL

FNWNHCGEMAPACKRHFQDTCLEECSPNLGPWQQVDQSWRKERVNLNPLCKEDCEQW
 WEDCRTSYTCKSNWHKGNWWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTHSYKVSN
 YSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAMSGAGPWAAWPFLLSLALMLLWLLS, mostrada como SEQ ID
 NO 13,

5 en la que Xaa es leucina; o

b) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % con la secuencia mostrada como SEQ ID NO 13, y en la que Xaa es leucina, y en el que la afinidad de unión de dicho receptor de folato mutado hacia el diastereoisómero 6S de 5-metiltetrahidrofolato se reduce en comparación con la secuencia del receptor de folato humano de tipo silvestre maduro alfa, en la que Xaa es alanina, mostrada como SEQ ID NO 1.

7. El vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además un polinucleótido que codifica un marcador seleccionable que participa en el metabolismo del folato, en el que, opcionalmente, el polinucleótido que codifica un marcador seleccionable codifica una dihidrofolato reductasa.

8. El vector de expresión o la combinación de al menos dos vectores de expresión de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende:

a) un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un receptor de folato mutado, en el que el receptor de folato mutado codificado es un receptor de folato mutado alfa que comprende una sustitución de aminoácido en la posición correspondiente estructuralmente o por homología de la secuencia de aminoácidos al aminoácido 49 de la secuencia del receptor de folato humano de tipo silvestre maduro alfa mostrada como SEQ ID NO 1, en el que la alanina presente en la secuencia de tipo silvestre en dicha posición está sustituida por leucina;

b) al menos un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés; y

c) un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica una dihidrofolato reductasa como marcador seleccionable.

9. Una célula hospedadora cuya viabilidad depende de la absorción del folato, que comprende:

a) un polinucleótido introducido que codifica un receptor de folato mutado que es un receptor de folato unido a membrana funcional que tiene una disminución de la afinidad de unión al folato en comparación con el receptor de folato de tipo silvestre como marcador seleccionable, en el que el receptor de folato mutado codificado es un receptor de folato mutado alfa que comprende una sustitución de alanina a leucina en la posición estructuralmente correspondiente o por homología de la secuencia de aminoácidos al aminoácido 49 de la secuencia del receptor de folato humano de tipo silvestre maduro alfa mostrada como SEQ ID NO: 1; y

b) al menos un polinucleótido introducido que codifica un polipéptido de interés,

en el que dicho polipéptido de interés es secretado por dicha célula hospedadora.

10. La célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el receptor de folato mutado tiene una o más de las características definidas en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.

11. La célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en la que la célula hospedadora comprende un vector de expresión o una combinación de al menos dos vectores de expresión según lo definido en una o más de las reivindicaciones 1 a 8.

12. La célula hospedadora de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 9 a 11, en la que la célula hospedadora tiene una o más de las siguientes características:

a) es una célula de mamífero;

b) es una célula de roedor;

c) es una célula CHO;

d) expresa un receptor de folato endógeno;

e) comprende un polinucleótido introducido que codifica un marcador seleccionable que participa en el metabolismo del folato, que, opcionalmente, es una dihidrofolato reductasa; y/o

f) los polinucleótidos introducidos están integrados de manera estable en el genoma.

13. Un método para producir una célula hospedadora de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 9 a 12, que comprende introducir en una célula hospedadora cuya viabilidad depende de la absorción del folato:

a) un polinucleótido que codifica un receptor de folato mutado que es un receptor de folato unido a membrana

funcional que tiene una disminución de la afinidad de unión al folato en comparación con el receptor de folato de tipo silvestre como marcador seleccionable, en el que el receptor de folato mutado codificado es un receptor de folato mutado alfa que comprende una sustitución de alanina a leucina en la posición estructuralmente correspondiente o por homología de la secuencia de aminoácidos al aminoácido 49 de la secuencia del receptor de folato humano de tipo silvestre maduro alfa mostrada como SEQ ID NO: 1;

y
b) al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés, en el que el polipéptido de interés es secretado por dicha célula hospedadora.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que un vector de expresión o una combinación de al menos dos vectores de expresión de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 8 se introduce en la célula hospedadora.

15. Un método para seleccionar al menos una célula hospedadora capaz de expresar un polipéptido de interés con un rendimiento deseado, que comprende:

a) proporcionar una pluralidad de células hospedadoras de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 9 a 11;

b) cultivar dicha pluralidad de células hospedadoras en un medio de cultivo selectivo que comprende folato en una concentración limitante; y

c) obtener al menos una célula hospedadora que expresa el polipéptido de interés.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, que tiene una o más de las siguientes características:

i) se realizan uno o más ciclos de selección que comprenden las etapas b) y c);

ii) después de la etapa c), las células se cultivan en un medio de cultivo que comprende una concentración no limitante de folato y luego se cultivan de nuevo de acuerdo con la etapa b) y se obtienen de acuerdo con la etapa c);

iii) se realizan una o más etapas de selección adicionales antes y/o después de realizar la etapa b) y/o c), en las que dichas una o más etapas de selección adicionales se seleccionan a partir de selección basada en citometría de flujo y una selección de uno o más marcadores seleccionables adicionales introducidos en la célula hospedadora;

iv) las células hospedadoras se transfectan de manera estable; y/o

v) las células hospedadoras seleccionadas se expresan de forma recombinante y secretan una molécula de inmunoglobulina.

