



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1008762-1 B1



(22) Data do Depósito: 26/02/2010

(45) Data de Concessão: 27/10/2020

(54) Título: MÉTODOS PARA SELEÇÃO DE CÉLULAS DE MAMÍFERO EXPRESSANDO UMA PROTEÍNA HETERÓLOGA, PARA PRODUIR UM PRODUTO DE INTERESSE E USO DE UM MEIO DE CULTURA SELETIVO

(51) Int.Cl.: C12N 15/85.

(30) Prioridade Unionista: 27/02/2009 EP 09154000.5.

(73) Titular(es): NOVARTIS AG.

(72) Inventor(es): THOMAS JOSTOCK; HANS-PETER KNOPF.

(86) Pedido PCT: PCT EP2010001223 de 26/02/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/097239 de 02/09/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 29/08/2011

(57) Resumo: MÉTODO PARA SELEÇÃO DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS EXPRESSANDO UMA PROTEÍNA HETERÓLOGA. A presente invenção refere-se a um método para selecionar pelo menos uma célula hospedeira eucariótica expressando um produto de interesse, compreendendo: (a) proporcionar uma pluralidade de células hospedeiras eucarióticas, em que a viabilidade de célula das ditas células hospedeiras depende da captação de folato, em que as ditas células hospedeiras incluem pelo menos (i) um polinucleotídeo estrangeiro que codifica um produto de interesse e (ii) um polinucleotídeo estrangeiro que codifica uma enzima da DHFR; (b) cultivar a dita pluralidade de células hospedeiras eucarióticas em um meio de cultura seletivo, compreendendo pelos menos um inibidor de DHFR e folato em uma concentração limitante, e (c) selecionar pelo menos uma célula hospedeira eucariótica expressando o produto de interesse. Também é fornecido um método para expressar um produto de interesse que é baseado em células hospedeiras selecionadas por meio do dito método e um meio de cultura de célula.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"MÉTODOS PARA SELEÇÃO DE CÉLULAS DE MAMÍFERO
EXPRESSANDO UMA PROTEÍNA HETERÓLOGA, PARA PRODUZIR
UM PRODUTO DE INTERESSE E USO DE UM MEIO DE CULTURA
SELETIVO".**

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] A presente invenção refere-se a um novo método de seleção de células hospedeiras eucarióticas, em particular células hospedeiras de mamíferos, expressando um produto de interesse. Além disso, a presente invenção pertence a um método para a produção eficiente de um produto de interesse com um alto rendimento.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] A capacidade de clonar e expressar os produtos de interesse, tais como os peptídeos e as proteínas recombinantes em grandes quantidades tem se tornado cada vez mais importante. A capacidade de purificar altos níveis de proteínas é importante no campo farmacêutico e de biotecnologia humana, por exemplo, para a produção de proteínas farmacêuticas, bem como na definição de pesquisa básica, por exemplo, para cristalizar as proteínas para permitir a determinação de sua estrutura tridimensional. As proteínas que são de outra forma difíceis de serem obtidas em quantidade, podem ser superexpressas em uma célula hospedeira e, posteriormente, isoladas e purificadas.

[0003] A escolha de um sistema de expressão para a produção de proteínas recombinantes depende de muitos fatores, incluindo características de crescimento de célula, os níveis de expressão, a expressão intracelular e extracelular, as modificações pós-translacionais e a atividade biológica da proteína de interesse, bem como questões regulatórias e considerações econômicas na produção das proteínas terapêuticas. As principais vantagens das células de mamíferos em relação a outros sistemas de expressão, tais como

bactérias ou leveduras, são a capacidade de realizar o dobramento adequado de proteínas, a glicosilação de complexos ligados a N e a glicosilação de autênticos ligados a O, bem como um amplo espectro de outras modificações pós-translacionais. Devido às vantagens descritas, as células eucarióticas e, em particular, as células de mamíferos são atualmente o sistema de expressão de escolha para a produção de complexos de proteínas terapêuticas, tais como anticorpos monoclonais.

[0004] A abordagem mais comum para obter alta expressão de células hospedeiras (também chamadas de altos produtores) gera um vetor de expressão adequado para expressar o produto de interesse, como uma primeira etapa. O vetor de expressão conduz à expressão do polinucleotídeo que codifica o produto de interesse na célula hospedeira e fornece, pelo menos, um marcador de seleção para gerar a linhagem de célula recombinante. Os elementos principais dos vetores de expressão de mamífero costumam incluir um promotor constitutivo ou induzido capaz de atividade transcricional robusta; processamento de mRNA otimizado e sinais de translação, que geralmente incluem uma sequência de Kozak, um códon de terminação translacional, a clivagem do mRNA e os sinais de poliadenilação, uma transcrição do terminal e os marcadores de seleção para a preparação de linhagens de células estáveis e para a amplificação do gene; além disso, uma origem procariótica de replicação e marcadores de seleção para a propagação de vetores em bactérias podem ser fornecidos por meio do vetor de expressão.

[0005] Nos últimos anos, o foco do desenvolvimento foi concentrando-se no design de vetores melhorados para a expressão do gene em células hospedeiras. Apesar da infinidade de vetores disponíveis, no entanto, a produção de polipeptídeo/proteína robusto com um alto rendimento em células de mamíferos ainda é um desafio.

[0006] Um procedimento estabelecido para a obtenção de alta produção de linhagens de células expressando o produto de interesse com alto rendimento é a transfecção estável das células do hospedeiro. No entanto, a integração estável no genoma é um evento raro e apenas um pequeno subconjunto de células transfectadas estavelmente são alto produtores. Sua seleção é, portanto, um desafio.

[0007] Os marcadores de seleção e os sistemas de seleção são amplamente utilizados na engenharia genética, na tecnologia de DNA recombinante e na produção de produtos recombinantes para a obtenção de células hospedeiras expressando o produto de interesse com alto rendimento. Os respectivos sistemas também são úteis para gerar e para identificar os clones estavelmente transfectadas. O principal objetivo do uso de marcadores de seleção e dos respectivos sistemas de seleção consiste em introduzir um gene de seleção que após a exposição a condições de crescimento seletivo permite a identificação de células capazes de alto nível de produção do marcador introduzido de seleção e, conseqüentemente, o produto recombinante de interesse. O aumento do rendimento do produto de expressão pode ser, por exemplo, alcançado por meio da amplificação do gene usando linhagens de células, por exemplo, deficientes em uma enzima, tal como a redutase de di-hidrofolato (DHFR) ou a sintetase de glutamina (GS) em conjunto com vetores de expressão contendo os genes que codificam estas enzimas e agentes do marcador de seleção, tais como o metotrexato (MTX), que inibe a DHFR, e metionina sulfoxamina (MSX), que inibe a GS.

[0008] Um sistema de seleção que merece destaque, o qual é comumente usado na técnica anterior, é o sistema de seleção redutase de di-hidrofolato/MTX. A redutase de di-hidrofolato (DHFR) catalisa a redução dependente de NADP do ácido di-hidrofólico ao ácido tetra-hidrofólico (THF). THF é então intraconvertido a 10-formil-DHF e 5,10-

metileno-DHF, os quais são usados na nova biossíntese de purinas e timidilato, respectivamente. DHF é o subproduto da atividade catalítica da sintase de timidilato (TS), que catalisa a conversão de dUMP a dTMP em uma reação dependente de 5,10-metileno-THF. Dessa maneira, DHFR é crucial para a reciclagem de cofatores THF que são essenciais para a biossíntese de purina e nucleotídeos de pirimidina que são necessários para a replicação do DNA. Assim, as células (por exemplo, as células CHO) que não possuem o gene DHFR (isto é, por meio da exclusão do genoma segmentado) podem ser usadas como recipientes para a transfecção do gene DHFR em um meio que é livre de nucleotídeos. Após a transfecção, as células podem ser sujeitas ao aumento gradual nas concentrações do antifolato de MTX, um inibidor da DHFR mais potente ($K_d = 1 \text{ pM}$), forçando, portanto, as células a produzirem um aumento dos níveis de DHFR. Depois de várias rodadas de seleção, o marcador de seleção da DHFR, frequentemente, sofre amplificação significativa. Também, as formas mutantes mais sensíveis dos respectivos marcadores de seleção podem ser usadas em conjunto com as células do hospedeiro do tipo selvagem. Alternativamente, um camundongo mutante da DHFR com uma maior resistência, isto é, menos sensibilidade, a MTX ou a outras formas mutantes da DHFR também tem sido amplamente utilizado como um marcador de seleção dominante que melhora consideravelmente a aquisição de alto nível de resistência a MTX nas células transfectadas. No entanto, uma grande desvantagem do sistema de seleção DHFR/MTX usado na técnica anterior é que esta técnica utiliza um agente mutagênico citotóxico, MTX, que pode particularmente, em concentrações mais elevadas, alterar o genótipo das células recipientes. Isto, frequentemente, resulta nas populações de células resistentes a MTX, na qual nenhuma expressão do gene alvo de interesse está presente devido à perda de função das mutações, por exemplo, o veículo de folato reduzido

(RFC)/ou à perda da expressão do gene RFC, sendo que ambos abolem a captação de MTX. No entanto, o aumento/altas concentrações de MTX são necessárias, a fim de atingir condições de seleção suficientemente rigorosas, a fim de isolar as células do hospedeiro produzindo o produto de interesse com um rendimento suficiente.

[0009] Como se torna evidente, um sistema de seleção de alto rigor é crucial para enriquecer a alta produção de células a partir de uma população transfectada. Quanto maior for o rigor do sistema de seleção, menor será o número de baixos produtores após o processo de seleção e maior a chance de encontrar os clones de alta produção ultrarraros em uma população de células transfectadas.

