



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 317 023**

51 Int. Cl.:
C12N 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04764194 .9**

96 Fecha de presentación : **17.08.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1658365**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.05.2006**

54 Título: **Método para reclonar células de producción.**

30 Prioridad: **19.08.2003 DE 103 38 531**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73 Titular/es:
Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG.
Binger Strasse 173
55216 Ingelheim, DE

72 Inventor/es: **Enenkel, Barbara;**
Fieder, Jürgen;
Otto, Ralf y
Krieg, Thomas

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 317 023 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

Método para reclonar células de producción.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al sector de la tecnología del cultivo celular y al método para la reproducción o multiplicación/clonación de células, preferiblemente de estirpes celulares, que son importantes para la producción de productos biofarmacéuticos así como a las composiciones que facilitan una reproducción de las estirpes celulares.

10 **Fundamento de la invención**

Para la fabricación biotecnológica de proteínas terapéuticas o activas desde el punto de vista biológico en células mamíferas, los llamados "biofármacos", las correspondientes células mamíferas son transinfectadas de forma estable con el ADN, que codifica la correspondiente proteína biológicamente activa (o bien sus subunidades). Tras el proceso de transinfección normalmente se obtiene una acumulación de millones de células transinfectadas de forma diferente. Por tanto la etapa decisiva para la fabricación de estirpes celulares de producción eficientes se basa en la selección y reproducción de clones celulares, que por un lado crecen de forma muy estable y por otro lado muestran una elevada productividad específica de proteínas terapéuticas (formación del producto, etc.). Puesto que existen millones de células que expresan el producto de forma distinta, resulta decisivo poder analizar individualmente una multitud de células, para poder elegir los candidatos apropiados (*clones celulares individuales*), que crecen de forma muy robusta así como aportan un valor o título de producto asimismo elevado. Este proceso de aislamiento de células individuales y de subcultivo se conoce como - *clonación* o bien *reclonación*.

La selección de células transinfectadas es posible, por ejemplo, a través de la clasificación o selección celular activada por la fluorescencia (FACS), de manera que la expresión de la proteína terapéutica se relacione con la expresión de una proteína marcador. Para ello se expresan conjuntamente en una célula, por ejemplo, las proteínas que emiten fluorescencia y sus variantes de *Aequorea victoria*, *Renilla reniformis* o bien otras especies, como por ejemplo, las proteínas rojas, amarillas, violetas, verdes fluorescentes o sus variantes de organismos no bioluminiscentes como, por ejemplo, *Discosoma sp.*, *Anemonia sp.*, *Clavularia sp.*, *Zoanthis sp.*, junto con la proteína terapéutica. Sobre la intensidad de la fluorescencia se pueden sacar conclusiones respecto a la productividad específica y al comportamiento del crecimiento de las células.

Sin embargo, existe la dificultad de depositar las células de producción recombinantes típicas como las células de mieloma (NSO) de ratón, ovario de hámster (CHO) o riñón de hámster (BHK), en particular, cuando se adaptan al crecimiento en cultivos de suspensión libres de suero, es decir en unas modernas condiciones del cultivo celular relevantes en cuanto a la producción, de forma aislada en recipientes de cultivo, por ejemplo, en las cavidades de las microplacas, en cultivos libres de suero, y se multiplican de forma eficiente (reclonación). Por ejemplo, en un cultivo en unas condiciones sin suero se depositan solamente escasas células, menos de 5 células, por lo que estás células mayoritariamente no se reproducen o si lo hacen se reproducen de forma poco eficaz. Se sospecha que el motivo de ello no reside en el contacto existente entre célula y célula, en la necesidad de un gran factor de crecimiento/nutriente en el caso de una densidad celular escasa y/o si falta o existe una concentración mínima de factores de señalización y acondicionamiento difusibles.

A nivel técnico el problema de la clonación de células aisladas libres de suero en las células de producción recombinantes mencionadas consiste en que los clones celulares son generados conforme al método de la "*limited dilution*". Es decir, se saturan un mínimo de 5 hasta 10 células en un medio sin suero en un recipiente de cultivo y seguidamente se hacen pasar por reiteradas clonaciones de la dilución, para obtener desde el punto de vista estadístico un cultivo formado por células genéticamente idénticas (método = *limited dilution*). Este tipo de reclonación ahorra tiempo por un lado y por otro conduce a cultivos de mezcla heterogénea desde el punto de vista genético, puesto que el procedimiento se basa en un cálculo estadístico y no en un cultivo real de cada una de las células idénticas genéticamente depositadas de forma aislada. Estos cultivos de mezcla heterogéneos se caracterizan en general por una limitada fortaleza en su fermentación y un perfil de expresión heterológico.

Alternativamente, se pueden generar estirpes celulares de producción relevante de clones de células aisladas solamente por deposición de cada célula de las células adherentes adaptadas al suero. Así Meng y cols. (2000) mencionan por ejemplo, un método para la deposición de células aisladas de células CHO que crecen adheridas en un medio que contiene suero. El método descrito por Meng y cols., tiene sin embargo un inconveniente importante: Debido a la adherencia de las células puede producir unas lesiones notables en las células y alteraciones en el crecimiento y en la productividad de las células reclonadas debido a la costosa disolución enzimática de las células de la base (tratamiento con tripsina). Además los clones de las células aisladas obtenidos se deben adaptar seguidamente al crecimiento libre de suero en un cultivo, lo que ordinariamente está ligado a un gasto elevado de tiempo así como a una productividad alterada de células y de calidad del producto (compárese aquí con Kaufmann y cols., 2001; Mueller y cols., 1999).

Mediante el empleo de células nutritivas, conocidas también como células *feeder*, al cultivar células que crecen de forma adherente se pueden ver influidas de forma positiva las propiedades de crecimiento de las células o bien se reproducen algunos tipos de células básicamente en las condiciones del cultivo celular. Aquí los ejemplos son células de hombre-ratón o bien de hibridoma de ratón-ratón (Hinak y cols., US 5.008,198), queratinocitos primarios (Rhein-

wald y Green, 1975; WO9954435), células madre (Williams y cols., 1988) y diferentes células tumorales (Wee Eng Lim y cols., 2002; Rexroad y cols., 1997; Peng y cols., 1996; Grigoriev y cols., 1996; Sanchez y cols., 1991; Butcher y cols., 1988; Long y cols., 1986; Shenyour y cols., 1984; Pintus y cols., 1983; Brodin y cols., 1983). Las células *feeder* son la mayoría células detenidas en su crecimiento física o químicamente, las cuales debido a un pretratamiento especial han ajustado su capacidad para la división celular, por lo que se mantienen vitales una media de 2 a 3 semanas. Por lo tanto las células *feeder* están en condiciones de aportar factores al medio que favorezcan el crecimiento y por lo tanto pueden favorecer el crecimiento inicial de células no retenidas o bien facilitarlo en el caso de diferentes células primarias. Para ello se colocarán las células *feeder* en un recipiente de cultivo formando una "monocapa". A continuación, se colocan en placas las células que se van a cultivar de forma adherente sobre o entre las células *feeder* y se cultivan en unas condiciones estándar. Las células *feeder* se pueden fabricar, por ejemplo, mediante irradiación o tratamiento con mitomicina C (Azirino(2',3':3,4)pirrolo(1,2-a)indol-4,7-diona,6-amino-8-[[aminocarbonil]oxi]metil]-1,1a,2,8,8a,8b-hexahidro-8a-metoxi-5-metil-,[1aR-(1a.alfa.,8.beta.,8a.alfa.,8b.alfa.)]) (9CI) (Butcher y cols., 1988). Las células primarias como las células del bazo, los fibroblastos, las células sanguíneas (Morgan, Darling; Kulturtierischer Zellen. Spectrum Akademischer Verlag 1994, pág 115f) y los macrófagos (Hlinak y cols., 1987) se han descrito en los sistemas celulares *Feeder*. En relación con la producción de anticuerpos en las células del hibridoma se ha descrito la utilización de células *feeder* y la selección celular basada en FACS. Hlinak y cols. (1987), por ejemplo, describen una eficacia de reclonación del 33 hasta del 57% en la reclonación de células del hibridoma que crecen de forma adherente a base de dos (2) células por recipiente de cultivo. En las células del hibridoma empleadas se trataba en general de células adaptadas a un medio que contiene suero y que crece de forma adherente.

En la utilización de células *feeder* heterogéneas, en especial de células *feeder* humanas para la generación de células de producción existe un riesgo de contaminación considerable por el virus de la enfermedad, como por ejemplo, virus, bacterias o micoplasmas. Además muchas de las células *feeder* (primarias) descritas necesitan un medio que contiene suero, lo que inicialmente incrementa el riesgo de la contaminación y en segundo lugar tiene el riesgo de que se deben readaptar células de producción adaptadas al crecimiento libre de suero lo que resulta caro.

En la utilización de células *feeder* heterogéneas, en general, se necesita una contraselección de células *feeder*. Las células de producción se basan, en general, en una presión de selección, por ejemplo, por el empleo de aditivos de medios (antibióticos como G418) y/o medios no completos (falta de hipoxantina, timidina). Esta presión de selección permite la selección de células, que han integrado y recogido la correspondiente información genética para, por ejemplo, una proteína recombinante. El medio así formado, adaptado a la célula de producción influye de forma decisiva en el crecimiento de las células *feeder* y conduce, enlazado al medio de producción no compatible, a una muerte muy rápida de las células *feeder*. Por ello no se garantiza la función de las células *feeder*.

Resumen de la invención

Un cometido de la presente invención consistía en hallar un método de reclonación eficiente, que a base de menos de cinco células, preferiblemente de una célula, permita una reproducción de células mamíferas relevante en la producción en unas condiciones sin suero y en un cultivo en suspensión. En particular, el cometido consiste en preparar el método correspondiente para la reclonación de células BHK o CHO aisladas habitualmente de hámster así como para células de mieloma aisladas de ratón, por ejemplo, células de NS0.

Otro cometido de la invención era disponer de composiciones que facilitaran la ejecución de los correspondientes métodos de reclonación, en particular de aquellos, que permiten una reclonación de células de mieloma de hámster o también de ratón.

Estos cometidos se resuelven mediante los objetos conforme a la invención definidos en las reivindicaciones, los cuales hacen referencia conforme a un aspecto de la invención a un método para la clonación de células, que se caracteriza porque menos de cinco, preferiblemente una (1) o (2) células mamíferas, preferiblemente células de mieloma de ratón, en presencia de células *feeder*, preferiblemente de origen autógeno, se colocan en un recipiente de cultivo en unas condiciones sin suero y se cultivan y se reproducen en unas condiciones sin suero. Un aspecto especial de la invención se refiere a un método determinado para la reclonación de células CHO ó BHK (células de hámster) o bien células NS0 (células de mieloma de ratón), preferiblemente cuando en las células correspondientes se trata de aquellas que se adaptan a un crecimiento libre de suero en cultivos en suspensión.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método correspondiente para la reclonación de células CHO-, BHK o bien NS0, que se caracteriza por, que las células CHO se emplean como células *feeder* cuando en las células mamíferas que se van a clonar se trata de células CHO, que las células BHK se emplean como células *feeder* cuando en las células mamíferas que se van a clonar se trata de células BHK, y porque las células NS0 se emplean como células *feeder* cuando en las células que se van a clonar se trata de células NS0.

Los métodos conforme a la invención se caracterizan por una buena eficacia de reclonación superior al 10%, preferiblemente superior al 20%, en particular para las células depositadas de forma aislada. Según otra forma de ejecución los métodos de reclonación conforme a la invención disponen de una eficacia de reclonación superior al 30%, preferiblemente superior al 40%, en especial superior al 50%, preferiblemente superior al 60%, incluso superior al 70%, o incluso superior al 80%.

En este caso se consideran eficientes las eficacias de reclonación del 10 hasta más del 65% en la reclonación de cada una de las células CHO, del 10 hasta más del 50% en la reclonación de cada una de las células BHK depositadas y de un 10 hasta de un 45% en la reclonación de cada una de las células NS0 depositadas. Cuando se depositan más de una (1) célula por recipiente de cultivo, por ejemplo, dos, tres o cuatro, la eficacia de reclonación para las células correspondientes se sitúa por encima de los valores indicados para las células correspondientes para la reclonación de células CHO, BHK y NS0.

