

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 008 383**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.10.2016 PCT/US2016/055915**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.04.2017 WO17062722**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2016 E 16788602 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2024 EP 3359665**

54 Título: **Tecnología mejorada de FLARE (expresión de indicador atenuada con citometría de flujo) para una clasificación rápida a granel**

30 Prioridad:

**09.10.2015 US 201562239515 P**

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

**24.03.2025**

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.00%)  
450 Water Street  
Cambridge, MA 02141, US**

72 Inventor/es:

**CAIRNS, VICTOR, R.;  
CHAVIDA, JOSE, IGNACIO, SANCHO y  
DEMARIA, CHRISTINE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 3 008 383 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**

Tecnología mejorada de FLARE (expresión de indicador atenuada con citometría de flujo) para una clasificación rápida a granel

5

**ANTECEDENTES**

Los métodos para la selección de poblaciones de células productoras y clones celulares son imperativos para la fabricación de productos biológicos, tales como anticuerpos y proteínas de fusión. Dichos métodos generalmente se basan en el uso de un agente de selección, tal como metotrexato (MTX) o metionina sulfoximina (MSX), para sesgar y amplificar la producción de productos biológicos. Los métodos basados en agentes de selección pueden afectar a la viabilidad o a la velocidad de crecimiento de poblaciones seleccionadas o pueden tener un impacto negativo en la estabilidad clonal. Dichas selecciones basadas en fármacos también pueden llevar mucho tiempo y a menudo requieren múltiples rondas de selección para obtener poblaciones que contienen clones que son adecuados para la fabricación biológica. Sigue existiendo la necesidad de métodos rápidos y fiables para generar tanto poblaciones celulares grandes como clones que produzcan títulos elevados de biológicas con menos impacto negativo en la célula hospedadora.

10

15

**SUMARIO DE LA INVENCION**

20

Se proporcionan métodos de selección por lotes de células productoras para la expresión de polipéptidos diana.

25

30

Como se describe en el presente documento, se desarrollaron métodos para la selección de lotes que se basaron en la clasificación rápida a granel de poblaciones heterogéneas de células productoras utilizando la clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) sin el uso de MTX como agente de amplificación. Sorprendentemente, se descubrió que los métodos descritos en el presente documento eran más rápidos y más productivos que la amplificación por MTX tradicional. Los métodos descritos en el presente documento son útiles, por ejemplo, para la generación de grupos productivos de células productoras para el cribado de polipéptidos de interés (tal como en el desarrollo clínico temprano) y para la generación de clones de título alto, que se pueden utilizar para producir un polipéptido de interés para la fabricación tanto a pequeña como a gran escala.

35

40

45

En consecuencia, la presente invención proporciona métodos de FACS para seleccionar por lotes células productoras que expresan un polipéptido diana como se establece en las reivindicaciones adjuntas.

En particular, la invención proporciona un método de clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) para agrupar por lotes células productoras seleccionadas que expresan un polipéptido diana sin el uso de metotrexato (MTX) como agente de amplificación, comprendiendo el método (a) proporcionar una población heterogénea de células productoras, en donde las células productoras en la población expresan niveles variables de un polipéptido seleccionable por FACS y un polipéptido diana que están codificados por el mismo ARNm multicistrónico, (b) seleccionar de la población heterogénea de células productoras una primera subpoblación heterogénea de células productoras utilizando FACS, en donde las células productoras en la primera subpoblación heterogénea expresan el polipéptido seleccionable por FACS a un nivel que es superior al nivel de al menos el 80 % de las células productoras en la población heterogénea en (a), y (c) expandir la primera subpoblación heterogénea de células productoras en medio sin selección farmacológica, produciendo de este modo una primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras.

50

En algunas realizaciones, el método comprende además (d) seleccionar de la primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras en (c) una segunda subpoblación heterogénea de células productoras utilizando FACS, en donde las células productoras en la segunda subpoblación expresan el polipéptido seleccionable por FACS a un nivel que es superior al nivel de al menos el 80 % de las células productoras en la primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras en (c), y (e) expandir la segunda subpoblación heterogénea de células productoras en un medio sin selección farmacológica, produciendo de este modo una segunda subpoblación heterogénea expandida de células productoras.

55

60

65

En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el método comprende además aislar el polipéptido diana de la primera o segunda subpoblación heterogénea expandida. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el método comprende además aislar una o más células productoras individuales de la primera o segunda subpoblación heterogénea expandida y cultivar individualmente la o las células productoras individuales para producir poblaciones clonales de la o las células productoras individuales. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, la primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras produce una mejora de 1,2 a 5 veces en la producción del polipéptido diana en comparación con la de la población heterogénea de células productoras en (a). En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, la segunda subpoblación heterogénea expandida de células productoras produce una mejora de 1,2 a 2,5 veces en la producción del polipéptido diana en comparación con la de la primera población heterogénea expandida de células productoras en (c). En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, al menos una de las poblaciones clonales de la o las células individuales produce una mejora de 5 a

30 veces en la producción del polipéptido diana en comparación con la de la población heterogénea de células productoras en (a).

5 En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, la población heterogénea de células productoras sujetas a FACS en (b) contiene  $80-120 \times 10^6$  células. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, la primera y/o segunda subpoblación heterogénea de células productoras contiene  $0,5-6,0 \times 10^6$  células antes de la expansión en la etapa (c) o (e).

10 En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, la expansión en la etapa c) es de entre 7 y 14 días. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, la expansión en la etapa e) es de entre 7 y 14 días.

15 En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el medio sin selección farmacológica es medio sin metionina sulfoximina.

20 En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, la población heterogénea de células productoras en (a) se produce transfectando células con un vector que codifica el ARNm multicistrónico y sometiendo las células transfectadas a un ciclo de selección basada en el medio para seleccionar células que expresan niveles variables del ARNm multicistrónico. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el vector contiene además un gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR). En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, la selección basada en el medio es por medio deficiente en nucleótidos.

25 En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, la población heterogénea de células productoras en (a) se produce transfectando células con un vector que codifica el ARNm multicistrónico y sometiendo las células transfectadas a FACS para seleccionar células que expresan niveles variables del ARNm multicistrónico. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el ARNm multicistrónico comprende un primer marco abierto de lectura (ORF) que codifica el polipéptido seleccionable por FACS y un segundo ORF que codifica el polipéptido diana, en donde el primer ORF está 5' con respecto al segundo ORF.

30 En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el primer ORF tiene un codón iniciador distinto de AUG. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el segundo ORF tiene un codón iniciador AUG. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el codón iniciador distinto de AUG es un UUG, GUG o CUG en una secuencia de consenso de Kozak. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el ORF que codifica el polipéptido seleccionable por FACS está desprovisto de cualquier secuencia AUG.

35 En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el polipéptido seleccionable por FACS es CD52 o CD59. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el polipéptido diana es un agente terapéutico. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el polipéptido diana es una proteína secretada. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el polipéptido diana es un anticuerpo o una proteína de fusión Fc.

Las células productoras pueden ser células CHO, células HEK293 o células HeLa.

45 La selección en la etapa (b) se puede realizar entre 2 y aproximadamente 15 días después de la transfección de la población heterogénea de células productoras con un vector que codifica el ARNm multicistrónico. Por ejemplo, la selección en la etapa (b) se puede realizar entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 días, aproximadamente 2 y aproximadamente 6 días, aproximadamente 2 y aproximadamente 4 días después de la transfección, dos días después de la transfección o tres días después de la transfección.

50 En un caso ilustrativo, que no se incluye en las reivindicaciones adjuntas, la divulgación proporciona un método de clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) para seleccionar por lotes células productoras que expresan un polipéptido de fusión sFc, comprendiendo el método (a) proporcionar una población heterogénea de células productoras, en donde las células productoras en la población expresan niveles variables de un polipéptido CD52 seleccionable por FACS y el polipéptido de fusión sFc que están codificados por el mismo ARN multicistrónico, (b) seleccionar de la población heterogénea de células productoras una primera subpoblación heterogénea de células productoras utilizando FACS, en donde las células productoras en la primera subpoblación heterogénea expresan el polipéptido CD52 a un nivel que es superior al nivel del 90 % de las células productoras en la población heterogénea en (a), y (c) expandir 1,3 millones de células de la primera subpoblación heterogénea de células productoras en medio sin selección farmacológica durante siete días, produciendo de este modo una primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras, en donde la población heterogénea de células productoras en (a) se produce transfectando células con un vector que codifica el ARNm multicistrónico y sometiendo las células transfectadas a un ciclo de selección basada en el medio para seleccionar células que expresan niveles variables del ARNm multicistrónico, en donde la selección basada en el medio es por medio que contiene metotrexato 50 nM, en donde el ARNm multicistrónico comprende un primer marco abierto de lectura (ORF) que codifica el polipéptido CD52 y un segundo ORF que codifica el polipéptido de fusión sFc, en donde el primer ORF está 5' con respecto al segundo ORF,

en donde el primer ORF tiene un codón iniciador UUG, en donde el segundo ORF tiene un codón iniciador AUG, en donde el primer ORF está desprovisto de cualquier secuencia AUG y en donde el ARNm multicistrónico está en un vector de expresión que comprende además un casete de dihidrofolato reductasa (DHFR).

5 En otro caso ilustrativo, que no se incluye en las reivindicaciones adjuntas, la divulgación proporciona un método de clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) para seleccionar por lotes células productoras que expresan un polipéptido de cadena pesada de IgG y un polipéptido de cadena ligera de IgG, comprendiendo el método (a) proporcionar una población heterogénea de células productoras, en donde las células productoras en la población expresan niveles variables de un polipéptido CD52 seleccionable por FACS y el polipéptido de cadena pesada de IgG que están codificados por un mismo primer ARNm multicistrónico, y en donde las células productoras de la población expresan niveles variables de un polipéptido CD52 seleccionable por FACS y el polipéptido de cadena ligera de IgG, que están codificados por un mismo segundo ARNm multicistrónico, (b) seleccionar de la población heterogénea de células productoras una primera subpoblación heterogénea de células productoras utilizando FACS, en donde las células productoras en la primera subpoblación heterogénea expresan el polipéptido CD52 a un nivel que es superior al nivel del 90 % de las células productoras en la población heterogénea en (a), y

(c) expandir 1,3 millones de células de la primera subpoblación heterogénea de células productoras en medio sin selección farmacológica durante siete días, produciendo de este modo una primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras, en donde la población heterogénea de células productoras en (a) se produce transfectando células con un primer vector que codifica el primer ARNm multicistrónico que codifica el polipéptido de cadena pesada de IgG y un segundo vector que codifica el segundo ARNm multicistrónico que codifica el polipéptido de cadena ligera de IgG y sometiendo las células transfectadas a un ciclo de selección basado en el medio para seleccionar células que expresan niveles variables de los ARNm multicistrónicos, en donde la selección basada en el medio es por medio que contiene metotrexato 5 nM, en donde el primer ARNm multicistrónico comprende un primer marco abierto de lectura (ORF) que codifica el polipéptido CD52 y un segundo ORF que codifica el polipéptido de cadena pesada de IgG, en donde el segundo ARNm multicistrónico comprende un primer marco abierto de lectura (ORF) que codifica el polipéptido CD52 y un segundo ORF que codifica el polipéptido de cadena ligera de IgG, en donde en cada uno del primer y el segundo ARNm multicistrónicos: (i) el primer ORF está 5' con respecto al segundo ORF, (ii) el primer ORF tiene un codón iniciador UUG, (iii) el segundo ORF tiene un codón iniciador AUG, (iv) el primer ORF está desprovisto de cualquier secuencia AUG y (v) el ARNm multicistrónico está en un vector de expresión que comprende además un casete de dihidrofolato reductasa (DHFR).

En otro caso ilustrativo, que no se incluye en las reivindicaciones adjuntas, la divulgación proporciona un método de clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) para seleccionar por lotes células productoras que expresan un polipéptido de fusión sFc, comprendiendo el método (a) proporcionar una población heterogénea de células productoras, en donde las células productoras en la población expresan niveles variables de un polipéptido CD52 seleccionable por FACS y el polipéptido de fusión sFc que están codificados por el mismo ARNm multicistrónico, (b) seleccionar de la población heterogénea de células productoras una primera subpoblación heterogénea de células productoras utilizando FACS, en donde las células productoras en la primera subpoblación heterogénea expresan el polipéptido CD52 a un nivel que es superior al nivel del 90 % de las células productoras en la población heterogénea en (a), (c) expandir la primera subpoblación heterogénea de células productoras en medio sin selección farmacológica durante doce días, produciendo de este modo una primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras, (d) seleccionar de la primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras en (c) una segunda subpoblación heterogénea de células productoras utilizando FACS, en donde las células productoras en la segunda subpoblación expresan un polipéptido CD52 a un nivel que es superior al nivel de al menos el 90 % de las células productoras en la primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras en (c), y (e) expandir la segunda subpoblación heterogénea de células productoras en un medio sin selección farmacológica durante nueve días, produciendo de este modo una segunda subpoblación heterogénea expandida de células productoras, en donde la población heterogénea de células productoras en (a) se produce transfectando células con un vector que codifica el ARNm multicistrónico y sometiendo las células transfectadas a un ciclo de selección basada en el medio para seleccionar células que expresan niveles variables del ARNm multicistrónico, en donde la selección basada en el medio es por medio que contiene metotrexato 5 nM, en donde el ARNm multicistrónico comprende un primer marco abierto de lectura (ORF) que codifica el polipéptido CD52 y un segundo ORF que codifica el polipéptido de fusión sFc, en donde el primer ORF está 5' con respecto al segundo ORF, en donde el primer ORF tiene un codón iniciador UUG, en donde el segundo ORF tiene un codón iniciador AUG, en donde el primer ORF está desprovisto de cualquier secuencia AUG y en donde el ARNm multicistrónico está en un vector de expresión que comprende además un casete de dihidrofolato reductasa (DHFR).

En otro caso ilustrativo, que no se incluye en las reivindicaciones adjuntas, la divulgación proporciona un método de clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) para seleccionar por lotes células productoras que expresan un polipéptido de cadena pesada de IgG y un polipéptido de cadena ligera de IgG, comprendiendo el método (a) proporcionar una población heterogénea de células productoras, en donde las células productoras en la población expresan niveles variables de un polipéptido CD52 seleccionable por FACS y el polipéptido de cadena pesada de IgG que están codificados por un mismo primer ARNm multicistrónico, y en donde las células productoras de la población expresan niveles variables de un polipéptido CD52 seleccionable por FACS y el polipéptido de cadena ligera de IgG, que están codificados por un mismo segundo ARNm multicistrónico, (b) seleccionar de la población heterogénea de

5 células productoras una primera subpoblación heterogénea de células productoras utilizando FACS, en donde las células productoras en la primera subpoblación heterogénea expresan el polipéptido CD52 a un nivel que es superior al nivel del 90 % de las células productoras en la población heterogénea en (a), (c) expandir la primera subpoblación heterogénea de células productoras en medio sin selección farmacológica durante once días, produciendo de este modo una primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras, (d) seleccionar de la primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras en (c) una segunda subpoblación heterogénea de células productoras utilizando FACS, en donde las células productoras en la segunda subpoblación expresan el polipéptido CD52 a un nivel que es superior al nivel de al menos el 90 % de las células productoras en la primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras en (c), y (e) expandir la segunda subpoblación heterogénea de células productoras en un medio sin selección farmacológica durante nueve días, produciendo de este modo una segunda subpoblación heterogénea expandida de células productoras, en donde la población heterogénea de células productoras en (a) se produce transfectando células con un primer vector que codifica el primer ARNm multicistrónico que codifica el polipéptido de cadena pesada de IgG y un segundo vector que codifica el segundo ARNm multicistrónico que codifica el polipéptido de cadena ligera de IgG y sometiendo las células transfectadas a un ciclo de selección basada en el medio para seleccionar células que expresan niveles variables de los ARNm multicistrónicos, en donde la selección basada en el medio es por medio que contiene metotrexato 5 nM, en donde el primer ARNm multicistrónico comprende un primer marco abierto de lectura (ORF) que codifica el polipéptido CD52 y un segundo ORF que codifica el polipéptido de cadena pesada de IgG, en donde el segundo ARNm multicistrónico comprende un primer marco abierto de lectura (ORF) que codifica el polipéptido CD52 y un segundo ORF que codifica el polipéptido de cadena ligera de IgG, en donde en cada uno del primer y el segundo ARNm multicistrónicos (i) el primer ORF está 5' con respecto al segundo ORF, (ii) el primer ORF tiene un codón iniciador UUG, (iii) el segundo ORF tiene un codón iniciador AUG, (iv) el primer ORF está desprovisto de cualquier secuencia AUG y (v) el ARNm multicistrónico está en un vector de expresión que comprende además un casete de dihidrofolato reductasa (DHFR).

25 En otro caso ilustrativo, que no se incluye en las reivindicaciones adjuntas, la divulgación proporciona un método de clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) para seleccionar por lotes células productoras que expresan un polipéptido de cadena pesada de IgG y un polipéptido de cadena ligera de IgG, comprendiendo el método (a) proporcionar una población heterogénea de células productoras, en donde las células productoras en la población expresan niveles variables de un polipéptido CD52 seleccionable por FACS y el polipéptido de cadena pesada de IgG que están codificados por un mismo primer ARN multicistrónico, y en donde las células productoras de la población expresan niveles variables de un polipéptido CD52 seleccionable por FACS y el polipéptido de cadena ligera de IgG, que están codificados por un mismo segundo ARNm multicistrónico, (b) seleccionar de la población heterogénea de células productoras una primera subpoblación heterogénea de células productoras utilizando FACS, en donde las células productoras en la primera subpoblación heterogénea expresan el polipéptido CD52 a un nivel que es superior al nivel del 90 % de las células productoras en la población heterogénea en (a), (c) expandir la primera subpoblación heterogénea de células productoras en medio sin selección farmacológica durante diez días, produciendo de este modo una primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras, (d) seleccionar de la primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras en (c) una segunda subpoblación heterogénea de células productoras utilizando FACS, en donde las células productoras en la segunda subpoblación expresan el polipéptido CD52 a un nivel que es superior al nivel de al menos el 90 % de las células productoras en la primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras en (c), y (e) expandir la segunda subpoblación heterogénea de células productoras en un medio sin selección farmacológica durante once días, produciendo de este modo una segunda subpoblación heterogénea expandida de células productoras, en donde la población heterogénea de células productoras en (a) se produce transfectando células con un primer vector que codifica el primer ARNm multicistrónico que codifica el polipéptido de cadena pesada de IgG y un segundo vector que codifica el segundo ARNm multicistrónico que codifica el polipéptido de cadena ligera de IgG y sometiendo las células transfectadas a un ciclo de selección basada en el medio para seleccionar células que expresan niveles variables de los ARNm multicistrónicos en donde la selección basada en el medio es por medio que contiene metotrexato 5 nM, en donde el primer ARNm multicistrónico comprende un primer marco abierto de lectura (ORF) que codifica el polipéptido CD52 y un segundo ORF que codifica el polipéptido de cadena pesada de IgG, en donde el segundo ARNm multicistrónico comprende un primer marco abierto de lectura (ORF) que codifica el polipéptido CD52 y un segundo ORF que codifica el polipéptido de cadena ligera de IgG, en donde en cada uno del primer y el segundo ARNm multicistrónicos (i) el primer ORF está 5' con respecto al segundo ORF, (ii) el primer ORF tiene un codón iniciador UUG, (iii) el segundo ORF tiene un codón iniciador AUG, (iv) el primer ORF está desprovisto de cualquier secuencia AUG y (v) el ARNm multicistrónico está en un vector de expresión que comprende además un casete de dihidrofolato reductasa (DHFR).

60 En otro caso ilustrativo, que no se incluye en las reivindicaciones adjuntas, la divulgación proporciona un método de clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) para seleccionar por lotes células productoras que expresan un polipéptido de cadena pesada de IgG y un polipéptido de cadena ligera de IgG, comprendiendo el método (a) una población heterogénea de células productoras, en donde las células productoras en la población expresan niveles variables de un polipéptido CD52 seleccionable por FACS y el polipéptido de cadena pesada de IgG que están codificados por un mismo primer ARN multicistrónico, y en donde las células productoras de la población expresan niveles variables de un polipéptido CD52 seleccionable por FACS y el polipéptido de cadena ligera de IgG, que están codificados por un mismo segundo ARNm multicistrónico, (b) seleccionar de la población heterogénea de células productoras una primera subpoblación heterogénea de células productoras utilizando FACS, en donde las células productoras en la primera subpoblación heterogénea expresan el polipéptido CD52 a un nivel que es superior al nivel

del 90 % de las células productoras en la población heterogénea en (a), y (c) expandir la primera subpoblación heterogénea de células productoras en medio sin selección farmacológica durante diez días, produciendo de este modo una primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras, (d) seleccionar de la primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras en (c) una segunda subpoblación heterogénea de células productoras utilizando FACS, en donde las células productoras en la segunda subpoblación expresan el polipéptido CD52 a un nivel que es superior al nivel de al menos el 90 % de las células productoras en la primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras en (c), (e) expandir la segunda subpoblación heterogénea de células productoras en un medio sin selección farmacológica durante once días, produciendo de este modo una segunda subpoblación heterogénea expandida de células productoras, y (f) aislar células productoras individuales de la primera o segunda subpoblación heterogénea expandida y cultivar individualmente las células productoras individuales para producir poblaciones clonales de las células productoras individuales, en donde las células productoras individuales aisladas expresan el polipéptido CD52 a un nivel que es superior al nivel del 97-99 % de las células productoras individuales, en donde la población heterogénea de células productoras en (a) se produce transfectando células con un primer vector que codifica el primer ARNm multicistrónico que codifica el polipéptido de cadena pesada de IgG y un segundo vector que codifica el segundo ARNm multicistrónico que codifica el polipéptido de cadena ligera de IgG y sometiendo las células transfectadas a un ciclo de selección basada en el medio para seleccionar células que expresan niveles variables de los ARNm multicistrónicos, en donde la selección basada en el medio es por medio que contiene metotrexato 5 nM, en donde el primer ARNm multicistrónico comprende un primer marco abierto de lectura (ORF) que codifica el polipéptido CD52 y un segundo ORF que codifica el polipéptido de cadena pesada de IgG, en donde el segundo ARNm multicistrónico comprende un primer marco abierto de lectura (ORF) que codifica el polipéptido CD52 y un segundo ORF que codifica el polipéptido de cadena ligera de IgG, en donde en cada uno del primer y el segundo ARNm multicistrónicos (i) el primer ORF está 5' con respecto al segundo ORF, (ii) el primer ORF tiene un codón iniciador UUG, (iii) el segundo ORF tiene un codón iniciador AUG, (iv) el primer ORF está desprovisto de cualquier secuencia AUG y (v) el ARNm multicistrónico está en un vector de expresión que comprende además un casete de dihidrofolato reductasa (DHFR).