[00010] Portanto, é o objetivo da presente invenção fornecer um sistema de seleção rigoroso para a seleção de células hospedeiras produzindo um produto de interesse com alto rendimento, bem como métodos para produzir um produto de interesse com o rendimento suficiente. Em particular, é o objetivo da presente invenção fornecer um sistema de seleção rigoroso, que exige menos quantidades de agentes tóxicos, em particular, MTX. Além disso, é o objetivo da presente invenção fornecer um método para produzir um produto de interesse com um alto rendimento.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[00011] A presente invenção pertence a um sistema de seleção para a seleção de células hospedeiras expressando um produto de interesse com um alto rendimento e para a produção de produtos respectivos, em particular, os polipeptídeos tais como anticorpos.

[00012] De acordo com um aspecto, a presente invenção pertence a um método para a seleção de pelo menos uma célula hospedeira eucariótica expressando um produto de interesse, o dito método compreendendo, pelo menos, as seguintes etapas:

(a) proporcionar uma pluralidade de células hospedeiras

eucarióticas, em que a viabilidade de célula das ditas células hospedeiras depende da captação de folato, em que as ditas células hospedeiras eucarióticas incluem pelo menos

- (i) um polinucleotídeo introduzido codificando um produto de interesse e
 - (ii) um polinucleotídeo introduzido codificando uma enzima DHFR;
- (b) cultivar a dita pluralidade de células hospedeiras eucarióticas em um meio de cultura seletivo, compreendendo pelo menos um inibidor de DHFR e folato em uma concentração limitante;
- (c) selecionar pelo menos uma célula hospedeira eucariótica expressando o produto de interesse.

[00013] A presente invenção também refere-se a um processo para produzir um produto de interesse, compreendendo a cultura de uma célula hospedeira selecionada de acordo com a presente invenção em condições que permitem a expressão do produto de interesse.

[00014] Também é fornecido um meio de cultura seletivo, incluindo pelo menos um inibidor de DHFR e folato em uma concentração limitante a qual pode ser usada no método de seleção de acordo com a presente invenção. Um "meio de cultura seletivo" é um meio de cultura de célula útil para a seleção das células hospedeiras.

[00015] Outros objetivos, características, vantagens e aspectos do presente pedido de patente se tornarão aparentes para aqueles versados na técnica a partir da seguinte descrição e reivindicações em anexo. Deve ser entendido, no entanto, que a seguinte descrição, reivindicações em anexo, e os exemplos específicos, enquanto indicando as modalidades preferidas do pedido do patente, são dadas a título de ilustração apenas. Várias mudanças e modificações dentro do espírito e escopo da presente invenção descrita irão tornar-se facilmente perceptíveis para aqueles versados na técnica na leitura

do seguinte.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00016] A presente invenção pertence a um sistema de seleção usando DHFR como marcador de seleção, o que requer uma menor concentração de agentes tóxicos, tal como o antifolato de MTX mas ainda fornece as condições de seleção rigorosas suficientes para a identificação de alta produção de células hospedeiras.

[00017] De acordo com um aspecto da presente invenção, é fornecido um método para selecionar pelo menos uma célula hospedeira eucariótica expressando um produto de interesse, o dito método compreendendo, pelo menos, as seguintes etapas:

- (a) proporcionar uma pluralidade de células hospedeiras eucarióticas, em que a viabilidade de célula das ditas células hospedeiras depende da captação de folato, em que as ditas células hospedeiras eucarióticas incluem, pelo menos
 - (i) um polinucleotídeo introduzido codificando um produto de interesse, e
 - (ii) um polinucleotídeo introduzido codificando uma enzima de DHFR;
- (b) cultivar a dita pluralidade de células hospedeiras eucarióticas em um meio de cultura seletivo, compreendendo pelo menos um inibidor de DHFR e folato em uma concentração limitante;
- (c) selecionar pelo menos uma célula hospedeira eucariótica expressando o produto de interesse.

[00018] Um "polinucleotídeo" é um polímero de nucleotídeos, que são geralmente ligados a partir de uma desoxirribose ou ribose para outro e refere-se ao DNA, bem como RNA, dependendo do contexto. O termo "polinucleotídeo" não compreende nenhuma das restrições de tamanho e também engloba os polinucleotídeos compreendendo as modificações, em particular, os nucleotídeos modificados.

[00019] O termo "produto de interesse" refere-se ao produto a ser expresso a partir da dita célula hospedeira. O produto de interesse pode ser, por exemplo, um polipeptídeo ou um polinucleotídeo, tais como RNA. Preferivelmente, o produto de interesse é um polipeptídeo, em particular, uma molécula de imunoglobulina. Outros exemplos de produtos de interesse são descritos em detalhes abaixo.

[00020] Um "polinucleotídeo introduzido" refere-se a uma sequência de polinucleotídeo que foi introduzida em uma célula hospedeira, por exemplo, pelo uso de técnicas recombinantes, tais como a transfecção. A célula hospedeira pode ou não incluir um polinucleotídeo endógeno correspondente, respectivamente, sendo idêntico ao polinucleotídeo introduzido. A introdução pode ser conseguida, por exemplo, por meio da transfecção por um vetor adequado que pode integrar-se no genoma da célula hospedeira (transfecção estável). Os vetores de expressão adequados que permitem a introdução de polinucleotídeos dentro da célula hospedeira são descritos em detalhes abaixo. No caso, o ácido nucleico heterólogo não é inserido no genoma, o ácido nucleico heterólogo pode ser perdido na fase posterior, por exemplo quando as células sofrem mitose (transfecção transitória). Os vetores adequados também podem ser mantidos na célula hospedeira, sem a integração no genoma, por exemplo, por meio da replicação epissomal. No entanto, outras técnicas também são conhecidas no estado da técnica para a introdução de um polinucleotídeo em uma célula hospedeira que são descritos em detalhe mais adiante.

[00021] O termo "inibidor da DHFR" é um composto que inibe a atividade da redutase de di-hidrofolato (DHFR). Um inibidor respectivo pode, por exemplo, competir com o substrato da enzima de DHFR, para ligação a DHFR. Os inibidores da DHFR adequados são, por exemplo, antifolatos, tal como o metotrexato (MTX). Outros exemplos incluem, mas não estão limitados a trimetrexato glucuronato (neutrexina), trimetoprim,

pirimetamina e pemetrexed.

[00022] O termo "selecionando" ou "de seleção", como utilizado aqui, em particular, refere-se a um processo de utilização de um marcador de seleção e as condições de cultivo seletivas para selecionar e, conseqüentemente, obter as células hospedeiras que incorporaram a combinação de vetor ou o vetor de acordo com a presente invenção. Portanto, células hospedeiras com sucesso transfectadas podem ser isoladas e/ou enriquecidas da população das células hospedeiras transfectadas.

[00023] As células hospedeiras que não foram incorporadas com sucesso à combinação de vetor ou ao vetor de acordo com a presente invenção, preferivelmente, morreram ou são prejudicadas em crescimento sob as condições de cultura seletivas em relação às células hospedeiras que foram incorporadas com sucesso à combinação de vetor ou ao vetor de acordo com a presente invenção. Durante a seleção, as células hospedeiras que foram incorporadas com sucesso à combinação de vetor ou ao vetor de acordo com a presente invenção podem ser enriquecidas como o pool a partir da população das células hospedeiras transfectadas. Também, as células hospedeiras individuais podem ser isoladas a partir da população das células hospedeiras transfectadas durante a seleção (por exemplo, por meio da seleção clonal). As modalidades adequadas dos processos de seleção, a fim de obter as células hospedeiras com sucesso transfectadas (por exemplo, por meio da classificação FACS ou diluição limitada) são bem-conhecidas no estado da técnica e, conseqüentemente, não precisam de descrição detalhada.

[00024] O termo "concentração limitante de folato" refere-se a uma concentração de folatos no meio de cultura seletiva que oferece uma pressão seletiva sobre a célula hospedeira. Assim, os folatos não são compreendidos no meio de cultura seletivo em abundância,

proporcionando, portanto, uma pressão de seleção sobre as células hospedeiras. O folato formado no meio de cultura seletivo em uma concentração limitante é capaz de ser levado para ser processado por meio da célula hospedeira. Os folatos e, em particular, os derivados de folato que não seriam processados por meio da célula hospedeira não contribuiriam para a pressão de seleção e, portanto, não contribuiriam para a concentração limitante. As faixas de concentração adequadas estão descritas abaixo.

[00025] O termo "polipeptídeo" refere-se a uma molécula que compreende um polímero de aminoácidos ligados entre si por meio de uma ligação peptídica (s). Os polipeptídeos incluem os polipeptídeos de qualquer comprimento, incluindo as proteínas (por exemplo, possuindo mais de 50 amino ácidos) e peptídeos (por exemplo, possuindo de 2 a 49 amino ácidos). Os polipeptídeos incluem as proteínas e/ou os peptídeos de qualquer atividade ou bioatividade. Os exemplos adequados são descritos abaixo.

[00026] Foi surpreendentemente descoberto que um sistema de seleção para o fornecimento das células eucarióticas recombinantes capazes de produzir um produto de interesse pode ser baseado na disponibilidade limitada de folatos no meio de cultura seletivo em conjunto com o uso de DHFR, como marcador de seleção. O sistema é amplamente aplicável, isto é, as células hospedeiras eucarióticas cuja viabilidade de célula depende da absorção de folato. Como é descrito acima, a técnica anterior deve usar bastante altas concentrações de antifolato/MTX a fim de atingir uma pressão de seleção suficiente para amplificação do gene e, conseqüentemente, para conseguir um aumento na produção do produto de interesse. Esta é uma desvantagem como antifolatos, tal como MTX, são tóxicos e podem alterar geneticamente a célula hospedeira. A abordagem da presente invenção, que é baseada no uso combinado de um marcador de seleção

da DHFR com uma concentração de folatos limitante no meio de cultura seletivo tem a vantagem de que é considerável aumentar o rigor de seleção até mesmo em concentrações baixas do inibidor da DHFR. Dessa maneira, ao usar o sistema de seleção da presente invenção, os altos produtores são obtidos mesmo quando se usa baixas concentrações do inibidor da DHFR (por exemplo MTX) no meio de cultura seletivo. Dessa maneira, menos inibidor da DHFR e, conseqüentemente, menos concentrações de agente tóxicos são necessários quando se usa o ensino da presente invenção em comparação com as abordagens da técnica anterior de proporcionar condições de seleção rigorosas que permitem a identificação da alta produção dos clones de célula. Devido ao seu design único, um sistema de seleção muito rigoroso é fornecido, permitindo o enriquecimento de alta produção de células a partir da população da célula hospedeira transfectada. Este alto rigor do sistema de seleção de acordo com a presente invenção reduz o número de baixos produtores na população após a seleção na população e aumenta a chance de encontrar a ultraprodução muito rara de clones.