Otro aspecto de la invención hace referencia a un método correspondiente para la reclonación de células mamíferas, en particular, células de mieloma de ratón o hámster, en el cual se reproducen las células que se clonan en presencia de 100 hasta 200.000 células *feeder* por ml de medio.

Además la presente invención se refiere a las composiciones que constan de un medio de cultivo libre de suero, con menos de cinco células mamíferas capaces de dividirse y a las células mamíferas capaces de dividirse y se refiere a las células mamíferas capaces de dividirse, las células *feeder* autógenas. Conforme a otro aspecto de la invención en las células mamíferas capaces de dividirse se trata de células que se adaptan al crecimiento libre de suero como cultivo de suspensión. En otra forma de ejecución especial, la composición tiene únicamente una (1) o dos (2) células mamíferas capaces de dividirse en el medio de cultivo. Preferiblemente, en las células mamíferas capaces de dividirse se trata de células de hámster, como por ejemplo células CHO ó BHK, o células de mieloma de ratón, por ejemplo, células de NS0.

Conforme a otro aspecto según la invención, la composición contiene células de hámster, preferiblemente células CHO como células *feeder*, cuando en las células mamíferas capaces de dividirse se trata de células CHO. Se trata de células BHK en las células mamíferas capaces de dividirse, por lo que la composición contiene asimismo células de hámster, preferiblemente células BHK como células *feeder*. En el caso de células mamíferas capaces de dividirse se trata de células de mieloma de ratón, por ejemplo, células NS0, por lo que la composición además contiene células de mieloma de ratón como células *feeder*, en el caso de células NS0 asimismo células NS0 como células *feeder*.

Sorprendentemente se ha descubierto que mediante el empleo de células *feeder* autógenas en suspensión, algunas células mamíferas, preferiblemente las células de mieloma de hámster o de ratón, se pueden depositar en un medio libre de proteínas y/o de suero y crecer en cultivos y por tanto vencer los inconvenientes mencionados antes en la reclonación, por ejemplo por la *dilución limitada*, o bien la adaptación de estirpes celulares mononucleares al crecimiento sin suero en un cultivo en suspensión.

Contrariamente a ello se ha descrito en la tecnología actual (Hugin A.W.: "Cloning of cells with autologous feeder cells" Journal of immunological methods, Elsevier science publishers B.V., Amsterdam, NL.Bd.205, Nr.2, 14 Juli 1997, páginas 211-212) solamente un método para mejorar la eficacia de la reclonación utilizando células Feeder autógenas en un medio que contiene suero. Sin embargo, Hugin no habla de una reclonación libre de suero de células mamíferas en un cultivo en suspensión

El método conforme a la invención facilita la deposición de las células mamíferas correspondientes en un medio de producción definido químicamente o sin proteínas, libre de suero, de manera que corresponde a una adaptación realizada normalmente en un medio de producción libre de proteínas o de suero. Esto conduce a una acortamiento esencial de los tiempos de desarrollo (aprox. 50%) al establecer las estirpes celulares relevantes en producción. Además la deposición de una sola célula conduce a clones celulares homogéneos, estables, lo que es esencial para la producción de biofármacos. Además la utilización de células *feeder* autógenas para la reclonación de células CHO, BHK o NS0 relevantes en la producción, por ejemplo, la utilización de células de hámster, preferiblemente células CHO o BHK, por ejemplo células de mieloma de ratón, preferiblemente, células NS0, representa un riesgo de contaminación mínimo en cuanto al virus de la enfermedad humano-patógeno como la utilización de células humanas o bien peor caracterizadas.

Descripción de las figuras

Figura 1 muestra la correlación entre la dosis de energía que se ha empleado en la fabricación de células *feeder*, y la eficacia de clonación en la reclonación de células aisladas CHO-DG44 depositadas de forma automatizada. La deposición de células se realizaba sobre aproximadamente 2000 células autógenas inactivadas *feeder*. A partir de los gráficos se deduce que con la dosis de energía de 20-500 Gy las células *feeder* irradiadas liberan suficientes factores al medio, de manera que más del 65% de los clones aislados depositados dan lugar a colonias con 50 Gy.

Figura 2 muestra la productividad de los cultivos de CHO-DG44 que expresan anticuerpos, que se obtienen por la dilución limitada (columna izquierda) o bien deposición de células aisladas (columna derecha). En la columna izquierda se representa la productividad de 6 cultivos, los cuales se han obtenido por medio de la dilución limitada. En la mitad derecha se representa la productividad de 6 clones aislados de la deposición automatizada de células aisladas. Para determinar la productividad se realizaban tres ensayos paralelos por clon celular/cultivo. Contrariamente a las clonaciones mediante "dilución limitada", la clonación por la deposición automatizada de clones individuales conducía a una dispersión básicamente menor en la productividad. Los subcultivos cultivados en paralelo y procedentes de un clon individual muestran una homogeneidad esencialmente superior en cuanto a su productividad en comparación con los subcultivos que se obtienen tras la dilución limitada.

Figura 3a muestra el título de producto de los clones celulares CHO-DG44 depositados por separado y seleccionados según diferentes criterios. En el gráfico A inferior se han depositado las células aisladas, que únicamente satisfacían el criterio de selección de “células vivas”. Este criterio se ha definido en un citómetro de flujo sobre la aplicación Forward-Side-Scatter. No se realizaba una selección según la fluorescencia de las células. Por el contrario, en los gráficos B y C medio y superior adicionalmente al criterio de selección de “células vivas” se acoplaba de forma lógica el criterio de selección de “fluorescencia de las células”. Se realizaba además una especificación posterior del criterio de selección “Fluorescencia de las células” sobre la intensidad de la fluorescencia. Para ello se depositaban por un lado los clones celulares que emitían fluorescencia en un 20% y por otro lado los que emitían fluorescencia en un 5%. En la desviación a la derecha del histograma C se puede ver que el porcentaje de clones celulares muy expresados al utilizar el criterio de células fluorescentes en un 5% aumenta claramente frente a los criterios habituales de selección empleados en A y B.

Figura 3b se basa en los datos visualizados en la figura 3a. Se representa la probabilidad porcentual, para obtener un productor con una productividad media doble (=productor elevado). En los datos que se obtenían para todas las células vivas, se adaptaba una distribución normal y se determinaba el título medio. A partir de la función de distribución para la distribución normal se calculaba entonces el porcentaje en el cual los clones celulares obtenidos sobre la deposición de cada una de las células poseen el título doble o elevado. Este porcentaje se representaba en la figura 3b. A partir del gráfico se pone de manifiesto que la probabilidad de un productor elevado en el empleo adicional del criterio del 5% superior en comparación con el empleo del criterio de células vivas aumenta en más de 20 veces.

Descripción detallada de la invención y de las formas de ejecución preferidas

Antes de que se explique seguidamente la invención con ayuda de los ejemplos de ejecución no limitados resulta que la utilización de artículos indeterminados, por ejemplo, “un” o “una”, así como de artículos determinados como “el”, “la”, incluyen el singular y plural del término correspondiente, siempre que una de ambas formas quede excluida de un modo explícito y se indique o remita a una forma determinada (singular, plural). Así el concepto “una célula” incluye automáticamente “varias células”, pues indica de forma explícita que solamente se refiere a una única célula. El singular se refiere explícitamente donde “una” se sustituye por (1).

Definiciones

El término “clonación/reclonación”, “clonar/reclonar” significa en relación con el cultivo celular una técnica, con cuya ayuda se puede obtener una población celular de células idénticas a partir de una célula de origen. La expresión “clonación celular” o también “clonación de una sola célula” se refiere por tanto a un método, en el cual a partir de un conjunto de células se identifican algunas células con células de genotipo diferente, se aíslan y seguidamente se multiplican en una población celular formada por una multitud de células idénticas desde el punto de vista genético. Para ello las células se depositan de una en una, es decir, una (1) célula por recipiente de cultivo, y a continuación se expanden en una población celular de células idénticas, así que se trata de un método de “clonación directa de cada una de las células”. Si se depositan varias células al mismo tiempo en un recipiente de cultivo, se expanden en una población celular y ésta mediante una dilución reiterada (=dilución limitada) se distribuye en poblaciones celulares de idénticas células, entonces hablaremos de un método de “clonación indirecta”.

En el caso de “clones aislados” se trata de células idénticas genéticamente que proceden de una única (1) célula. Una población celular formada por idénticas células de la misma procedencia se conocerá seguidamente como “población celular monoclonal”. Durante el cultivo de células del mismo origen se producen cambios espontáneos del genoma, por ejemplo, mutaciones y/o translocaciones, de manera que cada una de las células de esta población celular se considera como células idénticas en el sentido de la presente invención, y el cultivo se entiende como población celular monoclonal. Por el contrario, en un conjunto de células transinfectadas de forma estable (transinfectantes) no se trata de clones celulares de misma procedencia, es decir no de una población celular monoclonal, incluso cuando se transinfectan células inicialmente idénticas genéticamente con un ácido nucleico idéntico.

El término “subclones/subcultivos” se refiere a diferentes generaciones de células, que se forman en base a una célula origen/cultivo mediante el pase simple o múltiple de las células divisorias. Por ejemplo, se habla de “subclones/subcultivos”, cuando se cultivan y se reproducen idénticas células/cultivos celulares en varias generaciones.

Por una “reclonación eficiente o eficaz” se entiende una eficiencia de clonación decoro mínimo un 10%, preferiblemente de al menos un 20%, más preferiblemente de al menos un 30% y todavía más preferible de al menos un 40%. De acuerdo con una configuración especialmente preferida de la presente invención se entiende por una reclonación efectiva una clonación con una eficiencia de cómo mínimo un 50%, preferiblemente de cómo mínimo un 60%, más preferiblemente de un 70% como mínimo, y de incluso un 80%.

El término “eficiencia de clonación” se ha definido como el porcentaje de células que se pueden formar tras la deposición de poblaciones celulares vitales de preferiblemente más de 50 células. Por ejemplo, en una selección celular se distribuyen 50 células en 50 recipientes de cultivo y crecen 25 de cada una de estas 50 células depositadas, de manera que la eficacia de clonación es del 50% (25 de 50).

La expresión “capaz de dividirse/expandible” en el sentido de la presente invención describe el potencial de una célula/población celular a poder dividirse de forma ilimitada, al menos en 2, preferiblemente en 4 pases. Este potencial

puede verse reducido o alterado por completo, por ejemplo, mediante la irradiación con ^{137}Cs o bien mediante el tratamiento con mitomicina C.

La expresión “derivado/descendiente” se refiere a las células, que genéticamente se atribuyen a una determinada célula de partida o inicial y, por ejemplo, son generadas por el subcultivos (con o sin presión de selección) y/o por la manipulación genética. Los re-aislamientos de células del mismo tipo celular son registrados asimismo por la expresión “Derivado/descendiente”. Así por ejemplo todos los derivados/descendientes de estirpes celulares CHO equivalen a las células de hámster de *Cricetulus griseus* aisladas en 1958 por Puck y cols., independientemente de si se obtenían por cultivo, re-aislamiento o manipulaciones genéticas.