En otro caso ilustrativo, que no se incluye en las reivindicaciones adjuntas, la divulgación proporciona un método de clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) para seleccionar por lotes células productoras que expresan un polipéptido de fusión sFc, comprendiendo el método (a) proporcionar una población heterogénea de células productoras, en donde las células productoras en la población expresan niveles variables de un polipéptido CD52 seleccionable por FACS y el polipéptido de fusión sFc que están codificados por el mismo ARN multicistrónico, (b) seleccionar de la población heterogénea de células productoras una primera subpoblación heterogénea de células productoras utilizando FACS, en donde las células productoras en la primera subpoblación heterogénea expresan el polipéptido CD52 a un nivel que es superior al nivel del 90 % de las células productoras en la población heterogénea en (a), (c) expandir la primera subpoblación heterogénea de 3-4 × 10<sup>6</sup> células productoras en medio sin selección farmacológica durante ocho días, produciendo de este modo una primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras, (d) seleccionar de la primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras en (c) una segunda subpoblación heterogénea de células productoras utilizando FACS, en donde las células productoras en la segunda subpoblación expresan el polipéptido CD52 a un nivel que es superior al nivel de al menos el 90 % de las células productoras en la primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras en (c), y (e) expandir la segunda subpoblación heterogénea de 3-4 × 10<sup>6</sup> células productoras en un medio sin selección farmacológica durante ocho días, produciendo de este modo una segunda subpoblación heterogénea expandida de células productoras, en donde la población heterogénea de células productoras en (a) se produce transfectando células con un vector que codifica el ARNm multicistrónico y sometiendo las células transfectadas a un ciclo de selección basada en el medio para seleccionar células que expresan niveles variables del ARNm multicistrónico, en donde la selección basada en el medio es medio deficiente en nucleótidos complementado con glutamina y metotrexato 5 nM, en donde el ARNm multicistrónico comprende un primer marco abierto de lectura (ORF) que codifica el polipéptido CD52 y un segundo ORF que codifica el polipéptido de fusión sFc, en donde el primer ORF está 5' con respecto al segundo ORF, en donde el primer ORF tiene un codón iniciador UUG, en donde el segundo ORF tiene un codón iniciador AUG y en donde el ARNm multicistrónico está en un vector de expresión que comprende además un casete de dihidrofolato reductasa (DHFR).

En otro caso ilustrativo, que no se incluye en las reivindicaciones adjuntas, la divulgación proporciona un método de clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) para seleccionar por lotes células productoras que expresan un polipéptido de fusión sFc, comprendiendo el método (a) proporcionar una población heterogénea de células productoras, en donde las células productoras en la población expresan niveles variables de un polipéptido CD52 seleccionable por FACS y el polipéptido de fusión sFc que están codificados por el mismo ARN multicistrónico, (b) seleccionar de la población heterogénea de células productoras una primera subpoblación heterogénea de células productoras utilizando FACS, en donde las células productoras en la primera subpoblación heterogénea expresan el polipéptido CD52 a un nivel que es superior al nivel del 90 % de las células productoras en la población heterogénea en (a), (c) expandir la primera subpoblación heterogénea de 3-4 × 10<sup>6</sup> células productoras en medio sin selección farmacológica durante ocho días, produciendo de este modo una primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras, (d) seleccionar de la primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras en (c) una segunda subpoblación heterogénea de células productoras utilizando FACS, en donde las células productoras en la segunda subpoblación expresan el polipéptido CD52 a un nivel que es superior al nivel de al menos el 90 % de las células productoras en la primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras en (c), (e) expandir la

segunda subpoblación heterogénea de  $3-4 \times 10^6$  células productoras en un medio sin selección farmacológica durante ocho días, produciendo de este modo una segunda subpoblación heterogénea expandida de células productoras, y (f) aislar células productoras individuales de la primera o segunda subpoblación heterogénea expandida y cultivar individualmente las células productoras individuales para producir poblaciones clonales de las células productoras individuales, en donde las células productoras individuales aisladas expresan el polipéptido CD52 a un nivel que es superior al nivel del 99 % de células productoras individuales, en donde la población heterogénea de células productoras en (a) se produce transfectando células con un vector que codifica el ARNm multicistrónico y sometiendo las células transfectadas a un ciclo de selección basada en el medio para seleccionar células que expresan niveles variables del ARNm multicistrónico, en donde la selección basada en el medio es por medio deficiente en nucleótidos complementado con glutamina y metotrexato 5 nM, en donde el ARNm multicistrónico comprende un primer marco abierto de lectura (ORF) que codifica el polipéptido CD52 y un segundo ORF que codifica el polipéptido de fusión sFc, en donde el primer ORF está 5' con respecto al segundo ORF, en donde el primer ORF tiene un codón iniciador UUG, en donde el segundo ORF tiene un codón iniciador AUG y en donde el ARNm multicistrónico está en un vector de expresión que comprende además un casete de dihidrofolato reductasa (DHFR).

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La **FIG. 1** es un diagrama que muestra un ejemplo de cómo funciona FLARE (expresión de indicador atenuada con citometría de flujo).

La **FIG. 2** es un diagrama que muestra cómo se puede utilizar FLARE para identificar poblaciones de células productoras bajas o altas.

La **FIG. 3** es un diagrama que muestra la clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) con FLARE para enriquecer con respecto a células que expresan niveles altos de la proteína indicadora.

La **FIG. 4** es un diagrama que muestra la clasificación repetitiva inmediata con FACS para mejorar la viabilidad de las poblaciones después de la clasificación y, por lo tanto, mejorar la eficiencia de la clonación.

La **FIG. 5** es un diagrama que muestra el uso de FLARE para generar y cribar clones que expresan niveles altos de una IgG; que es superior al de la clonación por dilución limitante (LDC).

La **FIG. 6** es un diagrama que muestra múltiples métodos alternativos que utilizan clasificación rápida a granel (frente a métodos de selección con MTX convencionales) para generar grupos de células productoras que expresan altos niveles de una proteína de interés. Las células se transfectan por electroporación, se permite que se recuperen durante 2 días y después se someten a una estrategia de selección o metodología de clasificación para generar los grupos de células productoras.

La **FIG. 7** muestra una clasificación rápida a granel del 10 % superior de las células que expresan proteínas indicadoras de una población celular de antes de la clasificación que se había generado con MTX 5 nM.

La **FIG. 8** es un gráfico que muestra el enriquecimiento por lotes del día 14 de proteínas de interés (anticuerpo monoclonal, mAb n.º 2, o proteína de fusión Fc, Fusión sFc n.º 1) después de una clasificación rápida a granel que se dirigió al 1, 5 o 10 % superior de las células que expresan proteínas indicadoras de poblaciones de células antes de la clasificación. También se muestra en la parte superior del gráfico el número de células destinadas a la recogida de clasificaciones y el tiempo para expandir cada población después de la clasificación enriquecida. Los títulos eran de cultivos discontinuos sin aportaciones.

La **FIG. 9** es una serie de diagramas que muestran la metodología para la clasificación rápida secuencial a granel.

La **FIG. 10** es una tabla y una serie de diagramas de datos de citometría de flujo que muestran una clasificación secuencial rápida a granel del 10 % superior de células que expresan proteína de fusión Fc (Fusión sFc n.º 2) o anticuerpos monoclonales (mAb n.º 3 o mAb n.º 1).

La **FIG. 11** es un gráfico del título por lotes del día 14 de la proteína de fusión Fc o anticuerpos monoclonales en grupos celulares producidos por clasificación a granel rápida secuencial o amplificación con MTX.

La **FIG. 12** es dos gráficos, el gráfico izquierdo que muestra el título de 14 días de una proteína de fusión Fc y el gráfico derecho que muestra el % de viabilidad de las células que expresan la proteína de fusión Fc, que se habían generado mediante clasificación rápida a granel o selección con MTX 5 nM, después del pase con MTX 50 nM.

La **FIG. 13** es dos gráficos, el gráfico izquierdo que muestra el título de 14 días de un anticuerpo monoclonal y el gráfico derecho que muestra el % de viabilidad de las células que expresan el anticuerpo monoclonal,

que se habían generado mediante clasificación rápida a granel o selección con MTX 5 nM, después del pase con MTX 50 nM.

5 La **FIG. 14** es dos gráficos, el gráfico izquierdo que muestra el título de 14 días de un anticuerpo monoclonal y el gráfico derecho que muestra el % de viabilidad de las células que expresan anticuerpo monoclonal, que se habían generado mediante clasificación rápida a granel o con MTX 5 nM, después del pase con MTX 50 nM.

10 La **FIG. 15** es una serie de superposiciones de histogramas de FACS que muestran datos de citometría de flujo de grupos celulares producidos por clasificación a granel rápida secuencial o amplificación con MTX y que muestran los respectivos títulos del día 14 de la proteína de interés.

15 La **FIG. 16** es dos superposiciones de histogramas de FACS que muestran datos de citometría de flujo de células seleccionadas inicialmente con medio deficiente en nucleótidos (MTX 0 nM) y sometidas a dos ciclos de clasificación rápida a granel y mostrando los respectivos títulos del día 14 de la proteína de interés.

20 La **FIG. 17** es un gráfico que compara el título de 14 días de poblaciones celulares producidas por clasificación independiente con MTX o por amplificación con MTX.

25 La **FIG. 18** es una tabla que muestra los títulos antes de la clasificación (grupos) y clasificados (clones) de una proteína de fusión Fc de grupos celulares y clones producidos por clasificación rápida a granel independiente de MTX (grupo 1 indep. de MTX 10-10) o por amplificación con MTX (grupo 1 de 20 nM o grupo 2 de 100 nM). También se muestra la eficiencia de clonación y la capacidad de supervivencia de expansión de clones.

30 La **FIG. 19** es dos gráficos que muestran el título de 14 días de una proteína de fusión Fc de clones producidos por amplificación con MTX o clasificación independiente de MTX.

35 La **FIG. 20** es un diagrama que muestra la expresión de indicador de una población transfectada de células del día 3 al 21 en un proceso de selección deficiente en nucleótidos (en comparación con la población transfectada simulada). Las células transfectadas presentaron una expresión aparente poco después de la transfección (día 3-4) y después pasaron a una expresión estable tras finalizar la selección (día 18-21).

40 La **FIG. 21** es un diagrama y un gráfico que muestra el % de viabilidad después de una primera clasificación y posterior aumento de viabilidad logrado con una segunda clasificación inmediata.

45 La **FIG. 22** es dos gráficos que muestran primero los títulos de lotes sin aportación de 14 días de ambos grupos rápidos a granel y grupos amplificados con MTX (los grupos con asteriscos indican qué grupos se seleccionaron para clasificar para generar clones), mostrando el segundo gráfico los títulos de lotes sin aportación de 14 días resultantes tanto para clones clasificados rápidos a granel como para clones generados con MTX.

50 La **FIG. 23** es una serie de compensaciones de histogramas de FACS que representan la expresión temprana de la proteína fluorescente roja (RFP) y la expresión del indicador de superficie celular CD52 del mismo vector (pGZ729-RFP). No se aplicó presión de selección a las células transfectadas. La expresión temprana máxima de RFP y CD52 se produce entre los días 2 y 3.

55 La **FIG. 24** es una serie de compensaciones de histogramas de FACS que representan la expresión temprana del día 3 de RFP y CD52 en células transfectadas con pGZ729-RFP (que codifica tanto el polipéptido CD52 seleccionable como el polipéptido diana RFP) o pGZ700-RFP (que codifica solo el polipéptido diana RFP).

60 La **FIG. 25** es un esquema que muestra tanto la metodología de EPIC para generar una subpoblación de células para la selección poco después de la transfección como los efectos beneficiosos tanto para la expresión de indicador como para los títulos de anticuerpos monoclonales (mAb) tras el aislamiento/expansión de la población enriquecida en la clasificación. La simulación se refiere a transfección simulada.

65 La **FIG. 26** es un gráfico que representa los títulos de lotes sin aportación del día 14 para grupos generados por EPIC en comparación con las metodologías de MTX tradicionales.

La **FIG. 27** es un gráfico que representa los títulos de lotes sin aportación del día 14 de clones generados por EPIC que lograron una expresión máxima que varía de 1,5 a 2,0 g/l. La barra más a la izquierda (0,5 g/l) representa el título para el grupo clasificado por EPIC antes de la clonación. Todas las demás barras verticales representan títulos para clones individuales.

La **FIG. 28** es una serie de compensaciones de histogramas que representan el beneficio comparativo del direccionamiento de EPIC para generar grupos estables transfectados con pGZ729-RFP. Se utilizó EPIC para dirigirse a la expresión temprana de RFP el día 2, lo que produjo un conjunto estable con RFP mejorada (y expresión del indicador CD52) en comparación con las metodologías tradicionales de transfección/selección (MTX 0 nM).

La **FIG. 29** es un esquema que ilustra la metodología EPIC (como se utiliza con la clasificación por citometría de flujo) en comparación con la metodología tradicional de transfección/selección.

## **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

Se debe entender que la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir realizaciones particulares solo, y no se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas.

Asimismo, la práctica de la invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas biológicas e inmunológicas moleculares y celulares convencionales dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas son bien conocidas por el trabajador cualificado y se explican plenamente en la bibliografía. Véase, p. ej., Ausubel *et al.* ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y. (1987-2008), incluidos todos los suplementos, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (cuarta edición) por MR Green y J. Sambrook y Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, capítulo 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (2013, 2.<sup>a</sup> edición).

## **I. DEFINICIONES**

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los significados que entiende habitualmente un experto habitual en la materia. En caso de cualquier ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en el presente documento tienen preferencia sobre cualquier diccionario o definición extrínseca. Salvo que se requiera de otro modo por el contexto, los términos en singular deben incluir pluralidades y términos en plural deben incluir el singular. El uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. El uso del término "incluyendo", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitante.

En general, las nomenclaturas utilizadas en relación con el cultivo celular y tisular, la biología molecular, la inmunología, la microbiología, la genética y la química e hibridación de proteínas y ácidos nucleicos descritas en el presente documento son las bien conocidas y utilizadas habitualmente en la técnica. Los métodos y técnicas proporcionados en el presente documento se realizan generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y analizan a lo largo de la presente descripción a menos que se indique lo contrario. Pueden realizarse reacciones enzimáticas y técnicas de purificación según las especificaciones del fabricante, como se consigue normalmente en la técnica, o como se describe en el presente documento. Las nomenclaturas utilizadas a propósito de, y los procedimientos de laboratorio y técnicas de, química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descrita en el presente documento son los bien conocidos y usados habitualmente en la técnica. Se usan técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación y administración de productos farmacéuticos, y tratamiento de pacientes.

Para que la divulgación pueda entenderse más fácilmente, a continuación se definen términos específicos.

Como se utiliza en el presente documento, el término "polinucleótido" indica una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, cuyos ejemplos incluyen, pero sin limitación, un gen o fragmento génico, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos.

Como se utiliza en el presente documento, el término "polipéptido" indica una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, cuyos ejemplos incluyen, pero sin limitación, una proteína, un fragmento de proteína, una proteína multimérica, una proteína de fusión, un anticuerpo (incluidos fragmentos del mismo) o un péptido.

Como se utiliza en el presente documento, "clasificación de células activada por fluorescencia" o "FACS" se refiere a un método para separar una población de células en una o más subpoblaciones en función de la presencia, ausencia o nivel de uno o más polipéptidos seleccionables por FACS expresados por las células. La FACS se basa en las propiedades ópticas, incluida la fluorescencia, de células individuales para clasificar las células en subpoblaciones.

Como se utiliza en el presente documento, un "polipéptido seleccionable por FACS" es un polipéptido que se puede detectar, directa o indirectamente, mediante citometría de flujo. Los ejemplos de polipéptidos seleccionables por FACS incluyen polipéptidos que incluyen un dominio extracelular (p. ej., CD52 o CD59) que son capaces de unirse a un compañero de unión detectable (p. ej., un anticuerpo marcado con fluorescencia) para la detección indirecta del

polipéptido mediante citometría de flujo. Otros ejemplos de polipéptidos seleccionables por FACS incluyen proteínas fluorescentes tales como proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente roja (RFP), proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente azul (BFP) y variantes de las mismas que incluyen eGFP, Venus, mCherry, mTomato y similares, que se puede detectar directamente mediante citometría de flujo.

5 Como se utiliza en el presente documento, "polipéptido diana" se refiere a una proteína, un fragmento de proteína, una proteína multimérica, una proteína de fusión, un anticuerpo (incluidos fragmentos del mismo) o un péptido que se puede producir en células hospedadoras y en los aspectos ejemplificados en el presente documento, el polipéptido diana se selecciona debido a su potencial como agente terapéutico, p. ej., un anticuerpo (incluido un fragmento del mismo), una proteína de fusión Fc, una hormona o una enzima. En algunas realizaciones, el polipéptido diana es una proteína secretada. Sin embargo, los métodos descritos en el presente documento no están limitados para la selección y el aumento de escala de los polipéptidos terapéuticos. Por ejemplo, también se contemplan polipéptidos de diagnóstico o polipéptidos de uso en el ambiente para su uso como polipéptido diana en un método divulgado en el presente documento.

15 Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a tales conjuntos (p. ej., moléculas de anticuerpo intactas, fragmentos de anticuerpo o variantes de los mismos) que tienen actividad inmunorreactiva específica conocida significativa frente a un antígeno de interés. Los anticuerpos y las inmunoglobulinas comprenden cadenas ligeras y pesadas, con o sin un enlace covalente intercatenario entre ellas. Las estructuras básicas de inmunoglobulina en los sistemas de vertebrados se conocen relativamente bien.

20 El término "anticuerpo" incluye anticuerpos enteros, así como fragmentos de unión a antígeno y variantes de dichos anticuerpos. Los anticuerpos pueden ser de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM; y de cualquier subclase, tal como IgG1 o IgG4. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal, o puede ser fragmentos del anticuerpo policlonal o monoclonal. El anticuerpo puede ser quimérico, humanizado, biespecífico, bifuncional o totalmente humano. También se contempla cualquier fragmento de unión a antígeno o variante de un anticuerpo, tal como Fab, Fab', Fab'2, regiones variables monocatenarias y variaciones de los mismos.

25 Una "proteína de fusión Fc" se refiere a una proteína que comprende un dominio Fc de inmunoglobulina que está unido, directa o indirectamente, a un polipéptido, tal como una proteína o un péptido. El polipéptido unido puede ser cualquier molécula proteica de interés, tal como un ligando, un receptor o un péptido antigénico.

30 Como se utiliza en el presente documento, "células productoras" se refieren a células que son adecuadas para la producción de proteínas, p. ej., en un método de fabricación a pequeña o gran escala para producir productos biológicos. En algunas realizaciones, las células productoras son células de mamífero o de insecto. Las células productoras se analizan más detalladamente en el presente documento.

35 Como se utiliza en el presente documento, una "población heterogénea de células productoras" es una población de células que expresa niveles variables de uno o más polipéptidos, p. ej., un polipéptido seleccionable por FACS y un polipéptido diana que están codificados por el mismo ARNm multicistónico. En algunas realizaciones, los niveles variables incluyen una variación (p. ej., un intervalo) de al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces o al menos 10 000 veces del polipéptido o de los polipéptidos en la población. En algunas realizaciones, los niveles variables incluyen una variación (p. ej., un intervalo de fluorescencia relativa) de al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces o al menos 10 000 veces del polipéptido seleccionable por FACS en la población según se detecta mediante citometría de flujo (p. ej., en un clasificador celular BD Influx™). En el presente documento se describen métodos para generar poblaciones heterogéneas de células productoras.

40 Como se utiliza en el presente documento, un "ARNm multicistónico" es un ARNm que contiene al menos dos marcos abiertos de lectura (ORF) que son capaces de codificar dos o más polipéptidos.

45 Como se usa en el presente documento, un "medio sin selección farmacológica" es un medio de cultivo que carece de un fármaco (p. ej., metotrexato (MTX)) que se utiliza para seleccionar subpoblaciones de células que expresan una proteína que confiere resistencia a fármacos a la subpoblación.

50 Como se usa en el presente documento, "selección basada en el medio" es un proceso de selección mediante el cual el medio de cultivo se altera para incluir un agente de selección (p. ej., MTX) o para excluir un componente del medio, lo que da lugar a la selección de una subpoblación que es resistente al agente de selección o puede sobrevivir en ausencia del componente del medio.

55 Como se utiliza en el presente documento, "medio deficiente en nucleótidos" es medio de cultivo que carece o contiene niveles bajos (p. ej., menos de 10 microgramos/ml) de una o más de adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T), hipoxantina, o timidina. En algunas realizaciones, el medio deficiente en nucleótidos es un medio que está desprovisto de hipoxantina y timidina. El medio deficiente en nucleótidos ilustrativo incluye el medio CD CHO (Gibco, Life Technologies, números de catálogo 10743 (líquido) y 12490 (granulado)).

60

65

Como se utiliza en el presente documento, un "marcador de viabilidad" es una característica celular que es indicativa de viabilidad celular y es detectable por FACS. Los marcadores de viabilidad ilustrativos incluyen dispersión frontal, dispersión lateral, tinción con yoduro de propidio o combinaciones de los mismos.

5 Como se utiliza en el presente documento, se entiende que la expresión "codón iniciador distinto de AUG" incluye cualquier polinucleótido distinto de AUG (normalmente un triplete) que actúe como sitio de inicio para el inicio de la traducción con una eficiencia reducida en relación con la de un codón iniciador AUG. El uso de codones iniciadores alternativos naturales se conoce en la técnica y se describe, por ejemplo, en Kozak (1991) J. Cell Biol. 115(4): 887-903; Mehdi *et al.* (1990) Gene 91:173-178; Kozak (1989) Mol. Cell. Biol. 9(11): 5073-5080. En general, los codones  
10 iniciadores distintos de AUG tienen menor eficiencia de traducción en comparación con la de un AUG; por ejemplo, el codón iniciador alternativo GUG puede tener una eficiencia de traducción del 3-5 % en comparación con la de un AUG (100 %). La eficiencia de traducción de un codón iniciador distinto de AUG también puede verse afectada por su contexto de secuencia; por ejemplo, se ha notificado que una secuencia de consenso de Kozak óptima tiene un efecto positivo en el inicio de la traducción en codones de inicio distintos de AUG (Mehdi *et al.* (1990) Gene 91:173-178;  
15 Kozak (1989) Mol. Cell. Biol. 9(11): 5073-5080). La secuencia de consenso de ADN de Kozak completa es GCCRCCATGG (SEQ ID NO: 8), donde el codón iniciador ATG (AUG en ARN) está subrayado, la A del codón iniciador ATG se designa como la posición +1 y "R" en la posición -3 es una purina (A o G). Las dos posiciones más conservadas son una purina, preferentemente una A en -3 y una G en +4 (Kozak (1991) J Cell Biol 115(4): 887-903). Se describe el uso alternativo de codones de inicio para la expresión atenuada de un marcador seleccionable en la publicación de patente de los EE. UU. 2006/0172382 y la publicación de patente de los EE. UU. 2006/0141577. Un experto en la técnica reconocerá que las secuencias descritas en el presente documento como ADN tendrán secuencias correlativas como moléculas de ARN, p. ej., la secuencia de ADN ATG, por ejemplo, se correspondería con la secuencia de ARN AUG, y viceversa.

25 Como se utiliza en el presente documento, el término "preselección", cuando se utiliza en relación a una población de células, se refiere a una población de células que aún no ha sido sometida a la selección por FACS como se describe en el presente documento, p. ej., mediante FLARE, y opcionalmente se ha sometido a la selección inicial con MTX (p. ej., MTX 5 nM) o medio sin MTX (p. ej., MTX 0 nM) antes de someterse a la selección por FACS.

30 Como se usa en el presente documento, el término "FLARE" se refiere a "expresión de indicador atenuada con citometría de flujo". La FLARE es un sistema de expresión que utiliza un ARNm multicistrónico que contiene al menos dos marcos abiertos de lectura (ORF), un ORF en dirección 5' que contiene un codón iniciador distinto de AUG y que codifica un polipéptido seleccionable por FACS y un segundo ORF en dirección 3' que contiene un codón iniciador AUG y que codifica un polipéptido diana.

