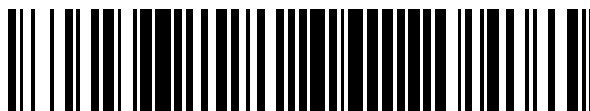


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 907**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

C07K 16/06 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2014 PCT/GB2014/000165**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2014 WO14177826**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2014 E 14721474 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 2992104**

54 Título: **Procedimiento de expresión**

30 Prioridad:

03.05.2013 GB 201308017
18.11.2013 GB 201320339

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.11.2019

73 Titular/es:

FUJIFILM DIOSYNTH BIOTECHNOLOGIES UK LIMITED (100.0%)
Belasis Avenue
Billingham TS23 1LH, GB

72 Inventor/es:

SAUNDERS, FAY LOUISE;
DODDS, ANNA LOUISE;
BAYARD, ADELINE MARIE GERALDINE y
KARA, BHUPENDRA VALLABH

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 732 907 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

Procedimiento de expresión

5 La presente invención trata de un procedimiento para la expresión de polipéptidos recombinantes, y en particular la secreción de polipéptidos recombinantes.

10 En la producción de polipéptidos recombinantes, es una ventaja significativa que el polipéptido de interés se pueda exportar desde la célula en la que se expresa. Por lo tanto, los sistemas de expresión están diseñados ventajosamente para permitir esta exportación o secreción. La secreción del polipéptido recombinante desde la célula hospedadora implica comúnmente el uso de péptidos de señalización, que se encuentran en la mayoría de las proteínas eucarióticas y procarióticas que están destinadas a la exportación desde el citoplasma. Típicamente, los líderes de secreción empleados en estos sistemas de expresión son naturales para el hospedador de expresión, por ejemplo, se han usado ampliamente los péptidos de señalización PhoA, MalB y OmpA de *Escherichia coli* para secretar polipéptidos al periplasma de ese organismo.

15 El documento US7.071.172 describe el uso de líderes de secreción de fibronectina en vectores de aporte basados en AAV para el uso en terapia génica.

20 Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la producción de un polipéptido diana que comprende:

a) expresar un vector de expresión para expresar un polipéptido diana en una célula hospedadora CHO, comprendiendo el vector de expresión un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido recombinante conectado operativamente a una secuencia líder de secreción de fibronectina; y

b) recuperar el polipéptido diana.

25 Los líderes de secreción de fibronectina que se pueden emplear en la presente invención incluyen líderes de secreción de fibronectina de mamífero y reptil. Ejemplos de líderes de secreción de fibronectina reptilianos incluyen líderes de secreción de fibronectina de *Xenopus laevis*. Ejemplos de líderes de secreción de fibronectina de mamífero incluyen líderes de secreción de fibronectina de ser humano, rata, mudo, bovino, porcino, canino, felino hámster chino, y equivalentes funcionales de los mismos, tales como líder de secreción de fibronectina de ser humano que tiene la secuencia MLRGPGPGLLLAVQCLGTAVPSTGA (SEQ ID No. 1). En ciertas realizaciones, se prefiere el líder de secreción de fibronectina de hámster chino que tiene la secuencia de aminoácidos MLRGPGPGLLLAVLCLGTAVRCTEA (SEQ ID No. 2) y equivalentes funcionales de la misma.

30 Un equivalente funcional para un líder de secreción es uno que comparte 70% o más de identidad con una secuencia de aminoácidos, preferiblemente 75% o más de identidad, más preferiblemente 80% o más de identidad y lo más preferiblemente 90% o más de identidad, tal como 95% de identidad o más, y que retiene la capacidad para secretar el polipéptido recombinante. En algunas realizaciones, el líder de secreción funcionalmente equivalente difiere en un solo aminoácido, mediante cualquiera de adición, eliminación o sustitución.

35 En muchas realizaciones, las secuencias polinucleotídicas que están conectadas operativamente son contiguas, en el caso de un líder de secreción, contiguas y en el mismo marco de lectura.