El término “células feeder autógenas” significa que tanto las células feeder como también las células que se van a cultivar en presencia de estas células feeder proceden de forma taxonómica del mismo origen. En las células que se van a cultivar se trata de por ejemplo una célula de hámster (subfamilia de *Cricetinae*), preferiblemente de una célula de la especie *Cricetulus* o *Mesocricetus*, por ejemplo, de una célula CHO o bien BHK, así que cada una de estas células feeder aislada originalmente de esta subfamilia representa una célula feeder autógena para estas células de hámster de la subfamilia *Cricetinae*. Según una configuración preferida el término “célula feeder autógena” significa que tanto las células feeder como también las células que van a ser cultivadas de forma taxonómica proceden de la misma especie o bien han sido aisladas originariamente de la misma especie (células de *Cricetulus* o bien *Mesocricetus*). Se trata en el caso de células que van a ser cultivadas, de una célula de hámster de la especie *Cricetulus* o *Mesocricetus*, preferiblemente de una célula CHO o bien BHK, de manera que cada una de las células feeder aislada originariamente de la especie respectiva representa una célula feeder autógena en el sentido de esta invención. Conforme a otra configuración preferida existe también una “célula feeder autógena”, siempre que las células feeder y las células que van a ser cultivadas procedan de la misma especie, por ejemplo, *Cricetulus griseus* o *Mesocricetus auratus*. Según otra configuración especialmente preferida existe también una “célula feeder autógena”, siempre que las células feeder y las células que van a ser cultivadas procedan de la misma especie y dispongan del mismo tropismo de tejido (por ejemplo, células de ovario de *Cricetulus griseus*- células CHO). Conforme a otra configuración especialmente preferida en el caso de una célula feeder se trata de una “célula feeder autógena”, siempre que las células feeder y las células que van a ser cultivadas procedan de la misma célula de base, por ejemplo, cuando en el caso de ambas células se trata originalmente de células CHO-DG44 o bien derivados de estas células. Conforme a otra configuración preferida, la célula feeder proporciona la misma resistencia, por ejemplo frente a los antibióticos, que la célula que va a ser cultivada. Esto es especialmente una ventaja cuando la deposición celular se realiza en presencia de un medio de selección, por ejemplo, un antibiótico.

El término “sin suero” equivale a los medios de cultivo así como a las condiciones del cultivo, que se caracterizan porque las células son cultivadas en presencia de suero humano y/o animal, preferiblemente en presencia de cualquier proteína aislada del suero, preferiblemente en presencia de proteínas obtenidas de forma no recombinante. Como consecuencia de ello la expresión “células adaptadas a las condiciones sin suero” equivale a aquellas células que pueden reproducirse en presencia de suero humano o animal o bien de proteínas de suero.

El concepto “libre de proteínas” significa que el medio de cultivo no contiene proteínas animales, por lo que las proteínas aisladas de bacterias, hongos o levadura, no se entienden como proteínas animales.

El concepto “definido químicamente” describe un medio de cultivo, que está libre de suero, preferiblemente de proteínas, y consta de sustancias definidas químicamente. Los medios definidos químicamente constan por tanto de una mezcla de sustancias preferiblemente puras. Un ejemplo de un medio definido químicamente es, por ejemplo, el medio CD-CHO de la empresa Invitrogen (Carlsbad, CA, US).

La expresión “una célula cultivable en suspensión” se refiere a las células, que se adaptan al crecimiento en cultivos líquidos (“cultivos de suspensión”) y cuya capacidad para adherirse a las superficies de los recipientes, por ejemplo a las placas de cultivo, es limitada o bien se pierde. Las células que se adaptan tanto al crecimiento libre de suero como al crecimiento en suspensión se conocen como “células adaptadas al medio libre de suero y no adherentes”. Si se preparan a partir de dichos cultivos células feeder, se trata conforme a la definición de “células feeder no adherentes y adaptadas al medio sin suero”.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un método para la clonación de células, que se caracteriza porque menos de cinco, por ejemplo, cuatro, tres, dos o una (1) célula mamífera se depositan en presencia de células feeder, preferiblemente células feeder autógenas, en un recipiente de cultivo en unas condiciones libres de suero, y se cultivan y se multiplican en unas condiciones libres de suero. De acuerdo con una configuración preferida, la presente invención se refiere a un método correspondiente para la clonación de células mamíferas, que se caracteriza porque una (1) o dos células mamíferas se depositan por recipiente de cultivo en unas condiciones sin suero y en presencia de células feeder autógenas en unas condiciones libres de suero. En otra configuración especialmente preferida se trata de un método para la clonación de células aisladas, que se caracteriza porque una (1) célula mamífera se deposita en presencia de células feeder autógenas en un recipiente de cultivo en unas condiciones libres de suero, se cultiva y se reproduce en unas condiciones sin suero. En otra configuración especialmente preferida en el caso de la célula depositada y de la célula que va a ser cultivada se trata de una célula que crece en un cultivo en suspensión.

Si únicamente se deposita una (1) célula por recipiente de cultivo y se multiplica en una población celular, se trata en el caso de cada población celular que crece de forma aislada de una población celular monoclonal, y en el caso del procedimiento se trata de un método para la clonación directa de cada célula aislada. Si se depositan y multiplican más de una (1) única célula por recipiente de cultivo por ejemplo, dos, tres o cuatro células, se trata entonces en el caso

de poblaciones celulares que crecen de los llamados clones mixtos. Luego éstos pueden mediante una clonación de cada célula o bien según un método convencional, por ejemplo, por la dilución reiterada de poblaciones celulares (*dilución limitada*) ser transferidos a las denominadas poblaciones celulares monoclonales estadísticas (ver por ejemplo, Morgan, Kultur tierischer Zellen, páginas 113 y 114, Spektrum Akademischer Verlag, 1994).

Con el método llevado a cabo mediante la presente invención se pueden multiplicar y también clonar en particular células mamíferas de la subfamilia de las *Murinae*, por ejemplo de la especie *Mus* o de la subfamilia *Cricetinae*, por ejemplo, de las especies *Cricetulus* o *mesocricetus*, así como de estas estirpes celulares aisladas incluyendo sus descendientes/derivados. Preferiblemente el método conforme a la invención es adecuado para la reproducción/clonación de células de hámster o de células de ratón-mieloma, así como de las estirpes celulares estables derivadas de ellas.

Según ello la presente invención hace referencia a un método para la clonación de células en presencia de células *feeder*, preferiblemente de células *feeder* autógenas, que se caracteriza porque para las células mamíferas depositadas y que se van a clonar se trata de células de hámster o de mieloma de ratón.

Conforme a una configuración especialmente preferida los procedimientos conforme a la invención hacen referencia a métodos para la reproducción/clonación de células de hámster de la especie *Cricetulus* (hámster chino) así como de las estirpes celulares estables derivadas de las células aisladas o aisladas de esta especie, por ejemplo, de células CHO, CHO-K1, CHO-DUKX, CHO-DUKX B1 o CHO-DG44 así como de los derivados/descendientes de estas estirpes celulares. Un método especialmente apropiado a la invención es aquel en el que las células CHO-DG44, CHO-DUKX y CHO-K1, en particular las células CHO-DG44 y CHO-DUKX se reproducen y clonan en presencia de células autógenas *feeder*. Con ayuda del método conforme a la invención se pueden multiplicar y también clonar según el método aquí descrito, células de *Mesocricetus auratus* (Syrischer Goldhamster) así como estirpes celulares estables derivadas de ellas o aisladas, por ejemplo, células BHK21 o BHK TK así como derivados/descendientes de estas estirpes celulares. Como consecuencia de ello la presente invención se refiere preferiblemente a un método para la reproducción y clonación de células CHO o BHK, así como de sus derivados/descendientes, que se caracteriza porque menos de cinco, por ejemplo, cuatro, tres, dos o preferiblemente meramente una (1) célula se depositan en presencia de células autógenas *feeder* en un recipiente de cultivo en unas condiciones sin suero y se cultivan y reproducen.

Además la presente invención se refiere a un método para la reproducción y en particular para la clonación de células de mieloma de ratón, preferiblemente de *Mus musculus* así como de estirpes celulares estables derivadas de las mismas o aisladas a partir de ellas, por ejemplo, las células NSO y Sp2/0 así como los derivados/descendientes de estas estirpes celulares. Este método se caracteriza porque menos de cinco, por ejemplo, cuatro, tres, dos o preferiblemente solamente una (1) de estas células se deposita en presencia de células autógenas *feeder* en un recipiente de cultivo en unas condiciones sin suero y se cultivan y reproducen.

Otros ejemplos para células de hámster y de ratón, que pueden reproducirse y clonarse conforme a la invención, se muestran en la tabla 1 siguiente. Además de derivados y descendientes de estas células/estirpes celulares, otras células de mamíferos que incluyen las estirpes celulares del hombre, ratón, rata, o bien de otros roedores como el ratón o el hámster, se pueden reproducir o clonar según uno de los métodos conforme a la invención.

TABLA 1

Estirpes celulares de hámster y ratones

Estirpe celular	Número de depósito
NSO	ECACC No. 85110503 ATCC CRL-1827 ATCC CRL-2695, 2696
Sp2/0-Ag14	ATCC CRL-1581
BHK21	ATCC CCL-10
BHK TK-	ECACC No. 85011423
HaK	ATCC CCL-15

TABLA 1 (continuación)

Estirpe celular	Número de depósito
2254-62.2 (BHK-21-Derivat)	ATCC CRL-8544
CHO	ECACC No. 8505302
CHO-K1	ATCC CCL-61
CHO-DUKX (= CHO duk ^r , CHO/dhfr)	ATCC CRL-9096
CHO-DUKX B1	ATCC CRL-9010
CHO-DG44	Urlaub et al., Cell 33[2], 405-412, 1983
CHO Pro-5	ATCC CRL-1781
V79	ATCC CCC-93
B14AF28-G3	ATCC CCL-14
CHL	ECACC No. 87111906

Según la invención, las correspondientes células mamíferas son cultivadas y depositadas en unas condiciones sin suero. Si se diera el caso estas etapas se llevan a cabo en unos medios, que se han definido químicamente y se encuentran libres de proteínas/péptidos animales. Los ejemplos para los medios que se obtienen en el comercio son Ham's F12 Medium (Sigma, Deisenhofen, DE), RPMI-1640 (Sigma), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma), Minimal Essential Medium (MEM; Sigma), Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Sigma), CD-CHO (Invitrogen), Carlsbad, Ca., USA), CHO-S-SFM-II (Invitrogen), Medio de CHO libre de suero (Sigma) y medio de CHO libre de proteínas. Cada uno de estos medios puede ser completado si se diera el caso con diferentes compuestos, por ejemplo, hormonas y/o otros factores de crecimiento (por ejemplo, insulina, transferrina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento similar a la insulina), sales (por ejemplo, cloruro sódico, calcio, magnesio, fosfato), tampones (por ejemplo, HEPES), nucleósidos (por ejemplo, adenosina, timidina). Glutamina, glucosa u otras sustancias nutritivas equivalentes, antibióticos y/o elementos traza. Para la selección de células modificadas genéticamente, que expresan uno o varios genes marcadores de la selección, se pueden añadir al medio un o varios medios de selección adecuados, por ejemplo, antibióticos.

Hasta el momento se ha descrito la utilización de células *feeder* para el cultivo de células en relación con el cultivo de células que crecen de forma adherente (por ejemplo, Wee Eng Lim y cols., 2002; Rexroad y cols., 1997; Peng y cols., 1996; Grigoriev y cols., 1996; Sanchez y cols., 1991; Butcher y cols., 1988; Long y cols., 1986; Shneyour y cols., 1984; Pintus y cols., 1983; Brodin y cols., 1983. Aquí se depositan células *feeder* adherentes en un recipiente de cultivo o bien sobre un soporte como capa para una sola célula (*monolayer*) y las células que van a ser cultivadas se cultivan en esta *monolayer*. Puesto que las células *feeder* han perdido su capacidad para crecer más (por acción natural o bien artificial) las células que se van a cultivar pueden reproducirse sin que las células *feeder* tengan que crecer. Por lo que tanto las células que se van a cultivar como las *feeder* son células que crecen de forma adherente.

La presente invención facilita conforme a otra forma de ejecución según la invención la multiplicación de células que crecen en suspensión, tanto si se utilizan células *feeder* autógenas adherentes como si conforme a otra configuración preferida se utilizan células *feeder* autógenas obtenidas en suspensión. La utilización de células *feeder* autógenas obtenidas en suspensión se prefiere especialmente cuando tanto las células *feeder* como las células que se van a cultivar proceden de la misma célula base, por ejemplo cuando en el caso de ambas células se trata de células que se han adaptado a su crecimiento en suspensión. Por lo tanto la presente invención hace referencia también a un método para la reproducción/clonación de las células mamíferas descritas antes, que se caracteriza porque las células que se van a cultivar son depositadas, cultivadas y se reproducen en presencia de células *feeder* autógenas obtenidas en suspensión. Se prefiere especialmente un método que se caracteriza porque en el caso de células que se van a cultivar se trata de células que se adaptan al crecimiento en suspensión. En este contexto es preferible un método para la reproducción/clonación de células mamíferas, que se caracteriza porque la deposición de las células y la multiplicación de las células mamíferas depositadas se realizan en un cultivo en suspensión definido químicamente y/o libre de suero y/o de proteínas.