[00027] O meio de cultura seletivo pode incluir um ou mais tipos de folato. Um folato de acordo com a presente invenção pode, por exemplo, ser um folato oxidado (isto é, um ácido fólico) ou um folato reduzido ou um derivado do mesmo. Em geral, um folato pode ser útil na presente invenção, desde que tais folato sejam capazes de serem levados para uma célula eucariótica, de preferência, por meio de um receptor de folato ligado pela membrana. O folato oxidado, isto é, o ácido fólico, bem como os derivados reduzidos de ácido fólico, conhecidos como folatos reduzidos ou tetra-hidrofolatos (THF), são um grupo de vitaminas B-9 que são cofatores essenciais e/ou coenzimas para a biossíntese de purinas, timidilato e certos aminoácidos em células eucarióticas, em particular dos mamíferos. Os cofatores de THF são particularmente

cruciais para a replicação do DNA e, conseqüentemente, a proliferação de célula. Especificamente, os cofatores de THF funcionam como doadores de unidades um-carbono em uma série de vias metabólicas interligadas que envolvem a nova biossíntese das purinas e timidilato, amino ácidos, bem como metabolismo do grupo metila, incluindo a metilação da ilhota de CpG do DNA. Especificamente, os cofatores de THF incluindo 10-formil-THF (10-CHO-THF) contribuem com unidade de um-carbono em duas reações chave de novo formiltransferase envolvidos na nova biossíntese de purinas. Um exemplo preferido de um folato oxidado é o ácido fólico. Os exemplos preferidos de folatos reduzidos são 5-metil-tetra-hidrofólico, 5-formil-tetra-hidrofólico, ácido 10-formil-tetra-hidrofólico e ácido 5,10-metileno-tetra-hidrofólico.

[00028] A concentração de folato no meio seletivo depende, em particular, da célula hospedeira eucariótica usada. A concentração de folato de 500 nM ou menos, 250 nM ou menos, 150 nM ou menos, 100 nM ou menos, 75nM ou menos, 50 nM ou menos, 25nM ou menos, 15nM ou menos, ou até mesmo 10 nM ou menos, tal como 7,5 nM ou menos é adequado. As faixas adequadas incluem 0,1 nM a 500 nM, 0,1 nM a 250 nM, 5 ou 10 nM a 250 nM, de preferência 1nM a 150 nM, 5 ou 10 nM a 150 nM, 1nM a 100 nM, 5 ou 10 nM a 100 nM e mais preferido 1 nM a 50 nM , 2,5 nM a 50 nM, 10 nM a 50 nM ou 12,5 nM a 50 nM. Estas concentrações são particularmente adequadas quando se utiliza ácido fólico como folato.

[00029] As respectivas concentrações são limitantes, no sentido da presente invenção, e, portanto, adequadas para fornecer uma pressão seletiva sobre as células hospedeiras. Quanto menor concentração, mais forte é a pressão de seleção exercida, desde que as células ainda sejam viáveis. Os níveis de concentração descritos são particularmente adequados para uso de células CHO como células hospedeiras.

[00030] A concentração do inibidor de DHFR utilizado no meio de

cultura seletivo também depende da célula hospedeira eucariótica usada. A concentração do inibidor da DHFR de 500 nM ou menos, 400 nM ou menos, 300 nM ou menos, 250 nM ou menos, 200 nM ou menos, 150 nM ou menos é vantajosa no caso de a concentração do inibidor de DHFR no meio seletivo ser suposta a ser reduzida. No entanto, de preferência, o meio seletivo compreende pelo menos 10 nM do inibidor de DHFR. As concentrações de antifolato preferidas, de preferência MTX, são de 1 nM a 500 nM, de preferência de 10 nM a 200 nM, de 10 nM a 150 nM e mais preferido de 10 nM a 100 nM. As respectivas concentrações no meio de cultura seletivo são particularmente adequadas para as células CHO.

[00031] As concentrações preferidas e as faixas de concentração de folato e antifolato descritas acima podem ser combinadas entre si. De acordo com uma modalidade, um meio de cultura seletivo é utilizado, que compreende uma concentração de inibidor da DHFR, de preferência MTX, de 200 nM ou menos, de preferência de 150 nM ou menos, de preferência de 100 nM ou menos e uma concentração de folato, de preferência ácido fólico, de menos de 100 nM, de preferência inferior a 75 nM. Em uma modalidade, uma concentração de folato de 12,5 nM a 50 nM é usada em combinação com uma concentração de antifolato de 10 nM a 100 nM. De preferência, ácido fólico e MTX são usados como folato e antifolato.

[00032] As concentrações de ácido fólico viáveis e MTX podem ser dependentes a partir de uma outra; uma combinação preferida é uma concentração de ácido fólico de 2,5 nM a 75nM, 2,5 nM a 50 nM ou 12,5 nM a 50 nM combinadas com uma concentração de MTX de 10 nM a 500 nM, de preferência 10 nM a 100 nM. Estas concentrações são particularmente preferidas quando se usa uma célula DHFR + (plus).

[00033] As concentrações descritas acima são particularmente adequadas para o rápido crescimento das células em suspensão, que é

um fenótipo preferido para linhagens de células de produção comercial. No entanto, as linhagens de células diferentes podem ter diferentes propriedades de consumo de ácido fólico. Além disso, as concentrações limitantes/seletivas podem variar dependendo do folato usado, respectivamente antifolato. Portanto, as concentrações de folato limitantes, em particular o ácido fólico e antifolato, em particular MTX, assim como o ácido fólico adequado às relações MTX podem ser diferentes para diferentes linhagens de células. As concentrações adequadas, no entanto, podem facilmente ser determinadas experimentalmente pelo versado na técnica.

[00034] De acordo com uma modalidade, as células hospedeiras são pré-cultivadas em um meio de cultura livre de folato ou em meio de cultura que compreende uma concentração limitante de folato antes da transfecção e/ou seleção. As concentrações adequadas de folato limitantes estão descritas acima. De preferência, o dito meio de cultura para pré-cultura das células hospedeiras compreende folato, em particular, ácido fólico em uma concentração de 50 nM ou menos.

[00035] A expressão do marcador de seleção DHFR incorporado fornece uma vantagem seletiva em condições de cultura seletivas para as células hospedeiras. Por exemplo, as células hospedeiras (por exemplo, células CHO) que não possuem o gene DHFR (por exemplo, por meio da exclusão genômica alvo, também chamada de DHFR - células hospedeiras) podem ser usadas como destinatários para a transfecção do gene DHFR como gene marcador de seleção em um meio que é livre de nucleotídeos. No entanto, também é possível usar células hospedeiras que expressam DHFR endogenamente (células hospedeiras de DHFR + (plus)) ao realizar uma seleção DHFR, se for o caso as condições de cultura seletivos são usadas. Após a transfecção com os polinucleotídeos de acordo com a presente invenção, as células podem ser sujeitas a um aumento gradual nas concentrações de

inibidores da DHFR. Um exemplo de inibidores da DHFR são antifolatos, tais como MTX, que é um inibidor da DHFR potente ($K_d = 1 \text{ pM}$). A presença do antifolato, tal como MTX, no meio força as células a produzirem níveis elevados de DHFR, a fim de sobreviver. Após várias rodadas de seleção, o marcador de seleção DHFR frequentemente sofre amplificação do gene significativo, a fim de conseguir isso.

[00036] Vários genes adequados da DHFR são conhecidos no estado da técnica que podem ser usados em conjunto com a presente invenção. DHFR pode ser uma DHFR do tipo selvagem ou uma variante ou derivado funcional. O termo uma "variante" ou "derivados" incluem enzimas da DHFR tendo uma ou mais trocas das sequências de amino ácidos (por exemplo, exclusões, substituições ou adições) com relação à sequência de amino ácidos da enzima da DHFR respectiva, as proteínas de fusão compreendendo uma enzima da DHFR ou fragmentos funcionais da mesma e enzimas da DHFR, que foram modificadas para fornecer uma estrutura e/ou função adicional, bem como os fragmentos funcionais do exposto, que ainda tem pelo menos uma função de uma enzima da DHFR. As enzimas/variantes da DHFR podem ser usadas como marcadores de seleção, que são mais ou menos sensíveis ao MTX do que a enzima da DHFR do tipo selvagem. De acordo com uma modalidade, a enzima da DHFR utilizada é mais sensível para antifolatos, tal como MTX, do que a enzima da DHFR do tipo selvagem correspondente e/ou a enzima da DHFR endogenamente expressa por meio da célula hospedeira, se expressa. A enzima da DHFR pode ser derivada de qualquer espécie, desde que ela seja funcional dentro da presente invenção, isto é, desde que seja compatível com a célula hospedeira utilizada. Por exemplo, um camundongo mutante da DHFR com uma grande resistência contra a MTX tem sido amplamente utilizado como um marcador dominante de seleção que aumenta significativamente a aquisição de alto nível de

resistência a MTX em células transfectadas. De preferência, uma enzima da DHFR é utilizada, a qual é menos suscetível e, portanto, menos sensível a um inibidor da DHFR, tal como MTX, do que a enzima da DHFR endogenamente expressa em uma célula hospedeira da DHFR⁺ (plus).