35 Como se utiliza en el presente documento, el término "aproximadamente" se referirá a un intervalo de tolerancia del 10 % en torno a un valor indicado. Por lo tanto, cuando se utiliza el término "aproximadamente" para modificar un valor indicado, el intervalo indicado abarcará cualquier número dentro de  $\pm 0,01$  %, 0,02 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 % del valor indicado.

40

## II. MÉTODOS DE FACS PARA LA SELECCIÓN POR LOTES DE CÉLULAS PRODUCTORAS

La presente invención se refiere a un método de clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) para seleccionar por lotes células productoras que expresan un polipéptido diana sin el uso de metotrexato (MTX) como agente de amplificación. El método comprende:

45 (a) proporcionar una población heterogénea de células productoras, en donde las células productoras de la población expresan niveles variables de un polipéptido seleccionable por FACS y un polipéptido diana que están codificados por el mismo ARNm multicistrónico,

50 (b) seleccionar de la población heterogénea de células productoras una primera subpoblación heterogénea de células productoras utilizando FACS, en donde las células productoras de la primera subpoblación heterogénea expresan el polipéptido seleccionable por FACS a un nivel que es superior al nivel de al menos el 80 % (p. ej., al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %) de las células productoras en la población heterogénea de (a), y

55 (c) expandir la primera subpoblación heterogénea de células productoras en medio sin selección farmacológica, produciendo de este modo una primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras.

60

En algunas realizaciones, el método comprende además:

65 (d) seleccionar de la primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras de (c) una segunda subpoblación heterogénea de células productoras utilizando FACS, en donde las células productoras de la segunda subpoblación heterogénea expresan el polipéptido seleccionable por FACS a un nivel que es superior al nivel de al menos el 80 % (p. ej., al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos

el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %) de las células productoras en la primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras de (c), y

5 (e) expandir la segunda subpoblación heterogénea de células productoras en medio sin selección farmacológica, produciendo de este modo una segunda subpoblación heterogénea expandida de células productoras. En algunas realizaciones, las etapas (d) y (e) se repiten al menos dos veces (p. ej., dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces o más) para producir una tercera, cuarta, quinta, sexta, etc. subpoblación heterogénea expandida de células productoras.

10 Los clasificadores celulares de FACS adecuados para llevar a cabo un método descrito en el presente documento son bien conocidos en la técnica y están disponibles en el mercado. Los clasificadores celulares de FACS ilustrativos incluyen BD Influx™ (BD Biosciences) y otros clasificadores celulares equivalentes producidos por otros proveedores comerciales tales como Sony, Bio-Rad y Beckman Coulter.

15 Las células productoras se pueden cultivar en condiciones que faciliten la expresión del polipéptido seleccionable por FACS en las células. El marcador seleccionable por FACS puede ser un marcador de superficie celular. Los ejemplos de polipéptidos marcadores de la superficie celular incluyen, pero sin limitación, CD2, CD20, CD52 o CD59. A continuación se proporcionan secuencias de aminoácidos ilustrativas, no limitantes, para los polipéptidos marcadores de la superficie celular CD52 y CD59.

**Secuencia de aminoácidos para el polipéptido CD52 humano ilustrativo (mutante aceptor de empalme):**

25 LERFLFLLLTISLLVLVQIQTGLSGQNDTSQTSSPSASSNISGGIFLFFVANAIHLFCFS\* (SEQ ID NO: 1)

**Secuencia de aminoácidos para el polipéptido CD59 humano ilustrativo (mutante aceptor de empalme):**

30 LGIQGGSVLFGLLLVLAVFCHSGHSLQCYNCPNPTADCKTAVNCSSDFDACLITKAG  
LQVYNNCWKFEHCNENFVITRLRENELTYCCKKDLGNFNEQLENGGTSLSSEKTVL  
LLVTPFLAAAWSLHP\* (SEQ ID NO: 2)

**Secuencia de aminoácidos para el polipéptido CD52 de ratón ilustrativo (mutante aceptor de empalme):**

35 LKSFLFLTIILLVVIQIQTGS LGQATTAASGTNKNSTSTKKTPLKSGASSIIDAGACSF  
FFANTLICLFYLS\* (SEQ ID NO: 3)

40 Se puede utilizar cualquier método conocido en la técnica útil para detectar un marcador de superficie celular en relación con los métodos de la divulgación. Por ejemplo, un anticuerpo u otro agente de unión específico de marcador de la superficie celular se pone en contacto directa o indirectamente con la célula productora en condiciones que favorecen la unión de anticuerpo al polipéptido seleccionable por FACS y, por lo tanto, a la célula productora. La selección del agente de unión o anticuerpo está determinada por: 1) su capacidad para unirse selectivamente al polipéptido seleccionable por FACS que se expresa en la célula hospedadora; y 2) su capacidad para marcarse con un marcador detectable o unirse a un marcador detectable, por ejemplo, para su uso en citometría de flujo o FACS.

45 Como alternativa, un primer agente puede ser una proteína o péptido que se une al polipéptido seleccionable por FACS, pudiendo este primer agente también unirse a su vez a un segundo agente que puede marcarse de manera detectable (p. ej., incorporando un marcador fluorescente, enzimático, colorimétrico u otro detectable). Se pretende, aunque no siempre se indica explícitamente, que la unión "indirecta" al polipéptido seleccionable por FACS incluya el uso de cualquiera de varios compañeros intermedios.

50 El agente o anticuerpo puede unirse directamente al marcador de superficie celular y comprende un marcador fluorescente. Los marcadores fluorescentes adecuados incluyen, pero sin limitación, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metilcumarinas, pireno, verde de malaquita, estilbeno, Lucifer Yellow, Cascade Blue y Texas Red. Se describen otros colorantes ópticos adecuados en el manual de Molecular Probes®, 11.ª edición, 2010.

55 El marcador fluorescente puede funcionalizarse para facilitar la unión covalente al agente o agentes. Los grupos funcionales adecuados incluyen, pero sin limitación, grupos isotiocianato, grupos amino, grupos haloacetilo, maleimidias, ésteres de succinimidilo y haluros de sulfonilo, todos los cuales se pueden utilizar para unir el marcador

fluorescente a una segunda molécula. La elección del grupo funcional del marcador fluorescente dependerá del sitio de unión al conector, el agente, el polipéptido seleccionable por FACS o el segundo agente de marcaje.

5 La unión del marcador fluorescente puede ser directa o a través de un conector al anticuerpo o agente. El conector puede ser un resto de acoplamiento relativamente corto que generalmente se utiliza para unir moléculas. La fijación del primer resto de marcaje a los agentes candidatos se realizará como es apreciado generalmente por los expertos en la técnica y puede incluir técnicas descritas anteriormente para la incorporación de marcadores fluorescentes.

10 Los materiales y técnicas para el diseño y la construcción de anticuerpos marcados y otros agentes para su uso en citometría se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Bailey *et al.* (2002) *Biotech. Bioeng.* 80(6); 670-676; Carroll y Al-Rubeai (2004) *Expt. Opin. Biol. Therapy* 4:1821-1829; Yoshikawa *et al.* (2001) *Biotechnol. Bioeng.* 74:435-442; Meng *et al.* (2000) *Gene* 242:201-207; Borth *et al.* (2001) *Biotechnol. Bioeng.* 71 (4):266-273; Zeyda *et al.* (1999) *Biotechnol. Prog.* 15:953-957; Klucher *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(23):4853-4860; y Brezinsky *et al.* (2003) *J. Immunol. Methods* 277:141-155.

15 Los pares de unión adecuados para su uso en la unión indirecta del marcador al agente (que, a su vez, se une al polipéptido seleccionable por FACS) incluyen, pero sin limitación, antígenos/anticuerpos, incluyendo digoxigenina/anticuerpo, dinitrofenilo (DNP)/anti-DNP, dansilo-X/anti-dansilo, fluoresceína/anti-fluoresceína, lucifer yellow/anti-lucifer yellow, rodamina/anti-rodamina; y biotina/avidina (o biotina/estreptavidina). Los pares de unión deben tener altas afinidades entre sí, suficientes para soportar las fuerzas de cizallamiento durante la clasificación por FACS u otro sistema de detección utilizado en relación con la divulgación.

20 Por lo tanto, los primeros restos de marcaje (cuando se utilizan segundos restos de marcaje) incluyen, pero sin limitación, haptenos, tales como biotina. La biotilación de moléculas diana es bien conocida, por ejemplo, se conoce un gran número de agentes de biotilación, incluidos agentes reactivos a amina y reactivos a tiol, para la biotilación de proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono y ácidos carboxílicos. Del mismo modo, también se conoce un gran número de reactivos de haptenilación.

25 Los anticuerpos utilizados en un método descrito en el presente documento se pueden producir en cultivo celular, en fagos o en diversos animales, incluyendo, pero sin limitación, vacas, conejos, cabras, ratones, ratas, hámsteres, cobayas, ovejas, perros, gatos, monos, chimpancés, simios, etc., siempre que los anticuerpos conserven la especificidad de unión para el polipéptido seleccionable por FACS. Los anticuerpos se pueden probar para determinar la especificidad de la unión comparando la unión con el antígeno adecuado con la unión a una mezcla de antígeno o antígeno irrelevante en un conjunto dado de condiciones.

30 En los casos en los que el anticuerpo o agente contra el polipéptido seleccionable por FACS no está marcado directamente, el anticuerpo o agente preferentemente también contiene y conserva la capacidad de unirse a un agente secundario que es detectable después de unirse a la célula a través del polipéptido seleccionable por FACS.

35 Cuando el polipéptido seleccionable por FACS es CD59, el polipéptido seleccionable por FACS puede detectarse utilizando un anticuerpo anti-CD59. "Anticuerpo anti-CD59" se refiere a un anticuerpo que reconoce y se une específicamente a CD59. Los anticuerpos anti-CD59 se pueden generar mediante métodos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, *et al.* eds., 1987 hasta las versiones actuales) y ANTIBODIES A LABORATORY MANUAL, segunda edición (Greenfield, ed. 2013). Además, varios anticuerpos anti-CD59 están disponibles en el mercado (p. ej., anticuerpos conjugados con un marcador fluorescente, tales como los comercializados por los proveedores comerciales Abcam, SeroTec y BioLegend).

40 Cuando el polipéptido seleccionable por FACS es CD52, el polipéptido seleccionable por FACS puede detectarse utilizando un anticuerpo anti-CD52. "Anticuerpo anti-CD52" se refiere a un anticuerpo que reconoce y se une específicamente a CD52. Los anticuerpos anti-CD52 se pueden generar mediante métodos bien conocidos en la técnica. Además, varios anticuerpos anti-CD52 están disponibles en el mercado (p. ej., anticuerpos conjugados con un marcador fluorescente, tales como los comercializados por los proveedores comerciales Abcam, SeroTec y BioLegend).

45 Cuando el polipéptido seleccionable por FACS es CD20, el polipéptido seleccionable por FACS puede detectarse utilizando un anticuerpo anti-CD20. "Anticuerpo anti-CD20" se refiere a un anticuerpo que reconoce y se une específicamente al polipéptido o la proteína CD20. Los anticuerpos anti-CD20 se pueden generar mediante métodos bien conocidos en la técnica. Además, varios anticuerpos anti-CD20 están disponibles en el mercado de proveedores tales como BD Pharmingen; Beckman Coulter, Inc. (Fullerton, Calif., múltiples clones, incluyendo el clon H299 (B1) n.º de catálogo 6604106; isotipo IgG2a y clon L26 n.º de catálogo IM1565, isotipo IgG2a); Invitrogen (Carlsbad, Calif., clon: BH-20, isotipo: IgG2a y clon: B-H20, isotipo: IgG2a); BioLegend (San Diego, Calif., n.º de catálogo 302301, clon: 21-7, isotipo: IgG2b, è); EMD Biosciences, Inc., marca CALBIOCHEM® (San Diego, Calif., clon 2H7 n.º de referencia 217670, isotipo: IgG2b); y Anaspec (San José, Calif., n.º de catálogo 29587).

65

En un método ilustrativo y no limitante, una población heterogénea de células productoras como se describe en el presente documento se pone en contacto con un agente que reconoce y se une directa o indirectamente al polipéptido seleccionable por FACS, si está presente, en la superficie de las células. El contacto se realiza en condiciones que favorecen o son adecuadas para la unión específica (directa o indirectamente) del agente o anticuerpo con el polipéptido seleccionable por FACS. Las células que se unen al agente o anticuerpo se seleccionan a continuación para usar FACS (p. ej., seleccionando células que expresan el polipéptido seleccionable por FACS a un nivel alto, tal como un nivel que es al menos el 80 % del nivel de la población) y se utilizan para crear una subpoblación heterogénea de células productoras. A continuación, la subpoblación heterogénea de células productoras se cultiva en condiciones que dan lugar a la expansión de la población para producir suficientes células para realizar un segundo ciclo de FACS, si se desea, o para producir una población por lotes para producir el polipéptido diana. Después de al menos un ciclo de FACS, la subpoblación heterogénea de células productoras se puede clasificar adicionalmente para producir poblaciones clonales. La preparación de una población clonal se puede realizar mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, en una realización, las células seleccionadas pueden sembrarse en placas de 96 pocillos (u otro tamaño) a una densidad de una célula por pocillo y dejarse crecer durante un período de tiempo (p. ej., normalmente 7-28 días), lo que permite que la célula individual se convierta en una colonia multicelular de células descendientes (es decir, una población clonal). El método puede comprender a continuación analizar una o más de las poblaciones clonales detectando el nivel del polipéptido seleccionable por FACS y/o expresión del polipéptido diana en dicha población clonal y seleccionar una o más poblaciones clonales con un nivel alto de expresión del polipéptido seleccionable por FACS y/o polipéptido diana, seleccionando de este modo una o más poblaciones clonales que expresan de manera estable el polipéptido diana. La población clonal se puede cultivar durante 7-28 días después de sembrar en placas a una densidad de células individuales antes de analizar las poblaciones clonales. El método puede incluir además poner en contacto la población clonal con un agente detectable que reconoce y se une directa o indirectamente al polipéptido seleccionable por FACS, si está presente, en la superficie de la célula clonal en condiciones que favorecen la unión del agente con el polipéptido seleccionable por FACS; y seleccionar o detectar una o más células que están unidas directa o indirectamente al agente o anticuerpo. Estas células seleccionadas de este modo también se pueden aislar y cultivar. El método puede incluir además analizar la expresión del polipéptido diana del clon o de los clones, p. ej., usando cribado de proteína A (tal como cuando el polipéptido diana es un anticuerpo o fusión Fc), transferencia de Western, SDS PAGE con tinción azul de Coomassie o plata, o un ensayo de actividad enzimática.

En consecuencia, un método descrito en el presente documento puede comprender además aislar una o más células productoras individuales de una primera o segunda (o tercera, cuarta, quinta o sexta) subpoblación heterogénea expandida y cultivar individualmente la o las células productoras individuales para producir poblaciones clonales de la o las células productoras individuales.

La primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras puede producir una mejora de 1,2 a 5 veces, de 1,2 a 4 veces, de 1,2 a 3 veces, de 1,2 a 2,5 veces, de 1,5 a 10 veces, de 1,5 a 9 veces, de 1,5 a 8 veces, de 1,5 a 7 veces, de 1,5 a 6 veces, de 1,5 a 5 veces, de 1,5 a 4 veces, de 1,5 a 3 veces o de 1,5 a 2,5 veces, de 2 a 10 veces, de 2 a 9 veces, de 2 a 8 veces, de 2 a 7 veces, de 2 a 6 veces o de 2 a 5 veces en la producción del polipéptido diana en comparación con la de la población heterogénea de células productoras.

La segunda subpoblación heterogénea expandida de células productoras puede producir una mejora de 1,2 a 5 veces, de 1,2 a 4 veces, de 1,2 a 3 veces, de 1,2 a 2,5 veces, de 1,5 a 5 veces, de 1,5 a 4 veces, de 1,5 a 3 veces o de 1,5 a 2,5 veces en la producción del polipéptido diana en comparación con la de la primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras.

Al menos una de las poblaciones clonales de la o las células individuales puede producir una mejora de 3 a 30 veces, de 5 a 30 veces, de 5 a 20 veces, de 3 a 20 veces, de 5 a 10 veces, de 3 a 10 veces o de 3 a 5 veces en la producción del polipéptido diana en comparación con la de la población heterogénea de células productoras (p. ej., en comparación con la producción promedio del polipéptido diana en la población heterogénea de células productoras).

El método puede comprender además aislar el polipéptido diana de la primera o segunda (o tercera, cuarta, quinta o sexta) subpoblación heterogénea expandida o la población clonal. El polipéptido diana se puede aislar utilizando cualquier método conocido en la técnica y se puede purificar adicionalmente, p. ej., según las buenas prácticas de fabricación actuales (CGMP) para proteínas recombinantes y anticuerpos, hasta un nivel de pureza de al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,9 % o más.

La población heterogénea de células productoras sometidas a FACS puede contener  $1-500 \times 10^6$  células,  $1-400 \times 10^6$  células,  $1-300 \times 10^6$  células,  $1-200 \times 10^6$  células,  $1-150 \times 10^6$  células,  $10-500 \times 10^6$  células,  $10-400 \times 10^6$  células,  $10-300 \times 10^6$  células,  $10-200 \times 10^6$  células,  $10-150 \times 10^6$  células,  $50-500 \times 10^6$  células,  $50-400 \times 10^6$  células,  $50-300 \times 10^6$  células,  $50-200 \times 10^6$  células,  $50-150 \times 10^6$  células,  $80-500 \times 10^6$  células,  $80-400 \times 10^6$  células,  $80-300 \times 10^6$  células,  $80-200 \times 10^6$  células,  $80-150 \times 10^6$  células u  $80-120 \times 10^6$  células.

La primera y/o segunda (y/o tercera, cuarta, quinta y/o sexta) subpoblación heterogénea de células productoras puede contener  $0,1-10,0 \times 10^6$  células,  $0,2-10,0 \times 10^6$  células,  $0,3-10,0 \times 10^6$  células,  $0,4-10,0 \times 10^6$  células,  $0,5-10,0 \times 10^6$

células,  $0,1-9,0 \times 10^6$  células,  $0,2-9,0 \times 10^6$  células,  $0,3-9,0 \times 10^6$  células,  $0,4-9,0 \times 10^6$  células,  $0,5-9,0 \times 10^6$  células,  $0,1-8,0 \times 10^6$  células,  $0,2-8,0 \times 10^6$  células,  $0,3-8,0 \times 10^6$  células,  $0,4-8,0 \times 10^6$  células,  $0,5-8,0 \times 10^6$  células,  $0,1-7,0 \times 10^6$  células,  $0,2-7,0 \times 10^6$  células,  $0,3-7,0 \times 10^6$  células,  $0,4-7,0 \times 10^6$  células,  $0,5-7,0 \times 10^6$  células,  $0,1-6,0 \times 10^6$  células,  $0,2-6,0 \times 10^6$  células,  $0,3-6,0 \times 10^6$  células,  $0,4-6,0 \times 10^6$  células o  $0,5-6,0 \times 10^6$  células antes de la expansión.

5 En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, se realiza una etapa de expansión descrita en el presente documento (p. ej., etapa c) o etapa e)) durante entre 5-21 días, 5-14 días, 6-21 días, 6-14 días, 7-21 días o 7-14 días.

10 En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el medio sin selección farmacológica es medio sin metionina sulfoximina.

### III. CÉLULAS PRODUCTORAS Y MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE LAS MISMAS

15 Una célula productora se puede generar utilizando cualquier tipo de célula adecuada para la producción de un polipéptido diana a partir de un ARNm multicistrónico. En algunas realizaciones, la célula es una célula eucariota. Los ejemplos de células eucariotas adecuadas para producir un polipéptido diana incluyen, pero sin limitación, una línea celular de ovario de hámster chino, incluidas las designadas CHO-DBX11, CHO-DG44, CHO-S, CHO-K1 y la línea celular de hámster BHK-21; las líneas celulares murinas designadas NIH3T3, NS0, C127, las líneas celulares de simio COS, Vero; y las líneas celulares humanas HeLa, HEK293 (también denominada 293), NIH-3T3, U-937 y Hep G2. Los ejemplos adicionales incluyen células de levadura, células de insecto (p. ej., células de *Drosophila* Schneider S2, células de insecto Sf9, documento WO 94/126087, células de insecto BTI-TN-5B1-4 (High Five™) (Invitrogen)), células vegetales, células aviares, células fúngicas y células bovinas. Los ejemplos de levaduras útiles para la expresión incluyen, pero sin limitación, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Torulopsis*, *Yarrowia*, o *Pichia*. Véanse, p. ej., las patentes de los EE. UU. n.º 4 812 405; 4 818 700; 4 929 555; 5 736 383; 5 955 349; 5 888 768 y 6 258 559. Otros ejemplos de células productoras pueden ser procariontes, incluidas células bacterianas, tales como *E. coli* (p. ej., cepa DH5a™) (Invitrogen, Carlsbad, CA), PerC6 (Crucell, Leiden, NL), *B. subtilis* y/u otras bacterias adecuadas. Las células se pueden adquirir de un proveedor comercial, tal como la colección americana de cultivos tipo (ATCC, Rockville, Md. EE. UU.) o cultivarse a partir de un aislado utilizando métodos conocidos en la técnica.

35 En la etapa (a) del método reivindicado se proporciona una población heterogénea de células productoras. La población heterogénea de células productoras se puede producir utilizando cualquier método conocido en la técnica o descrito en el presente documento. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, la población heterogénea de células productoras se produce transfectando células con un vector que codifica el ARNm multicistrónico y sometiendo las células transfectadas a menos de o igual a un ciclo de selección basada en el medio para seleccionar células que expresan niveles variables (p. ej., una variación de al menos 10, 100, 1000 o 10 000 veces) del ARNm multicistrónico. En algunas realizaciones, el vector contiene además un gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) y la selección basada en el medio es por medio deficiente en nucleótidos. En algunas realizaciones, el vector contiene además un gen de la glutamina sintetasa (GS) y la selección basada en el medio es por metionina sulfoximina (MSX, p. ej., MSX 25-100  $\mu$ M). En algunas realizaciones, se utiliza FACS para seleccionar células que expresan niveles variables del ARNm multicistrónico, p. ej., utilizando el nivel de polipéptido seleccionable por FACS para seleccionar las células. En algunas realizaciones, el vector carece de un marcador seleccionable por fármaco, p. ej., carece de un gen de DHFR o un gen de GS.

45 Las células productoras contienen un polinucleótido recombinante (p. ej., un ADNc recombinante) que codifica una molécula de ARNm multicistrónica a partir de la cual los polipéptidos diana y seleccionables por FACS se traducen por separado de diferentes ORF. En algunas realizaciones, se proporciona un primer ORF que codifica un polipéptido seleccionable por FACS, tal como CD59 o CD52. A continuación, se proporcionan las primeras secuencias de ORF ilustrativas, no limitantes, para CD52 y CD59.