El número de células *feeder* autógenas que se van a emplear en la reproducción/clonación de las células mamíferas aquí descritas depende fundamentalmente de la naturaleza de la célula mamífera que se va a reproducir y va a ser clonada y se puede determinar mediante un simple ensayo de titulación para cada tipo de célula. Los métodos conforme a la invención para la reproducción/clonación de células mamíferas se llevan a cabo por ejemplo en presencia de al menos más de 100 células *feeder* autógenas por ml de medio, preferiblemente en presencia de 100 hasta 200.000 células *feeder* autógenas por ml de medio. En otra configuración preferida la reproducción/clonación de las células mamíferas se realiza en presencia de 500 hasta 50.000 células *feeder* autógenas. Se prefiere asimismo un método en el cual la multiplicación/clonación de las células mamíferas se realiza preferentemente en presencia de 500 hasta 10.000

células *feeder* autógenas por ml de medio, preferiblemente en presencia de 2000 hasta 10.000 células *feeder* autógenas por ml de medio.

Según la definición del concepto “células *feeder* autógenas”, la presente invención se refiere a un método para la reproducción/clonación de células mamíferas, que se caracteriza porque las células de hámster, preferiblemente de la subfamilia *Cricetinae*, mas preferiblemente de las especies *Cricetulus* o *Mesocricetus*, se emplean como células *feeder*, cuando en el caso de células mamíferas depositadas y que se van a multiplicar/clonar se trata de células CHO o BHK, y se caracteriza porque las células de mieloma de ratón se emplean como células *feeder*, cuando en el caso de células mamíferas depositadas y que se van a multiplicar /clonar se trata de células NS0. Se prefiere además un procedimiento para la reproducción/clonación de células mamíferas que se caracteriza porque las células CHO se emplean como células *feeder*, cuando las células mamíferas depositadas y que se van a reproducir/clonar son células CHO, que se caracteriza porque las células BHK se emplean como células *feeder*, cuando las células mamíferas depositadas y que se van a reproducir/clonar son células BHK, y que se caracteriza porque las células NS0 se emplean como células *feeder*, cuando las células depositadas y que se van a reproducir/clonar son células NS0.

Para el caso en que las células mamíferas depositadas y que se van a cultivar son cultivadas en presencia de un medio de selección, es adecuada la utilización de células autógenas *feeder*, que asimismo disponen de un gen marcador de selección mediador de la resistencia, con el cual se puede evitar una muerte rápida de las células *feeder* en presencia del medio de selección. Según ello la presente invención se refiere también a un método para la clonación de células, en especial de las células de mieloma de ratón o de hámster anteriormente mencionadas, que se caracteriza porque menos de cinco, por ejemplo, cuatro, tres, dos o una (1) de estas células mamíferas se deposita en presencia de células autógenas *feeder*, en un recipiente de cultivo en unas condiciones sin suero y se cultivan y se multiplican en unas condiciones sin suero, de manera que las células autógenas *feeder* y las células mamíferas depositadas disponen al menos de un marcador de selección, que proporciona una resistencia frente a un medio de selección y al menos la reproducción de las células mamíferas que se van a clonar se realiza en unas condiciones sin suero en presencia del medio de selección determinado frente al que es resistente tanto la célula *feeder* como la célula mamífera que se va a clonar.

Las células *feeder* autógenas se pueden preparar, por ejemplo, por irradiación con una fuente de rayos radioactiva, por ejemplo por irradiación con el isótopo de cesio 137. Para el método aquí descrito es preferible la irradiación con una dosis de energía entre 1 y 1000 Gy. Es especialmente preferible la utilización de una dosis de energía entre 10 y 300 Gy, a ser posible entre 20 y 200 Gy. En relación con la clonación de células de CHO se ha demostrado que la utilización de células *feeder* autógenas, por ejemplo de células CHO, resulta preferible y conduce a una eficacia de clonación eficiente, si éstas se han irradiado con una dosis de energía entre 1 y 500 Gy. Se ha comprobado que es especialmente preferible el empleo de células autógenas *feeder* que han sido irradiadas con una dosis de energía entre 20 y 100 Gy, preferiblemente con unos 50 Gy. Fundamentalmente la dosis de energía óptima para cada célula se puede averiguar de modo experimental de forma que las células *feeder* son tratadas con distintas dosis de irradiación y análogamente al método descrito en los ejemplos de las configuraciones la eficiencia de clonación se calcula en función de la dosis de irradiación. Además de la radiación gamma con ^{137}Cs y ^{60}Co (isótopo de cobalto 60) también es adecuado, por ejemplo, un tratamiento con rayos UV, rayos de electrones, irradiación radiactiva, rayos de neutrones y rayos de microondas.

Las células *feeder* se pueden emplear directamente o tras una crioconservación, por ejemplo, en nitrógeno líquido, en uno de los métodos conforme a la invención para la reproducción/clonación de células mamíferas. Los métodos para la crioconservación de células mamíferas son conocidos por el técnico y se han descrito por ejemplo en Freshney (Hers.), Animal cell culture - un método práctico, IRL-Press 1986, páginas 73-78, al que aquí se hace referencia.

Los presentes métodos son adecuados para reproducir las células mamíferas depositadas hasta una densidad de 1×10^5 hasta 4×10^6 ml de medio en el recipiente de cultivo, en el que originariamente se han depositado. Preferiblemente, se realiza un primer pase para una densidad celular de 2×10^5 hasta 8×10^5 ml de medio, en particular para una densidad celular de 2×10^5 hasta 5×10^5 ml de medio.

Los métodos conforme a la invención para la reproducción/clonación de las células mamíferas aquí descritas se caracterizan por una eficacia de reclonación eficiente, de manera que la presente invención se refiere a un método para la reproducción/reclonación de células mamíferas, que se caracteriza porque la eficiencia de clonación es como mínimo del 10%, preferiblemente del 20%, más preferiblemente de un 30% como mínimo, e incluso de un 40%. Según una configuración especialmente preferida, la presente invención se refiere a un método para la reproducción/reclonación de células mamíferas que se caracteriza porque la eficiencia de reclonación es como mínimo del 50%, preferiblemente del 60%, en particular del 70% y muy especialmente del 80%.

Según los ejemplos aquí descritos para las células CHO se obtenía una eficiencia de reclonación incluso superior al 65%. Conforme a ello la presente invención se refiere asimismo a un método para la reproducción/reclonación de células CHO, que se caracteriza porque la eficiencia de reclonación en la reclonación de las células CHO depositadas es mayor al 10%, preferiblemente mayor al 20%, en particular mayor al 30%, mayor al 40%, e incluso mayor al 50 y al 60%. La presente invención se refiere en general también a los métodos con eficiencias de reclonación algo inferiores para los correspondientes tipos de células indicadas.

En una configuración preferida del método conforme a la invención, la célula correspondiente que va a ser clonada contiene uno o varios genes de interés que codifican uno o varios productos (polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Se trata preferiblemente en el caso de la célula correspondiente de una célula CHO, BHK o bien NSO así como de los derivados/descendientes de estas estirpes celulares. En general puede tratarse de cualquier otra célula, por ejemplo de una de las células mencionadas en la tabla 1.

En el gen(es) de interés que se van a producir se puede tratar naturalmente de genes existentes en la célula huésped pero también de genes introducidos artificialmente en las células. Por definición cada secuencia o cada gen que se introduce en una célula, se conoce en lo que se refiere a esta célula como “secuencia heterogénea” o bien “gen heterogéneo”, incluso cuando la secuencia que se va a introducir o el gen a introducir es idéntico a una secuencia endógena o a un gen endógeno de la célula. Por ejemplo, un antígeno de hámster que se introduce en una célula de hámster, es por definición un gen heterogéneo. Cuando este gen heterogéneo es codificado como un gen de interés entonces se habla de un “gen heterogéneo de interés”.

Un gen heterogéneo de interés se puede introducir en la célula de formas distintas, por ejemplo, mediante la transformación vírica, transinfección o bien a través de una microinyección. Por lo que el gen heterogéneo de interés puede ser introducido en la célula como ADN lineal o bien como parte de un vector de expresión. Se conocen una multitud de vectores de expresión eucarióticos, que facilitan los lugares de clonación para la introducción de uno o varios genes heterogéneos así como su expresión. Las empresas que los distribuyen son entre otras Stratagene, La Jolla, CA, USA; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; Promega, Madison, WI, USA o bien BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA. La transinfección de células con un ADN o un vector de expresión que codifica uno o varios genes de interés, se realiza según los métodos habituales, como por ejemplo los descritos en Sambrook y cols., 1989 o Ausubel y cols., 1994. Los métodos de transfección adecuados son, por ejemplo, la transfección mediada por liposomas, la coprecipitación con fosfato de calcio, la electroporación, la transfección mediada por policationes (por ejemplo, dextrano-DEAE), la fusión de protoplastos, microinyección y las infecciones víricas. Preferiblemente se realiza una transfección estable, de manera que las moléculas de ADN se integran en el genoma de la célula huésped o bien en un cromosoma/minicromosoma artificial o se encuentran contenidas en la célula huésped de forma estable episomal. Se prefiere pues el método de transfección que facilita la frecuencia de transfección óptima y la expresión de uno o varios genes heterogéneos de interés en la célula correspondiente.

El gen heterogéneo de interés es mayoritariamente funcional con un promotor que facilita la transcripción del gen de interés, así como se acopla a otros elementos reguladores que permiten una transcripción y traslación (expresión) del gen de interés o bien incrementan su eficacia.

Como “promotor” se conoce una secuencia de polinucleótidos, que facilita y controla la transcripción de los genes o secuencias acoplados con ella. Un promotor contiene secuencias de reconocimiento para el enlace del ARN-polimerasa y del lugar de iniciación de la transcripción (lugar de iniciación de la transcripción). Para la expresión de una secuencia deseada en un tipo de célula determinada o de una célula huésped se debe elegir un promotor funcional adecuado. El técnico reconoce una multitud de promotores de diferentes fuentes, que incluyen promotores constitutivos, inducibles y reprimibles. Se encuentran documentados en bancos de datos, por ejemplo, el banco de genes y puede hacerse referencia a ellos como autónomos o independientes o bien como elementos de fuentes comerciales o individuales clonados dentro de las secuencias de los polinucleótidos. En los promotores inducibles la actividad del promotor puede verse reducida o intensificada como reacción a una señal. Un ejemplo de un promotor inducible es el promotor de tetraciclina. Este contiene secuencias de operador de tetraciclina (tetO), que pueden ser inducidas por una proteína transactivador regulada por la tetraciclina (tTA). En presencia de tetraciclina se inhibe el enlace de la tTA al tetO. Ejemplos de otros promotores inducibles son el promotor de metalotionina y de choque calórico (ver también Sambrook y cols., 1989; Gossen y cols., 1994). Entre los promotores que son especialmente adecuados para una expresión elevada en eucariontes se encuentran el promotor de Ubiquitina/S27a de hámster (WO 97/15664), el promotor temprano SV40, el promotor tardío principal de los adenovirus, el promotor de metalotionina-I de ratón, la región repetitiva terminal larga del virus del sarcoma de Rous y el promotor temprano del virus humano de citomegalia. Ejemplos de otros promotores de mamíferos heterogéneos son los promotores del choque calórico o de la inmunoglobulina, y de la actina.

Por ejemplo, el promotor puede acoplarse a secuencias amplificadoras para incrementar la actividad de la transcripción. Para ello se pueden emplear uno o varios amplificadores y/o varias copias de secuencias amplificadoras, por ejemplo un amplificador CMV o SV40.