[00037] De acordo com uma modalidade, um íntron ou um fragmento do mesmo é colocado na extremidade 3' da estrutura de leitura aberta do gene da DHFR. Isto tem efeitos vantajosos sobre a taxa de expressão/ amplificação do constructo. O íntron utilizado no cassete de expressão da DHFR está levando a um menor, uma variante não funcional do gene da DHFR (Grillari *et al.*, 2001, J. Biotechnol. 87, 59 a 65). Portanto, o nível de expressão do gene da DHFR é reduzido e pode, dessa maneira, aumentar ainda mais o rigor do sistema de seleção. Consequentemente, a célula hospedeira pode incluir um polinucleotídeo que codifica uma enzima da DHFR, o dito polinucleotídeo compreendendo um íntron que está localizado na extremidade 3' da sequência de codificação da DHFR. Os métodos alternativos fazem uso de um íntron para reduzir o nível de expressão do gene da DHFR são descritos em EP 0 724 639 e também poderiam ser usados.

[00038] Em contraste com a maioria dos procariotas, as plantas e os fungos os quais sintetizam seus próprios folatos, mamíferos e outras espécies eucarióticas são desprovidos de biossíntese de cofator THF e devem, portanto, obtê-las de fontes exógenas, geralmente o meio de cultura. Três sistemas de transporte independentes são atualmente conhecidos para mediar a absorção de folatos e antifolatos em células de mamíferos, ou seja, o folato reduzido veículo (RFC); os receptores de folato acoplados aos prótons (PCFT, também conhecido como SLC46A) e folato (FRs).

[00039] A célula hospedeira eucariótica é, de preferência,

selecionada a partir do grupo que consiste em uma célula de mamíferos, uma célula do inseto, uma célula vegetal e uma célula de fungos. Os fungos e as células vegetais podem ser fototrópicos para os folatos (isto é, tais células podem sintetizar de forma autônoma os seus próprios folatos necessários para a sua viabilidade de célula, isto é, o crescimento e a proliferação de célula). A presente invenção compreende, em particular, tais fungos e células vegetais que são ou podem tornar-se auxotróficos para os folatos. Isso pode ser por exemplo, devido à manipulação genética, isto é, as células são agora incapazes de sintetizar as quantidades suficientes de folatos necessárias para a sua viabilidade de célula. Por exemplo, a capacidade de tais fungos ou células vegetais para biossintetizar endogenamente os folatos, por exemplo, através de uma via metabólica adequada, pode ser inativada, por exemplo, por meio da ruptura do gene ou por meio do silenciamento dos genes alvo apropriados, ou a inibição das enzimas chave, etc. De preferência, a célula hospedeira é uma célula de mamíferos. As ditas células de mamíferos podem ser selecionadas do grupo que consiste em uma célula de roedores, uma célula humana e uma célula do macaco. Particularmente preferida é uma célula de roedores, que de preferência é selecionada do grupo que consiste em uma célula CHO, uma célula BHK, uma célula NS0, um rato de células de fibroblastos 3T3 e uma célula SP2/0. Uma célula de roedores mais particularmente preferida é uma célula CHO. Também preferida é uma célula humana, a qual, de preferência, é selecionada do grupo que consiste em uma célula HEK293, uma célula MCF-7, uma célula PerC6, e uma célula HeLa. Mais preferida é uma célula do macaco, que, de preferência, é selecionada do grupo que consiste em um COS-1, uma célula COS-7 e uma célula Vero. A célula hospedeira é de preferência uma célula DHFR⁺ (plus), em particular, uma célula CHO DHFR⁺ (plus).

[00040] De acordo com uma modalidade, o polinucleotídeo que

codifica um produto de interesse e o polinucleotídeo que codifica uma enzima da DHFR foram introduzidos por meio de, pelo menos, um vetor de expressão. As técnicas adequadas para a introdução de um vetor respectivo são descritas abaixo e incluem, por exemplo, a transfecção.

[00041] Um "vetor de expressão", de acordo com a presente invenção, é um polinucleotídeo capaz de transportar pelo menos um fragmento de ácido nucleico estrangeiro. Um vetor funciona como uma molécula veículo, fornecendo fragmentos de ácidos nucleicos, respectivamente os polinucleotídeos em uma célula hospedeira. Ele compreende pelo menos um cassete de expressão compreendendo as sequências regulatórias para expressar adequadamente um polinucleotídeo incorporado nele. Os polinucleotídeos (por exemplo, codificando o produto de interesse ou marcadores de seleção) podem ser inseridos no(s) cassete(s) de expressão do vetor de expressão, a fim de ser expresso dele. O vetor de expressão, de acordo com a presente invenção, pode estar presente em uma forma circular ou linear. O termo "vetor de expressão" também compreende os cromossomos artificiais ou os respectivos polinucleotídeos similares permitindo a transferência de fragmentos de ácido nucleico estrangeiros.

[00042] O polinucleotídeo que codifica o produto de interesse e o polinucleotídeo que codifica a enzima da DHFR pode ser localizado nos vetores de expressão iguais ou diferentes. Usando um vetor de expressão transportando ambos os polinucleotídeos tem a vantagem que apenas um vetor de expressão precisa ser introduzido na célula hospedeira. Além disso, em particular, ao estabelecer uma linha de expressão estável, é mais provável que os polinucleotídeos sejam integrados para formar o genoma e, portanto, expressam-se com um rendimento similar. No entanto, também é possível, e no escopo da presente invenção, usar uma combinação de pelo menos dois vetores de expressão para a transfecção, em que os polinucleotídeos

respectivos estão localizados nos vetores de expressão diferentes. A dita combinação dos vetores de expressão é, então, transferida para a célula hospedeira.

[00043] A célula hospedeira eucariótica pode incluir pelo menos um polinucleotídeo introduzido adicional que codifica um produto adicional de interesse. Esta modalidade é particularmente adequada para expressar as moléculas de imunoglobulinas. De acordo com uma modalidade preferida, a célula hospedeira compreende pelo menos dois polinucleotídeos introduzidos, cada um codificando um produto de interesse, em que pelo menos um polinucleotídeo codifica a cadeia pesada de uma molécula de imunoglobulina ou um fragmento funcional do mesmo e o outro polinucleotídeo codifica a cadeia leve de uma molécula de imunoglobulina ou um fragmento funcional do mesmo. Os polinucleotídeos respectivos podem ser introduzidos por meio do uso de um vetor de expressão adequado. Os ditos polinucleotídeos são usados codificando a cadeia leve e a cadeia pesada de uma molécula de imunoglobulina (ou um fragmento funcional do mesmo) podem ser encontrados no mesmo ou em vetores de expressão diferentes no caso de uma combinação de pelo menos dois vetores de expressão.

[00044] A célula hospedeira e, conseqüentemente, a expressão do vetor para a introdução de polinucleotídeos na dita célula hospedeira pode ainda compreender um ou mais polinucleotídeo(s) adicional(is) que codificam um ou mais marcador(es) de seleção(ões) adicional(is). Assim, em uma modalidade da presente invenção, a cos-seleção utilizando o sistema da presente invenção, juntamente com um ou mais sistema(s) de seleção diferente (por exemplo, sistemas de seleção resistentes a antibióticos tais como neo/G418) pode ser aplicado para melhorar ainda mais o desempenho. Além disso, os marcadores de seleção eucarióticos adicionais, permitindo a seleção de células hospedeiras eucarióticas, podem ser usados também marcadores de

seleção procarióticos, os quais permitem a seleção em células hospedeiras eucarióticas. Os exemplos de marcadores de seleção procarióticos respectivos são os marcadores que proporcionam uma resistência aos antibióticos, tais como, por exemplo, ampicilina, canamicina, tetraciclina e/ou cloranfenicol.

[00045] Os vetores usados para a introdução dos polinucleotídeos para as células hospedeiras geralmente contêm elementos de controle transcricional adequados para dirigir a transcrição, tais como, por exemplo, promotores, intensificador, sinais de poliadenilação, pausando a transcrição ou terminando os sinais como elemento de um cassete de expressão. Se o produto desejado é uma proteína, elementos de controle de translação adequados são, de preferência, incluídos no vetor e operavelmente ligados ao polinucleotídeos a ser expresso, tal como, por exemplo, as regiões não traduzidas 5' levando as estruturas 5' adequadas para os o recrutamento dos ribossomos e param os códons para finalizar o processo de tradução. Em particular, o polinucleotídeo servindo como genes marcadores de seleção, bem como o polinucleotídeo codificando o produto de interesse, pode ser transcrito sob o controle dos elementos de transcrição presentes nos promotores apropriados. As transcrições resultantes dos genes marcadores de seleção e os produto de interesse do porto dos elementos funcionais que facilitam os níveis substanciais da expressão da proteína (isto é, a tradução) e a terminação correta da tradução. Uma unidade de expressão funcional, capaz de conduzir corretamente a expressão de um polinucleotídeo incorporado também é referida aqui como um "cassete de expressão".

[00046] O vetor de expressão ou a combinação dos vetores de expressão de acordo com a presente invenção utilizado para a introdução dos polinucleotídeos para as células hospedeiras eucarióticas pode incluir pelo menos um promotor e/ou um elemento

promotor/intensificador como elemento de um cassete de expressão. Embora as fronteiras físicas entre estes dois elementos de controle nem sempre sejam claras, o termo "promotor" geralmente se refere a um local na molécula de ácido nucleico para o qual uma RNA polimerase e/ou qualquer fatores associados ligam-se e em que a transcrição é iniciada. Os intensificadores potencializam a atividade do promotor, temporalmente, bem como espacialmente. Muitos promotores estão transcrionalmente ativos em uma ampla gama de tipos de células. Os promotores podem ser divididos em duas classes, aqueles que funcionam constitutivamente e aqueles que são regulados por meio da indução ou desrepressão. Ambas as classes são adequadas para os ensinamentos da presente invenção. Os promotores usados para alto nível de produção de polipeptídeos nas células de mamíferos devem ser fortes e de preferência ativos em uma ampla gama de tipos de células.