40 Preferiblemente, la conexión entre el polinucleótido que codifica la secuencia líder de secreción de fibronectina y el polinucleótido que codifica el polipéptido diana es tal que el líder de secreción esté unido al extremo N del polipéptido recombinante. En ciertas realizaciones, el polipéptido recombinante comprende una etiqueta N-terminal, siendo tal la conexión entre la secuencia líder de secreción y el polinucleótido que codifica el polipéptido recombinante que el líder de secreción esté unido a la etiqueta, preferiblemente al extremo N de la etiqueta.

45 El polinucleótido que codifica la secuencia líder de secreción de fibronectina está unido preferiblemente al extremo 5' del polinucleótido que codifica el polipéptido diana y preferiblemente tiene la secuencia ATGCTGAGAGGCCCTGGACCTGGACTGCTGCTGGCTGTGCAGTGTCTGGGAACCGCCGTGCCTTCTACCG GCGCC (SEQ ID No. 3) o ATGCTCAGGGGTCCGGACCCGGGCTGCTGCTGGCCGTCCCTGTGCCTGGG GACAGCGGTGCGCTGTACCGAAGCC (SEQ ID No. 4).

50 Los vectores de la presente divulgación comprenden un promotor conectado operativamente al casete de expresión para el líder de secreción y los polipéptidos recombinantes.

55 Los promotores que se pueden emplear en células hospedadoras CHO pueden ser endógenos o exógenos para las células CHO. Promotores adecuados incluyen promotores virales tales como CMV, promotor SV40 y RSR-LTR. También se pueden utilizar promotores procedentes de genes constitutivos tales como hEF1a y fosfoglicerato cinasa murina (mPGK). En algunas realizaciones, promotores preferidos son CMV humano y CMV de rata. Los promotores

pueden ser iguales o diferentes si se está expresando más de un polipéptido (p. ej. polipéptidos HC y LC de MAb). El promotor se puede emplear en combinación con una secuencia potenciadora, tal como el potenciador temprano inmediato principal de un citomegalovirus, especialmente citomegalovirus humano.

5 El vector de expresión puede estar integrado en el genoma de la célula hospedadora comprendido dentro de un elemento extracromosómico tal como un plásmido.

Típicamente, el vector de expresión también comprende un marcador seleccionable. Marcadores seleccionables para células de mamífero, y especialmente para células de ovario de hámster chino, incluyen sistemas marcadores de glutamina sintetasa y dihidrofolato reductasa.

Los vectores empleados comprenden rasgos convencionales en la técnica apropiados para la expresión en la célula hospedadora CHO apropiada. Típicamente, los vectores de expresión de CHO comprenden una secuencia de poliadenilación, tal como secuencia de poliA de betaglobina humana, secuencia de poliA de hormona de crecimiento bovina y secuencias de poliA tempranas o tardías de SV40.

El vector de expresión se puede emplear para expresar polipéptidos recombinantes, especialmente proteínas en célula hospedadoras CHO.

20 Células hospedadoras preferidas son células de ovario de hámster chino (CHO) y en particular células CHOK1, DG44, DUXKB11 y CHO pro3-.

El vector de expresión se emplea comúnmente en la forma de un plásmido. Los plásmidos pueden ser plásmidos que se replican autónomamente o plásmidos integradores.

25 En ciertas realizaciones altamente preferidas de la presente invención, el líder de secreción de fibronectina es fibronectina de hámster chino.

Polipéptidos que se pueden expresar mediante el procedimiento de la presente invención incluyen proteínas y péptidos terapéuticos, incluyendo citocinas, factores de crecimiento, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, polipéptidos inmunoglobulínicos, una enzima, vacunas, hormonas peptídicas, quimocinas, receptores, fragmentos de receptores, cinasas, fosfatasa, isomerasas, hidrolasas, factores de transcripción y polipéptidos de fusión.