Con la expresión “amplificador” se hace referencia a una secuencia de polinucleótidos que actúa en la localización *cis* sobre la actividad de un promotor y de este modo estimula la transcripción de un gen acoplado funcionalmente a este promotor. Contrariamente a los promotores, la acción del amplificador depende de la orientación y de la posición y por tanto pueden estar colocados delante o detrás de una unidad de transcripción, dentro de un intron o propiamente dentro de la región codificadora. El amplificador puede estar localizado tanto junto a la unidad de transcripción como también a una distancia considerable del promotor. También es posible un solapamiento físico y funcional con el promotor. El experto conoce una multitud de amplificadores de diferentes fuentes (y documentados en los bancos de datos como el banco de genes, por ejemplo, amplificador SV40, amplificador CMV, amplificador de polioma, amplificador de adenovirus) y disponibles como elementos clonados independientes o dentro de las secuencias de polinucleótidos (por ejemplo, documentados en ATCC o de fuentes comerciales e individuales). Una multitud de secuencias de promotores contienen también secuencias de amplificadores, como por ejemplo el promotor CMV frecuentemente empleado.

El amplificador CMV humano pertenece por tanto a los amplificadores más fuertes identificados hasta el momento. Un ejemplo de un amplificador inducible es el amplificador de metalotioneína, que puede ser estimulado por los glucocorticoides o metales pesados.

Fundamentalmente los elementos reguladores incluyen promotores, amplificadores, señales de terminación y de poliadenilación y otros elementos de control de la expresión. Para los distintos tipos de células se conocen tanto las secuencias reguladoras inducibles como también las constitutivas. “Los elementos reguladores de la transcripción” incluyen habitualmente un promotor de la secuencia de genes que se va a expresar, lugares de inicio de la transcripción y de terminación de la transcripción así como una señal de la poliadenilación.

La expresión “lugar de inicio de la transcripción” hace referencia a una secuencia de nucleótidos en la construcción génica, que corresponde a un ácido nucleico, que se incorpora en el transcripto primario, es decir, el receptor del ARNm. El lugar de inicio de la transcripción puede solaparse con las secuencias del promotor.

La expresión “lugar de terminación de la transcripción” se refiere a una secuencia de nucleótidos, que normalmente está presente en el extremo 3' del gen de interés o del segmento de gen transcribible y actúa sobre la interrupción de la transcripción por la ARN polimerasa.

La “señal de poliadenilación” es una secuencia de señalización que provoca el desdoblamiento en un lugar específico en el extremo 3' del ARNm eucariótico y la construcción post-transcripcional de una secuencia de unos 100-200 nucleótidos de adenina (cola poliA). La señal de poliadenilación incluye la secuencia AATAAA aproximada de 10-30 nucleótidos corriente arriba del lugar de desdoblamiento así como una secuencia situada corriente abajo. Se conocen diferentes elementos de poliadenilación, por ejemplo, tk poliA, SV40 tardío y poliA temprano o BGH poliA (por ejemplo, descritos en US 5.122.458).

Los “elementos reguladores de la traslación” incluyen un lugar de inicio de la traslación (AUG), un codón de terminación y una señal poliA para cada polipéptido que se va a expresar. Para una expresión óptima puede ser adecuado separar, añadir o modificar las zonas 5' y/o 3' que no han sufrido traslación de la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar, para eliminar los potenciales codones de inicio de la traslación no adecuados y adicionales o bien otras secuencias que puedan perjudicar la expresión a nivel de la transcripción o expresión. Para causar la expresión, se pueden insertar de un modo alternativo los lugares de enlace de consenso ribosomales directamente corriente arriba del codón de partida. Para producir un polipéptido secretado, el gen de interés contiene habitualmente una secuencia de señalización, que codifica un péptido precursor de la señal, que transporta el polipéptido sintetizado hacia y a través de la membrana ER. La secuencia de señalización se encuentra a menudo, pero no siempre, en un término amino de la proteína secretada y es desdoblada por las peptidasas de señalización después de que la proteína haya atravesado la membrana ER. La secuencia genética habitualmente, pero no necesariamente, contendrá una única secuencia de señalización. Cuando la secuencia de señalización nativa no está presente, se puede introducir de algún modo conocido una secuencia de señalización heterogénea. El experto conoce numerosas secuencias de señalización y se depositan en los bancos de datos de secuencias como el banco de genes y EMBL.

Los productos del gen de interés pueden englobar proteínas/polipéptidos, por ejemplo, anticuerpos, enzimas, citoquinas, linfocinas, moléculas de adherencia, receptores así como sus derivados o bien fragmentos, pero no se limitan a estos. En general, todos los polipéptidos son significativos, los que actúan como agonistas o antagonistas y/o pueden hallar una aplicación terapéutica o diagnóstica.

La expresión “polipéptidos” se emplea para las secuencias de aminoácidos o proteínas y define polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. Esta expresión engloba también proteínas que son modificadas de forma post-translacional por medio de reacciones como, por ejemplo, la glucosilación, fosforilación, acetilación o tratamiento de proteínas. La estructura del polipéptido puede ser modificada, por ejemplo, mediante sustituciones, delecciones o la inserción de aminoácidos, la fusión con otras proteínas, manteniendo su actividad biológica.

Ejemplos de proteínas son la insulina; el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I o IGF-II); la hormona de crecimiento humana (hGH) y otros factores de crecimiento como por ejemplo VEGF, EGF, TGF, por ejemplo, TGF-alfa y beta, que incluye $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ y $\beta 5$; el activador del plasminógeno tisular (tPA); la eritropoyetina (EPO); trombopoyetina (TBO); citoquinina, por ejemplo, interleucina (IL) como IL-1, IL-2, IL-3 IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18; interferona (IFN)-alfa, beta, gamma, omega o tau; factor de necrosis tumoral (TNF), como, por ejemplo, TNF-alfa, beta, gamma, ligando CD40, apo-2-ligando/TRAIL, DR4, DR5, DcR1, DcR2, DcR3, OPG, ligando Fas; G-CSF; GM-CSF; M-CSF; MCP-1 y VEGF. Otros ejemplos son los factores de coagulación como el factor VII, factor VIII, factor IX, factor de von Willebrands; factores anticoagulantes como la proteína C; Enekephalinase, RANTES (regulated on activation normally T-cell expressed and secreted); la proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); albúmina de suero (humana), molécula de adhesión celular como LFA-1, Mac-1, p 150.95, VLA-4, ICAM-2, ICAM-3, VCAM, o bien $\alpha V/\beta 3$ Integrina que incluye subunidades α ó β ; antígenos de grupos sanguíneos; receptor flk2/3; receptor OB; receptor mlp; CTLA-4; receptores Apo-2L como por ejemplo Apo-2; *Transforming Growth Factor* (TGF); proteínas CD; receptores de células T; antígenos víricos como por ejemplo el gp120 de HIV; antígenos asociados a tumores como por ejemplo receptor HER-1, HER-3 o HER-4, factores reumatoides, por ejemplo NGF-beta o PDGF; Cadena Relaxin-A ó B; Péptido asociado a la Gonadotropina; Inhibina; Activina; un antígeno citotóxico asociado a los linfocitos T (CTLA) o bien factores de neurotrofina como por ejemplo BDNF, neurotrofina-3, -4, -5 ó -6.

Otros ejemplos son los anticuerpos monoclonales, policlonales, multiespecíficos y de una sola cadena (*single Chain*) y los fragmentos de los mismos, como por ejemplo, Fab, Fab'F(ab')₂Fc y fragmentos Fc', cadenas de inmunoglobulina ligeras (L) y pesadas (H) y sus regiones constantes, variables o hipervariables así como fragmentos Fv y Fd (Chamov y cols., 1999). Los anticuerpos pueden ser de origen humano o no humano. También se cuestionan los anticuerpos humanizados y los anticuerpos quimera.

Los fragmentos Fab (*Fragment antigen-binding* = FAb) constan de las regiones variables de ambas cadenas, que se mantienen unidas por las regiones constantes limítrofes. Pueden ser producidas por ejemplo mediante el tratamiento con una proteasa, como por ejemplo la papaina, a partir de anticuerpos convencionales o bien también por la clonación del ADN. Otros fragmentos de anticuerpos son los fragmentos F(ab')₂, que pueden ser fabricados por la digestión proteolítica con pepsina.

Mediante la clonación de genes se pueden fabricar fragmentos de anticuerpos reducidos, que solamente constan de la región variable de la cadena ligera (VL) y pesada (VH). Estas se conocen como fragmentos Fv (*Fragment variable* = fragmento de la parte variable). Puesto que en estos fragmentos Fv no es posible la unión covalente a lo largo de los radicales de cisteína de las cadenas constantes, estos fragmentos a menudo se estabilizan de otro modo. Para ello se acoplarán la región variable de la cadena ligera y pesada por medio de un fragmento peptídico corto de aproximadamente 10-30 aminoácidos, en particular preferiblemente de 15 aminoácidos.

De este modo se forma una única cadena polipeptídica, en la cual VH y VL están unidos por medio de un enlace peptídico. Dichos fragmentos de anticuerpos se conocen como fragmentos Fv de cadena única (scFv). Se conocen y se han descrito ejemplos de anticuerpos scFv, ver por ejemplo Huston y cols. (1988).

En años anteriores se han desarrollado diferentes estrategias para fabricar derivados de scFv multímeros. La intención consiste en la creación de anticuerpos recombinantes con unas propiedades farmacocinéticas mejoradas y una mayor avidez de enlace. Para conseguir la multimerización de los fragmentos scFv estos se fabrican como proteínas de fusión con dominios de multimerización. Como dominios de multimerización puede actuar, por ejemplo, la región CH3 de una IgG o las estructuras de hélice ("*coiled coil structure*") como los dominios de la leucina. En otras estrategias, se aprovecha la interacción entre las regiones VH y VL del fragmento scFv para una multimerización (por ejemplo, Dia, Tri y Pentabodies).

"Diabody" ha sido definido por el experto como un derivado scFv homodímero, bivalente. El acortamiento del enlace peptídico en la molécula scFv a 5-10 aminoácidos da lugar a la formación de homodímeros por la superposición de cadenas VH/VL. Los Diabodies pueden ser además estabilizados por medio de puentes de disulfuro. Ejemplos de Diabodies encontramos en la literatura, por ejemplo, en Perisic y cols. (1994).

Como "Minibody" el experto define un derivado scFv homodímero bivalente. Consta de una proteína de fusión, que contiene la región CH3 de una inmunoglobulina, preferiblemente, de la IgG, en particular de la IgG1, como región de dimerización. Esta se une a los fragmentos scFv a través de una región de empalme, asimismo de la IgG, y una región de enlace. Ejemplos de dichos Minibodies se describen en Hu y cols. (1996).

Con "Triabody" el experto hace referencia a un derivado scFv homotrímero trivalente (Kortt y cols., 1997). La fusión directa de VH-VL sin utilizar una secuencia de enlace conduce a la formación de trímeros.

En los fragmentos denominados por el experto mini-anticuerpos, que tienen una estructura bi-, tri- o tetravalente, se trata asimismo de derivados del fragmento scFv. La multimerización se consigue pues a través de las estructuras "coiled coil" de di-, tri-, o tetrámeros (Pack y cols., 1993 y 1995; Lovejoy y cols., 1993).

Para la selección de las células transfectadas se pueden transfectar además con uno o varios genes marcadores de la selección. En la literatura se han descrito una multitud de genes marcadores de la selección, que incluyen marcadores (positivos/negativos) bifuncionales (ver por ejemplo, WO 92/08796 y WO 94/28143). Ejemplos de marcadores de selección, que se emplean en células eucarióticas, contienen los genes para la aminoglucósido-fosfotransferasa (APH), higromicina-fosfotransferasa (HYG), dihidrofolato-reductasa (DHFR), timidinacinasa(TK), glutamina-sinmicina, fleomicina y zeocina. Estos genes pueden ser introducidos en la célula junto con el gen de interés o por separado. Preferiblemente son introducidos a través de vectores de expresión. Las células modificadas del modo correspondiente pueden ser cultivadas en presencia de uno o varios medios de selección adecuados, que prefieren células en crecimiento, que contienen un gen marcador de selección determinado y lo expresan.