#### ORF humano de CD52 ilustrativo (mutante aceptor de empalme):

```
tgggagcgtctctctctctactcaccatcagcctctctgttttggtagcaatacaaacccgactctccggacaaaacgacaccagc
caaaccagcagccctcagcatccagcaacataagcggaggcatttctttctctctcgtcgaacgccataatccacctctctgcttca
gttga (SEQ ID NO: 4)
```

55

#### ORF humano de CD59 ilustrativo (mutante aceptor de empalme):

ttgggaatccaaggagggtctgtctctgttcgggctgctgctcctcgtctgtctctgcccattccggctatagcctgcagtgctacaact  
 gtcctaaacccaactgctgactgcaaaaacagccgcaattgttcattctgatttgcagcgtgtctcattaccaaaagctgggttacaagtgtat  
 aacaactgttggaagttgagcattgcaattcaacgacgtcacaacccgcttgagggaacgagcctaactactactgctgcaagaa  
 ggacctgtgtaactttaacgaacagcttgaaaacggaggacatccttatcagagaaaacagttctctgctggtgaciccatttctggca  
 gctgctggagccttcatecctaa (SEQ ID NO: 5)

**ORF de ratón de CD52 ilustrativo (mutante aceptor de empalme):**

tigaagagcttctcctcctcctcaactatcattctctcgtagtcattcagatacaaacaggatcctlaggacaagccactacggccgctca  
 ggtactaacaaaaacagcacctccaccaaaaaaaccccttaagagagcggggcctcatccatcagcagcggggcgttgcagttc  
 ctctctctgcccaataaccitatttgcctctctacclcagcctaactgagtaa (SEQ ID NO: 6)

5

10

15

En algunas realizaciones, se proporciona un segundo ORF que codifica un polipéptido diana, tal como un anticuerpo, enzima o proteína de fusión Fc. En algunas realizaciones, se realiza traducción separada mediante el uso de un codón iniciador distinto de AUG para el inicio de la traducción del polipéptido seleccionable por FACS y el uso de un codón iniciador AUG para el inicio de la traducción del polipéptido diana. En esta realización, generalmente el polinucleótido que codifica el polipéptido diana se ubica cadena abajo del polinucleótido que codifica el polipéptido seleccionable por FACS. También se puede realizar una traducción separada utilizando un sitio interno de entrada de ribosomas (IRES). El elemento de IRES puede ubicarse cadena arriba del polinucleótido que codifica el polipéptido diana y cadena abajo del polinucleótido que codifica el polipéptido seleccionable por FACS. El elemento de IRES también puede ubicarse cadena arriba del polinucleótido que codifica el polipéptido seleccionable por FACS y cadena abajo del polinucleótido que codifica el polipéptido diana.

20

En algunas realizaciones, un codón iniciador distinto de AUG se encuentra dentro del ADN que codifica el polipéptido seleccionable por FACS de tal manera que la traducción del polipéptido seleccionable por FACS es menos eficiente que la traducción del polipéptido diana. Para lograr una eficiencia de traducción reducida, el codón iniciador AUG del polipéptido seleccionable por FACS puede cambiarse a un codón iniciador alternativo distinto de AUG, ejemplos de los cuales incluyen, pero sin limitación: CUG, GUG, UUG, AUU, AUA o ACG.

25

Por lo tanto, cuando se utiliza un codón iniciador alternativo distinto de AUG, la expresión de un polipéptido seleccionable por FACS puede atenuarse con respecto a la de un polipéptido diana coexpresado. Además de la alteración del codón iniciador, el ADN que codifica el polipéptido seleccionable por FACS puede modificarse en todos los tripletes ATG internos para evitar el inicio interno de la traducción. El polipéptido seleccionable por FACS puede tener una secuencia de aminoácidos corta (<200 aminoácidos) con pocos (<10) tripletes ATG.

30

Sin desear quedar ligados a la teoría, para iniciar la traducción del ARNm que codifica tanto el polipéptido seleccionable por FACS como el polipéptido diana, los ribosomas comienzan a leer en la estructura de caperuza 5' del ARNm, leyendo la mayoría más allá del codón iniciador alternativo (por ejemplo, UUG) y, en su lugar, inician la traducción en el codón iniciador AUG cadena abajo. Sin embargo, el inicio de la traducción puede producirse en el codón iniciador alternativo con muy baja frecuencia de modo que se expresa un nivel bajo del polipéptido seleccionable por FACS.

35

Para crear una célula productora, el o los polinucleótidos recombinantes se pueden insertar en la célula utilizando cualquier técnica de transferencia adecuada (p. ej., por transformación, transfección, electroporación o transducción). En algunas realizaciones, se puede utilizar un vector para la inserción del polinucleótido o los polinucleótidos en la célula. Los vectores que se pueden utilizar incluyen plásmido, virus, fago, transposones y minicromosomas, de los que los plásmidos son un vector típico. Generalmente, dichos vectores incluyen además una secuencia señal, origen de replicación, uno o más genes marcadores, un promotor y secuencias de terminación de la transcripción unidas operativamente al gen que codifica el ARNm multicistrónico para facilitar la expresión. Los ejemplos de vectores víricos de ADN adecuados incluyen adenovirus (Ad) o virus adenoasociado (VAA). Los vectores basados en adenovirus para el suministro de polinucleótidos se conocen en la técnica y pueden obtenerse comercialmente o construirse mediante métodos biológicos moleculares convencionales. Los adenovirus (Ad) son un grupo de virus, que incluye más de 50 serotipos. Véase, p. ej., la solicitud internacional de PCT n.º WO 95/27071. Otros vectores víricos para su uso en la presente divulgación incluyen vectores derivados de vaccinia, herpesvirus (p. ej., virus del herpes simple (VHS)) y retrovirus. Los vehículos de suministro génico también incluyen varios vectores no víricos, incluidos complejos de ADN/liposomas y complejos dirigidos de ADN-proteína vírica.

50

Los vectores que contienen tanto un promotor como un sitio de clonación al que se puede unir operativamente un polinucleótido son conocidos en la técnica y están disponibles en proveedores comerciales. Dichos vectores son capaces de transcribir ARN *in vitro* o *in vivo*, y están disponibles en el mercado de fuentes tales como Agilent Technologies y Promega Corporation. Para optimizar la expresión y/o la transcripción *in vitro*, puede ser necesario eliminar, añadir o alterar partes no traducidas en 5' y/o 3' para eliminar codones iniciadores de la traducción alternativos

55

adicionales, potencialmente inadecuados, u otras secuencias que puedan interferir en la expresión o reducirla, ya sea a nivel de transcripción o traducción. Como alternativa, se pueden insertar sitios de unión al ribosoma de consenso en posición inmediatamente 5' del codón iniciador para mejorar la expresión.

5 También se divulgan además células productoras que contienen un primer polinucleótido recombinante que codifica un ARNm multicistrónico como se describe en el presente documento y contienen además un segundo polinucleótido recombinante que codifica una segunda proteína o polipéptido diana bajo el control del primer o segundo elemento promotor.

10 Se puede proporcionar un promotor para la expresión en la célula productora. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles. Por ejemplo, un promotor puede unirse operativamente a un ácido nucleico que codifica un ARNm multicistrónico, de modo que dirige la expresión de los polipéptidos codificados. Se dispone de diversos promotores adecuados para hospedadores procariontes y eucariotes. Los promotores procariontes incluyen promotores lac, tac, T3, T7 para *E. coli*; 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, p. ej., enolasa, gliceraldehído 3-fosfato  
15 deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa 6 fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa y glucocinasa. Los promotores eucariotes incluyen promotores de levadura inducibles tales como alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, metalotioneína y enzimas responsables del metabolismo del nitrógeno o la utilización de la maltosa/galactosa; promotores de ARN polimerasa II, incluidos promotores víricos tales como polioma, viruela y adenovirus (p. ej., adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (en particular, el promotor génico temprano inmediato), retrovirus, virus de la hepatitis B, actina, promotor del virus del sarcoma rous (VSR) y promotores temprano o tardío del virus de los simios 40 y promotores no víricos, tales como EF-1 alfa (Mizushima y Nagata (1990) Nucleic Acids Res. 18(17):5322). Los expertos en la técnica  
20 podrán seleccionar el promotor adecuado para expresar un polipéptido diana.

25 Cuando resulte adecuado, p. ej., para la expresión en células de eucariotes superiores, se pueden incluir elementos potenciadores adicionales en lugar de o además de los que se encuentran en los promotores descritos anteriormente. Las secuencias potenciadoras de mamífero adecuadas incluyen elementos potenciadores de globina, elastasa, albúmina, fetoproteína, metalotionina e insulina. Como alternativa, se puede utilizar un elemento potenciador de un virus celular eucariota tal como potenciador de SV40, potenciador promotor temprano del citomegalovirus, potenciador del polioma, potenciador baculovírico o locus de IgG2a murino (véase el documento WO 04/009823). Aunque dichos potenciadores a menudo se encuentran en el vector en un sitio cadena arriba del promotor, también pueden ubicarse en otra parte, p. ej., dentro de la región no traducida o cadena abajo de la señal de poliadenilación. La elección y el posicionamiento del potenciador pueden basarse en la compatibilidad con la célula hospedadora utilizada para la  
30 expresión.

35 Además, los vectores (p. ej., vectores de expresión) pueden comprender un marcador seleccionable para la selección de células hospedadoras que transportan el vector y, en el caso de un vector replicable, un origen de replicación. Los genes que codifican los productos que confieren resistencia a antibióticos o fármacos son marcadores de selección habituales y se pueden utilizar en células procariontes (p. ej., gen de  $\beta$ -lactamasa (resistencia a ampicilina), gen tet (resistencia a tetraciclina)) y eucariotes (p. ej., genes de resistencia a la neomicina (G418 o genética), gpt (ácido micofenólico), ampicilina o higromicina 5). El gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) permite la selección con metotrexato o medio deficiente en nucleótidos en diversos hospedadores. De modo similar, el gen de la glutamina sintetasa (GS) permite la selección con metionina sulfoximina. Los genes que codifican el producto génico de marcadores auxotróficos del hospedador (p. ej., LEU2, URA3, HIS3) se utilizan a menudo como marcadores de  
40 selección en levadura. También se contempla el uso de vectores víricos (p. ej., baculovirus) o fagos, y vectores que son capaces de integrarse en el genoma de la célula hospedadora, tales como vectores retrovíricos.

45 En sistemas eucariotes, las señales de poliadenilación y terminación pueden unirse operativamente a un polinucleótido que codifica el ARNm multicistrónico como se describe en el presente documento. Tales señales se colocan normalmente en dirección 3' con respecto a un marco abierto de lectura. En sistemas de mamíferos, los ejemplos no limitantes de señales de poliadenilación/terminación incluyen las derivadas de hormonas del crecimiento, genes alfa del factor de elongación 1 y víricos (p. ej., SV40) o repeticiones terminales largas retrovíricas. En sistemas de levadura, los ejemplos no limitantes de señales de poliadenilación/terminación incluyen las derivadas de los genes de la fosfoglicerato cinasa (*PGK*) y la alcohol deshidrogenasa 1 (*ADH*). En los sistemas procariontes, normalmente no se requieren señales de poliadenilación y, en cambio, es habitual emplear secuencias terminadoras más cortas y definidas. La elección de las secuencias de poliadenilación/terminación puede basarse en la compatibilidad con la célula hospedadora utilizada para la expresión. Además de lo anterior, otras características que se pueden emplear para mejorar los rendimientos incluyen elementos de remodelación de cromatina, intrones y modificación de codones  
50 específicos de células hospedadoras.

60 Las células productoras se pueden cultivar en matraces giratorios, matraces de agitación, frascos rotatorios, reactores de ondas (p. ej., System 1000 de wavebiotech.com) o sistemas de fibra hueca, o, para la producción a gran escala, se utilizan reactores de tanques con agitación o reactores de bolsa (p. ej., Wave Biotech, Somerset, Nueva Jersey, EE. UU.), en particular para cultivos en suspensión. Los reactores de tanques con agitación se pueden adaptar para aireación utilizando, p. ej., rociadores, deflectores o impulsores de cizallamiento bajo. Para columnas de burbujas y reactores de transporte aéreo, se puede utilizar aireación directa con burbujas de aire u oxígeno. Cuando las células  
65

hospedadoras se cultivan en un medio de cultivo sin suero, el medio se puede complementar con un agente protector celular tal como pluronic F-68 para ayudar a prevenir el daño celular como resultado del proceso de aireación. Dependiendo de las características de las células hospedadoras, se pueden utilizar microportadores como sustratos de cultivo para líneas celulares dependientes de anclaje o se pueden adaptar las células al cultivo en suspensión. El cultivo de células hospedadoras, en particular células hospedadoras de vertebrados, puede utilizar diversos modos operativos, tales como procesamiento discontinuo, semicontinuo, de repetición de lotes (véase Drapeau *et al.* (1994) Cytotechnology 15:103-109), proceso discontinuo extendido o cultivo de perfusión. Aunque las células productoras transformadas de forma recombinante se pueden cultivar en medios que contienen suero, tales como medios que comprenden suero de ternera fetal (FCS), en algunas realizaciones, dichas células hospedadoras se cultivan en medios sin suero, tal como se desvela en Keen *et al.* (1995) Cytotechnology 17:153-163, o medios disponibles en el mercado, tales como ProCHO-CDM o UltraCHOTM (Cambrex NJ, EE. UU.), complementados cuando sea necesario con una fuente de energía tal como glucosa y factores de crecimiento sintéticos tales como insulina recombinante. El cultivo sin suero de células hospedadoras puede requerir que esas células se adapten a crecer en condiciones sin suero. Un enfoque de adaptación es cultivar dichas células hospedadoras en medios que contienen suero e intercambiar repetidamente el 80 % del medio de cultivo por el medio sin suero, para que las células hospedadoras aprendan a adaptarse a condiciones sin suero (véase, p. ej., Scharfenberg, K. *et al.* (1995) Animal Cell Technology: Developments Towards the 21st Century (Beuvery, E.C. *et al.*, eds), págs. 619-623, Kluwer Academic publishers).

Un polipéptido diana según las realizaciones descritas puede secretarse en el medio y recuperarse y purificarse a partir del mismo utilizando diversas técnicas para proporcionar un grado de purificación adecuado para el uso previsto. Por ejemplo, el uso de un polipéptido diana (p. ej., un anticuerpo o proteína de fusión Fc) para el tratamiento de sujetos humanos normalmente exige al menos un 95 % de pureza según se determina mediante SDS-PAGE reductora, más normalmente un 98 % o un 99 % de pureza, en comparación con el medio de cultivo que comprende el polipéptido diana. En el primer caso, los residuos celulares del medio de cultivo se pueden eliminar utilizando centrifugación seguida de una etapa de clarificación del sobrenadante utilizando, p. ej., microfiltración, ultrafiltración y/o filtración en profundidad. Como alternativa, un polipéptido diana se puede recoger mediante microfiltración, ultrafiltración o filtración en profundidad sin centrifugación previa. Están disponibles diversas otras técnicas, tales como diálisis y electroforesis en gel, y técnicas cromatográficas, tales como hidroxapatita (HA), cromatografía de afinidad (que implica opcionalmente un sistema de marcaje de afinidad, tal como polihistidina) y/o cromatografía de interacción hidrofoba (HIC) (véase el documento US 5 429 746). Un polipéptido diana, tal como un anticuerpo o fusión Fc, después de diversas etapas de clarificación, se puede capturar utilizando cromatografía de afinidad con proteína A o G seguida de etapas de cromatografía adicionales, tales como intercambio iónico y/o cromatografía de HA, intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de exclusión por tamaño y precipitación con sulfato de amonio. También se pueden emplear diversas etapas de eliminación de virus (p. ej., nanofiltración utilizando, p. ej., un filtro DV-20). Siguiendo estas diversas etapas, se proporciona una preparación purificada que comprende al menos 10 mg/ml o más, p. ej., 100 mg/ml o más, del polipéptido diana descrito en el presente documento.

Se puede obtener una población clonal de células productoras que expresa un polipéptido seleccionable por FACS y un polipéptido diana utilizando un método como se describe en el presente documento. En algunos casos, la población clonal produce una mejora de 3 a 30 veces, de 5 a 30 veces, de 5 a 20 veces, de 3 a 20 veces, de 5 a 10 veces, de 3 a 10 veces o de 3 a 5 veces en la producción del polipéptido diana en comparación con la de la población heterogénea de células productoras en (a) (p. ej., una mejora de 3 a 30 veces, de 5 a 30 veces, de 5 a 20 veces, de 3 a 20 veces, de 5 a 10 veces, de 3 a 10 veces, de 3 a 5 veces o de 1,2 a 5 veces en comparación con la producción promedio del polipéptido diana en la población heterogénea de células productoras).

#### IV. MÉTODOS PARA AUMENTAR LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS DESPUÉS DE FACS

Otros aspectos de la divulgación, que no se incluyen en las reivindicaciones adjuntas, se refieren a un método para aumentar la viabilidad de las células después de la clasificación de células activada por fluorescencia (FACS). En algunos casos, el método comprende usar un primer ciclo de FACS para seleccionar en función de un marcador de viabilidad una primera subpoblación de células de una población de células que expresan un polipéptido diana, y usar un segundo ciclo de FACS para seleccionar en función del marcador de viabilidad una segunda subpoblación de células de la primera subpoblación de células, en donde el primer ciclo y el segundo ciclo de FACS se producen en un intervalo de 8 horas (p. ej., en un intervalo de 8, en un intervalo de 7, en un intervalo de 6, en un intervalo de 5, en un intervalo de 4, en un intervalo de 3, en un intervalo de 2 o en un intervalo de 1 hora, o en un intervalo de 60 minutos o en un intervalo de 30 minutos) entre sí.

En algunos casos, el marcador de viabilidad es una diferenciación de población de dispersión frontal/dispersión lateral y/o una tinción con yoduro propidio.

En algunos casos, la segunda subpoblación tiene una mejora de la viabilidad después de la clasificación de 1,2 a 4 veces, de 2 a 4 veces o de 3 a 4 veces en comparación con la viabilidad posterior a la clasificación de la subpoblación inicial.

En algunos casos, la viabilidad de las células sometidas al método es superior al 75 %, superior al 80 %, superior al 85 % o superior al 90 % de viabilidad (p. ej., el 90 % de las células contienen o presentan el marcador de viabilidad después de la realización del método).

- 5 En algunos casos de uno cualquiera de los métodos, el método comprende además expandir la segunda subpoblación. En algunos casos de uno cualquiera de los métodos, el método comprende además cultivar individualmente células de la segunda subpoblación con el fin de generar una o más poblaciones clonales. En algunos casos, el método para aumentar la viabilidad de las células después de la clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) se realiza después de un método de selección por lotes como se describe en el presente documento (véase, p. ej., la sección II anterior). En algunos casos, las células expresan un polipéptido diana y un marcador seleccionable por FACS como se describe en el presente documento. En algunos casos, el método comprende además aislar el polipéptido diana.

15 Resultará evidente para los expertos en la técnica que se pueden realizar otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de los métodos descritos en el presente documento utilizando equivalentes adecuados. Habiendo descrito ahora determinadas realizaciones en detalle, las mismas se entenderán más claramente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen únicamente con fines ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

### EJEMPLOS

20 Los siguientes ejemplos son ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes de la invención.

#### EJEMPLO 1: INTRODUCCIÓN A LA TECNOLOGÍA FLARE

25 FLARE (del inglés *FLow cytometry Attenuated Reporter Expression*, expresión de indicador atenuada con citometría de flujo) es un proceso de generación de líneas celulares utilizado previamente para 1) clasificación celular para aislar clones y 2) cribado de clones (véase, p. ej., Cairns, V. *et al.* (2011) Utilization of Non-AUG Initiation Codons in a Flow Cytometric Method for Efficient Selection of Recombinant Cell Lines. *Biotechnol Bioeng* 108(11):2611-2622). En el sistema FLARE, un marco abierto de lectura (ORF) indicador de superficie celular que utiliza un codón iniciador sin ATG se ubica inmediatamente cadena arriba de un gen que codifica un ORF proteico de interés (p. ej., un anticuerpo o proteína de fusión de interés). Los dos ORF se transcriben como un único ARNm pero se traducen independientemente (FIG. 1). Sin desear quedar ligados a teoría alguna, los ribosomas de lectura reconocen el codón iniciador distinto de AUG a una frecuencia muy baja (UUG tiene aproximadamente el 1 % de la capacidad de inicio en comparación con AUG), mientras que la mayoría de los ribosomas continúan leyendo hasta el codón iniciador AUG primario de la proteína de interés. Esto da como resultado una expresión de bajo nivel del indicador de superficie celular y una expresión de nivel relativamente alto de la proteína de interés. El ARNm bicistrónico que contiene 2 ORF garantiza que la expresión del indicador de la superficie celular sea predictiva de la expresión de la proteína de interés.

35 Las células que expresan una proteína de interés con el sistema FLARE se evalúan mediante citometría de flujo para determinar los niveles de un indicador de la superficie celular (CD52 en este ejemplo) que son predictivos de los títulos de proteína de interés. Las células se tiñen con mAb anti-CD52 de FITC y se adquieren en un citómetro de flujo. Las células que expresan proteína de interés tendrán un nivel de expresión de indicador que se puede visualizar en una superposición de histogramas y medirse en unidades de fluorescencia relativas (URF, FIG. 2).

45 El sistema FLARE también se puede utilizar con un clasificador de células para identificar y aislar células individuales de alta expresión de una población de expresión diversa que se recogerá como un grupo enriquecido a granel o se sembrará como células individuales en un formato de placa de 96 pocillos (FIG. 3 y FIG. 4). La clasificación puede evaluar y recoger millones de células en un periodo corto de tiempo, lo que lo convierte en un método de rendimiento extremadamente alto. Las células enriquecidas clasificadas se pueden recoger como una población posterior a la clasificación y evaluar su enriquecimiento y viabilidad.

50 Los clones generados por clasificación con FLARE producen un grupo de clones con una mayor frecuencia de productores elevados que las metodologías de clonación por dilución limitante. Los clones generados por FLARE tienen una amplia gama de productividad, mostrando los clones de expresión la expresión más robusta del indicador (FIG. 5). Por lo tanto, los clones individuales se pueden evaluar muy temprano (en la etapa de expansión de la placa de 96 pocillos) utilizando el sistema de FLARE para eliminar los clones menos productivos en una etapa de cribado basada en la expresión del indicador.

#### EJEMPLO 2: CLASIFICACIÓN RÁPIDA A GRANEL MEDIANTE FLARE

60 Utilizando la tecnología de FLARE analizada en el ejemplo 1, se generaron varios tipos de células enriquecidas a granel dirigiéndose a un gran porcentaje superior (5-20 % superior) de células transfectadas con una cantidad de recolección alta (500 000-3 millones de células) para una expansión rápida a una población productora más alta (FIG. 6). Estas clasificaciones de % más grandes (p. ej., 5 %, 10 %) permiten recoger rápidamente un mayor número de células enriquecidas y expandirlas a poblaciones sanas, que a su vez se pueden utilizar para la producción o para generar clones. Los métodos utilizados anteriormente para aumentar la productividad del polipéptido diana dependían del uso de cantidades crecientes en serie de metotrexato (MTX) para seleccionar células que expresaban niveles altos

de DHFR (véase el proceso menos riguroso o proceso de selección directa en la FIG. 6). La selección de células que expresan niveles altos de DHFR aumenta la probabilidad de que la proteína de interés también se exprese a un nivel alto. La selección de MTX, desafortunadamente, es un proceso bastante lento que generalmente tarda al menos 50 días en generar grupos que expresan la proteína de interés a un nivel alto (FIG. 6, proceso menos riguroso o proceso de selección directa) adecuado para su uso para generar clones. Por el contrario, utilizando la clasificación por FACS y el sistema FLARE con selección mínima o sin selección (véase el proceso EPIC, proceso rápido a granel independiente de MTX o proceso rápido a granel en la FIG. 6), se puede lograr un método más rápido y productivo de generar poblaciones celulares que se enriquecen para una mayor expresión de la proteína de interés. Estas poblaciones de células enriquecidas son útiles para la generación de clones para la fabricación a gran escala de productos biológicos y también para el suministro temprano por lotes de productos biológicos, p. ej., para realizar pruebas preliminares de candidatos clínicos potencialmente relevantes.