35 Anticuerpos que se pueden expresar incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpo que tienen actividad biológica, incluyendo formas multivalentes y/o multispecíficas de cualquiera de los precedentes.

Los anticuerpos presentes en la naturaleza comprenden típicamente cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) idénticas y dos cadenas ligeras (L) idénticas interconectadas mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable (V_H) y una región constante (C_H), comprendiendo la región C_H en su forma natural tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera comprende una región variable (V_L) y una región constante que comprende un dominio, C_L .

45 Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Fragmentos de anticuerpo que se pueden expresar comprenden una porción de un anticuerpo intacto, teniendo dicha porción una actividad biológica deseada. Los fragmentos de anticuerpo incluyen generalmente al menos un sitio de unión antigénica. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen: (i) fragmentos Fab que tienen dominios V_L , C_L , V_H y C_{H1} ; (ii) derivados de Fab, tales como un fragmento Fab' que tiene uno o más residuos de cisteína en el extremo C del dominio C_{H1} , que pueden formar fragmentos bivalentes mediante puentes de disulfuro entre dos derivados de Fab; (iii) fragmento Fd que tiene dominios V_H y C_{H1} ; (iv) derivados de Fd, tales como derivados de Fd que tienen uno o más residuos de cisteína en el extremo C del dominio C_{H1} ; (v) fragmentos Fv que tienen los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo; (vi) moléculas de anticuerpo monocatenarias tales como anticuerpos Fv monocatenarios (scFv) en los que los dominios V_L y V_H están conectados covalentemente; (vii) polipéptido del dominio V_H o V_L sin dominios de la región constante conectados a otro dominio variable (un polipéptido del dominio V_H o V_L), esto es, con o sin dominios de la región constante, (p. ej., V_H - V_H , V_H - V_L o V_L - V_L) (viii) fragmentos de anticuerpos de dominio, tales como fragmentos que consisten en un dominio V_H o un dominio V_L , y fragmentos que se unen a anticuerpos de dominios bien V_H o bien V_L , tales como regiones CDR aisladas; (ix) los llamados "diacuerpos" que comprenden dos sitios de unión antigénica, por ejemplo un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L), en la misma cadena polipeptídica; y (x) los llamados anticuerpos lineales que comprenden un par de segmentos Fd en tándem que, junto con polipéptidos de la cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión antigénica.

Fragmentos de anticuerpo preferidos que se pueden preparar son anticuerpos de un solo dominio variable de mamífero, que son un fragmento de anticuerpo que comprende un dominio polipeptídico plegado que comprende secuencias características de dominios variables inmunoglobulínicos y que se une específicamente a un antígeno (es decir, constante de disociación de 500 nM o menos, tal como 400 nM o menos, preferiblemente 250 nM o menos, y lo más preferiblemente 100 nM o menos), y que se une al antígeno como un solo dominio variable; esto es, sin ningún dominio variable complementario. Anticuerpos de un solo dominio variable incluyen dominios variables de anticuerpo completos así como dominios variables modificados, por ejemplo, en los que uno o más bucles se han reemplazado por secuencias que no son características de dominios variables de anticuerpo o dominios variables de anticuerpo que se han truncado o comprenden extensiones N- o C-terminales, así como fragmentos plegados de dominios variables. Dominios variables individuales preferidos que se pueden preparar se seleccionan del grupo de V_H y V_L , incluyendo V_{kappa} y V_{lambda} . Lo más preferiblemente, los dominios variables individuales son dominios de ser humano o camélido, incluyendo dominios de camélido humanizados.

Cuando el polipéptido diana comprende dos o más cadenas que se van a secretar, particularmente cuando el polipéptido diana es un anticuerpo o un anticuerpo fragmentario que comprende dos o más cadenas, al menos una, y preferiblemente cada una, de las cadenas está unida a un líder de secreción de fibronectina, y se diseñan según esto polinucleótidos que codifican estos polipéptidos. Los líderes de secreción de fibronectina empleados pueden ser iguales o diferentes. Los polinucleótidos que codifican las dos o más cadenas pueden estar comprendidos dentro del mismo casete de expresión, pero preferiblemente están comprendidos en diferentes casetes de expresión. Cuando se emplean diferentes casetes de expresión, los casetes de expresión pueden estar situados en diferentes vectores, pero preferiblemente están en el mismo vector. Los promotores empleados pueden ser iguales o diferentes.