Una selección de células transfectadas es posible incluso mediante la selección celular activada por la fluorescencia (FACS), por ejemplo a través de la beta-galactosidasa bacteriana, el marcador superficial celular o las proteínas fluorescentes. Las proteínas fluorescentes permiten además un aislamiento basado en la FACS de cada una de las células mamíferas. Las células detectadas de ese modo pueden ser depositadas automáticamente en un recipiente de cultivo como células aisladas o como varias células, por ejemplo, con ayuda de un láser, por ejemplo con un láser de argón (488 nm) y por ejemplo con una unidad clon en un Flow Cytometer (Coulter EPICS Altra, Beckman-Coulter, Miami, FL, USA). Según una configuración preferida únicamente se depositarán de este modo una (1) única célula o dos células como máximo en un recipiente de cultivo celular armado con células *feeder* autógenas. Se prefiere especialmente la deposición de únicamente una sola célula. Además se puede realizar una selección a través de perlas

magnéticas. Para ello se realiza un marcaje de células a través de, por ejemplo, anticuerpos que se han acoplado a perlas magnéticas. Esto permite una selección de células conforme unas características definidas.

Se prefiere especialmente el aislamiento basado en FACS de clones celulares, que se han depositado conforme a uno de los métodos aquí descritos y han expresado conjuntamente una proteína fluorescente y un gen de interés. Preferiblemente se acoplan de un modo funcional la expresión de la proteína fluorescente y del gen de interés. Dicho acoplamiento funcional consiste, por ejemplo, en que ambos genes se encuentran en una disposición espacial estrecha, de manera que los índices de expresión de ambos genes se correlacionan unos con otros, por ejemplo, tras la transfección estable o transitoria de una célula huésped. Dicho acoplamiento funcional se puede conseguir, por ejemplo, mediante la utilización de los mencionados elementos IRES (=internal ribosome entry site) o bien mediante corte y empalme de ARN, de manera que ambos genes (ge de interés y gen de proteína fluorescente) son sintetizados como el ARNm bicistrónico. De este modo existe una correlación directa entre la velocidad de expresión de la proteína fluorescente y el gen de interés. Los clones celulares correspondientes, que muestran una elevada expresión en proteína fluorescente disponen a consecuencia del acoplamiento funcional de una elevada velocidad de expresión del gen de interés.

En el caso de la proteína fluorescente puede tratarse por ejemplo de una proteína fluorescente de color verde, verde azulado, azul, amarillo o de otros colores. Un ejemplo especial es la proteína fluorescente de color verde (GFP) de *Aequorea victoria* o *Renilla reniformis* y los mutantes desarrollados a partir de ella; ver, por ejemplo, Bennet y cols. (1988); Chalfie y cols. (1994); WO 01/04306 y la literatura allí citada. Otras proteínas fluorescentes y los genes que las codifican se han descrito en WO 00/34318, WO 00/34326, WO 00/34526 y WO 01/27150, a los que aquí se hace referencia. Para estas proteínas fluorescentes se trata de fluoróforos de organismos no bioluminiscentes de la especie Anthozoa, por ejemplo de *Anemonia majano*, *Clavularia sp.*, *Zoanthus sp. I*, *Zoanthus sp. II*, *Discosoma striata*, *Discosoma sp. "red"*, *Discosoma sp. "green"*, *Discosoma sp. "Magenta"*, *Anemonia sulfata*. Las proteínas de fluorescencia empleadas pueden constar de proteínas tipo natural, mutantes y variantes de los mutantes naturales o fabricados por vía genotecnológica, sus fragmentos, derivados o por ejemplo variantes fusionados con otras proteínas o péptidos. Las mutaciones registradas pueden, por ejemplo, modificar el espectro de excitación o de emisión, la formación de cromóforos, los coeficientes de extinción o la estabilidad de la proteína, mediante la optimización del codón se puede mejorar además la expresión en las células mamíferas o bien otras especies. Según la invención la proteína fluorescente puede ser empleada también en la fusión con un marcador de selección, preferiblemente con un marcador de selección amplificable como, por ejemplo, la dihidrofolato-reductasa (DHFR).

La etapa de selección se puede llevar a cabo en poblaciones de células o bien con poblaciones de células/clones de células previamente seleccionadas. Se pueden depositar una o varias, preferiblemente una (1), dos, tres o cuatro células por recipiente de cultivo celular. La deposición de las células se realiza preferiblemente en un medio sin suero, se prefiere en particular en un medio definido químicamente, en presencia de células autógenas *feeder*. En otro lugar de esta comunicación se habla con detalle de los medios adecuados así como de los métodos conforme a la invención para la deposición celular utilizando células *feeder* autógenas. Fundamentalmente se pueden realizar dos o más pasos de selección, de manera que entre cada uno de los pasos o etapas de selección las células se cultiven durante un espacio de tiempo determinado, por ejemplo, unas dos semanas como reservas, en un medio adecuado correspondiente y se multipliquen.

En una configuración preferida del método conforme a la invención, en el cual uno o varios de los productos del gen de interés existen en las células reclonadas, se cultivan las células reclonadas preferiblemente en un medio de cultivo libre de suero y en un cultivo en suspensión en unas condiciones, que permiten una expresión del gen de interés. Si el gen de interés se encuentra, por ejemplo, bajo el control del promotor constitutivo, no se requiere una adición de inductores especiales. Si la expresión del gen de interés se encuentra, por ejemplo, bajo el control de promotores inducibles, al medio de cultivo celular se añadirá un inductor determinado en una concentración suficiente pero no tóxica. Las células pueden expandirse mediante múltiples subpases y ser transferidas a los correspondientes recipientes de cultivo. El/los productos del gen pueden presentarse o bien como un producto celular, ligado a la membrana o como un producto secretor.

El producto de interés se obtiene preferiblemente como un producto del gen secretado del medio de cultivo celular. En la expresión de una proteína o polipéptido sin señal de secreción se puede aislar el producto del gen a partir de lisados celulares. Para obtener un producto puro, homogéneo, que básicamente esté libre de otras proteínas recombinantes y de proteínas de la célula huésped, se realizan las habituales fases de limpieza. Para ello se elimina con frecuencia las células y los restos de células del medio de cultivo o del lisado. El producto del gen deseado puede ser liberado de las proteínas solubles contaminantes, polipéptidos y ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante el fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad y de intercambio iónico, precipitación en etanol, fases invertidas de HPLC o cromatografía en Sephadex, sílice o resinas de intercambio catiónico como la DEAE. Los métodos que conducen a una limpieza de una proteína heterogénea expresada de las células huésped recombinantes son conocidos por el experto y se han descrito en la literatura, por ejemplo, en Harris y cols. (1995) y Scopes (1988).

Según otra configuración preferida, en el caso de la célula mamífera se trata de una célula mamífera transinfectada, en la cual se introduce el gen de interés. Aquí se prefiere la transinfección estable de la correspondiente célula mamífera.

Tal como se ha mencionado antes, la presente invención se refiere también a una selección basada en FACS de algunas células mamíferas y la deposición de algunas o varias células mamíferas, preferiblemente, de menos de 5, a ser posible menos de 4, 3, 2 o 1 célula mamífera, que expresa una proteína de interés, de manera que la selección y la deposición celular se realizan preferiblemente dependiendo de la velocidad de expresión de la proteína fluorescente coexpresada en la célula mamífera, cuya expresión se acopla de un modo funcional a la expresión de la proteína de interés. Conforme a otra configuración preferida se elegirán solamente el 5% de las células con fluorescencia más clara, preferiblemente el 3% y solamente el 1% de una mezcla de células. Tal como muestran las figuras 3a y 3b, esto conduce a un enriquecimiento de los clones celulares con una velocidad de expresión comparativamente elevada del gen de interés. Mediante la deposición de cada una de las células basada en la FACS se pueden identificar y multiplicar clones celulares homogéneos, que disponen de una velocidad de expresión comparativamente elevada en un gen-+ de interés, que se sitúan como punto de partida para otras etapas de optimización (por ejemplo, amplificación del gen).

Los métodos para la fabricación de las correspondientes células *feeder* se han descrito además en los ejemplos de las configuraciones. Las células correspondientes *feeder* de mieloma de ratón o de hámster pueden ser fabricadas mediante procedimientos químicos o físicos conocidos por el experto, por ejemplo, mediante su tratamiento con mitomicina C (Azirino(2'3,'3,4)pirrolo(1,2-a)indol-4,7-diona-6-amino-8-[[[(aminocarbonil)oxi]metil]-1,1a,2,8,8a,8b-hexahidro-8a-metoxi-5-metil,(1aR-(1a,alfa,8.beta.,8a.alfa.,8b.alfa))-(9CI)(Butcher y cols., 1988) o bien por irradiación con ¹³⁷Cs. Según una configuración preferida, la presente invención hace referencia a emplear o contener células *feeder* inactivadas física o químicamente. El concepto "inactivada" significa en este contexto, a que las células están limitadas en su capacidad de división, es decir que la han podido perder pero siguen siendo vitales. Esto significa que las células presentan incluso actividades del metabolismo como, por ejemplo, la síntesis y la secreción de los factores de crecimiento durante un periodo de tiempo determinado, preferiblemente al menos una hasta dos semanas después de la inactivación. Según una configuración preferida, se trata en el caso de las células *feeder* correspondientes de células *feeder* que se adaptan a unos cultivos sin suero. Conforme a otra configuración preferida de la invención, se trata en el caso de células *feeder* empleadas en un método conforme a la invención, de células CHO, BHK o bien NSO así como de derivados/descendientes de estas estirpes celulares.

Además todas estas células mencionadas en esta comunicación se pueden emplear como células *feeder* conforme a la inactivación correspondiente.

La presente invención se refiere además a las composiciones a base de un medio de cultivo celular sin suero, con menos de cinco células mamíferas capaces de dividirse, preferiblemente con cuatro, tres, dos o una célula mamífera capaz de dividirse y células *feeder* que son autógenas a las células mamíferas capaces de dividirse. Según una configuración preferida de la presente invención la composición correspondiente contiene únicamente (1) una o dos células mamíferas capaces de dividirse. Según otra configuración preferida la composición correspondiente contiene meramente una (1) única célula mamífera capaz de dividirse.

Otras composiciones preferidas contienen células hámster como células *feeder*, preferiblemente de la subfamilia *Cricetinae*, en particular de la especie *Cricetulus* o bien *Mesocricetus*, cuando dentro de las células mamíferas capaces de dividirse se trata de células BHK o de derivados/descendientes de las mismas. Además contiene otra composición preferida como las células de ratón células *feeder*, preferiblemente la subfamilia *Murinae*, en particular de la especie *Mus*, cuando en el caso de células mamíferas capaces de dividirse se trata de células de hibridoma de ratón, preferiblemente de células NSO o de derivados/descendientes de las mismas. Las composiciones especialmente preferidas son las que se caracterizan porque, la composición contiene células CHO como células *feeder*, en el caso de células mamíferas capaces de dividirse se trata de células CHO, la composición contiene células BHK como células *feeder*, en el caso de células mamíferas capaces de dividirse se trata de células BHK, y la composición contiene células NSO como células *feeder*, en el caso de células mamíferas capaces de dividirse se trata de células NSO.

Fundamentalmente existen también aquellas composiciones conforme a la invención que permiten que se depositen y multipliquen menos de 5, preferiblemente 4, 3, 2 o 1 célula de hámster relevante en la producción, como por ejemplo, las células CHO, o BHK así como las células de mieloma de ratón relevantes en la producción, como por ejemplo, las células NSO en presencia de células *feeder* de mamíferos en unas condiciones libres de suero.