[00047] Os promotores constitutivos fortes os quais levam a expressão em vários tipos de células incluem mas não estão limitados ao promotor de adenovírus principal tardio, o promotor de início de citomegalovírus humano imediato, o promotor do vírus SV40 e Rous Sarcoma, e o promotor quinase murino 3-fosfoglicerato, EF1a. Bons resultados são alcançados com o vetor de expressão da presente invenção, quando o promotor e/ou intensificador é obtido a partir de CMV e/ou SV40. Os promotores de transcrição podem ser selecionados do grupo que consiste em um promotor SV40, um promotor CMV, um promotor EF1 alfa, um promotor RSV, um promotor BROAD3, um promotor rosa murino 26, um promotor pCEFL e um promotor β -actina.

[00048] De preferência, o polinucleotídeo que codifica o produto de interesse e o polinucleotídeo que codifica a enzima da DHFR estão sob o controle de promotores de transcrição distintas. Em geral, um promotor capaz de promover a expressão, em particular na transcrição, nos polinucleotídeos essenciais em uma célula hospedeira eucariótica

será apropriado. Os promotores de transcrição distintos conduzindo a expressão a partir dos polinucleotídeos podem ser o mesmo ou diferentes.

[00049] De acordo com uma modalidade, um promotor e/ou intensificador forte é usado para conduzir a expressão do polinucleotídeo que codifica o produto de interesse do que para conduzir a expressão do polinucleotídeo que codifica a enzima da DHFR e/ou os marcadores de seleção adicionais, se houver. Esse arranjo tem o efeito que mais transcrição é gerada para o produto de interesse do que para os marcadores de seleção. É vantajoso que a produção do produto de interesse seja dominante sobre a produção dos marcadores de seleção, uma vez que a capacidade da célula individual para produzir produtos heterólogos não é ilimitada e que deveria ser voltada para o produto de interesse. Além disso, o processo de seleção ocorre apenas nos estágios iniciais de criação de uma linhagem de células de expressão, que então produz constantemente o produto de interesse. Dessa maneira, é vantajoso focalizar os recursos das células para a expressão/produção do produto de interesse. Além disso, usando um promotor menos forte para expressar o (s) marcador (es) de seleção, em particular DHFR, aumenta ainda mais a pressão de seleção e, portanto, permite o uso de concentrações mais baixas de inibidores da DHFR no meio de cultura seletivo.

[00050] De acordo com uma modalidade, o promotor conduzindo a expressão do polinucleotídeo que codifica o produto de interesse é um promotor CMV e o promotor conduzindo a expressão do polinucleotídeo que codifica a enzima da DHFR é um promotor SV40. O promotor CMV é conhecido por ser um dos promotores mais fortes disponíveis para promotores de expressão de mamífero e leva a uma taxa de expressão muito boa. Considera-se para dar transcrição significativamente mais do que o promotor SV40.

[00051] De acordo com uma modalidade adicional, o polinucleotídeo que codifica o produto de interesse e o polinucleotídeo que codifica a enzima da DHFR estão sob o controle do mesmo promotor de transcrição e são, portanto, expressos a partir de um cassete de expressão. Os promotores adequados estão descritos acima. Nesta modalidade, uma transcrição longa é obtido a partir do respectivo cassete de expressão que está sob o controle do dito promotor de transcrição. De acordo com uma modalidade, pelo menos um elemento IRES é funcionalmente localizado entre o polinucleotídeo que codifica o produto de interesse e/ou o polinucleotídeo que codifica a enzima da DHFR. Portanto, é garantido que os produtos de tradução separados são obtidos a partir da dita transcrição.

[00052] O cassete de expressão pode incluir um local de terminação da transcrição apropriado. Esta transcrição, como continuada a partir de um promotor a montante através de uma segunda unidade de transcrição pode inibir a função do promotor a jusante, um fenômeno conhecido como oclusão promotora ou interferência de transcrição. Este evento tem sido descrito em ambos procariotos e eucariotos. A colocação adequada dos sinais de terminação da transcrição entre duas unidades de transcrição pode prevenir a oclusão promotora. Os locais de terminação de transcrição são bem-caracterizados e sua incorporação nos vetores de expressão tem sido demonstrada que têm múltiplos efeitos benéficos sobre a expressão do gene.

[00053] A célula hospedeira utilizada é uma eucariótica, em particular, uma célula hospedeira de mamífero. A maioria dos mRNAs eucarióticos nascentes possuem uma cauda poli A nas suas extremidade 3', que é adicionada durante um processo complexo que envolve a clivagem da transcrição primária e uma reação de poliadenilação acoplada. A cauda poli A é vantajosa para a estabilidade e para a transferibilidade do mRNA. Dessa maneira, os cassetes de

expressão para expressar os polinucleotídeos que codificam o produto de interesse e da enzima da DHFR, normalmente compreendem um local de poliadenilação adequado para terminação de transcrição e de poliadenilação. Existem vários sinais poli A eficientes que podem ser usados nos vetores de expressão de mamífero, incluindo aqueles derivados a partir do hormônio de crescimento bovino (bgh), camundongo beta-globina, a unidade de transcrição SV40 precoce e o gene da timidina quinase do vírus simples de Herpes. No entanto, os locais de poliadenilação sintéticos também são conhecidos (vide por exemplo, o vetor de expressão neo-PCI da Promega que se baseia na Levitt et al, 1989, Genes Dev 3, (7): 1019 a 1025). O local de poliadenilação pode ser selecionado a partir do grupo consistindo no local SV40polyA, tais como o SV40 tardio e local do poli-A precoce (vide, por exemplo plasmídeo pSV2-DHFR, conforme descrito no Subramani et al, 1981, Mol.Cell. Biol. 854 a 864), um local de poli A sintético (vide por exemplo, o vetor de expressão neo-PCI da Promega que se baseia em Levitt et al, 1989, Genes Dev 3, (7): 1019-1025) e um local de poli bgh (hormônio de crescimento bovino).

[00054] Além disso, um cassete de expressão compreendendo o polinucleotídeo que codifica o produto de interesse e polinucleotídeo que codifica a enzima da DHFR pode incluir pelo menos um íntron. Esta modalidade é particularmente adequada quando uma célula hospedeira de mamíferos é utilizada para a expressão. A maioria dos genes de eucariotos superiores contêm íntrons, os quais são removidos durante o processamento de RNA. Os respectivos constructos são expressos de forma mais eficiente nos sistemas transgênicos do que os constructos idênticos faltando íntrons. Normalmente, os íntrons são colocados na extremidade 5' da estrutura de leitura aberta, mas também podem ser colocados na extremidade 3'. Assim, um íntron pode ser compreendido no (s) cassete (s) de expressão para aumentar a taxa de

expressão. O dito íntron pode estar localizado entre o promotor e ou o (s) elemento (s) promotor/intensificador (es) e a extremidade 5' da estrutura de leitura aberta do polinucleotídeo a ser expressa. Vários íntrons adequados são conhecidos no estado da técnica que podem ser usados em conjunto com a presente invenção.

[00055] De acordo com uma modalidade, o íntron usado com os cassetes de expressão para expressar o produto de interesse, é um íntron sintético, tais como o SIS ou o íntron RK. O íntron RK é um íntron sintético forte que é, de preferência, colocado antes do códon de partida ATG do gene de interesse. O íntron RK consiste no local da parte do íntron doador do promotor CMV e o local da parte do aceitador da região variável do camundongo IgG de cadeia pesada (vide, por exemplo Eaton et al., 1986, Bioquímica 25, 8343 a 8347, Neuberger *et al.*, 1983, EMBO J. 2 (8), 1373 a 1378; que pode ser obtido a partir do vetor PRK-5 (BD PharMingen)).

[00056] Um vetor de expressão compreendendo os polinucleotídeos e/ou os cassetes de expressão, como descrito acima, pode ser transfectado dentro da célula hospedeira em sua forma circular. As moléculas vetor superenroladas normalmente serão convertidas em moléculas lineares dentro do núcleo, devido à atividade de endo e exonucleases. No entanto, a linearização do vetor de expressão antes da transfecção muitas vezes melhora a eficiência de uma transfecção estável. Isso também, como ponto de linearização, pode ser controlado se o vetor de expressão for linearizado antes de transfecção. Assim, de acordo com uma modalidade da presente invenção, o vetor de expressão ou a combinação de pelo menos dois vetores de expressão compreende pelo menos um local de restrição predefinido, o que pode ser usado para a linearização do (s) vetor (es) antes da transfecção. De acordo com uma modalidade, o local de linearização é organizado tal como que, após a linearização, o polinucleotídeo que codifica a enzima

da DHFR está localizado na extremidade 5' do polinucleotídeo que codifica o produto de interesse. Este arranjo é vantajoso para a amplificação do gene. No caso de um marcador de seleção procariótico ser adicionalmente usado, o polinucleotídeo que codifica o dito marcador procariótico está localizado na extremidade 3' do polinucleotídeo que codifica o produto de interesse. Isso tem o efeito que o gene marcador de seleção procariótico está na extremidade 3' e, dessa maneira, "fora" das partes dos "mamíferos" do ácido nucleico do vetor linearizado. Este arranjo é favorável desde que os genes procarióticos sejam presumivelmente não vantajosos para a expressão de mamíferos como sequências procarióticas que pode levar a metilação aumentada ou outros efeitos de silenciamento nas células de mamíferos.

[00057] O polinucleotídeo que codifica um produto de interesse e o polinucleotídeo que codifica a enzima da DHFR são, de preferência, estavelmente introduzidos nas ditas células hospedeiras. A transfecção respectiva da introdução estável é vantajosa para o estabelecimento da expressão de linhagens de células e, em particular para a produção em larga escala e consequentemente industrial do produto de interesse.