El sistema de expresión se expresa mediante métodos bien conocidos en la técnicas para las células empleadas. Métodos de expresión preferidos incluyen cultivar las células hospedadoras en medio de crecimiento y a continuación recuperar el polipéptido expresado. El término "medio de crecimiento" se refiere a un medio nutritivo usado para hacer crecer las células hospedadoras. En muchas realizaciones, se emplea una solución nutritiva. Medios de crecimiento adecuados para células hospedadoras dadas y métodos para recuperar polipéptidos son muy conocidos en la técnica.

En muchas realizaciones, la recuperación del polipéptido comprende una o más de filtración, centrifugación, diafiltración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, tal como cromatografía de afinidad a proteína A, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), filtración en gel y HPLC.

Según un aspecto preferido de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la producción de un polipéptido diana que comprende:

(a) transfección o transformación de una célula hospedadora con un vector de expresión para expresar un polipéptido diana en una célula hospedadora CHO, comprendiendo el vector de expresión un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido diana conectado operativamente a una secuencia líder de secreción de fibronectina;

(b) cultivar la célula hospedadora bajo condiciones que permitan la proliferación de la célula hospedadora y la expresión y la secreción del polipéptido diana desde la célula hospedadora

(c) y recuperar el polipéptido diana.

Según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una célula de ovario de hámster chino, preferiblemente una célula CHOK1, DG44, DUXKB11 o CHO pro3-, transfectada con un vector de expresión que comprende un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido diana conectado operativamente a una secuencia líder de secreción de fibronectina.

El polipéptido diana codificado comprende preferiblemente un anticuerpo monoclonal. Se puede emplear un casete de expresión que comprende polinucleótidos que codifican las cadenas tanto pesadas como ligeras de un anticuerpo monoclonal, preferiblemente cada una conectada operativamente a un líder de secreción de fibronectina. En algunas realizaciones, se emplean casetes de expresión separados que comprenden las cadenas pesadas y ligeras, que pueden estar situados en vectores separados, pero a menudo están situados en el mismo vector. Los líderes de secreción de fibronectina empleados pueden ser iguales o diferentes, pero preferiblemente son iguales.

En muchas realizaciones preferidas, el casete de expresión comprende un promotor de gen constitutivo, especialmente un promotor hEF1a conectado operativamente al polinucleótido que codifica el polipéptido diana, y cuando se emplean dos o más casetes de expresión, cada casete de expresión comprende un promotor del gen constitutivo, preferiblemente el mismo promotor, y lo más preferiblemente un promotor hEF1a.

El, o cada, casete de expresión para el polipéptido diana comprende preferiblemente una secuencia de poliA de hormona del crecimiento bovina.

5 El vector de expresión comprende preferiblemente un marcador de selección, lo más preferiblemente un sistema marcador de dihidrofolato reductasa. En muchos casos, el sistema marcador de dihidrofolato reductasa comprende un casete de expresión que comprende además un promotor de fosfoglicerato cinasa murino.

10 En ciertos casos, el sistema marcador de dihidrofolato reductasa comprende un casete de expresión que comprende además un promotor de fosfoglicerato cinasa murino.

La presente invención se ilustra sin limitación mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

15 Para cada líder de secreción (SL) que se ensaye, se construyeron dos vectores monogénicos que contenían bien la cadena pesada (HC) de hy1 FL de un MAb anti-MUC-1 o bien la cadena ligera (LC) lambda de un MAb anti-MUC-1. Cada casete de expresión consistía en un promotor de CMV de rata, conectado funcionalmente a una secuencia polinucleotídica que codifica el líder de secreción que estaba conectado en el marco a una secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido maduro de HC o LC y una secuencia de poliA de betaglobina humana. La estructura de los casetes de expresión se ilustra en la Figura 1.