Para la clasificación rápida a granel, se transfectaron células hospedadoras parentales CHO 8D6 DXB11 sin ADC mediante electroporación con un vector de FLARE pGZ729 que codificaba una cadena pesada de IgG o una proteína de fusión Fc como se ha descrito anteriormente (Cairns, V. *et al.* (2011) Utilization of Non-AUG Initiation Codons in a Flow Cytometric Method for Efficient Selection of Recombinant Cell Lines. *Biotechnol Bioeng* 108(11):2611-2622). Cada vector de FLARE contenía dos ORF impulsados por un solo promotor de beta-actina cadena arriba de los dos ORF y un único sitio de poliadenilación de SV40 cadena abajo de los dos ORF. En cada vector de FLARE, el ORF cadena arriba codificaba un gen indicador CD52 con un codón iniciador UUG. El gen indicador CD52 se optimizó adicionalmente modificando todos los codones de inicio AUG internos en cualquier marco y todos los codones iniciadores internos distintos de AUG en un contexto de Kozak en cualquier marco dentro del ORF CD52. El codón iniciador AUG de CD52 se reemplazó con un único codón iniciador distinto de AUG (UUG) en una secuencia de consenso de Kozak. El ORF cadena abajo codificaba una cadena pesada de IgG o una proteína de fusión sFc con un codón iniciador AUG. El vector de FLARE que codifica la cadena pesada de IgG se cotransfectó en las células CHO con un segundo vector que codifica una cadena ligera de IgG para producir un anticuerpo monoclonal (mAb). Cada vector de FLARE contenía además un casete de expresión de dihidrofolato reductasa (DHFR) independiente. Las poblaciones celulares se seleccionaron antes de la clasificación rápida a granel mediante tratamiento en MTX 5 nM o 50 nM, lo que eliminó células que no se expresaban o tenían una expresión de bajo nivel de DHFR.

A continuación se muestra la secuencia principal del vector de FLARE pGZ729, seguida de anotaciones de la secuencia.



tggaaaaacgttcttcggggcgaaaaactctcaaggatcttaacggctgttgagatccagttccgatglaacccactc  
 gtgcacccaactgatcttcaggcatcttttactttcaaccagcgtttctgggtgagcaaaaaacaggaaggcaaaatg  
 ccgcaaaaaaggggaataaagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttccctttttcaatatttattgaaqca  
 tttatcaggggttattgtctcatgagcggatatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaatagggggtccgc  
 gcaatttcccggaaaagtgcacactgacgtctaaagaaccattattatcatgacattaaacctataaaaataggg  
 gtatcacgaggccctttcgtcttcaagaattggggacaagacagaaccataagccagtgaggatagatcagaat  
 gttccagagggtgggatggggccagagtgctgccccttgaaccgtcccagggaccagagggtgacaaagtggcaac  
 acaggtccctgctgggaatctggctctgctcctacttagtaaggtgcctggctgtaacacaagcagggcccactta  
 tccctgcacccctgggtagggtggcgtctctcccctgcagccaccaggctcccctgagaacactgccggcagt  
 cctcattgacaggcagttatcggctctgccccaccccactgtgaattgcagggtggcaggtcctcaggcagct  
 ggcacaaccgctgaaacaactgagagatcacgggcccaggggccagggcagtccctgccccggaggccagggagggga  
 cgtgctgggaaagtctctctctctcaggccagggttgggtgactgcagaaggctctgtcaaatctcttttggggga  
 accacagagtagccctgaacgtgggggtgctcttccagtabactctgggggtcacccttcccatactggaggcctc  
 tgoaaccttcaaaatgctctgctaccaacctagcaaacggaaagtgggtccagcctcccacgcaggggccactgctg  
 cagtcacatataaggactaagccctccctgggtttcaaacactacactcactgagccctactctgtgtatgcaqag  
 ccgagacagggccctgagcatctcatctgaagcaccctcttggcctaacttcagttttctgtcactttctccagg  
 aggtgtgtgctccctcaagctaaagccagggtcccctcaaccctgcccactcccataccctagtgtaggtatcagc  
 tgaagagcttctgagcagaacactcttgggtgctgacattttgataaataggcccatgtttaggagagcagggg  
 tccggggggcgggagatctctctctgggtggattgagggctccaagaactactctttgaggcagctgcccctcccaga  
 gtccccacagcctccagatggactagaacacagttggcctgtgggtgcacataactaacagaggatagatgggtgg  
 gtcccagcccacagtgccctggcaatcaccacagagccaccagctaacggccttggcttagttttttgctgggtg  
 tgatcaggcagcctccaaaactgcccggactccatgacaagttttggcttctctatagagcagagttcctttct  
 aggtctggggcaaggacatcggggagacatcttccctgcaacagctccagtcactggaccaccaggctcgcctgt  
 ctttgggtgtgaggccctgagtcctccaaagtggcccaaacctgtgaagaccctccaaaccacagttttgctctctaa  
 abtgtaccccacaacactagcaaatgaaaccccacagaaagtcccacagatctggcttccggctcttctgctgg  
 caagggggagtgactccggcccactcaactccagcccggcgtgttccctcaaacagaagcagctaaacataaaa  
 ccgagcctccatgctgacccctgcccctagaggtaactcaatgttccagtgatatacaaccccagaggggtcctggg  
 gtgggtgcaltgagcccagaatgcaggcttgataaccagagaccctgaatcgggcagtgctccacaggggcggagcc  
 cagtcactgcatgttcgggctctatggggccagcaaccccacgcaaaaactctccatctctctccctcaatctcgtctt  
 ctctctctctctctcttt  
 ctgtcggcctaggccgggtgagtgagcgggcggggagccaatcagcgtcgcgcgttccgaaaagttgcttttatggc  
 tccagtgggcgtgtggcgtccatataaaaccccggggcgcaacgcgcagccactgtccagtcgcgcgtcccccgc  
 gagcacaagccttccagcgtctttctccgcgtccacaccggccaccaggttaagcagggacaacagggcccagc  
 ccggccacagccctccggggcagtgaccgcctgcaggggtcgcgggggacactcgggcgggacaaccgggggaag  
 ctggagggtgggtgcccggccggcggagcggcactttcagatccaaactttcagtcacagggtgtagaccctttacag  
 ccgcaattgccacggtgtagacaccggtggaccocctctggctcagagcagcggcttgggggaacccattaggggt  
 ccgagtggtgggctatgagagccgatgcagctttcgggtgttgaaccgtatctgcccaccttggggggaggaca  
 caaggtccggagccaaaagccacgatcatgcttgggtggcccctgggtctcttcttctaaacccggttttggccattt  
 gcttgcggggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcgggcgggc  
 tatggctgggtattggggcggctgcagcctggggaggggagcccttccctctcccccctctcccaagttaaacttgc  
 ggtgcttatgtgagacttggagcggcggccaccgggttggggcagggcggggcgggttggccggaagggggcgggt  
 ccgagcggcttccggggcggctgctcggcctctccctgctgggtgtgggtggcctccggcggcggcactagccgcggc  
 ccggggggcgaaggcgggggttgcggccgtttggggaggggggcggaggcctggcttccctgctggggcggcctc  
 cggaccagcgtttgctcttatggttaataacggccggccctgggttcccttctgctccctgagtttgggcggcgg  
 cccctggcggcccgaggccggcggcttgcgggaagtgggcaggggcggcagcggctgcccctagtggcccggctagt  
 gaccgcgaccctcttttctgctccatagatagttgcgggatccctaacggcgttagcggcggcggccacttggagcc  
 ctccctcttccctctacccaccatcagcctccctgggtttgggtacaaatacaaaaccggactctccggacaaaacga  
 caccagccaaaaccagcagccctcagcatccagcaacataaagcggaggcattttccctttcttctgctgcccacgc  
 cataatccacctctctctgcttcagttgaaaggccggccaatcagtagggcggccattgagtgagtgatttggcggc  
 ccaagatatacaaccccggatataaagggtacctaacggtagaattccacgtagtggtttaaactctagatcac  
 cccttgaacctgaaacataaaaatgaatgcaattgcttgggtggttaacttggtttatggcagcttataatgggtacaa  
 ataaagcaatagcatcaaaatttcaaaaataaaqcaattttttccactgcatctagttgtgggtttgtccaaact  
 catcaatgtatcttatcagct

**Elementos del vector de expresión pGZ729 (y ubicaciones de nucleótidos):**

- 5 Nucleótidos 1-325 - promotor temprano de SV40 (para transcripción de DHFR)
- Nucleótidos 347-1089 - marco abierto de lectura de la dihidrofolato reductasa (DHFR)
- Nucleótidos 1090-1934 - intrón y poliA tempranos de SV40
- 10 Nucleótidos 2684-3366 - origen de *E. coli* ColE1

Nucleótidos 3464-4123 - gen de resistencia a ampicilina

Nucleótidos 4528-7539 - promotor de  $\beta$ -actina de hámster (para la transcripción del gen de interés)

Nucleótidos 7568-7753 - marco abierto de lectura de CD52 (que contiene el codón iniciador TTG)

Nucleótidos 7781-7791 - codones de parada en cada uno de 3 marcos de lectura

Nucleótidos 7813-7872 - sitio de clonación múltiple (para la inserción del polipéptido diana con codón iniciador ATG)

Nucleótidos 7882-8123 - poliA temprana de SV40

La clasificación rápida a granel se llevó a cabo de la siguiente manera y se ilustra en la FIG. 7:

1. Se identificó un grupo de candidatos con un perfil de expresión de indicador adecuado (grupo antes de la clasificación)
2. El % superior de células que expresan el indicador en el grupo antes de la clasificación se dirigió a la recogida de FACS (entre el 5 y 20 %)
3. Se recogió un gran número de células clasificadas como una población enriquecida a granel ( $0,5-5,0 \times 10^6$  células)
4. El grupo clasificado a granel se expandió rápidamente a una población sana y enriquecida (en tan solo 1 semana)
5. Se evaluó la productividad del grupo rápido a granel (refuerzo del título del polipéptido diana sobre el grupo antes de la clasificación)

En un conjunto de experimentos, se evaluó la relación entre diferentes % de corte del indicador (detectados por FACS) frente a niveles de enriquecimiento de títulos del polipéptido diana utilizando una proteína de interés del anticuerpo monoclonal (mAb) (un polipéptido diana de mAb) o una proteína de fusión Fc de interés (un polipéptido diana de fusión Fc). No estaba claro si dirigirse a un intervalo más amplio de células con una expresión de indicador más baja (p. ej., el 5-20 % superior) también produciría enriquecimientos significativos en la población resultante. Era posible que después del enriquecimiento de clasificación, las células productoras inferiores (que pueden tener tasas de crecimiento más rápidas que las células productoras superiores) pudieran superar a una población en una dinámica de agrupación y, por lo tanto, dar lugar a un grupo con una productividad inferior a la deseada. Se teorizó que se debe lograr un equilibrio: dirigirse a un porcentaje lo suficientemente grande como para recoger muchas células rápidamente, pero no tan grande como para capturar células productoras inferiores que podrían afectar negativamente al grado de enriquecimiento. Por lo tanto, el objetivo de estos experimentos era comprender la relación entre los niveles de enriquecimiento alcanzables para los diferentes porcentajes de clasificación que se estaban seleccionando. Los resultados muestran que la clasificación para el 10 % superior y el 5 % superior de las células que expresan el indicador dio lugar a un enriquecimiento de la productividad similar al de la clasificación del 1 % superior con alta rigurosidad. En particular, se mostró que cada uno del 10 % superior, el 5 % superior y el 1 % superior del grupo antes de la clasificación era capaz de producir un grupo que tenía hasta 4 veces más título de polipéptido diana que el grupo antes de la clasificación seleccionado inicialmente con un nivel bajo de MTX (FIG. 8 y tabla 1).

**Tabla 1: Diferente % de corte para la clasificación frente al título de un polipéptido diana de mAb**

CLASIFICACIÓN	N.º de células clasificadas	Tiempo de expansión*	Título del mAb
Antes de la clasificación	NA	NA	104 mg/l
10 % superior	500 000 células	9 días	397 mg/l
5 % superior	500 000 células	9 días	415 mg/l
1 % superior	50 000 células	16 días	335 mg/l

\* tiempo desde la clasificación para producir una población celular que contiene una serie de células adecuadas para congelarse, establecer un cultivo por lotes y/o volver a clasificar ( $60-80 \times 10^6$  células)

Estos datos sugirieron que las dianas de porcentajes superiores grandes se pueden clasificar con éxito para recoger grandes cantidades de células dentro de una única clasificación para una rápida expansión del grupo resultante, que mantuvo un nivel muy alto de enriquecimiento. La velocidad de esta metodología se demostró además repitiendo las

clasificaciones que se dirigían al 10 % superior con un número aún mayor de células recogidas (1,3 millones), de las cuales se amplió con éxito un grupo más productivo en solo 7 días (FIG. 8).

Se logró un alto nivel de enriquecimiento gracias a este tipo de clasificaciones a granel rápidas. La clasificación rápida a granel de un grupo que expresaba mAb que producía solo 100 mg/l demostró una mejora de 4 veces en la productividad del grupo en tan solo 7 días (FIG. 8, segunda clasificación del 10 % superior). Asimismo, un grupo ya muy productivo que expresaba una proteína de fusión Fc a 700 mg/l se enriqueció en un 20 % en el mismo periodo de tiempo (FIG. 8). Estos resultados demostraron que la clasificación rápida a granel con el sistema de FLARE fue 1) factible, 2) rápida (limitada solo por el número de células que se pueden clasificar y la recuperación de la población posterior a la clasificación) y 3) muy productiva. También se mostró que esta clasificación rápida a granel funciona tanto con mAb como con una proteína de fusión Fc y fue exitosa para grupos de iniciación tanto de alta como de baja productividad.

Ver un enriquecimiento tan robusto a partir de un solo ciclo de clasificación a granel condujo a la pregunta de si se necesitaba MTX en absoluto y, en particular, si MTX impulsaba ("amplificaba") la expresión en estas células o simplemente destruía las células de baja producción. Se planteó la hipótesis de que si MTX sirve principalmente para destruir las células productoras inferiores, entonces los enriquecimientos de clasificación rápida a granel mediante FLARE podrían proporcionar una metodología más eficiente (más rápida y al menos igual de productiva) y menos intrusiva para aumentar la productividad de las poblaciones celulares. En otras palabras, las clasificaciones secuenciales que generan una serie de grupos rápidos a granel pueden ser un vehículo para impulsar la expresión en un grupo independiente de MTX. Esta clasificación secuencial puede utilizar la siguiente metodología, que se ilustra en la FIG. 9:

1. Generar un grupo de arranque antes de la clasificación por transfección y selección con nivel bajo de MTX (5 nM) (la selección también se podría lograr utilizando solo medio deficiente en nucleótidos (MTX 0 nM))
2. Clasificación rápida a granel (10 % superior) para generar un grupo estable con expresión mejorada
3. Repetir (secuencialmente) la clasificación rápida a granel (10 % superior) para generar otro grupo estable con expresión mejorada adicional

Esto crea en la práctica una metodología de clasificación secuencial que se centra en aislar las células de baja frecuencia y alta producción de una población diversa. Esto reemplazaría esencialmente la función del MTX para eliminar células productoras bajas (por muerte celular) usando la clasificación celular el sistema de FLARE para ignorar selectivamente las células productoras bajas y aislar solo las productoras altas para un crecimiento continuo (es decir, el enriquecimiento de la población celular con respecto a productoras altas).

Se estableció un experimento demostrativo preliminar para probar esta metodología de clasificación a granel rápida secuencial utilizando tres grupos de MTX 5 nM, expresando cada uno una molécula diferente (mAb n.º 1, mAb n.º 3 y fusión sFc n.º 2). Cada grupo se clasificó rápidamente a granel, dirigiéndose al 10 % superior, y se expandió en 9-12 días, y a continuación se volvió a clasificar rápidamente a granel (secuencial), dirigiéndose al 10 % superior y se expandió rápidamente. Los grupos resultantes se establecieron en cultivos discontinuos para evaluar el título del polipéptido diana. La FIG. 10 muestra la expresión del indicador (superposiciones de histogramas de citometría de flujo) y el título del polipéptido diana para cada grupo enriquecido en la clasificación con respecto al grupo inicial 5 nM. Los datos muestran que es posible enriquecer secuencialmente la expresión mediante clasificación rápida a granel repetitiva.

Para permitir una comparación con un procedimiento de selección de MTX "tradicional" para la generación de grupos de alta producción, cada grupo 5 nM inicial también se sometió a dos ciclos adicionales de selección con MTX (50 nM y 250 nM; FIG. 11 y 15). Como se muestra en las FIG. 11 y 15, no solo las clasificaciones rápidas a granel secuenciales lograron títulos significativamente mejores de polipéptidos diana que las selecciones con MTX 50 nM y 250 nM, sino que cada clasificación rápida a granel (con la excepción de mAb n.º 3 RG n.º 1) se generó 2-3 veces más rápido que cada ciclo correspondiente de amplificación con MTX.

El grado significativo de mejora con respecto a la selección con MTX fue inesperado y sugirió de nuevo que el MTX no era tan críticamente importante para la amplificación de la expresión como se creía anteriormente. Se planteó la hipótesis de que las poblaciones enriquecidas a granel rápidas clasificadas secuencialmente pueden verse menos afectadas por una concentración de MTX más alta debido a sus enriquecimientos significativos de expresión génica. Para probar esto, cada grupo a granel rápido se sembró en medio de cultivo con MTX 50 nM y se comparó la viabilidad del cultivo con la del grupo inicial con MTX 5 nM sembrado en el mismo medio MTX 50 nM. Los resultados se muestran en las FIG. 12-14.

Aunque se planteó la hipótesis de que habría alguna resistencia de los grupos a granel rápidos a MTX 50 nM, los grupos a granel rápidos para fusión sFc n.º 2 y mAb n.º 3 mostraron poco o ningún impacto de MTX 50 nM en absoluto (FIG. 12 y 14). Para el mAb n.º 1, disminuyó la viabilidad del primer grupo a granel rápido de manera similar al grupo de partida de MTX 5 nM, pero comenzó a recuperarse antes que el grupo de 5 nM, y disminuyó la viabilidad del

segundo grupo a granel rápido, pero se vio significativamente menos afectado por MTX 50 nM en comparación con el grupo de MTX 5 nM (FIG. 13). Estos resultados son una prueba sólida de que la amplificación con MTX no es necesaria para amplificar la expresión de grupos y que tal vez su función sea simplemente la de destruir células productoras inferiores.

Los clones se generaron a partir de grupos amplificados con MTX (MTX 5 nM y 50 nM) y de grupos rápidos a granel (RG n.º 1 y RG n.º 2) que expresaban mAb n.º 1 para evaluar comparativamente las productividades. Los clones se generaron utilizando FLARE como se ha descrito anteriormente (véase, p. ej., Cairns, V. *et al.* (2011) Utilization of Non-AUG Initiation Codons in a Flow Cytometric Method for Efficient Selection of Recombinant Cell Lines. *Biotechnol Bioeng* 108(11):2611-2622). En resumen, se utilizó FLARE para aislar y sembrar en células individuales el 1-3 % superior de las células que expresan el indicador de cada grupo utilizando FACS. A continuación, se examinaron los clones expandidos (tomando el 25-30 % con mayor expresión positiva), utilizando de nuevo FLARE, para identificar solo los clones de nivel superior para expandir para la evaluación del título del polipéptido diana. Como se muestra en la FIG. 22, la clasificación rápida a granel generó clones a partir de los grupos RG n.º 1 y RG n.º 2 que expresaban mAb n.º 1 que eran comparables a los generados a partir de grupos amplificados con MTX 5 nM y 50 nM. Los títulos máximos de clones rápidos a granel se lograron a 1,4 g/l y 1,6 g/l para RG n.º 1 y RG n.º 2, respectivamente. Los títulos máximos de clones amplificados con MTX se lograron a 1,2 g/l y 1,9 g/l para 5 nM y 50 nM, respectivamente. Mientras que el rendimiento máximo de clones y la frecuencia de los productores superiores fueron ligeramente mayores en los clones generados con MTX 50 nM, se cree que los clones generados a granel rápidos pueden demostrar un perfil más robusto en estudios de estabilidad, ya que las concentraciones de MTX utilizadas son 10 veces más bajas y se eliminan durante el proceso de clonación.

En conclusión, se mostró que la clasificación a granel rápida secuencial de grupos de MTX 5 nM es una alternativa viable a un proceso de selección directa utilizando MTX. Se mostró que la clasificación secuencial rápida a granel era más rápida (diferencia en el plazo de hasta 2-3 semanas), que utilizaba menos MTX (lo que potencialmente daba lugar a clones más robustos y estables), que era más productiva (se lograron títulos significativamente mejores de los grupos de los polipéptidos diana) y que funcionaba con 3 polipéptidos diana diferentes (2 mAb diferentes y una proteína de fusión Fc).

### 30 EJEMPLO 3: CLASIFICACIÓN RÁPIDA A GRANEL SECUENCIAL TOTALMENTE INDEPENDIENTE DE MTX

A continuación, se probó un método de volumen rápido totalmente independiente de MTX. Los grupos iniciadores de la prueba expresaron una proteína de fusión Fc (FsFc n.º 2). Se establecieron dos grupos iniciadores mediante la selección inicial de células transfectadas con medios deficientes en nucleótidos (medio CD CHO, Gibco, Life Technologies, número de catálogo 10743) complementados con glutamina (es decir, MTX 0 nM) durante 21 días. En este proceso, las células transfectadas de manera estable se colocaron en un medio deficiente en nucleótidos para una selección de menor rigurosidad del casete de expresión de DHFR. La selección inicial deficiente en nucleótidos sin MTX generalmente produce grupos de expresión más bajos en marcos temporales ligeramente más cortos (generalmente esto no se prefiere en plataformas de expresión de MTX convencionales porque genera un mayor porcentaje de células con menor expresión que, con el tiempo, es necesario eliminar en ciclos posteriores de amplificaciones con MTX).

Para la primera clasificación, el grupo de MTX 0 nM se clasificó a granel rápidamente (10 % superior) y se recogieron  $3-4 \times 10^6$  células como Rápida a granel n.º 1. Se permitió que la población celular de Rápida a granel n.º 1 se expandiera durante 8 días y después se volvió a clasificar como se describe a continuación y se estableció como un cultivo discontinuo para la evaluación del título de polipéptidos diana y para el análisis por FACS de la expresión del indicador. Para la segunda clasificación, el grupo de Rápida a granel n.º 1 se clasificó a granel rápidamente (10 % superior) y se recogieron  $3-4 \times 10^6$  células como Rápida a granel n.º 2. Se permitió que la población celular de Rápida a granel n.º 2 se expandiera durante 8 días y después se estableció como un cultivo discontinuo para la evaluación del título de polipéptidos diana y para el análisis por FACS de la expresión del indicador. Este proceso se realizó para el segundo grupo de MTX 0 nM, lo que dio lugar a dos poblaciones Rápida a granel n.º 1 y n.º 2 separadas.