[00058] Existem vários métodos apropriados conhecidos no estado da técnica para a introdução de polinucleotídeos e vetores de expressão nas células hospedeiras eucarióticas, incluindo as células hospedeiras de mamíferos. Os métodos respectivos incluem mas não estão limitados a transfecção de fosfato de cálcio, eletroporação, lipofecção, transferência de genes mediada por biobalística e polímero. Além dos métodos tradicionais de integração aleatória, as abordagens mediadas pela recombinação também podem ser usadas para transferir o polinucleotídeo que codifica o produto de interesse e os polinucleotídeos que codificam uma enzima da DHFR no genoma da célula hospedeira. Tais métodos de recombinação podem incluir o uso

de recombinases de local específico, tal como Cre, FLP ou ϕ C31 (vide, por exemplo Oumard et al, Citotecnologia (2006) 50: 93 a 108), que podem mediar a inserção dirigida de transgenes. Alternativamente, o mecanismo de recombinação homóloga pode ser usado para inserir os ditos polinucleotídeos (revisto em Sorrell et al., Avanços da biotecnologia 23 (2005) 431 a 469). A recombinação baseada na inserção dos genes permite minimizar o número de elementos a serem incluídos no ácido nucleico heterólogo que é transferido/introduzido na célula hospedeira. Por exemplo, um locus de inserção pode ser usado, o que já fornece o local do promotor e poli-A (exógeno ou endógeno) de tal forma que apenas os elementos restantes (por exemplo, o polinucleotídeo que codifica o produto de interesse e o polinucleotídeo que codifica a enzima da DHFR precisam ser transferidos/ transfectados para a célula hospedeira. As modalidades de um vetor de expressão adequado ou a combinação dos vetores de expressão de acordo com a presente invenção, bem como as células hospedeiras adequadas são descritas em detalhes acima; faz-se referência à descrição acima.

[00059] No caso de um marcador de seleção adicional ser usado, além da enzima da DHFR, as condições de seleção para o dito marcador de seleção podem ser aplicadas antes de aplicar-se as condições seletivas para a enzima da DHFR. Por exemplo, no caso do gene fosfotransferase de neomicina (neo) ser usado como marcador de seleção adicional, as células podem ser cultivadas primeiro em um meio, por exemplo, contendo G418, a fim de selecionar as células que incorporaram o (s) vetor (es) de expressão de acordo com a presente invenção.

[00060] A estratégia da presente invenção para utilizar uma concentração limite de folato no meio de cultura seletivo, além de um marcador de seleção da DHFR tem a vantagem de que um rigor muito elevado é obtido mesmo que concentrações mais baixas do inibidor da

DHFR sejam usadas. A produtividade da população de células sobreviventes a estas novas condições de seleção é notavelmente aumentada. Os exemplos têm mostrado que as células hospedeiras obtidas após o método de seleção produzem o produto de interesse com um alto rendimento. Também, a produtividade média das células hospedeiras individuais é aumentada. Dessa maneira, as chances são melhoradas para encontrar clones de alta produção com menor esforço de triagem. Dessa maneira, o sistema de seleção de acordo com a presente invenção é superior aos sistemas de seleção utilizados no estado da técnica. Em particular, as células hospedeiras são obtidas, as quais possuem uma maior produtividade em comparação com o uso dos marcadores respectivos de seleção sozinho. Dessa maneira, devido ao maior rigor das condições de seleção, o processo de seleção é otimizado.

[00061] As células obtidas como resultado do processo rigoroso de triagem/seleção da presente invenção geralmente serão isoladas e podem ser enriquecidas a partir de células não selecionadas da população de célula original. Elas podem ser isoladas e cultivadas como células individuais. Elas também podem ser usadas em uma ou mais rodadas adicionais de seleção, opcionalmente para análise qualitativa ou quantitativa adicional, ou podem ser usadas, por exemplo, no desenvolvimento de uma linhagem de célula para a produção de proteínas. De acordo com uma modalidade, uma população enriquecida de produção de células hospedeiras selecionadas como descrita acima, é usada diretamente como uma população para a produção do polipeptídeo de interesse com um bom rendimento. De preferência, uma célula hospedeira é selecionada de forma estável, a qual expressa o produto de interesse. As vantagens de uma transfecção/expressão estável são descritas em detalhes acima. Faz-se referência à descrição acima.

[00062] Também é fornecido um método para produzir um produto de interesse, incluindo pelo menos as seguintes etapas:

(a) executar o método de seleção de acordo com a presente invenção para a seleção de pelo menos uma célula hospedeira eucariótica expressando o produto de interesse, e

(b) cultivar, pelo menos, uma célula hospedeira eucariótica selecionada em condições que permitam a expressão do produto de interesse.

[00063] Como o método de seleção de acordo com a presente invenção permite a identificação de alta produção de clones de célula, o dito sistema de seleção é uma parte importante e integrante do processo de produção. O produto expresso de interesse pode ser obtido por meio do rompimento das células hospedeiras. Os polipeptídeos também podem ser expressos, por exemplo, secretados para o meio de cultura e podem ser obtidos a partir desse local. As combinações dos respectivos métodos também são possíveis. De acordo com uma modalidade, as ditas células hospedeiras são cultivadas em condições livres de soro.

[00064] Portanto, os produtos em particular os polipeptídeos, podem ser produzidos e obtidos/isolados de forma eficiente com alto rendimento. O produto obtido pode também ser sujeito a etapas de processamento adicionais, tais como, por exemplo, etapas de purificação e/ou de modificação. Assim, o método para produzir o produto de interesse pode incluir pelo menos uma das seguintes etapas:

- Isolar o produto de interesse a partir do dito meio de cultura da célula e/ou a partir da dita célula hospedeira; e/ou;

- Transformar o produto de interesse isolado.

[00065] O produto de interesse, por exemplo, um polipeptídeo, produzido de acordo com a presente invenção pode ser recuperado e, opcionalmente, posteriormente, por exemplo, mais purificado, isolado

e/ou modificado por meio de métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, o produto pode ser recuperado a partir do meio nutriente por meio de procedimentos convencionais, incluindo, mas não limitados a, centrifugação, filtração, ultrafiltração, extração ou precipitação. A purificação pode ser realizada por meio de uma variedade de procedimentos conhecidos na técnica, incluindo, mas não limitados a, cromatografia (por exemplo, troca iônica, afinidade, hidrofóbico, cromatografia e exclusão de tamanho), procedimentos eletroforéticos (por exemplo, focalização isoeletrica preparativa), solubilidade diferencial (precipitação de sulfato de amônio, por exemplo) ou extração.

[00066] O produto de interesse pode ser qualquer produto biológico capaz de ser produzido por meio da transcrição, tradução ou qualquer outro evento de expressão da informação genética codificada por meio do dito polinucleotídeo. A este respeito, o produto será um produto de expressão. O produto de interesse pode ser selecionado do grupo que consiste em polipeptídeos, ácidos nucleicos, em particular RNA ou DNA. O produto pode ser um composto farmacêutica ou terapeuticamente ativo, ou uma ferramenta de pesquisa para ser utilizada em ensaios e similares. Em uma modalidade particularmente preferida, o produto é um polipeptídeo, de preferência, um polipeptídeo farmacêutica ou terapeuticamente ativo ou uma ferramenta de pesquisa para ser utilizada em ensaios e similares. Um polipeptídeo é, portanto, não limitado a qualquer proteína ou grupo específico de proteínas, mas pode, pelo contrário, ser qualquer proteína, de qualquer tamanho, função ou origem, o que se deseja selecionar e/ou expressar através dos métodos descritos neste documento. Assim, vários polipeptídeos diferentes de interesse podem ser expressos/produzidos. Como é descrito acima, o termo "polipeptídeos" inclui as proteínas e/ou peptídeos de qualquer atividade ou bioatividade, incluindo, por exemplo,

os polipeptídeos bioativos, tais como proteínas ou peptídeos enzimáticos (por exemplo, proteases, quinases, fosfatases), proteínas ou peptídeos receptores, proteínas ou peptídeos veículo, proteínas de ligação à bactericida e/ou endotoxina, proteínas ou peptídeos estruturais, polipeptídeos imune, toxinas, antibióticos, hormônios, fatores de crescimento, vacinas ou similares. O dito polipeptídeo pode ser selecionado do grupo consistindo nos hormônios do peptídeo, interleucinas, ativadores de plasminogênio de tecido, citocinas, imunoglobulinas, em particular, anticorpos ou fragmentos de anticorpos funcionais ou variantes dos mesmos. Em uma modalidade preferida, o polipeptídeo é uma molécula de imunoglobulina ou anticorpos, ou uma variante funcional do mesmo, por exemplo, um anticorpo quimérico, ou parcial ou totalmente humanizado. Tal anticorpo pode ser um anticorpo de diagnóstico, ou um anticorpo farmacêutica ou terapeuticamente ativo.

[00067] Também é fornecido um produto obtido por meio de um método de acordo com a presente invenção, tal como definido acima e nas reivindicações. O dito produto é, de preferência, um polipeptídeo, em particular, uma molécula de imunoglobulina ou um fragmento funcional do mesmo.

[00068] De acordo com uma modalidade, a presente invenção também fornece um meio de cultura seletivo composto de folato na concentração limitante e pelo menos um inibidor da DHFR. De preferência, o dito meio de cultura seletivo tem uma ou mais das seguintes características:

(a) que compreende folato, de preferência ácido fólico, em uma concentração selecionada de:

(aa) 500 nM ou menos;

(bb) 250 nM ou menos;

(cc) 150 nM ou menos;

- (dd) 100 nM ou menos;
- (ee) 75 nM ou menos;
- (ff) 50 nM ou menos;
- (gg) 25 nM ou menos; e/ou
- (hh) 15 nM ou menos;
- e/ou

(b) que compreende folato, de preferência ácido fólico, na faixa de concentração selecionada a partir de

- (aa) 0,1 nM a 500 nM;
- (bb) 0,1 nM a 250 nM, de preferência 2,5 nM a 250 nM ou 5 ou 10 nM a 250 nM;
- (cc) 0,1 nM a 150 nM, de preferência 2,5 nM a 150 nM ou 5 ou 10 nM a 150 nM;
- (dd) 1 nM a 100 nM, de preferência 2,5 nM a 100 nM ou 5 ou 10 nM a 100 nM;
- (ee) 1 nM a 75 nM, de preferência 2,5 nM a 75 nM ou 5 ou 10 nM a 75 nM;
- (ff) 1 nM a 50 nM;
- (gg) 2,5 nM a 50 nM, e/ou
- (hh) 12,5 nM a 50 nM
- e/ou

(c) que compreende o inibidor da DHFR, que é de preferência um antifolato, em uma concentração selecionada a partir de

- (aa) 500 nM ou menos;
- (bb) 400 nM ou menos;
- (cc) 300 nM ou menos;
- (dd) 250 nM ou menos;
- (ee) 200 nM ou menos;
- (ff) 150 nM ou menos, e/ou
- (gg) 100 nM ou menos;

e/ou

(d) que compreende o inibidor da DHFR, que é, de preferência, um antifolato e mais de preferência MTX, em uma concentração selecionada a partir de

(aa) 1 nM a 500 nM;

(bb) 10 nM a 200 nM;

(cc) 10 nM a 150 nM, e/ou

(dd) 10 nM a 100 nM.,

[00069] As concentrações indicadas e as faixas de concentração para o folato e o inibidor da enzima da DHFR, podem ser combinadas entre si. As vantagens e as modalidades preferidas adicionais das faixas de concentração e modalidades adequadas para folatos e antifolatos no meio de cultura seletivo foram descritas em detalhe acima em conjunto com o método de seleção de acordo com a presente invenção; faz-se referência à descrição acima. O dito meio de cultura seletivo pode ser usado em conjunto com o sistema de seleção da presente invenção.