20 Los líderes de secreción empleados eran como sigue:

Líder de secreción A: colágeno humano, secuencia MLSFVDTRTLLLLAVTLCLATCQS (SEQ ID No. 5)

Líder de secreción B: fibronectina humana, secuencia MLRGPGPGLLLLAVQCLGTAVPSTGA (SEQ ID No. 1)

Líder de secreción C: fibronectina de hámster chino, secuencia MLRGPGPGLLLAVLCLGTAVRCTEA (SEQ ID No. 2)

Líder de secreción D: albúmina de hámster chino, secuencia MKWVTFLLLLFVSDSAFS (SEQ ID No. 6)

25 Las células hospedadoras CHO DG44 se contaron y se sembraron sobre pocillos de una placa de 6 pocillos a $1,2 \times 10^6$ células/pocillo en medio MEM- α complementado con 10% de suero, 2 mM de glutamina y 0,45% de glucosa, y se incubaron durante la noche a $36,5^\circ\text{C}$, 7,5% de CO_2 .

30 Para cada transfección, se mezclaron entre sí 4 μg de los vectores monogénicos HC y LC (2 μg) y se diluyeron en 250 μl de medio MEM- α libre de suero (Life Technologies). También se incluyó una transfección simulada (PBS solamente). Para cada transfección, se diluyeron 12,5 μl de Lipofectamine 2000 (Life Technologies) en 250 μl de medio MEM- α libre de suero y se mezclaron. La mezcla se incubó a temperatura ambiente ($15\text{-}25^\circ\text{C}$) durante 5 minutos. El ADN diluido y el reactivo Lipofectamine 2000TM se combinaron, se mezclaron y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron a cada mezcla de transfección 500 μl adicionales de medio MEM- α , el medio de crecimiento se retiró del pocillo y el complejo se añadió a continuación a un pocillo de la placa de 6 pocillos que contiene las células. Después de 5 horas, el medio se retiró y se añadió medio de crecimiento reciente. Las células se incubaron durante 5 días a $36,5^\circ\text{C}$, 7,5% de CO_2 . El sobrenadante se recogió y se clarificó mediante centrifugación. El título de anticuerpo se determinó usando un ensayo de proteína A Octet (Forte Bio).

40 Los resultados se dan en la Tabla 1 posteriormente.

Tabla 1

Líder de secreción usado	Título de anticuerpo medio (mg/l)
A	2,91
B	7,79
C	8,85
D	1,89

45 El anticuerpo producido se recupera del sobrenadante mediante captura de proteína A, elución a pH bajo y se purifica mediante cromatografía de intercambio catiónico seguido por cromatografía de intercambio aniónico. El eluyente procedente de la cromatografía de intercambio aniónico se somete a nanofiltración viral, seguido por intercambio de tampón y concentración.

Ejemplo 2

Construcción de vectores

Se construyeron vectores bigénicos que contenían un promotor hEF1 α que conducía la expresión tanto de la cadena pesada de hy1 FL de un MAb anti-MUC-1 como de la cadena ligera lambda humana de un MAb anti-MUC-1.

5 Se construyeron vectores bigénicos adicionales en los que el promotor hEF1 α se intercambiaba bien por un promotor hCMV-MIE o bien por un promotor CMV de rata.

10 Cada casete de expresión con los vectores bigénicos consistía en un promotor conectado funcionalmente a una secuencia polinucleotídica que codifica el péptido de señalización de fibronectina de CHO del Ejemplo 1, que estaba conectada en el marco a una secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido maduro de HC o LC. El procesamiento correcto de ARNm se aseguraba por la presencia de una secuencia de poliA de hormona del crecimiento bovina.