Como se muestra en las FIG. 16 y 17, 2 ciclos de clasificación rápida a granel después de la selección con un medio deficiente en nucleótidos (MTX 0 nM) generaron grupos que produjeron 0,51 g/l y 0,64 g/l (en cultivo discontinuo sin aportación) en solo 16 días, en comparación con la productividad de 0,17 g/l del grupo de MTX 0 nM antes de la clasificación. Para poner estos resultados en contexto con la selección con MTX, estos mismos dos grupos de MTX 0 nM también se amplificaron con MTX por separado utilizando el paradigma de amplificación convencional (MTX 0 nM, seguido de MTX 20 nM, después seguido de MTX 100 nM). Ambos grupos tardaron 21 días en completar la selección con MTX 20 nM mientras que solo produjeron ganancias modestas en el título del polipéptido diana hasta poco más de 0,2 g/l (FIG. 17). Cuando se amplificó adicionalmente hasta MTX 100 nM, tardando 23 días más para la selección, en un grupo disminuyó la expresión y en el otro solo aumentó la productividad hasta 0,31 g/l (FIG. 17). En otras palabras, la productividad de los grupos seleccionados con MTX ni siquiera superó la del primer grupo rápido a granel generado a partir del grupo de partida respectivo.

En este momento, los datos mostraron que se podían generar grupos muy productivos con esta nueva metodología, que también se podría utilizar para la producción de material en las primeras etapas del desarrollo de un producto

biológico proteico clínico. La siguiente cuestión era si los clones que estos grupos podrían generar superarían a los clones generados con MTX. Para probar esto, se seleccionaron el mejor grupo independiente de MTX y dos de los mejores grupos seleccionados con MTX para generar clones (grupos indicados por asteriscos en la FIG. 17). Los clones se generaron utilizando FLARE como se ha descrito anteriormente (véase, p. ej., Cairns, V. *et al.* (2011) Utilization of Non-AUG Initiation Codons in a Flow Cytometric Method for Efficient Selection of Recombinant Cell Lines. *Biotechnol Bioeng* 108(11):2611-2622). En resumen, se utilizó FLARE para aislar y sembrar en células individuales el 1 % superior de las células que expresan el indicador de cada grupo utilizando FACS. A continuación, se examinaron los clones expandidos, utilizando de nuevo FLARE, para identificar solo los clones de nivel superior para expandir para la evaluación del título del polipéptido diana. Como se muestra en las FIG. 18 y 19, los clones independientes de MTX produjeron hasta 2,3 g/l en lotes sin aportación. La FIG. 18 también muestra que la eficiencia de clonación y la capacidad de supervivencia de los clones fueron mayores en la clasificación independiente de MTX.

En conclusión, estos resultados muestran que el método rápido a granel totalmente independiente de MTX es una alternativa muy atractiva a la selección directa con MTX. El método rápido a granel totalmente independiente de MTX fue más rápido (con un ahorro de plazo de hasta 4 semanas y sin necesidad de retirar el MTX antes de la clasificación), se realizó sin el uso de MTX y fue más productivo (títulos de grupos más altos en comparación con los grupos de MTX y clones de títulos altos comparables o ligeramente mejores que los clones seleccionados con MTX).

Un sistema de generación de líneas celulares independiente de fármacos tiene muchas implicaciones. En primer lugar, estos resultados son sorprendentes en vista del dogma aceptado desde hace mucho tiempo de que se requiere MTX para impulsar la expresión de DHFR en algunas líneas de CHO. En segundo lugar, si los enriquecimientos de clasificación de lotes utilizando FLARE pueden extraer células raras, de baja frecuencia y con alta expresión al tiempo que evitan un sistema de selección farmacológica como MTX/DHFR, se espera que esta metodología también funcione para otros sistemas de selección por fármacos como el sistema MSX/GS. En tercer lugar, se plantea la hipótesis de que la eliminación de DHFR de los casetes de expresión de FLARE puede permitir una verdadera independencia de un marcador seleccionable que está vinculado a la supervivencia celular. Obtener este nivel de independencia de los sistemas de selección por fármacos también puede desatar por completo el sistema de expresión de células CHO y abrir una caja de herramientas mucho más amplia de células hospedadoras animales.

#### 30 **EJEMPLO 4: AISLAMIENTO TEMPRANO DE LAS CÉLULAS DESPUÉS DE LA TRANSFECCIÓN (EPIC)**

A continuación, se exploró la viabilidad de un método de clasificación que tiene como objetivo dirigirse a una población de expresión temprana transfectada no seleccionada para el enriquecimiento antes de la selección. Este método de clasificación se denomina "clasificación corta" o EPIC (del inglés *Early Post-transfection Isolation of Cells*, aislamiento temprano de las células después de la transfección) y está diseñado para clasificar-aislar o enriquecer a granel la expresión temprana del indicador poco después de la transfección. EPIC puede reducir significativamente los plazos de selección y/o mejorar la productividad de la población heterogénea resultante.

Se han realizado experimentos para investigar el perfil de expresión de indicador de una población transfectada a lo largo de un proceso de selección deficiente en nucleótidos. La FIG. 29 representa un esquema general para EPIC. La FIG. 20 muestra la expresión temprana aparente del gen indicador durante el proceso de selección deficiente en nucleótidos. Estos histogramas de compensación demuestran que la expresión temprana (p. ej., día 3-4) es positiva y clasificable; lo que hace factible aislar una subpoblación de células transfectadas para un proceso EPIC.

Como se muestra en la FIG. 29, EPIC puede ejecutarse transfectando una población y permitiendo que se desarrolle una expresión temprana, que puede ser objetivo de aislamiento utilizando la clasificación por citometría de flujo. Estas poblaciones de expresión temprana aisladas por clasificación se pueden colocar a continuación en un medio de selección para establecer un grupo de expresión estable. El aislamiento antes de la selección de estas poblaciones de expresión temprana después de la transfección produce una mejora de la productividad con respecto a las metodologías convencionales de transfección/selección por sí solas.

Para demostrar el concepto de que la señal de CD52 detectada es de hecho la expresión temprana del indicador de CD52, se construyeron y transfectaron vectores que expresan tanto RFP como CD52 (pGZ729-RFP) y solo RFP (pGZ700-RFP) para la evaluación de la expresión temprana. Como se muestra en la FIG. 23, las células CHO transfectadas con pGZ729-RFP produjeron una expresión temprana de CD52 y RFP que alcanzó su máximo en torno a los días 2 y 3, deteriorándose la señal hasta el día 7 después de la transfección. Por lo tanto, el direccionamiento de EPIC en o cerca de estos días es adecuado para el aislamiento de subpoblaciones de expresión temprana de células hospedadoras transfectadas. Para demostrar que estas señales de intensidad baja eran de hecho expresión de CD52, se analizaron células CHO transfectadas con pGZ729-RFP o pGZ700-RFP para determinar la expresión de RFP y CD52. Como se muestra en la FIG. 24, tanto las células CHO transfectadas con pGZ729-RFP como las células CHO transfectadas con pGZ700-RFP expresaron robustamente RFP (parte superior izquierda e inferior izquierda, respectivamente), mientras que las células CHO transfectadas con pGZ729-RFP tuvieron una expresión modesta de CD52 (parte superior derecha), y las células CHO transfectadas con pGZ700-RFP esencialmente no expresaron ningún CD52 detectable (parte inferior derecha). Estos datos respaldan la noción de que estas señales de intensidad de fluorescencia de grado relativamente bajo eran de hecho expresión de CD52 del casete de expresión de inicio alternativo y son dianas adecuadas para el aislamiento por clasificación (EPIC). Como validación adicional de

concepto, la expresión temprana de RFP fue diana EPIC de una población transfectada utilizando pGZ729-RFP para luego generar un grupo estable. La expresión temprana de RFP fue diana del aislamiento por clasificación y la recogida dos días después de la transfección (transitoriedad máxima). A continuación, se utilizó la subpoblación positiva para RFP generada por EPIC para establecer un grupo estable mediante selección en medios deficientes en nucleótidos con MTX 0 nM. También se generó un grupo de transfección/selección convencional para que actuara como control comparativo. Como se muestra en la **FIG. 28**, el grupo generado por EPIC (que se dirigió a la expresión temprana de RFP) produjo un grupo estable (grupo EPIC) con mayor expresión de indicador de RFP y CD52 que la metodología tradicional de transfección/selección por sí sola (grupo de 0 nM). Los resultados demuestran una validación de concepto independiente de FLARE que respalda la afirmación de que los grupos generados por EPIC son más productivos que las metodologías tradicionales de transfección/selección.

EPIC se intentó inicialmente utilizando el mAb n.º 1 en el que se transfectaron células CHO y se les dejó recuperarse durante 2 días, después de lo cual se inició la selección con MTX 0 nM para establecer la expresión temprana. Cuatro días después de la transfección, la expresión temprana del indicador de superficie celular CD52 fue diana de aislamiento por clasificación (EPIC). La clasificación se dirigió únicamente a la expresión positiva que se recogió como una población enriquecida a granel de aproximadamente 1 millón de células a la que luego se permitió continuar la selección en un medio deficiente en nucleótidos (MTX 0 nM). Como control, se permitió que una transfección no clasificada continuara la selección mediante un procedimiento de selección convencional. Como se muestra en la **FIG. 25**, la clasificación por EPIC produjo una población ligeramente enriquecida como se muestra por la expresión del indicador en comparación con la selección convencional para el día 8. Sin embargo, a medida que continuó la selección de ambas poblaciones, fue sorprendente observar cómo esta pequeña subpoblación EPIC se hizo más prominente con el tiempo. De hecho, la subpoblación negativa se había eliminado casi por completo al finalizar la selección. En comparación, el método de selección convencional demostró una ligera mejora en la expresión del indicador que es históricamente típica. La clasificación EPIC, o aislamiento de expresión temprana, produce una subpoblación de expresión positiva que tiene una capacidad de supervivencia preferencial sobre las células menos expresivas, lo que a su vez produce un grupo estable más productivo.

Los grupos seleccionados por EPIC y de forma convencional se utilizaron para establecer cultivos discontinuos sin aportación para determinar los títulos de mAb n.º 1. Como se muestra en las **FIG. 25 y 26**, el grupo generado por EPIC produjo un título de 502 mg/l, superando con creces cualquier grupo generado por amplificación a granel rápida o con MTX, de nuevo sin usar MTX durante los procesos. En comparación, el grupo generado mediante selección convencional produjo un título de 150 mg/l, que fue 3 veces menor que el del grupo generado por EPIC.

Si bien estas clasificaciones por EPIC iniciales tardaron 35 días (transfección/aislamiento/selección) en lograr llegar a un grupo estable, esto estaba directamente relacionado con el pequeño número de células clasificadas recogidas (1 millón) que después tuvieron que soportar tanto la expansión como la selección como la población estable. Tales plazos podrían reducirse en gran medida, ya sea simplemente recogiendo más células y/o dirigiéndose a una clasificación más pura. Muchas de las células clasificadas tenían altos niveles de impurezas (células con poca o ninguna expresión) y tuvieron que seleccionarse (eliminarse), prolongando los tiempos de selección/expansión.

Este grupo generado por EPIC se utilizó a continuación para generar clones de nuevo utilizando FLARE como se ha descrito anteriormente (véase, p. ej., Cairns, V. *et al.* (2011) Utilization of Non-AUG Initiation Codons in a Flow Cytometric Method for Efficient Selection of Recombinant Cell Lines. *Biotechnol Bioeng* 108(11):2611-2622). En resumen, se utilizó FLARE para aislar y sembrar en células individuales el 3-5 % superior de las células que expresan el indicador de cada grupo utilizando FACS. A continuación, se examinaron los clones expandidos (tomando el 30 % con mayor expresión positiva), utilizando de nuevo FLARE, para identificar solo los clones de nivel superior para expandir para la evaluación del título del polipéptido diana. Como se muestra en la **FIG. 27**, los clones generados por EPIC de expresión superior lograron títulos similares a los de los clones de expresión superior de métodos tradicionales, p. ej., utilizando amplificación con MTX (casi 2,0 g/l). Los resultados demuestran que el uso de EPIC para aislar poblaciones de expresión temprana antes de la selección es una alternativa viable a las metodologías tradicionales de transfección y selección. EPIC ofrece una metodología independiente de MTX para lograr títulos de clones similares a los de las metodologías con MTX tradicionales, lo que da lugar a clones potencialmente más robustos y estables. EPIC también se presta a la introducción de MTX durante la selección/expansión de poblaciones generadas por EPIC que tiene el potencial de impulsar una mayor expresión en estas poblaciones enriquecidas.

#### **EJEMPLO 5: CLASIFICACIÓN REPETITIVA INMEDIATA PARA LA GANANCIA DE VIABILIDAD**

Se ha observado a menudo que las células CHO recogidas mediante clasificación tienen viabilidades celulares escasas como población a granel después de la clasificación. Esta viabilidad se determinó mediante un reanálisis inmediato de una alícuota de la población después de la clasificación. Se observó una baja viabilidad posterior a la clasificación utilizando dos clasificadores celulares diferentes con dos líneas celulares hospedadoras CHO diferentes. Se intentó optimizar diferentes parámetros y condiciones en el procedimiento de clasificación celular con el fin de lograr mayores viabilidades celulares después de la clasificación de manera uniforme. Durante este trabajo, se observó sorprendentemente que las células clasificadas que se volvieron a clasificar inmediatamente tenían viabilidades posteriores a la clasificación significativamente mejoradas (aproximadamente un 83 % de viabilidad después de la reclasificación en comparación con aproximadamente un 47 % de viabilidad después de la primera clasificación, **FIG.**

4 y 21). Este fenómeno se descubrió con células con alta expresión de indicador utilizando FLARE con ventanas de adquisición vivas, pero es independiente del sistema indicador. Esta independencia se confirmó al mostrar que las células clasificadas solo en función de las ventanas de adquisición vivas mostraron una viabilidad mejorada mediante clasificación repetitiva inmediata. Esto se demostró en dos experimentos independientes que generaron subclones productores de mAb sin FLARE (las células no expresaron indicador).

Este proceso (clasificación de repetición inmediata) trabajó para mejorar la viabilidad celular después de la clasificación en un grado significativo. Además, como muestra la tabla 2, este fue un resultado muy reproducible observado tanto con un modelo más nuevo de clasificador (BD Influx™) como con un modelo más antiguo de clasificador (FACS Aria). Este resultado se mostró con varias células que expresan proteínas (tanto mAb como la proteína de fusión Fc), incluidas aquellas con y sin el sistema de FLARE. El uso de esta metodología de clasificación por repetición inmediata produjo una viabilidad mejorada en la población de células recogidas mediante clasificación, que se espera que se traduzca en una mejor eficiencia de clonación al sembrar las células clasificadas en placas de pocillos para la generación de clones.

**Tabla 2: Viabilidad por clasificación repetitiva inmediata de diferentes células que expresan proteínas**

Construcción	% de viabilidad después de la 1. <sup>a</sup> clasificación	% de viabilidad después de la 2. <sup>a</sup> clasificación inmediata
FsFc n.º 1	47	83
	40	77
	22	76
	64	71
mAb n.º 1	41	79
	65	89
	54	74
	57	63
	54	89
	66	80
mAb n.º 3	70	72
	76	82
	67	78
	79	89
mAb n.º 2	65	93
	58	69
	30	81
	47	77

## REIVINDICACIONES

1. Un método de clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) para seleccionar por lotes células productoras que expresan un polipéptido diana sin el uso de metotrexato (MTX) como agente de amplificación, comprendiendo el método:
- 5 (a) proporcionar una población heterogénea de células productoras, en donde las células productoras de la población expresan niveles variables de un polipéptido seleccionable por FACS y un polipéptido diana que están codificados por el mismo ARNm multicistrónico,
- 10 (b) seleccionar de la población heterogénea de células productoras una primera subpoblación heterogénea de células productoras utilizando FACS, en donde las células productoras de la primera subpoblación heterogénea expresan el polipéptido seleccionable por FACS a un nivel que es superior al nivel de al menos el 80 % de las células productoras en la población heterogénea de (a), y
- 15 (c) expandir la primera subpoblación heterogénea de células productoras en medio sin selección farmacológica, produciendo de este modo una primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además:
- (d) seleccionar de la primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras de (c) una segunda subpoblación heterogénea de células productoras utilizando FACS, en donde las células productoras de la segunda subpoblación expresan el polipéptido seleccionable por FACS a un nivel que es superior al nivel de al menos el 80 % de las células productoras en la primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras de (c), y
- 20 (e) expandir la segunda subpoblación heterogénea de células productoras en medio sin selección farmacológica, produciendo de este modo una segunda subpoblación heterogénea expandida de células productoras, que comprende además opcionalmente
- 25 aislar el polipéptido diana de la primera o segunda subpoblación heterogénea expandida, y/o que comprende además opcionalmente
- (f) aislar una o más células productoras individuales de la primera o segunda subpoblación heterogénea expandida y cultivar individualmente la o las células productoras individuales para producir poblaciones clonales de la o las células productoras individuales.
- 30 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras produce una mejora de 1,2 a 5 veces en la producción del polipéptido diana en comparación con la de la población heterogénea de células productoras en (a).
- 35 4. El método de la reivindicación 2 o 3, en donde la segunda subpoblación heterogénea expandida de células productoras produce una mejora de 1,2 a 2,5 veces en la producción del polipéptido diana en comparación con la de la primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras en (c).
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde al menos una de las poblaciones clonales de la o las células individuales produce una mejora de 5 a 30 veces en la producción del polipéptido diana en comparación con la de la población heterogénea de células productoras en (a).
- 40 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la expansión en (c) es durante entre 7 y 14 días.
- 45 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde la expansión en (e) es durante entre 7 y 14 días.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el medio sin selección farmacológica es medio sin metionina sulfoximina.
- 50 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la población heterogénea de células productoras en (a) se produce transfectando células con un vector que codifica el ARNm multicistrónico y sometiendo las células transfectadas a un ciclo de selección basada en el medio para seleccionar células que expresan niveles variables del ARNm multicistrónico.
- 55 10. El método de la reivindicación 9, en donde el vector contiene además un gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR), opcionalmente en donde la selección basada en el medio es por medio deficiente en nucleótidos.
- 60 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la población heterogénea de células productoras en (a) se produce transfectando células con un vector que codifica el ARNm multicistrónico y sometiendo las células transfectadas a FACS para seleccionar células que expresan niveles variables del ARNm multicistrónico.
- 65 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el ARNm multicistrónico comprende un primer marco abierto de lectura (ORF) que codifica el polipéptido seleccionable por FACS y un segundo ORF que codifica el polipéptido diana, en donde el primer ORF está 5' con respecto al segundo ORF, opcionalmente en donde el primer ORF tiene un codón iniciador distinto de AUG, opcionalmente en donde

el segundo ORF tiene un codón iniciador AUG, opcionalmente en donde el codón iniciador distinto de AUG es un UUG, GUG o CUG en una secuencia de consenso de Kozak.

5 13. El método de la reivindicación 12, en donde el ORF que codifica el polipéptido seleccionable por FACS está desprovisto de cualquier secuencia AUG, y/o el polipéptido seleccionable por FACS es CD52 o CD59.

10 14. El método de la reivindicación 12, en donde el ORF que codifica el polipéptido seleccionable por FACS está desprovisto de cualquier secuencia AUG, y el polipéptido seleccionable por FACS es CD52.

15 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el polipéptido diana es:  
(i) un agente terapéutico,  
(ii) una proteína secretada, y/o  
(iii) un anticuerpo o una proteína de fusión Fc.