17. Un procedimiento para producir un polipéptido de interés, que comprende:

a) cultivar una célula hospedadora de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 9 a 12 y/o una célula hospedadora seleccionada de acuerdo con la reivindicación 15 o 16 bajo condiciones que permiten la expresión y secreción del polipéptido de interés;

b) aislar el polipéptido de interés a partir del medio de cultivo celular; y

c) opcionalmente, procesar el polipéptido de interés aislado.

18. El uso de un polinucleótido que codifica:

a) un receptor de folato mutado que comprende la siguiente secuencia
IAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEXaaHKDVSYL
YR
FNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIIQQVDQSWRKERVNLVPLCKEDCEQW
WEDCRTSYTCKSNWHKGNWWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTHSYKVS
N
YSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYA mostrada en SEQ ID NO 9,
en la que Xaa es leucina;

o
b) un receptor de folato mutado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % con la secuencia mostrada como SEQ ID NO 9, y en el que Xaa es leucina en dicho receptor de folato mutado de acuerdo con b);

como marcador seleccionable para la selección de células cuya viabilidad es dependiente de la absorción del folato.

Fig. 1

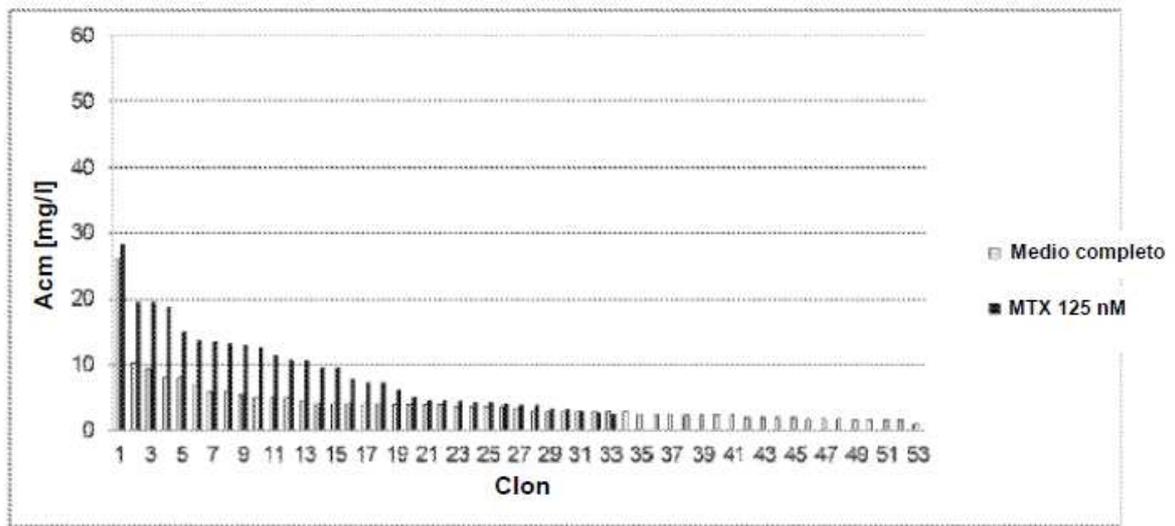


Fig. 2

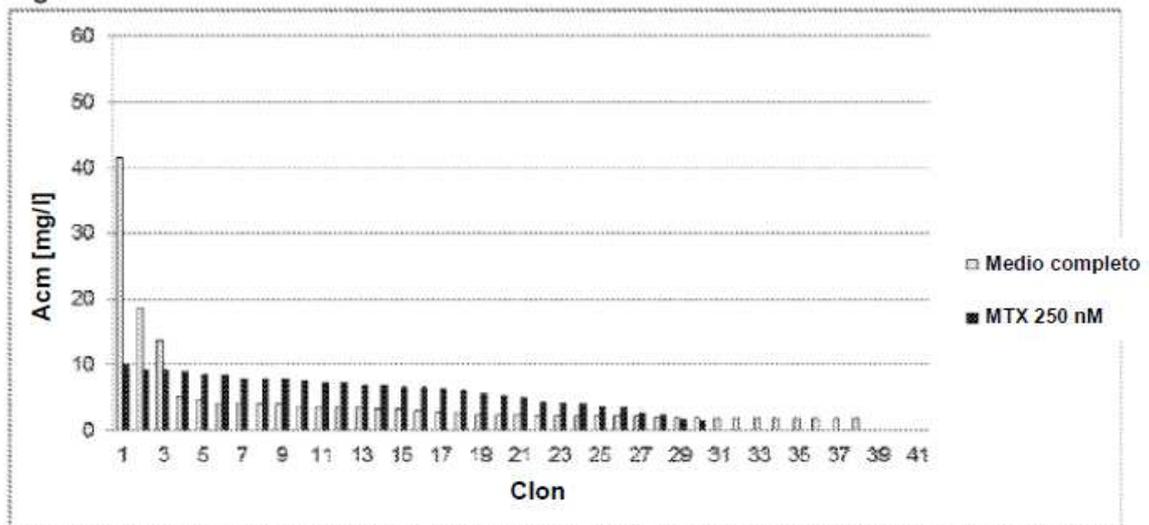


Fig. 3

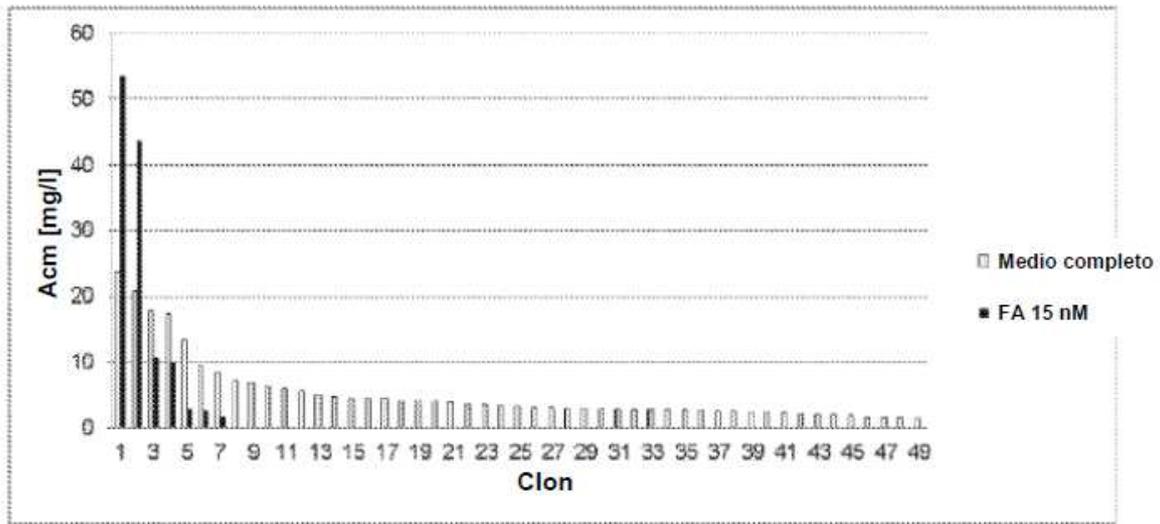


Fig. 4

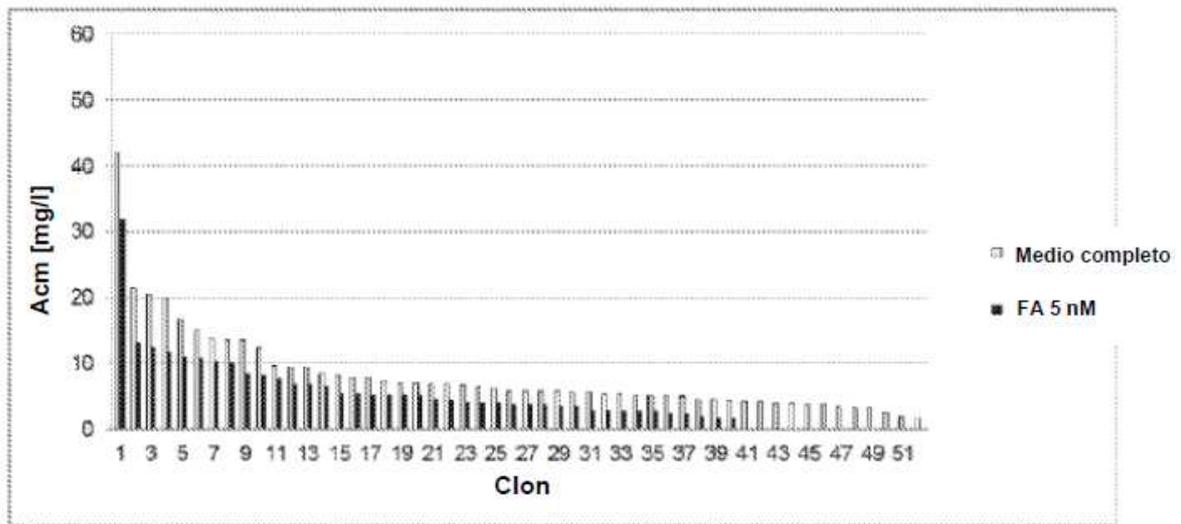


Fig. 5