[00070] O conteúdo completo dos textos e documentos aqui mencionados são aqui incorporados por referência e, portanto, fazem parte da presente descrição.

[00071] Os exemplos a seguir servem para ilustrar a presente invenção, sem de forma alguma limitar o escopo da mesma. Em particular, os exemplos relacionam-se às modalidades preferidas da presente invenção.

EXEMPLOS

[00072] Em geral, os materiais adequados, tais como reagentes, estão familiarizados àqueles versados na técnica, disponíveis comercialmente e podem ser utilizados de acordo com as instruções do fabricante. Os experimentos foram realizados como descrito.

[00073] Uma experiência de transfecção em células CHO é feita usando um vetor de expressão contendo os cassetes de expressão

para expressar um anticorpo monoclonal como produto de interesse. Como marcadores de seleção, um gene de resistência G418 (NEO) e um gene DHFR estão presentes no vetor de expressão nos cassetes de expressão em separado. Esta experiência demonstra que a seleção com quantidades reduzidas de MTX sob condições de pouco folato rende alta produção de populações de células. Como referência, as condições de seleção padrão para DHFR são usadas, as quais utilizam altas concentrações MTX e ácido fólico em quantidades não limitantes.

Exemplo I - DHFR e concentrações limitantes do ácido fólico

1.1. O vetor de expressão

[00074] O vetor de expressão é um vetor de expressão de mamífero compreendendo os seguintes elementos decisivos, os quais estão dispostos na mesma orientação sobre o vetor de expressão:

Promotor/intensificador CMV
Íntron
Polinucleotídeo que codifica a cadeia leve do anticorpo
Sítio de clonagem múltiplo
Local poli A SV40
Promotor/intensificador CMV
Íntron
Polinucleotídeo que codifica a cadeia pesada de anticorpos
Sítio de clonagem múltiplo
Local poli A SV40
Promotor/intensificador SV40
Neomicina fosfotransferase (neo)
Local poli A (sintético)
Gene de resistência à ampicilina
Promotor SV40

Gene mutante da DHFR é menos sensível ao MTX do que a DHFR do tipo selvagem
Íntron
Local poli A

1.2. Transfecção e seleção de células CHO

[00075] O cultivo, a transfecção e a triagem de células são realizados em frascos de agitação com uma suspensão de células CHO em crescimento em um meio de cultura apropriada para células CHO sem FCS. As células foram transfectadas com o vetor de expressão por meio da eletroporação. A fim de reduzir os reservatórios intracelular de ácido fólico nas células hospedeiras e evitar a cotransferência de ácido fólico a partir da pré-seleção do meio de cultura, as células são passadas para o meio livre de ácido fólico ou para o meio com teor reduzido de ácido fólico (por exemplo, 50 nM) antes da transfecção e da seleção. Dependendo da viabilidade de célula, uma primeira etapa de seleção é iniciada 24 a 48 h após a transfecção, adicionando G418 e MTX contendo o meio de cultura seletivo para as células. Em uma primeira etapa de seleção, três diferentes MTX (2,5, 5 e 10 nM) e concentrações de ácido fólico (12,5, 25 e 50 nM) são testados. Como referência, um meio de cultura é usado compreendendo quantidades não limitantes de ácido fólico, aqui 11,3 μM - o que corresponde a uma concentração padrão do meio de cultura).

[00076] Assim como as células recuperam-se para uma viabilidade acima de 80%, uma segunda etapa de seleção é aplicada por meio da passagem das células a um meio livre G418 contendo a mesma quantidade de ácido fólico como na primeira etapa de seleção, mas 10 vezes mais de MTX (isto é, 25, 50 e 100 nM). No caso das condições de cultura de referência, MTX a 500 nM é adicionado às células.

1.3. Determinação da produtividade do pool

[00077] A produtividade das populações de células selecionadas é

analisada após as etapas de seleção inicial e final através de culturas de batelada em um frasco de agitação supercultivado em um meio contendo quantidades não limitantes do ácido fólico (11,3 mM) sem G418, mas contendo MTX na mesma concentração, como nos respectivos meios de seleção.

[00078] As culturas de bateladas são semeadas em um frasco de agitação tendo capacidade para 250 mL com 50 mL de volume de trabalho e são cultivadas em um armário do agitador (não umidificado) a 150 rpm e CO₂ a 10%. A viabilidade das células tem que ser > 90% ao iniciar o ensaio. A densidade de semeadura das células é geralmente de cerca de 2×10^5 c/mL. A determinação do título acontece no dia 13. Os anticorpos título no sobrenadante de cultura de células são determinadas por meio das proteínas HPLC A, 13 dias após o início da cultura.

1.4. Resultados

[00079] Para avaliar a severidade da seleção de dhfr/MTX em limitar as concentrações de ácido fólico é feita, a transfecção de uma expressão do vetor da DHFR para expressar um anticorpo monoclonal neste exemplo I. O vetor também contém um gene de resistência G418 (vide acima). Em primeiro lugar, as populações de células transfectadas são selecionadas por meio da adição de G418 e diferentes concentrações de MTX em diferentes concentrações de ácido fólico. Esta primeira etapa inicial de seleção deve ajudar a matar as células não transfectadas e em paralelo forçar as células a consumirem os reservatórios intracelular de ácido fólico antes que um maior rigor seja aplicado na etapa de segunda seleção. Sob estas condições, todas as populações de células transfectadas normalmente se recuperam e a produtividade é avaliada como descrito acima.

[00080] A Tabela 1 resume os resultados de produtividade obtidos:

Tabela 1: Produtividade de populações de células após a primeira etapa de seleção.

Meio de Seleção	Produtividade de mAb (mg/L)
I. Séries de teste sem (w/o) MTX e baixas concentrações de ácido fólico (FA) (12,5 nM, 25 nM e 50 nM)	
+ 0,8 g/L G418 + 12,5 nM FA + w/o MTX	16
+ 0,8 g/L G418 + 25 nM FA + w/o MTX	12
+ 0,8 g/L G418 + 50 nM FA + w/o MTX	17
II. Séries de teste com uma baixa concentração de MTX (2,5 nM) e baixas concentrações de ácido fólico (FA) (12,5 nM, 25 nM e 50 nM)	
+ 0,8 g/L G418 + 12,5 nM FA + 2,5 nM MTX	12
+ 0,8 g/L G418 + 25 nM FA + 2,5 nM MTX	17
+ 0,8 g/L G418 + 50 nM FA + 2,5 nM MTX 11	11
III. Série de testes com uma baixa concentração de MTX (5 nM) e baixas concentrações de ácido fólico (12,5 nM, 25 nM e 50 nM)	

Meio de Seleção	Produtividade de mAb (mg/L)
+ 0,8 g/L G418 + 12,5 nM FA + 5 nM MTX	12
+ 0,8 g/L G418 + 25 nM FA + 5 nM MTX + 0,8 g/L G418	33
+ 0,8 g/L G418 + 50 nM FA + 5 nM MTX	16
IV. Série de testes com uma baixa concentração de MTX (10 nM) e baixas concentrações de ácido fólico (FA) (12,5 nM, 25 nM e 50 nM)	
+ 0,8 g/L G418 + 12,5 nM FA + 10 nM MTX	205
+ 0,8 g/L G418 + 25 nM FA + 10 nM MTX	30
+ 0,8 g/L G418 + 50 nM FA + 10 nM MTX	23
V. Série de testes com concentrações não limitantes de ácido fólico (FA) (11,3 mM) e diferentes concentrações de MTX (0; 2; 2,5; 5 e 10 nM)	
+ 0,8 g/L G418 + 11,3 uM FA + w/ o MTX	16

Meio de Seleção	Produtividade de mAb (mg/L)
+ 0,8 g/L G418 + 11,3 μ M FA + 2,5 nM MTX	11
+ 0,8 g/L G418 + 11,3 μ M FA + 5 nM MTX	16
+ 0,8 g/L G418 + 11,3 μ M FA + 10 nM MTX	11

[00081] As células transfectadas selecionadas em G418 e MTX contendo o meio com diferentes concentrações de ácido fólico são analisadas em culturas de bateladas de frascos de agitação. No 13º dia da cultura, as amostras do meio de cultura são tomadas e são analisadas quanto ao teor de anticorpos por meio da Proteína-A HPLC.

[00082] Os resultados mostram que todas as populações de células produzem anticorpos. Além do que menos do que MTX a 10 nM não mostra muito efeito sobre as células, mesmo em baixas concentrações de ácido fólico. A concentração de anticorpos produzidos é comparável à seleção, na ausência de MTX. Entretanto, ao usar MTX a 10 nM na primeira etapa de seleção, a produtividade das células em baixas concentrações de ácido fólico aumenta significativamente e de forma dependente da concentração. Após a seleção com a menor concentração de ácido fólico (12,5 nM) e MTX a 10 nM, a produtividade das células é encontrada sendo mais de 10 vezes maior em relação ao meio com concentração de ácido fólico padrão.