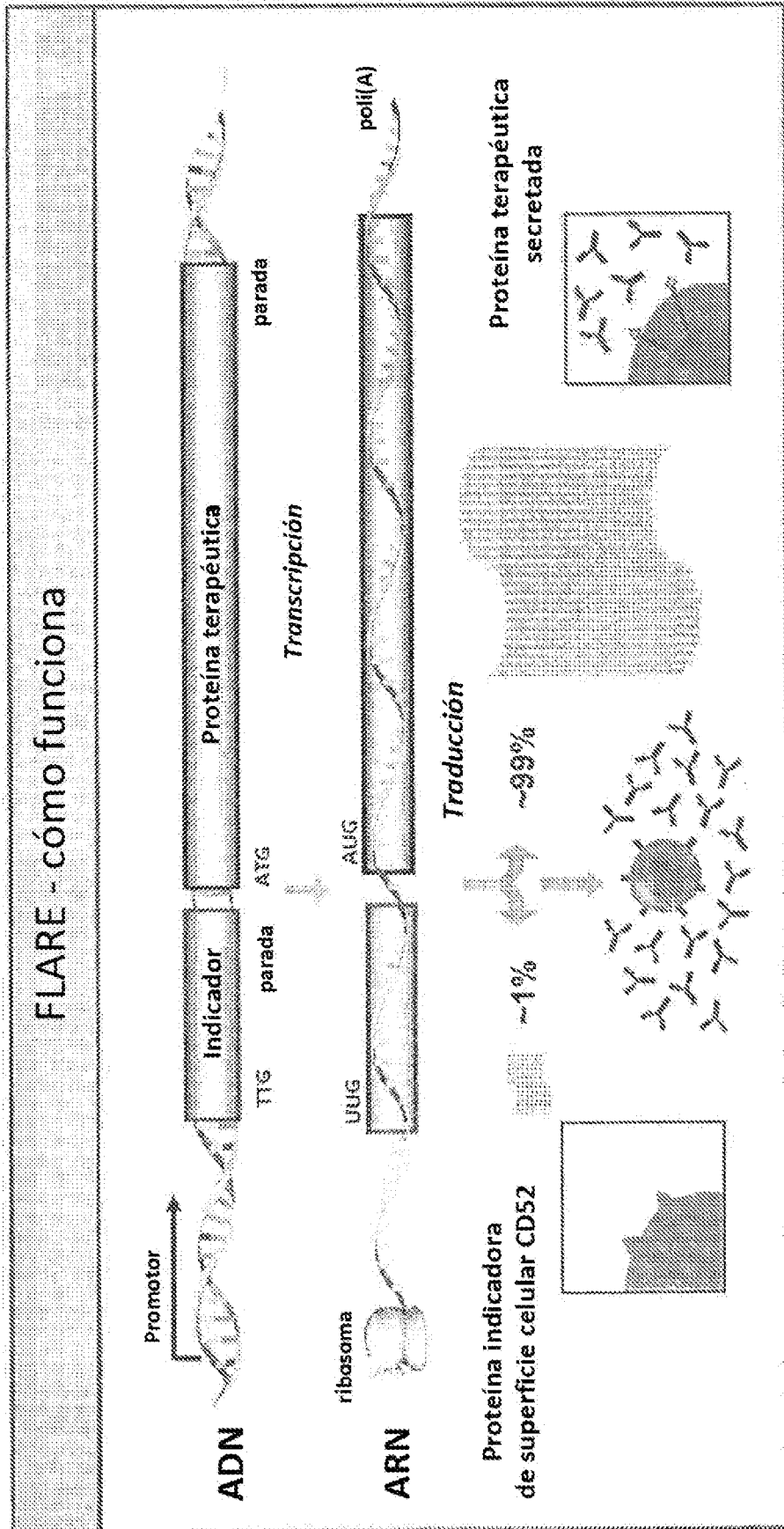


FIG. 1

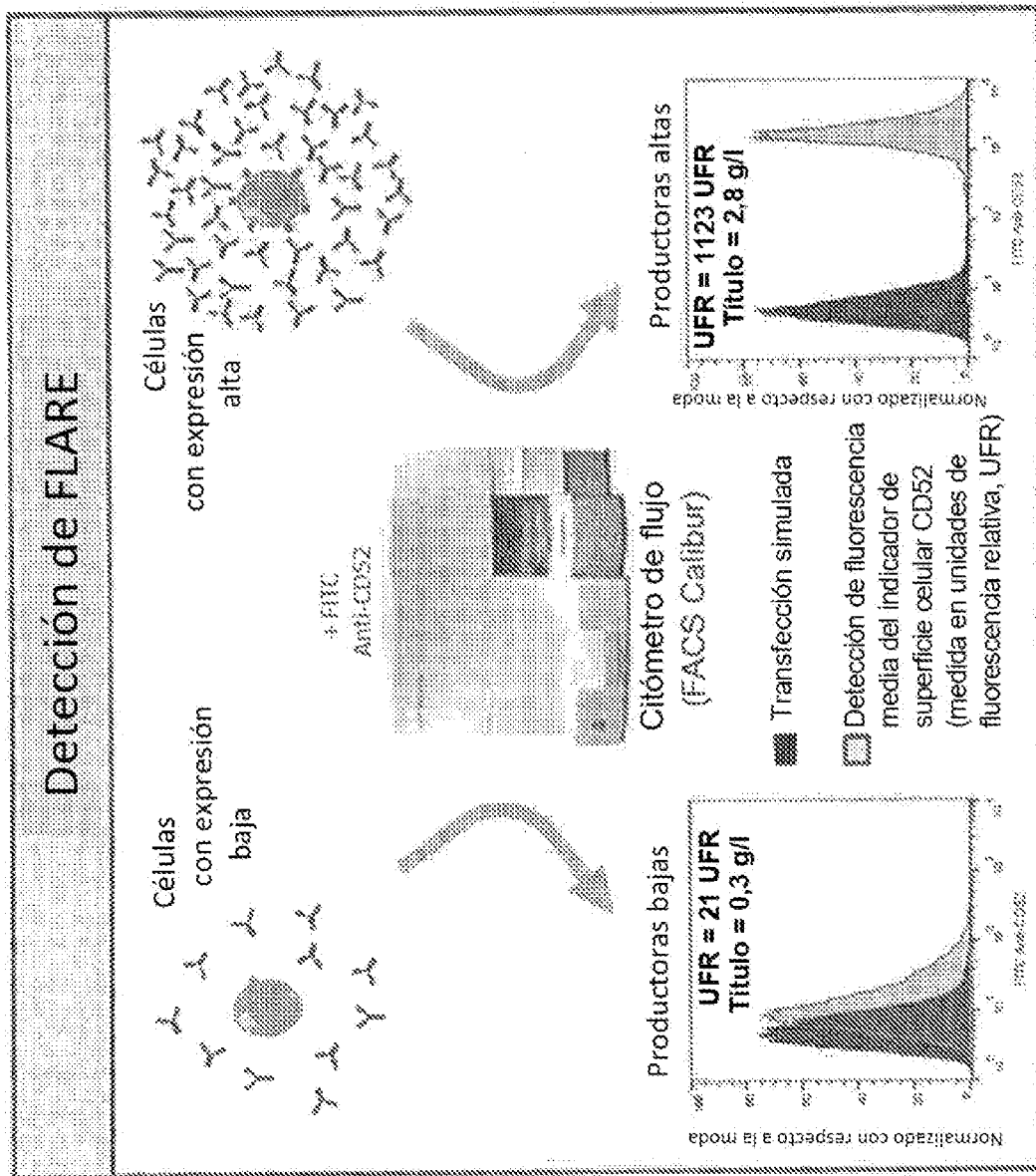


FIG. 2

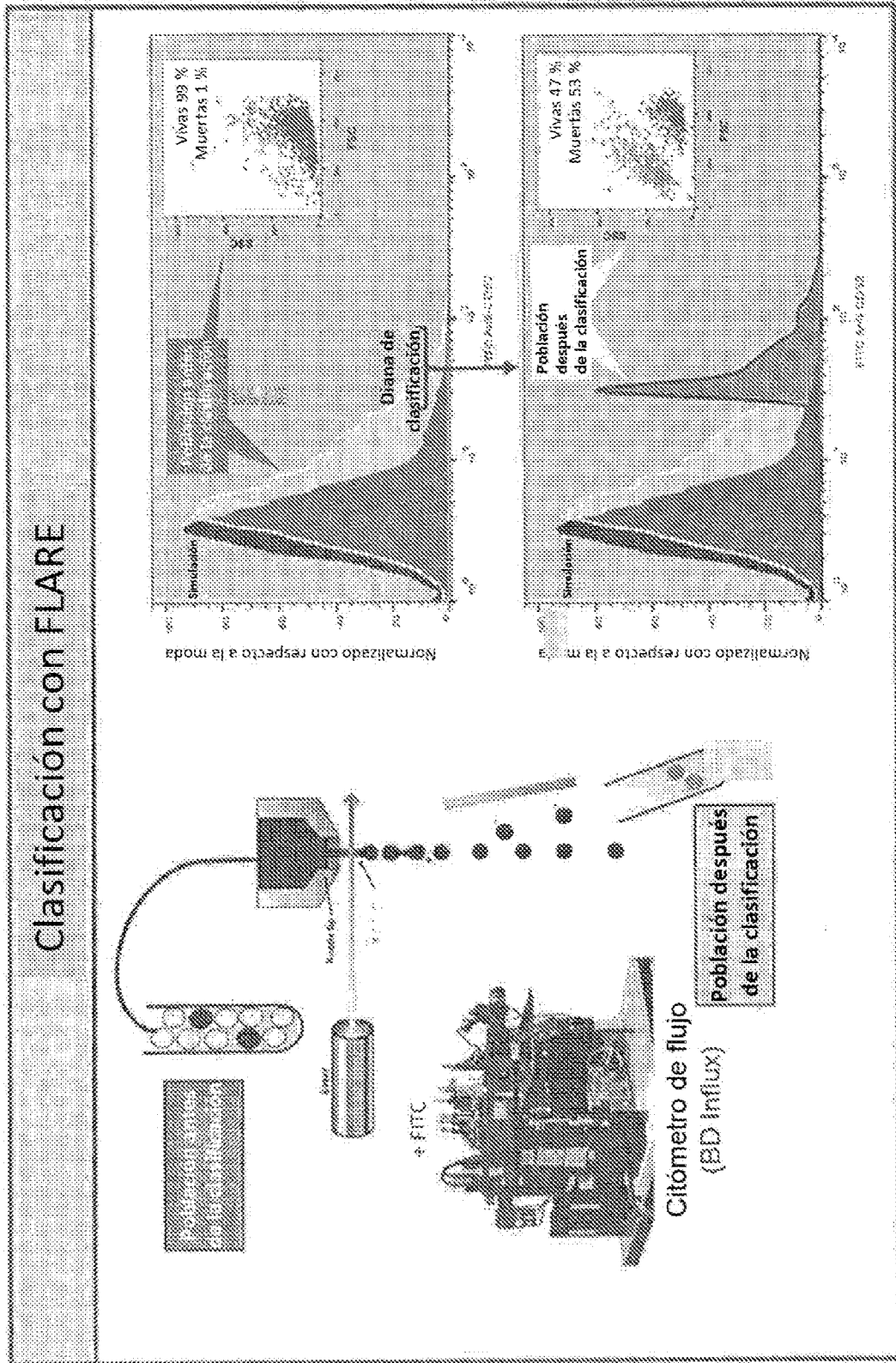


FIG. 3

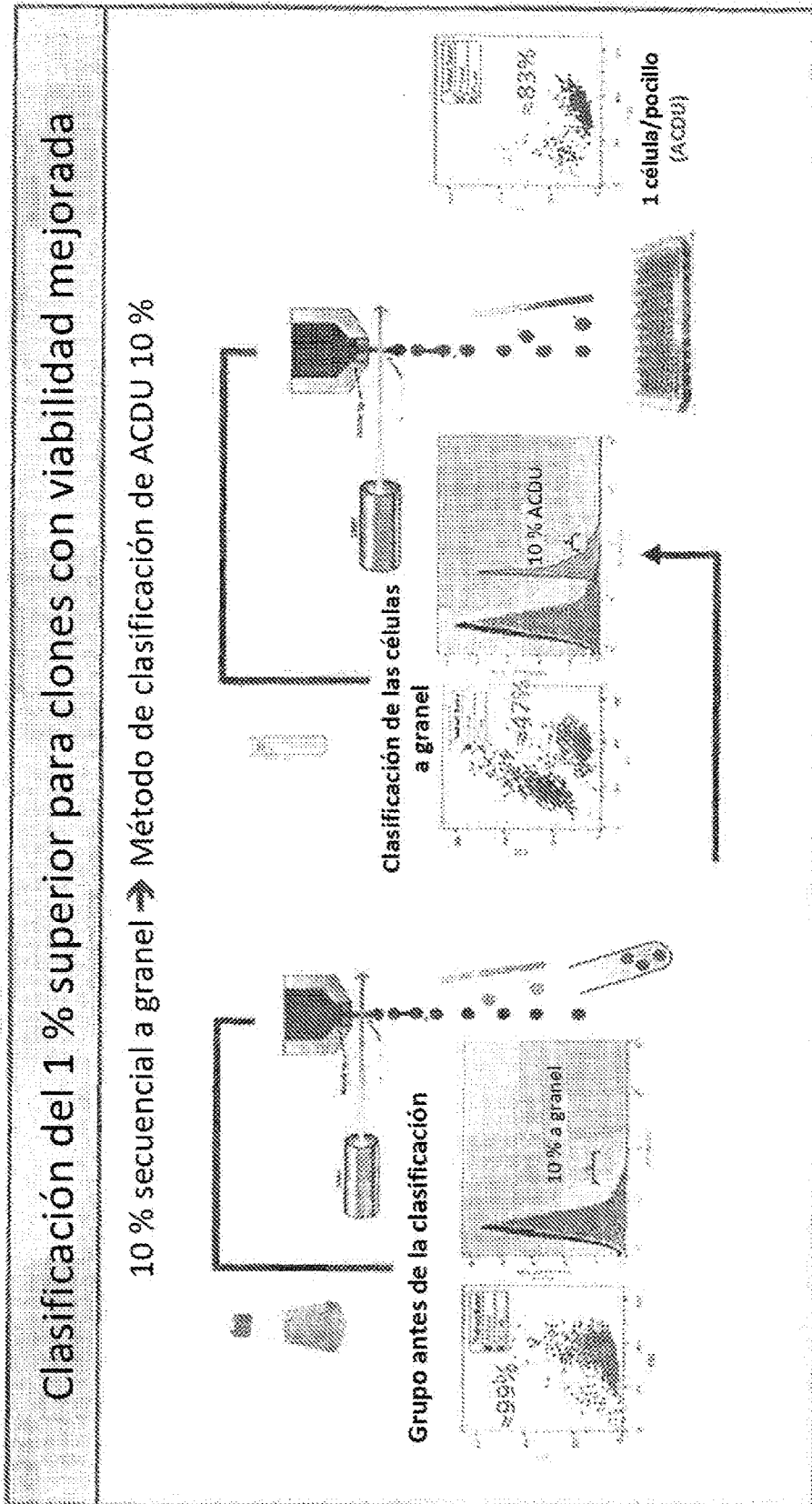


FIG. 4

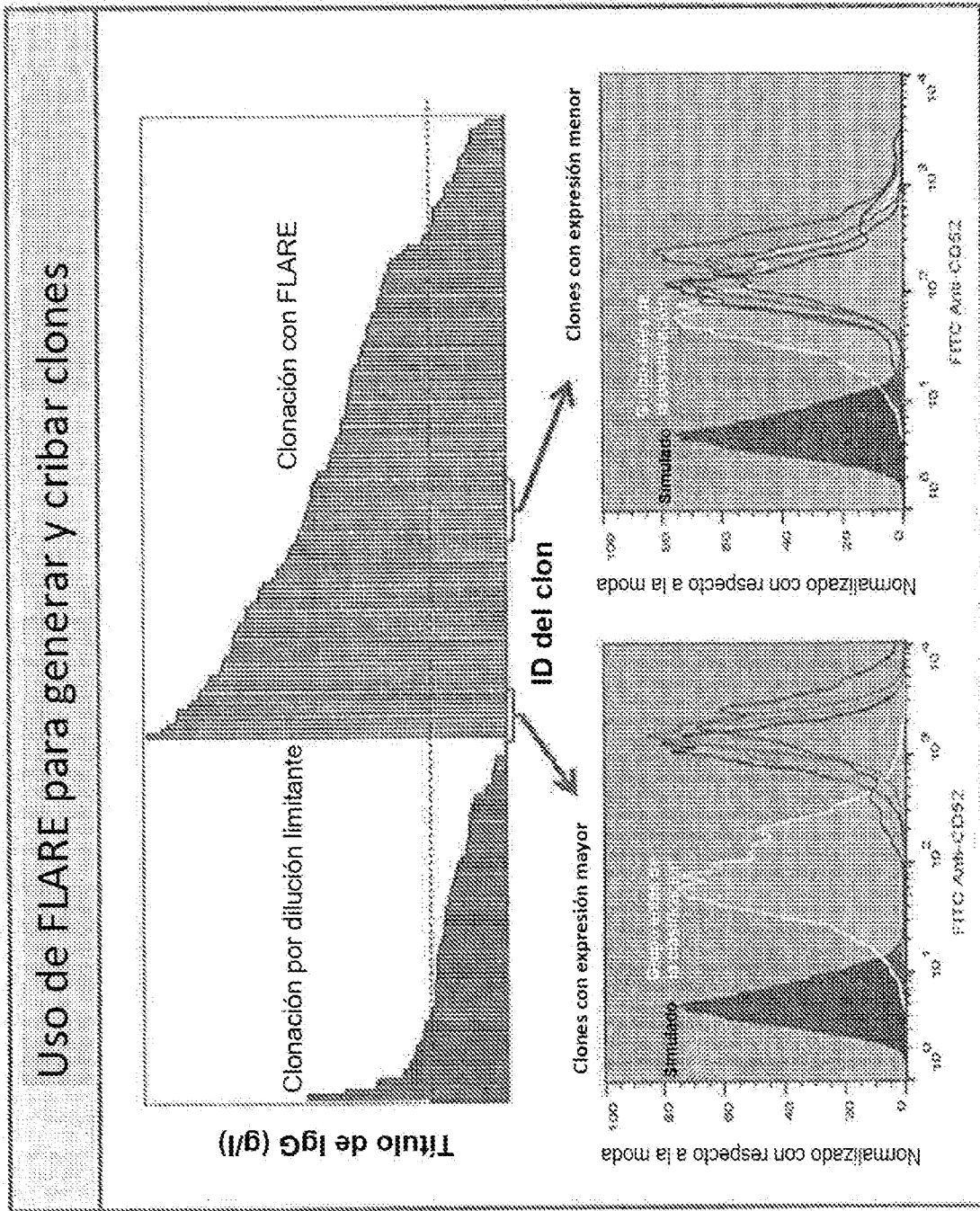


FIG. 5





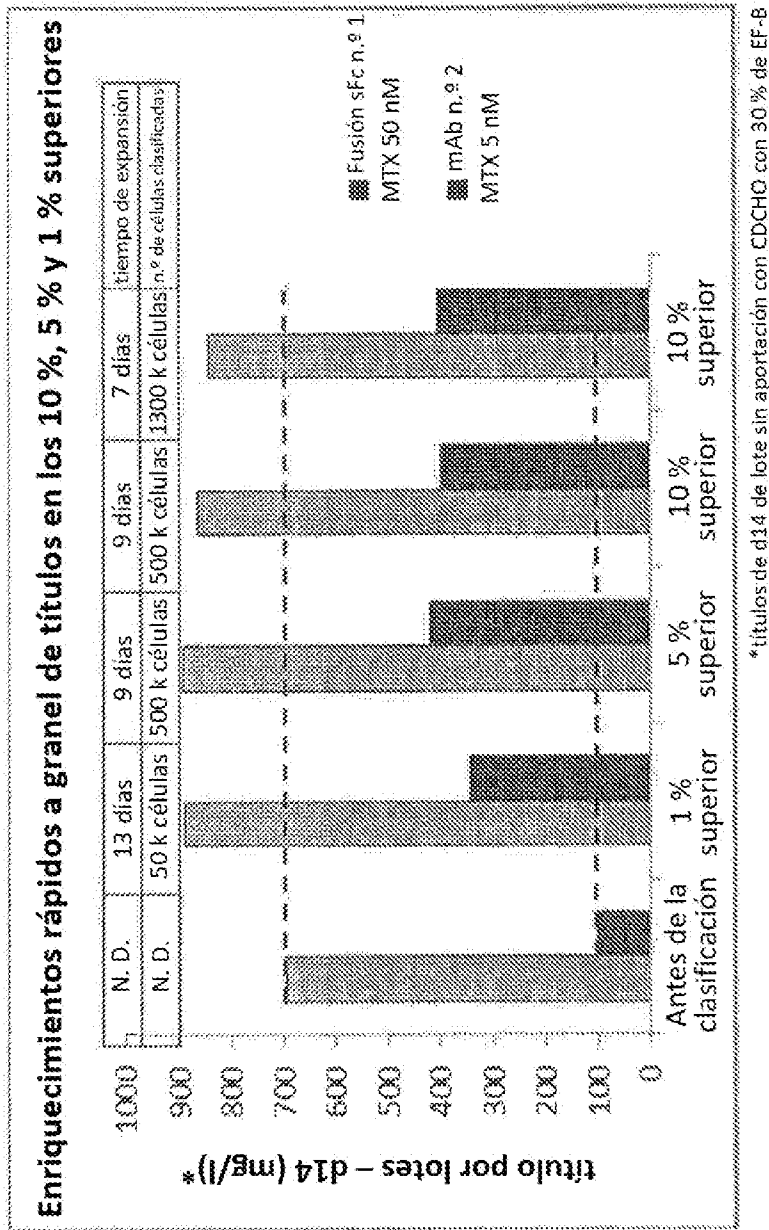
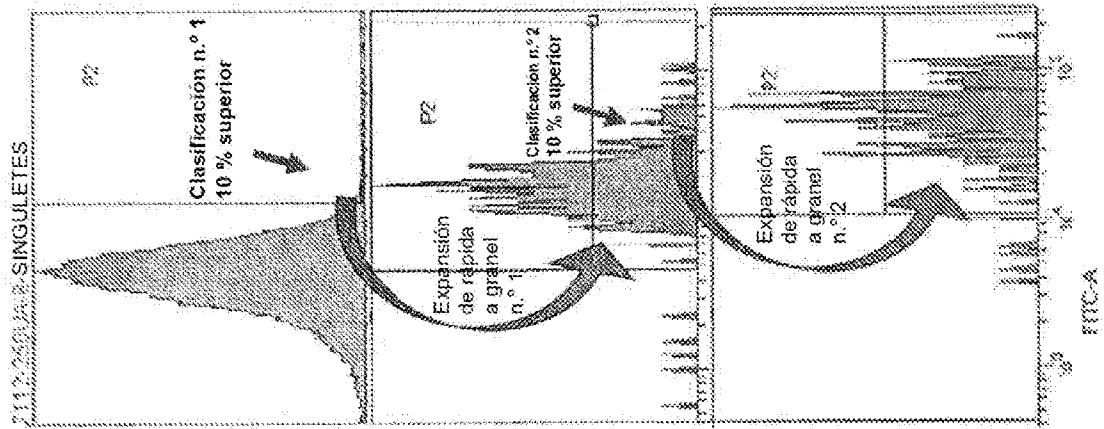


FIG. 8



Grupos	Rápida a granel n.º 1 (10 % superior)				Rápida a granel secuencial n.º 2 (10 % superior)			
	Células clasificadas	Viabilidad después de la clasificación	Pureza después de la clasificación	Días de expansión	Células clasificadas	Viabilidad después de la clasificación	Pureza después de la clasificación	Días de expansión
Fusión sFc n.º 2 5 nM	$1,9 \times 10^6$	75%	98%	12 d	$2,8 \times 10^6$	52%	98%	9 d
mAb n.º 3 5 nM	$3,6 \times 10^6$	32%	98%	11 d	$3,0 \times 10^6$	35%	98%	9 d
mAb n.º 1 5 nM	$2,6 \times 10^6$	57%	99%	10 d	$1,7 \times 10^6$	49%	98%	11 d