Los ejemplos para los medios definidos químicamente o sin proteínas, libres de suero equivalen, por ejemplo, a los medios Ham's F12 (Sigma, Deisenhofen, DE), RPMI-1640(Sigma), Dulbecco's Modified Eagle's Médium (DMEM; Sigma), Minimal Essential Médium (MEM;Sigma), Iscove's Modified Dulbecco's Médium (IMDM; Sigma), CD-CHO(Invitrogen, Carlsbad, Ca., USA), CHO-S-SFMII(Invitrogen), medio de CHO libre de suero (Sigma) y al medio CHO (Sigma) libre de suero. Cada uno de estos medios puede ser completado si fuera preciso con diferentes composiciones, por ejemplo, hormonas y/o otros factores de crecimiento (por ejemplo, insulina, transferrina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento similar a la insulina), sales (por ejemplo, cloruro sódico, fosfato de calcio y magnesio), tampones (por ejemplo, HEPES), nucleósidos (por ejemplo, adenosina, timidina), glutamina, glucosa y otras sustancias nutritivas equivalentes, antibióticos y/o elementos traza. En el caso de células capaces de multiplicarse se trata de células recombinantes que expresan uno o varios marcadores de selección, de manera que al medio se añaden uno o varios medios de selección adecuados, por ejemplo, antibióticos.

Ejemplos*Abreviaciones*

5	ATCC	American Type Culture Collection
	BHK	Baby Hamster Kidney
	⁶⁰ Co	Isótopo de cobalto 60
10	¹³⁷ Cs	Isótopo de cesio 137
	CHO	Chinese Hamster Ovary
15	CMV	Citomegalovirus
	DE	Alemania
	DEAE	Dietilaminoetil-
20	DMSO	Dimetilsulfóxido
	FACS	Selector de células activado por la fluorescencia
25	FITC	Isotiocianato de fluoresceína
	Gy	Gray
	HBSS	Solución salina equilibrada de Hank
30	HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
	mRNA	Acido ribonucleico mensajero
35	NS0	Célula de hibridoma de ratón
	polyA	Secuencia de poliadenilación
	Sp2/0	Célula de hibridoma de ratón
40	SV40	Virus Simian no.40

Métodos

45 1. *Cultivo de las células*

Las células CHO-DG44/dhfr (Urlaub y cols., 1983) se han cultivado de forma permanente como células en suspensión en un medio de CHO-S-SFMII al que se añade hipoxantina y timidina libres de suero (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE) en frascos de cultivo celular a 37°C en una atmósfera húmeda y un 5% de CO₂. Los recuentos celulares así como la viabilidad se han determinado con un Contador de Células CEDEX (Innovatis, DE) o bien a través de una coloración de azul de tripano y las células luego saturadas en una concentración de 1-3x10⁵/ml y se hacen pasar 2-3 días. Para la clonación de cada una de las células se empleaban CHO-DG44/dhfr recombinante, que expresa una proteína fluorescente (por ejemplo, ZS-Green de *Zoanthus sp.*) o bien una proteína fluorescente y un anticuerpo monoclonal humano o humanizado. El cultivo de células recombinantes clonadas se realizaba de forma análoga a estas células. Como medio se empleaba asimismo el medio CHO-S-SFM-II (Invitrogen GmbH Karlsruhe, DE) sin hipoxantina y timidina.

Las células BHK se pueden cultivar de forma permanente como células de suspensión en un medio Opti Pro SFM libre de suero (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE) en frascos de cultivo celular a 37°C en atmósfera húmeda y un 5% de CO₂. Los recuentos celulares así como la viabilidad se puede determinar con un Contador celular CEDEX (Innovatis, DE) o mediante la coloración del azul de tripano, donde las células luego se saturan en una concentración de de 1-3x10⁵/ml y se hacen pasar 2-3 días. El cultivo de las células clonadas se realizaba de forma análoga a las células BHK.

Las células NS0 se pueden cultivar de forma permanente como células de suspensión en un medio de hibridoma libre de suero, Animal component free Medium (Sigma, Aldrich, St. Louis, USA) en frascos de cultivo celular a 37°C en atmósfera húmeda y un 5% de CO₂. Los recuentos celulares así como la viabilidad se puede determinar con

un Contador celular CEDEX (Innovatis, DE) o mediante la coloración del azul de tripano, donde las células luego se saturan en una concentración de $1-3 \times 10^5$ /ml y se hacen pasar 2-3 días. El cultivo de las células clonadas se realizaba de forma análoga a las células NS0. Como medio se emplea el medio de hibridoma, Animal componente free Médium (Sigma, Aldrich, St. Luis, USA).

2. Fabricación de células *feeder* mediante irradiación

Las células básicas de CHO suspendidas que crecen sin suero y sin proteínas (células no transinfectadas), se centrifugaban a 180 g durante 10 minutos y se ajustaban a una concentración celular de 1×10^6 /ml en HBSS (solución salina equilibrada de Hank). Después se realizaba la irradiación de las células con una fuente radiactiva (Cs137-Strahler, Gammacell 2000, Fa. Molsgaard Medical A/S, Dänemark) con una potencia de dosis energética de 4Gy/min. Con un tiempo de irradiación entre 5 min y 125 min se obtenía una dosis energética entre 20 y 500 Gy. Tras la irradiación las células se saturaban con unas 2000 células/pocillo (=recipiente de cultivo) en microplacas de valoración de 96 pocillos en un medio CHO-S-SFMII específico para la célula a unos 37°C y 5% de CO₂ en una atmósfera de incubación. El método se lleva a cabo con las células BHK y NSO, de manera que las células *feeder* se saturan en el medio específico para las células.

3. Crioconservación de las células *feeder*

Las células *feeder* fabricadas del modo correspondiente pueden crioconservarse a -150°C. La crioconservación se realiza con ayuda de un aparato de congelación programable en un medio correspondiente del cultivo celular (Consarctic BV-25, Consarctic, Schölkrippen, DE). Como crioprotector se añade al medio DMSO (v/v) al 10%. La velocidad de congelación se sitúa entre 0°C y -20°C a 1°C/min, seguidamente se realiza otro descenso de temperatura con 0,4°C/min. Tras el proceso de congelación se crioconservan las células *feeder* en la fase gas en nitrógeno líquido.

4. Deposición celular automatizada

La deposición celular automatizada (deposición de una o de varias células) se lleva a cabo con un Citómetro de Flujo (Coulter EPICS Altra (Fa. Beckman-Coulter, Miami, FL, USA) dotado de láser de argón (488 nm). Las células se centrifugan en la fase de crecimiento exponencial y se recogen en una concentración celular de $1-1,5 \times 10^7$ /ml en HBSS. A continuación se seleccionan las células con la "Hypersort-Option" a una velocidad de 8000-12000 células/segundo tras su deposición en luz dispersa. Las células que expresan una proteína de fluorescencia se pueden elegir de un modo alternativo conforme a su intensidad de fluorescencia en lo que se refiere a la proteína de fluorescencia expresada de forma intracelular. Las células se depositarán en microplacas de 96 orificios dotadas de células *feeder*. La deposición de las células BHK se realiza, por ejemplo, en un medio OptiPro SFM (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE). Las células NSO elegidas se depositarán por ejemplo en un medio de hibridoma, medio libre de componente animal (Sigma Aldrich, St. Louis USA).

En la selección de las células CHO se realizaba la deposición celular en CHO-S-SFM-II (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE). Se depositaba una célula CHO-DG-44 recombinante que co-expresaba un anticuerpo monoclonal humanizado así como el ZS-Green de *Zoanthus sp.* La selección celular se realizaba tal como se ha descrito con láser de argón a 488 nm.

5. Determinación de la productividad de los productos genéticos expresados de modo recombinante (para la CHO-DG-44 expresada en mAk)

La cuantificación del anticuerpo en los sobrenadantes de células CHO-DG44 transinfectados de forma estable, que expresan un anticuerpo humano o humanizado monoclonal, se realizaba por medio de ELISA según protocolos estándar (Ausubel y cols., 1994, actualizado) de forma que por un lado se empleaba un fragmento Fc de IgG antihumano de cabra (Dianova, Hamburg, DE) y por otro lado un anticuerpo de cadena ligera Kappa anti humano de cabra conjugado de AP (Sigma). Como estándar servía el anticuerpo purificado. Las productividades (pg/célula/día) se calculaban conforme a la fórmula $\text{pg}/(\text{Ct-Co})/\ln(\text{Ct-Co})$, de manera que Co y Ct indicaban el número de células en el cultivo y t la duración del cultivo.

Ejemplo 1

Influencia de la dosis de energía en la fabricación de células *feeder* en la eficacia de reclonación de células CHO-DG-44

Para examinar la influencia de la dosis de energía en la fabricación de las células *feeder* sobre la eficacia de la reclonación, se cultivaban las células CHO-DG-44 tal como se han descrito en los métodos "cultivo de células". La fabricación de células *feeder* se realizaba tal como se ha descrito en los métodos "Fabricación de células *feeder* por irradiación" con una dosis de energía de 20 Gy, 50 Gy, 100 Gy, 200 Gy y 500 Gy, respectivamente. Tras la irradiación se saturaban las células *feeder* en microplacas de 96 pocillos con un número de células de aproximadamente 2000 células/pocillo, y se depositaban en una atmósfera de incubación. A continuación se realizaba una deposición celular automatizada con una célula CHO-DG-44 recombinante, que expresaba una proteína fluorescente, tal como se ha descrito en los métodos "deposición automatizada de una célula". Para ello se depositaba una (1) única célula por

pocillo frente a las células *feeder*. Como parámetro objetivo para la eficacia de la reclonación servía el número de pocillos positivos, es decir, los pocillos en los cuales se encontraban los clones, los cuales después de un tiempo de incubación de tres semanas daban lugar a una población celular. Las eficacias de reclonación conseguidas se situaban entre el 40 y el 70% para la reclonación de células CHO-DG-44 recombinantes (ver figura 1).

Ejemplo 2

Homogeneidad de la reclonación de las células CHO-DG 44 expresadas en anticuerpos

Para comparar la homogeneidad de los clones celulares se depositaban las células CHO-DG 44 expresadas en anticuerpos recombinantes por un lado frente al método estándar "Limited dilution" y se clonaban y por otro lado se depositaban y se clonaban por medio de la deposición celular aquí descrita en presencia de las células *feeder* (ver figura 2). Para ello se cultivaban respectivamente, 6 grupos de células CHO-DG-44 expresadas en anticuerpos transinfectados según el método Limited-dilution y paralelamente conforme a la deposición celular automatizada, tal como se ha descrito en "cultivo de células", y a continuación se reclinaban tal como se ha descrito en "deposición unicelular automatizada". Los clones formados se cultivaban tal como se ha descrito en "cultivo de células" y se determinaban después de tres pasadas del título del producto según el método "Determinación de la productividad de los productos genéticos expresados de forma recombinante". El valor medio resultante de estas tres pasadas se empleaba para la realización del gráfico.

Ejemplo 3

Método de alta resolución para generar clones celulares de título elevado mediante la combinación de la expresión de proteínas fluorescentes con una deposición de células basada en FACS y una selección de células basada en FACS

Mediante la transfección de las células CHO-DG44 con un vector de expresión, que codifica la expresión bicistrónica de un gen del producto (anticuerpo recombinante) y de una proteína fluorescente (ZS-Green de *Zoanthis sp.*), se obtenían grupos de células que co-expresaban tanto el anticuerpo como la proteína fluorescente. Estos grupos de células se depositaban y cultivaban conforme al método ya descrito en presencia de células *feeder* CHO-DG44, en microplacas. La deposición de los clones se realizaba por medio de tres criterios diferentes

A) Deposición de todas las células vivas

B) Deposición del 20% de las células más fluorescentes

C) Deposición del 5% de las células más fluorescentes

Los clones obtenidos son transferidos luego a una macro placa de valoración de 24 pocillos y se cultivan tres pasadas tal como se describe en "cultivo de células". Al final de cada pasada se determinaba la titulación del anticuerpo en un sobrenadante según el método "Determinación de la productividad del producto genético expresado de modo recombinante". El valor medio resultante de estas tres pasadas se empleaba para trazar el gráfico. En él se registraba el número de clones obtenidos sobre unas clases de títulos definidos y se adaptaba una distribución normal.

REIVINDICACIONES

1. Método para la clonación de células, que se **caracteriza** porque

a) se depositaban menos de 5 células mamíferas en presencia de células *feeder* autógenas en un recipiente de cultivo en unas condiciones libres de suero y se cultivaban y multiplicaban en unas condiciones libres de suero,

b) las células mamíferas depositadas se multiplicaban en un cultivo en suspensión sin suero,

c) en el caso de células *feeder*, se trataba de células cultivadas de forma no adherente, y adaptadas a un medio libre de suero y

d) la eficacia de la reclonación es mayor al 10% en la reclonación de células depositadas del modo correspondiente.