[00083] Para continuar a aumentar rigor de seleção, a próxima etapa é remover G418, mas para aumentar a concentração de MTX no meio

de cultura por meio de um fator 10, enquanto mantém a concentração de ácido fólico utilizada na primeira etapa de seleção. No caso da referência, o MTX é adicionado a uma concentração alta como é comum na técnica anterior, aqui a 500 nM. Sob essas condições, a viabilidade das células de muitas populações transfectadas dramaticamente cai e permanece em níveis baixos, para que nem todos possam ser recuperados. As populações das células que poderiam ser recuperadas são mais alargadas e a produtividade é analisada (Tabela 2).

Tabela 2: Produtividade de populações de células após a segunda etapa de seleção.

Meio de seleção	Produtividade de mAb (mg/L)
Série de testes com MTX a 10 nM e baixas concentrações de ácido fólico (FA) (12,5 nM, 25 nM e 50 nM)	
+ w/o G418 + 12,5 nM FA + 10 nM MTX	Nenhuma recuperação
+ w/o G418 + 25 nM FA + 10 nM MTX	19
+ w/o G418 + 50 nM FA + 10 nM MTX	15
Série de testes com MTX a 25 nM e baixas concentrações de ácido fólico (FA) (12,5 nM, 25 nM e 50 nM)	
+ w/o G418 + 12,5 nM FA + 25 nM MTX	Nenhuma recuperação

Meio de seleção	Produtividade de mAb (mg/L)
+ w/o G418 + 25 nM FA + 25 nM MTX	Nenhuma recuperação
+ w/o G418 + 50 nM FA + 25 nM MTX	20
Série de testes com MTX a 50 mM e baixas concentrações de ácido fólico (FA) (12,5 nM, 25 nM e 50 nM)	
+ w/o G418 + 12,5 nM FA + 50 nM MTX	Nenhuma recuperação
+ w/o G418 + 25 nM FA + 50 nM MTX	Nenhuma recuperação
+ w/o G418 + 50 nM FA + 50 nM MTX	20
Série de testes com MTX a 100 nM e baixas concentrações de ácido fólico (FA) (12,5 nM, 25 nM e 50 nM)	
+ w/o G418 + 12,5 nM FA + 100 nM MTX	277
+ w/o G418 + 25 nM FA + 100 nM MTX	131

Meio de seleção	Produtividade de mAb (mg/L)
+ w/o G418 + 50 nM FA + 100 nM MTX	15
Série de testes com concentração não limitante de ácido fólico (FA) (11,3 mM) e uma concentração de MTX a 500 nM	
+ w/o G418 + 11,3 µM FA + 500 nM MTX	31
+ w/o G418 + 11,3 µM FA + 500 nM MTX	26
+ w/o G418 + 11,3 µM FA + 500 nM MTX	21
+ w/o G418 + 11,3 µM FA + 500 nM MTX	25

[00084] As populações de células G418 e MTX selecionadas são mais selecionadas por meio do aumento da concentração MTX. As populações recuperadas são analisadas em culturas de batelada do frasco de agitação. No 13º dia da cultura, as amostras do meio de cultura são tomadas e analisadas quanto ao teor de anticorpos por meio da Proteín-A HPLC.

[00085] A produtividade das populações de células de referência (MTX a 500 nM, FA a 11,3 µM) após esta etapa de seleção aumentou para aproximadamente 25 a 30 mg/L. Nenhum benefício é visto em concentrações abaixo de MTX a 100 nM. No entanto, quando a

utilização de MTX a 100 nM em combinação com produtividades de baixo teor de ácido fólico (12,5 ou 25 nM) é de até 277 mg/L e, portanto, 10 vezes maior que a referência, embora as baixas concentrações de MTX sejam usadas para a amplificação/seleção.

[00086] Dessa maneira, usando DHFR como marcador de seleção em combinação com a concentração limitante de ácido fólico no meio seletivo gera células altamente superexpressando uma proteína de interesse, mesmo em concentrações baixas do inibidor da DHFR. Os resultados também mostram que esta combinação é superior aos sistemas de seleção convencionais (por exemplo DHFR/G418 usando concentração de ácido fólico padrão no meio seletivo).

Exemplo II - Produção em grande escala de polipeptídios com células CHO transfectadas

[00087] A produção de polipeptídeos em larga escala pode ser feita, por exemplo, em biorreatores de aço de vidro de onda, ou aço inoxidável. Para tal efeito, as células são expandidas, geralmente a partir de um único frasco congelado, por exemplo, um frasco de um Banco de Células Principal. As células são descongeladas e expandidas através de várias etapas. Os biorreatores de escala diferentes são inoculados com quantidades adequadas de células. A densidade das células pode ser aumentada por meio da adição de soluções de alimentação e os aditivos para o biorreator. As células são mantidas a uma alta viabilidade por um tempo prolongado. A concentração do produto no reator que varia a partir de algumas centenas de miligramas por litro até várias gramas por litro são obtidas em grande escala. A purificação pode ser feita por meio da metodologia de cromatografia padrão, que pode incluir afinidade, troca iônica, interação hidrofóbica ou etapas do tamanho da cromatografia de exclusão. O tamanho do biorreator pode ser de até vários mil litros de volume na escala final (vide também, por exemplo F. Wurm, Nature Biotechnology vol. 22, 11, 2004, 1393 a 1398).

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a seleção de pelo menos uma célula hospedeira de mamífero expressando um produto de interesse, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos as seguintes etapas:

- (a) proporcionar uma pluralidade de células hospedeiras de mamífero, em que a viabilidade de célula das ditas células hospedeiras depende da captação de folato, em que as ditas células hospedeiras de mamífero incluem pelo menos
 - (i) um polinucleotídeo introduzido que codifica um produto de interesse e
 - (ii) um polinucleotídeo introduzido que codifica uma enzima da redutase de di-hidrofolato ;
- (b) cultivar a dita pluralidade de células hospedeiras de mamífero em um meio de cultura seletivo, compreendendo pelo menos um inibidor da enzima redutase de di-hidrofolato e o folato na concentração limitante;
- (c) selecionar pelo menos uma célula hospedeira de mamífero expressando o produto de interesse.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura seletivo compreende o inibidor de redutase de di-hidrofolato em uma concentração de 1nM a 500 nM e um folato em uma concentração de 0,1nM a 500 nM.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura seletivo compreende o inibidor de redutase de di-hidrofolato em uma concentração de 1nM a 200 nM e/ou compreende um folato na concentração de 2,5 nM a 100 nM.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura seletivo é

composto de ácido fólico como folato na concentração de 12,5 nM a 50 nM combinado com metotrexato como inibidor da redutase de di-hidrofolato em uma concentração de 10 nM a 100 nM.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que um íntron está presente na extremidade 3' da sequência de codificação da redutase de di-hidrofolato.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a dita célula hospedeira de mamífero é uma célula hospedeira CHO, de preferência uma célula positiva para redutase de di-hidrofolato.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que uma célula hospedeira positiva para redutase de di-hidrofolato é usada em conjunto com uma enzima redutase de di-hidrofolato introduzida, que é menos sensível a metotrexato do que a enzima redutase de di-hidrofolato endogenamente expressa por meio da célula hospedeira.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo que codifica um produto de interesse e o polipeptídeo que codifica uma enzima da redutase de di-hidrofolato foram introduzidos por pelo menos um vetor de expressão.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira compreende pelo menos dois polinucleotídeos introduzidos que codificam um produto de interesse, em que de preferência pelo menos um polinucleotídeo codifica a cadeia pesada de uma molécula de imunoglobulina e o outro polinucleotídeo codifica a cadeia leve de uma molécula de imunoglobulina.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações

1 a 9, caracterizado pelo fato de que o(s) polinucleotídeo(s) introduzido(s) que codifica(m) o produto de interesse e o polinucleotídeo introduzido que codifica a enzima da redutase de di-hidrofolato são compostos em diferentes cassetes de expressão e em que o(s) cassete(s) de expressão para a condução da expressão do(s) polinucleotídeo(s) que codifica(m) o produto de interesse compreende (m) um promotor e/ou um intensificador mais forte do que a cassete de expressão para conduzir a expressão do polinucleotídeo que codifica a enzima da redutase de di-hidrofolato, em que o cassete de expressão para acionar os polinucleotídeos que codificam o produto de interesse compreende um promotor de CMV e o cassete de expressão para acionar a expressão do polinucleotídeo que codifica a enzima redutase de di-hidrofolato compreende um promotor de SV40.

11. Método para produzir um produto de interesse, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos as seguintes etapas:

(a) executar o método de seleção como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, para a seleção de pelo menos uma célula hospedeira de mamífero expressando o produto de interesse, e

(b) cultivar, pelo menos, uma célula hospedeira de mamífero selecionada em condições que permitam a expressão do produto de interesse.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos uma das seguintes etapas:

(c) isolar o produto de interesse a partir do dito meio de cultura da célula e/ou a partir da dita célula hospedeira de mamífero, e/ou

(d) processar adicionalmente o produto isolado de interesse.

13. Método de acordo com a reivindicação 11 ou 12, caracterizado pelo fato de que o produto de interesse é uma molécula

de imunoglobulina.

14. Uso de um meio de cultura seletivo compreendendo um inibidor da redutase de di-hidrofolato em uma concentração de 1 nM a 500 nM e um folato em uma concentração limite de 0,1 nM a 500 nM, caracterizado pelo fato de ser em um método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10.

15. Uso de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura seletivo possui uma ou mais das seguintes características

a) o meio de cultura seletivo que compreende folato em uma concentração limite de 2,5 nM a 100 nM e/ou do inibidor da redutase de di-hidrofolato em uma concentração de 200 nM ou menos, e/ou

b) o meio de cultura seletivo, que compreende folato em uma concentração de 12,5 nM a 50 nM combinado com uma concentração de MTX de 10 nM a 100 nM.