15 Para permitir la selección de líneas celulares estables, los vectores también contenían una copia del gen de dihidrofolato reductasa (dhfr) de ratón bajo el control del promotor de fosfoglicerato murino (mPGK) y el gen de resistencia a higromicina bajo el control del promotor de timidina cinasa (TK).

Subcultivo normal de células CHO DG44:

20 Las células CHO DG44 se cultivaron normalmente en matraces agitadores de suspensiones en medio EX-CELL ACF CHO (Sigma) complementado con 8 mM de L-glutamina y 1 x complemento HT (Life Technologies). Las células se sembraron a una concentración de 2×10^5 células/ml, y las células se separaron cada 3 días. Los matraces se cultivaron a 37°C, 7,5% de CO₂ en una incubadora de agitación orbital a 140 rpm.

Transfecciones para la generación de líneas celulares estables

25 Las células usadas para las transfecciones se hicieron crecer en cultivo de suspensión celular, según se detalla anteriormente. Las células procedentes de cultivos en crecimiento se centrifugaron y se resuspendieron hasta una concentración de 2×10^7 células/ml. Un volumen de 0,1 ml de la suspensión celular y 4 μ g de ADN plasmídico linealizado se añadieron a una cubeta de electroporación. A continuación, la cubeta se puso en el nucleoflector Amaxa (Lonza) y se nucleofectó. Después de la transfección, las células se añadieron a 20 ml de medio EX-CELL ACF CHO (Sigma) precalentado complementado con 8 mM de glutamina y 1 x complemento HT en un matraz T75.

30 Las células transfectadas se incubaron a 37°C, 7,5% de CO₂. Después de la retirada de hipoxantina y timidina (HT) (48 h después de la transfección) del medio y la adición de 400 μ g/ml de Hygromycin B (Invitrogen) y 25 nM de MTX (144 h después de la transfección), las células se sembraron en placas de 96 pocillos a 5000 células/pocillo ($2,5 \times 10^4$ /ml). Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera de 7,5% de CO₂ en aire. Las placas se comprobaron con respecto al crecimiento de colonias hasta aproximadamente tres semanas después de la transfección. El sobrenadante procedente de hasta 100 pocillos que contenían crecimiento celular se recogieron y se analizaron con respecto al anticuerpo usando un ensayo de proteína A Octet (Forte Bio). Las 24 colonias que expresan superiores se expandieron en placas de 24 pocillos y se cultivaron durante 10 días. A continuación, el sobrenadante se ensayó con respecto al anticuerpo usando un ensayo de proteína A Octet (Forte Bio). Los resultados se dan en la Tabla 2 posteriormente.

40

Tabla 2

	hEF1 α		hCMV-MIE		CMV de rata	
	96 wp	24 wp	96 wp	24 wp	96 wp	24 wp
Nivel Exp Máx (μ g/ml)	7,3	18,0	6,1	3,2	6,1	nd
Nivel Exp Medio (μ g/ml)	3,3	4,2	0,7	1,3	0,6	nd

Ejemplo 3**Purificación de anticuerpo procedente de sobrenadante de CHO**

45 El sobrenadante procedente de líneas celulares CHO DG44 recombinantes generadas usando el vector bigénico del promotor hEF1 α descrito en el Ejemplo 2 se purificó usando proteína A-resina. Se cargaron 350 ml de la recolección clarificada a una columna prerrellena que contenía resina MabSelect SuRe (GE Healthcare). La resina se lavó en

primer lugar con 20 mM de fosfato sódico, 1M de NaCl (pH 7,0) y a continuación con 20 mM de fosfato sódico (pH 7,0). A continuación, el anticuerpo se eluyó con 100 mM de ácido acético. El producto recuperado se cuantificó usando un ensayo de proteína A Octet (Forte Bio) y se muestra en la Tabla 3.