2. Método conforme a la reivindicación 1, que se **caracteriza** porque únicamente se depositan una(1) ó dos(2) células mamíferas en un recipiente de cultivo en unas condiciones sin suero y en presencia de células *feeder* autógenas y se cultivan y multiplican en condiciones libres de suero.

3. Método conforme a la reivindicación 1, que se **caracteriza** porque una única célula mamífera (1) se deposita en presencia de células *feeder* autógenas en un recipiente de cultivo en unas condiciones sin suero y se cultiva y multiplica en condiciones libres de suero.

4. Método conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 3, que se **caracteriza** porque en el caso de las células mamíferas depositadas del modo correspondiente se trata de células de mieloma de ratón o de hámster.

5. Método conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 3, que se **caracteriza** porque en el caso de las células de hámster depositadas del modo correspondiente se trata de células de CHO o BHK.

6. Método conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 4, que se **caracteriza** porque en el caso de las células de mieloma de ratón depositadas del modo correspondiente se trata de células de NS0.

7. Método conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 6, que se **caracteriza** porque las células de hámster se emplean como células *feeder* cuando en el caso de células mamíferas depositadas del modo correspondiente se trata de células CHO o BHK y porque las células de mieloma de ratón se emplean como células *feeder* cuando en el caso de células mamíferas depositadas del modo correspondiente se trata de células NS0.

8. Método conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 6, que se **caracteriza** porque las células CHO se emplean como células *feeder* cuando en el caso de células mamíferas depositadas del modo correspondiente se trata de células CHO, que las células BHK se emplean como células *feeder*, cuando en el caso de células mamíferas depositadas del modo correspondiente se trata de células BHK, y que las células NS0 se emplean como células *feeder*, cuando en el caso de células mamíferas depositadas del modo correspondiente se trata de células NS0.

9. Método conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 8, que se **caracteriza** porque las células mamíferas depositadas del modo correspondiente se multiplican en presencia de 100 hasta 200.000 células *feeder* por ml de medio.

10. Método conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 9, que se **caracteriza** porque las células mamíferas depositadas del modo correspondiente se cultivan y multiplican hasta una densidad de 4×10^6 células/ml de medio.

11. Método conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 10, que se **caracteriza** porque la eficacia de reclonación en la reclonación de las células CHO depositadas del modo correspondiente es hasta mayor del 65%, en la reclonación de las células BHK depositadas del modo correspondiente es del 10 hasta del 50% mayor y en la reclonación de las células NS0 depositadas del modo correspondiente de un 10 hasta un 45% mayor.

12. Composición a base de un medio de cultivo libre de suero, que consta de menos de cinco células mamíferas capaces de dividirse y células *feeder* que son autógenas frente a las células mamíferas capaces de dividirse.

13. Composición conforme a la reivindicación 12, donde la composición contiene solamente una o dos células mamíferas capaces de dividirse en el medio de cultivo.

14. Composición conforme a la reivindicación 12 ó 13, que se **caracteriza** porque la composición contiene células de hámster como células *feeder* si las células mamíferas capaces de dividirse son células CHO o BHK y la composición contiene células de mieloma de ratón como células *feeder* si las células mamíferas capaces de dividirse son células NS0.

15. Composición conforme a la reivindicación 12 ó 13, que se **caracteriza** porque la composición contiene células CHO como células *feeder* si las células mamíferas capaces de dividirse son células CHO, la composición contiene células BHK como células *feeder* si las células mamíferas capaces de dividirse son células BHK, y la composición contiene células NS0 como células *feeder* si las células mamíferas capaces de dividirse son células NS0.

Figura 1

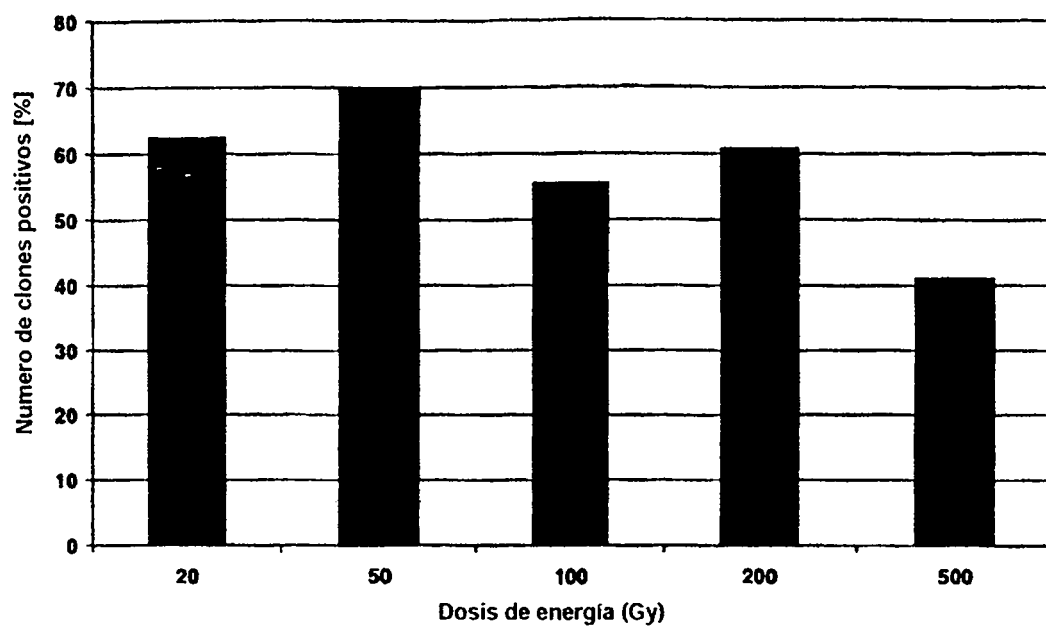


Figura 2

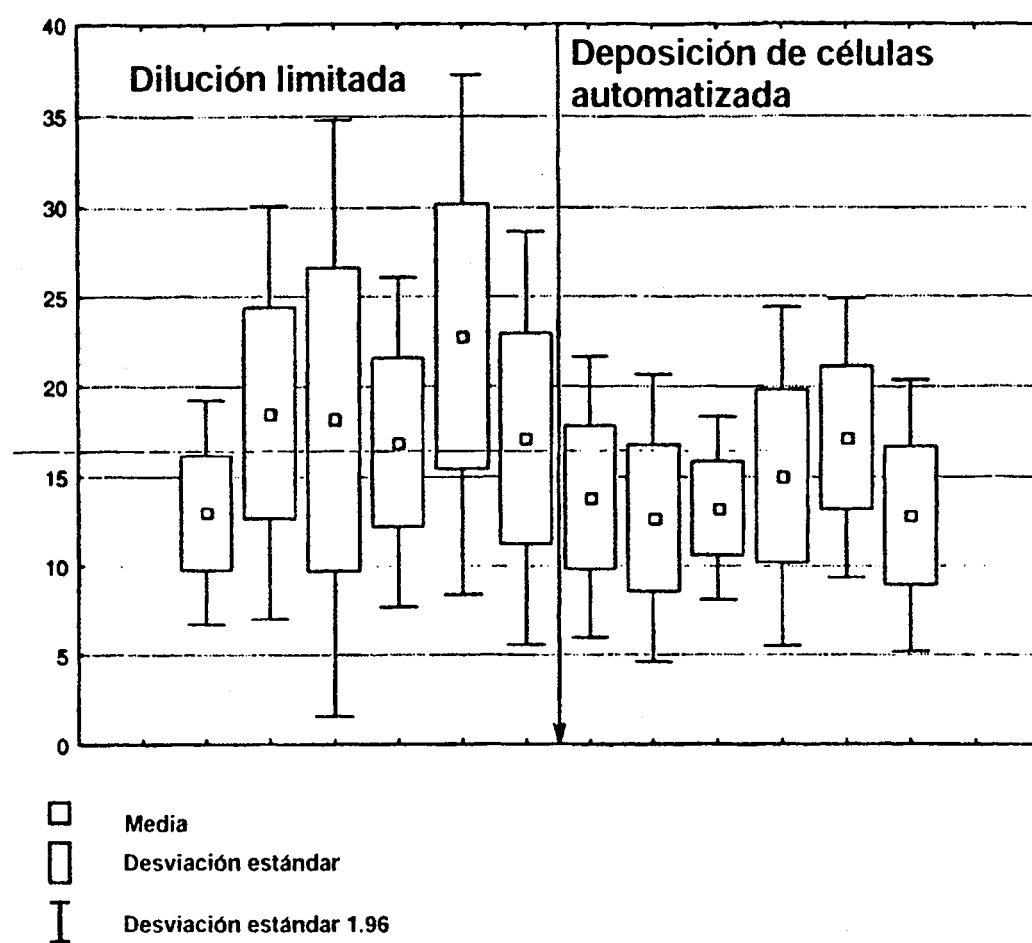


Figura 3a

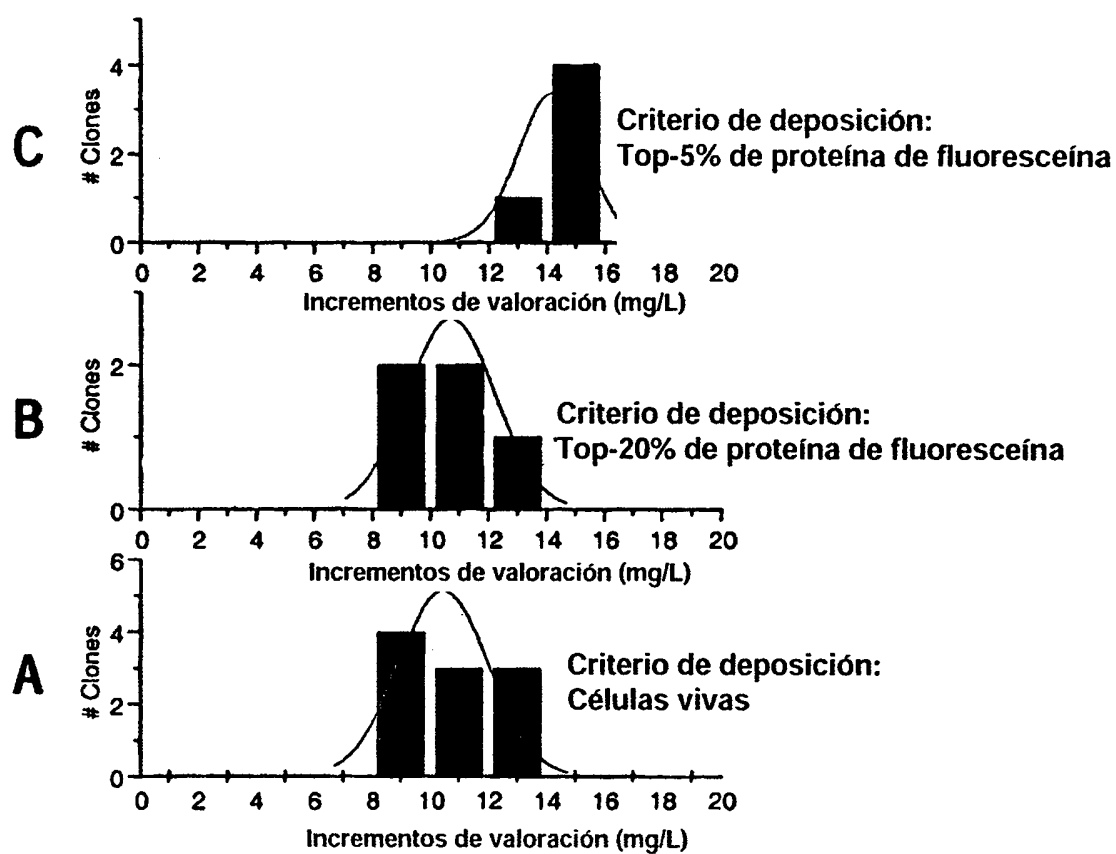


Figura 3b