5 **Tabla 3**

	Volumen (ml)	Concentración (mg/ml)
Recolección Clarificada	350	1,3
Anticuerpo Eluido	50,55	7,7

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de un polipéptido diana que comprende:
- (a) expresar un vector de expresión para expresar un polipéptido diana en una célula hospedadora CHO, comprendiendo el vector de expresión un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido recombinante conectado operativamente a una secuencia líder de secreción de fibronectina; y
- (b) recuperar el polipéptido diana.
2. Un procedimiento para la producción de un polipéptido diana que comprende:
- (a) transfección o transformación de una célula hospedadora con un vector de expresión para expresar un polipéptido diana en la célula hospedadora, comprendiendo el vector de expresión un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido diana conectado operativamente a una secuencia líder de secreción de fibronectina;
- (b) cultivar la célula hospedadora bajo condiciones que permitan la proliferación de la célula hospedadora y la expresión y la secreción del polipéptido diana desde la célula hospedadora; y
- (c) recuperar el polipéptido diana.
3. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que el líder de secreción de fibronectina se selecciona para corresponder a la célula hospedadora.
4. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que el casete de expresión comprende un promotor hEF1a.
5. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que el casete de expresión comprende una secuencia de poliA.
6. Un procedimiento según la reivindicación 5, en el que la secuencia de poliA se selecciona de secuencias de poliA de betaglobina humana, de poliA tempranas o tardías de SV40 de hormona del crecimiento bovina.
7. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que el líder de secreción de fibronectina tiene la secuencia MLRGPGPGLLLAVLCLGTAVRCTEA o una secuencia que tiene 90% de identidad de secuencia con la misma y que retiene la capacidad para secretar el polipéptido diana.
8. Un procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que se emplean dos casetes de expresión, un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera de un anticuerpo monoclonal y un segundo casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada de un anticuerpo monoclonal.
9. Un procedimiento según la reivindicación 8, en el que los dos casetes de expresión comprenden el mismo promotor, líder de secreción y secuencia de poliA.
10. Un procedimiento según la reivindicación 9, en el que el promotor es un promotor hEF1a, el líder de secreción de fibronectina es líder de secreción de fibronectina de hámster chino y la secuencia de poliA es secuencia de poliA de betaglobina bovina.
11. Una célula de ovario de hámster chino, preferiblemente una célula CHOK1, DG44, DUXKB11 o CHO pro3-, transfectada con un vector de expresión que comprende un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido diana conectado operativamente a una secuencia líder de secreción de fibronectina.
12. Una célula de ovario de hámster chino según la reivindicación 11, en la que el polipéptido diana comprende un anticuerpo monoclonal.
13. Una célula de ovario de hámster chino según la reivindicación 12, en la que se emplean casetes de expresión separados que comprenden cadenas pesada y ligera.
14. Una célula de ovario de hámster chino según la reivindicación 13, en la que los casetes de expresión están situados en el mismo vector.

15. Una célula de ovario de hámster chino según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en la que cada casete de expresión comprende un promotor de gen constitutivo, especialmente un promotor hEF1a conectado operativamente al polinucleótido que codifica el polipéptido diana.
- 5 16. Una célula de ovario de hámster chino según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en el que cada casete de expresión comprende una secuencia de poliA de hormona del crecimiento bovina.
17. Una célula de ovario de hámster chino según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, que comprende además un sistema marcador de dihidrofolato reductasa.
- 10 18. Una célula de ovario de hámster chino según la reivindicación 17, en la que el sistema marcador de dihidrofolato reductasa comprende un promotor de fosfoglicerato cinasa murino.
- 15 19. Una célula de ovario de hámster chino según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18, en la que el líder de secreción de fibronectina es fibronectina de CHO.
- 20 20. Una célula de ovario de hámster chino según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19, en la que el líder de secreción de fibronectina tiene la secuencia MLRGPGPGLLLAVLCLGTAVRCTEA o una secuencia que tiene 90% de identidad de secuencia con la misma y que retiene la capacidad para secretar el polipéptido diana.
21. Un procedimiento para la producción de un polipéptido que comprende cultivar una célula de ovario de hámster chino según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 20.

Figura 1 Estructura de Casetes de Expresión