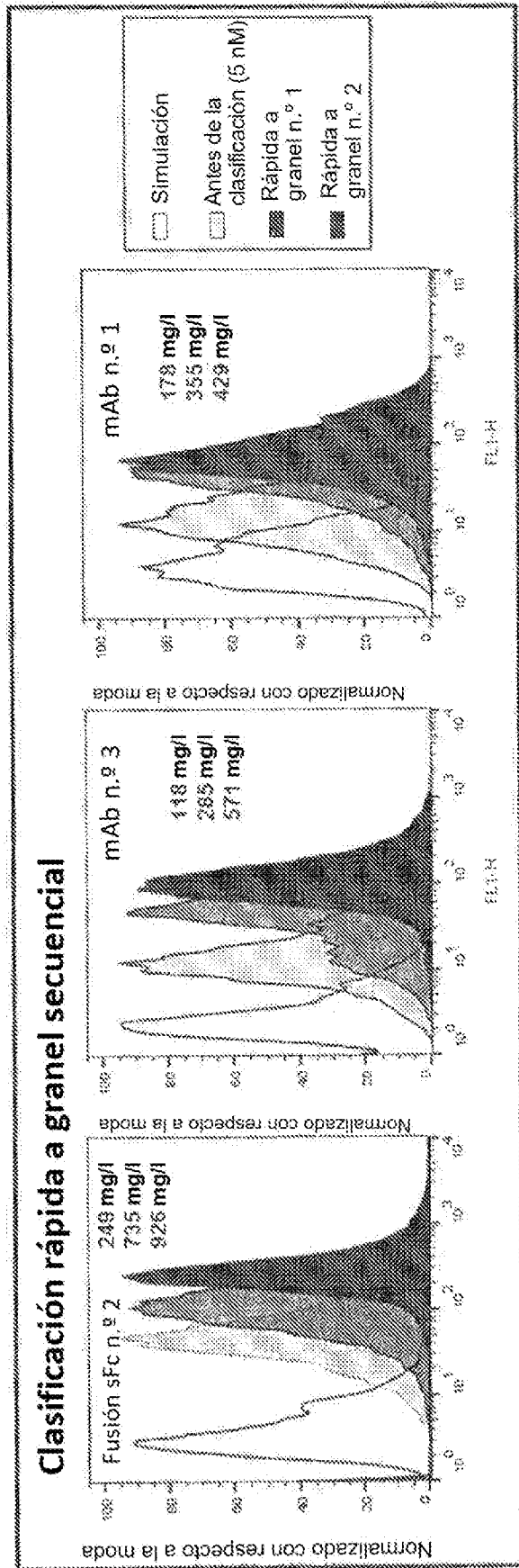


FIG. 10

### Amplificación rápida a granel frente a MTX

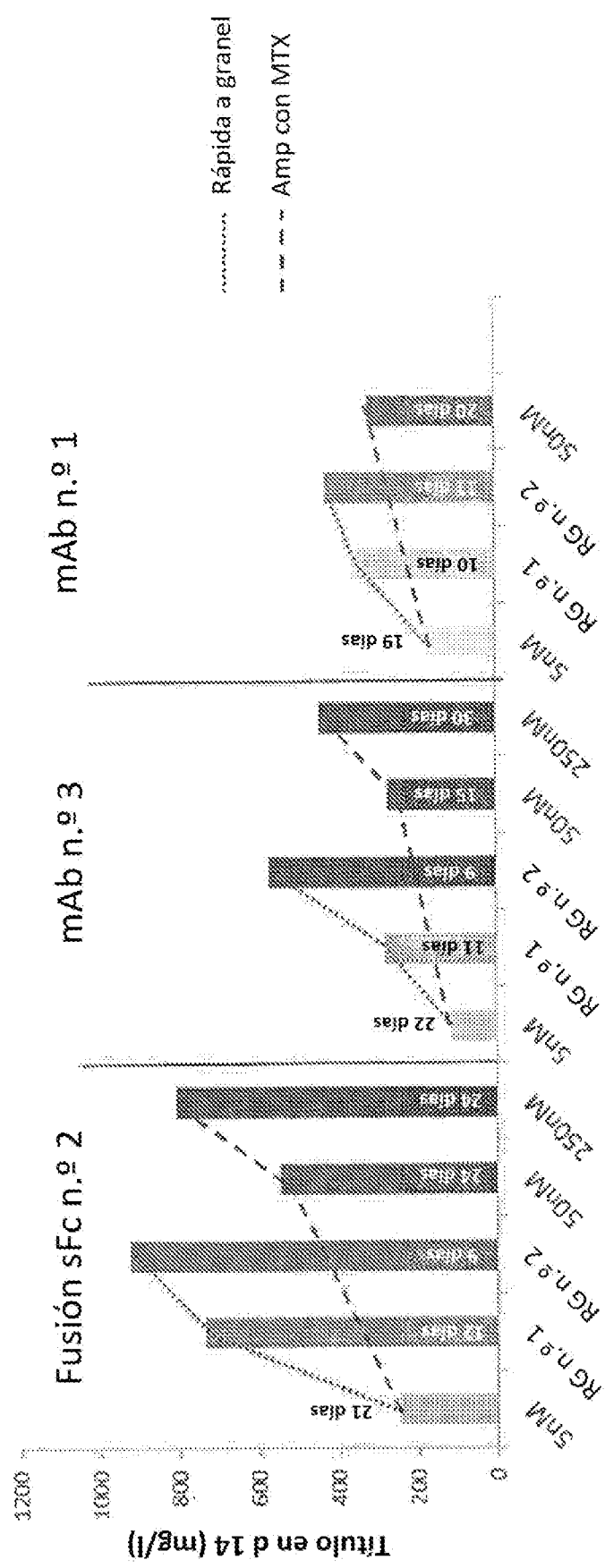
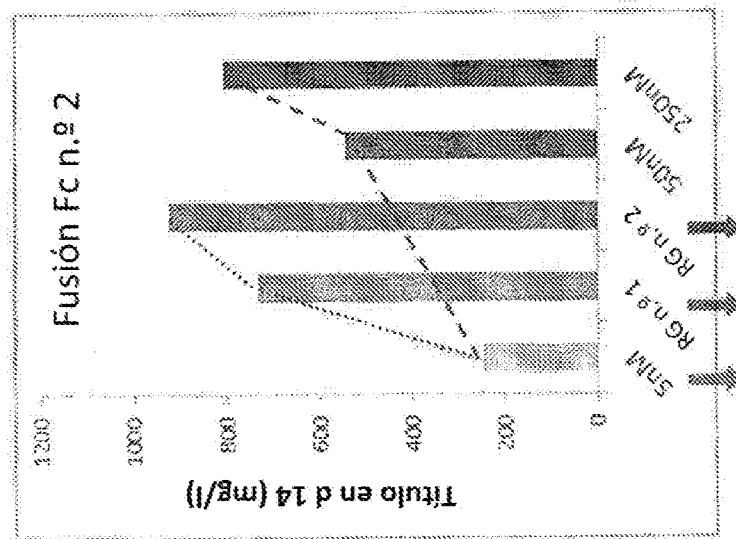
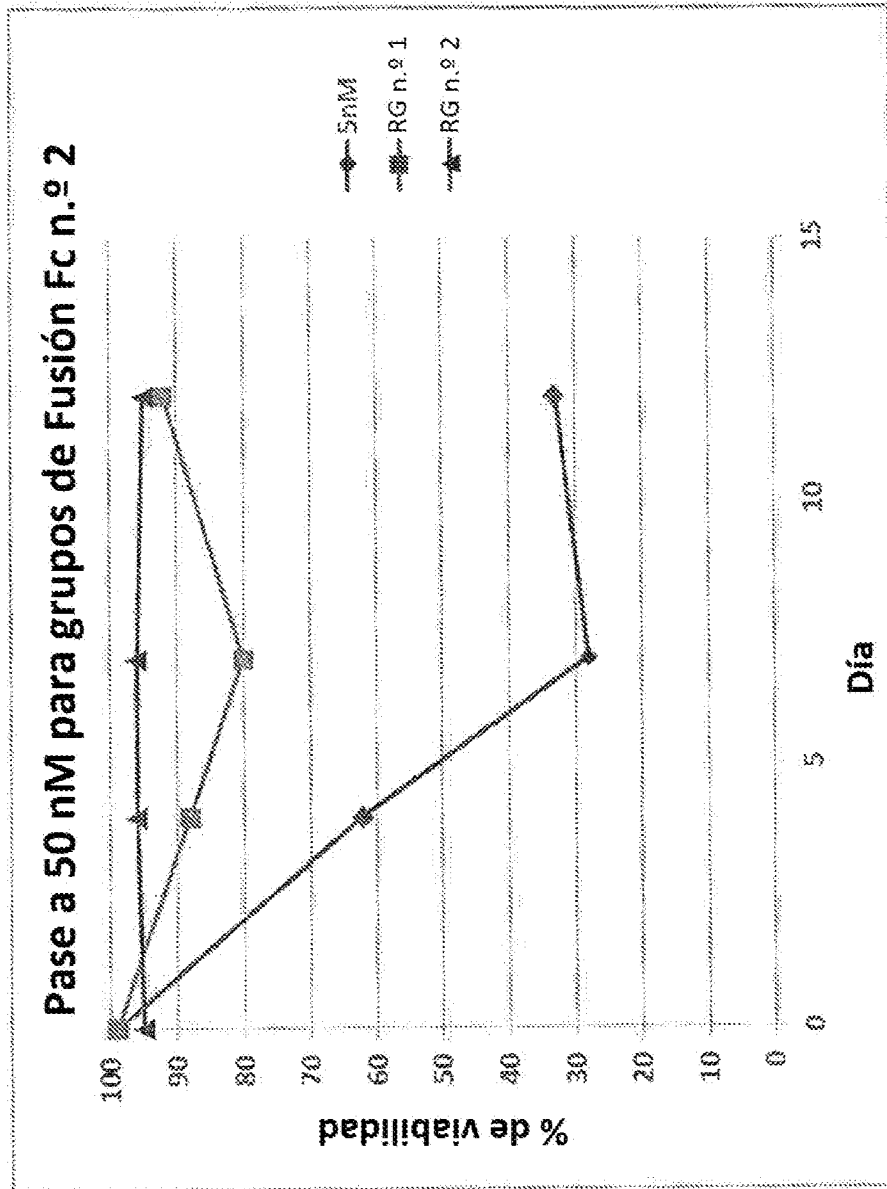


FIG. 11



Pase a MTX 50 nM

FIG. 12

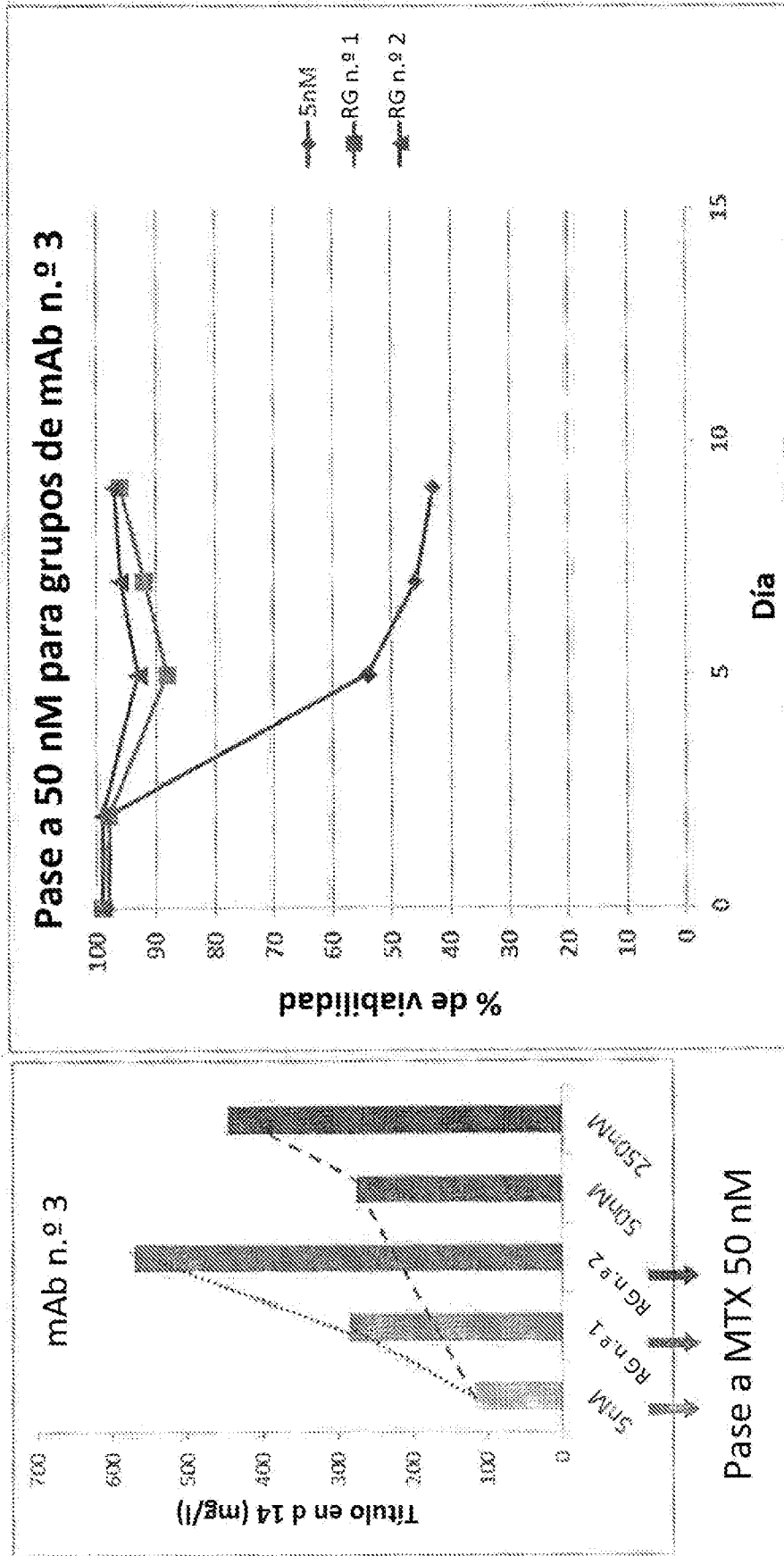


FIG. 13

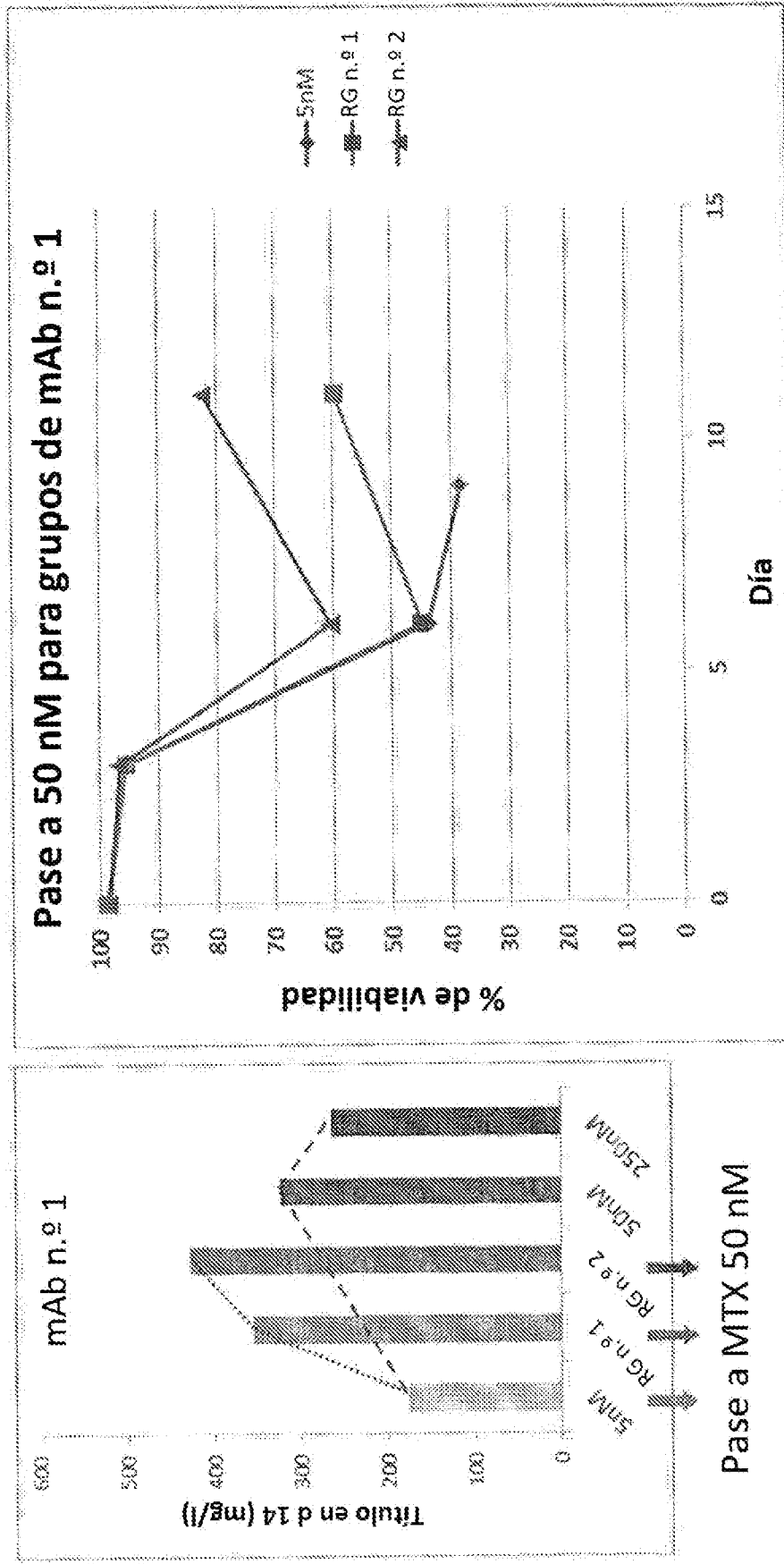


FIG. 14

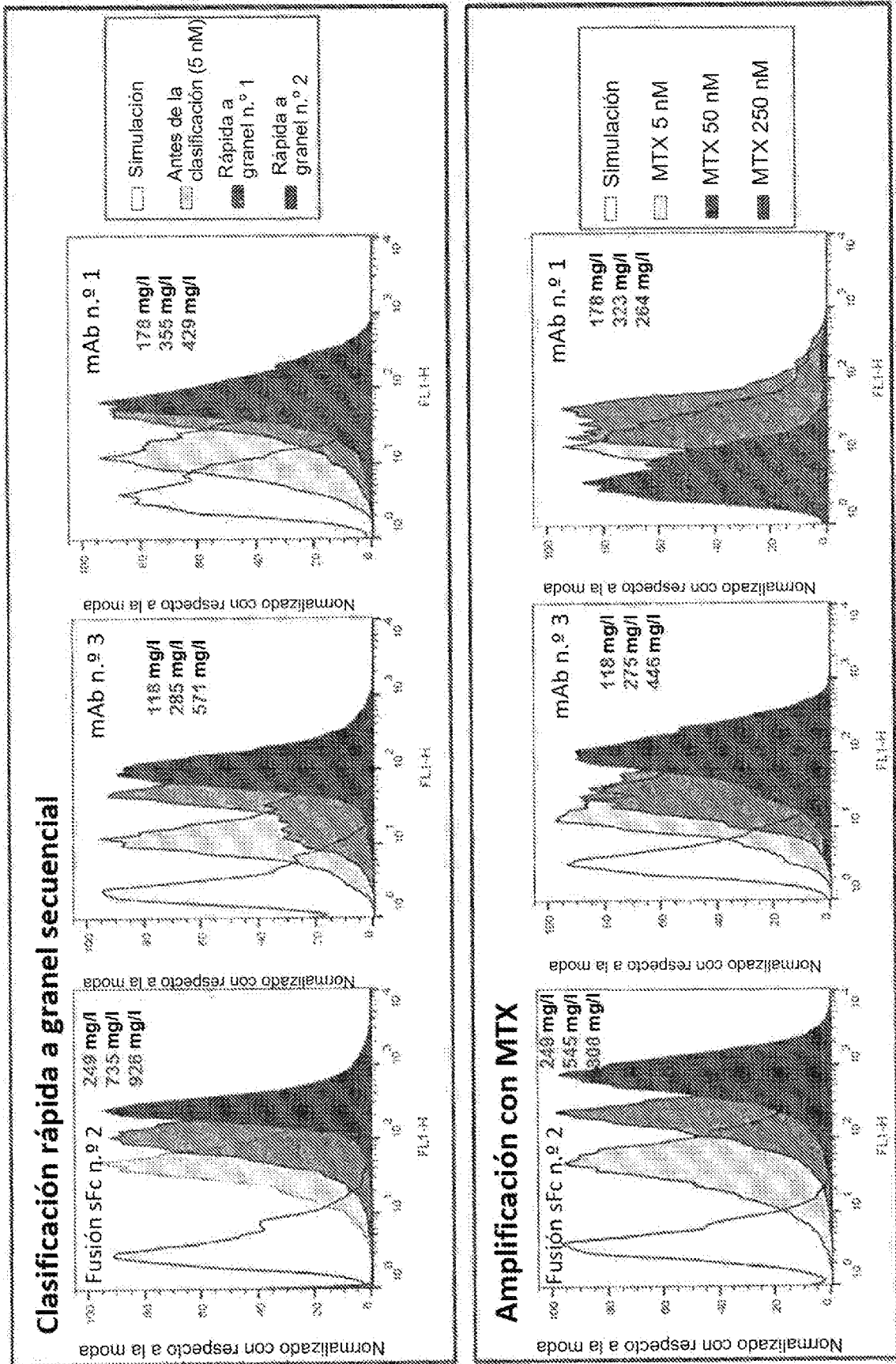


FIG. 15

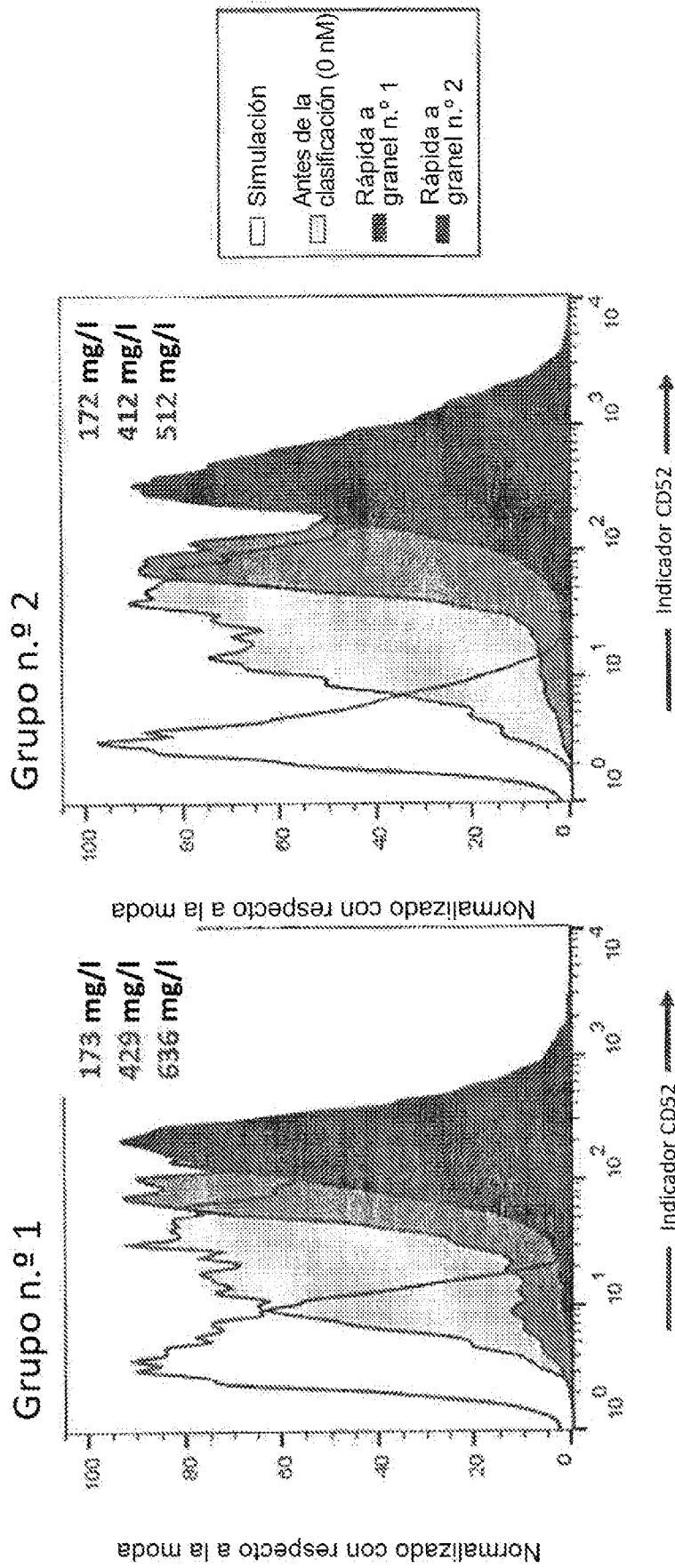


FIG. 16



**sFcR n.º 2 (grupos n.º 1 y n.º 2)**

Grupos		Clones						
ID de clasificación	Filtración antes de la clasificación (lote en 30 % de EF-B)	ID del grupo	Nº de FACS de exploradas	Eficiencia de clonación	Nº seleccionado para expansión	Nº de configuraciones de lotes terminales	Capacidad de supervivencia de los clones	Título máximo (lote en 30 % de EF-B)
Clasificación 1 (grupo 4 20 nM) (6) placas de 96 pocillos	0,20 g/l	A	56	9,8%	26	15	58%	1,3 g/l
Clasificación 2 (grupo 2 100 nM) (6) placas de 96 pocillos	0,30 g/l	B	67	11,8%	33	0	0%	ND
Clasificación 3 (grupo 4 RG n.º 2) (6) placas de 96 pocillos	0,64 g/l	C	98	17,2%	48	41	85%	2,3 g/l
Clasificación secuencial 10 % a granel → 10 % ACDU sembradas = 1692			221	13,1%	107	56	52,3%	

\*títulos de d14 de lote sin aportación con CDCHO con 30 % de EF-B

FIG. 18

**Clones amplificados con MTX frente a independientes de MTX  
(Fusión sFc n.º 2)**

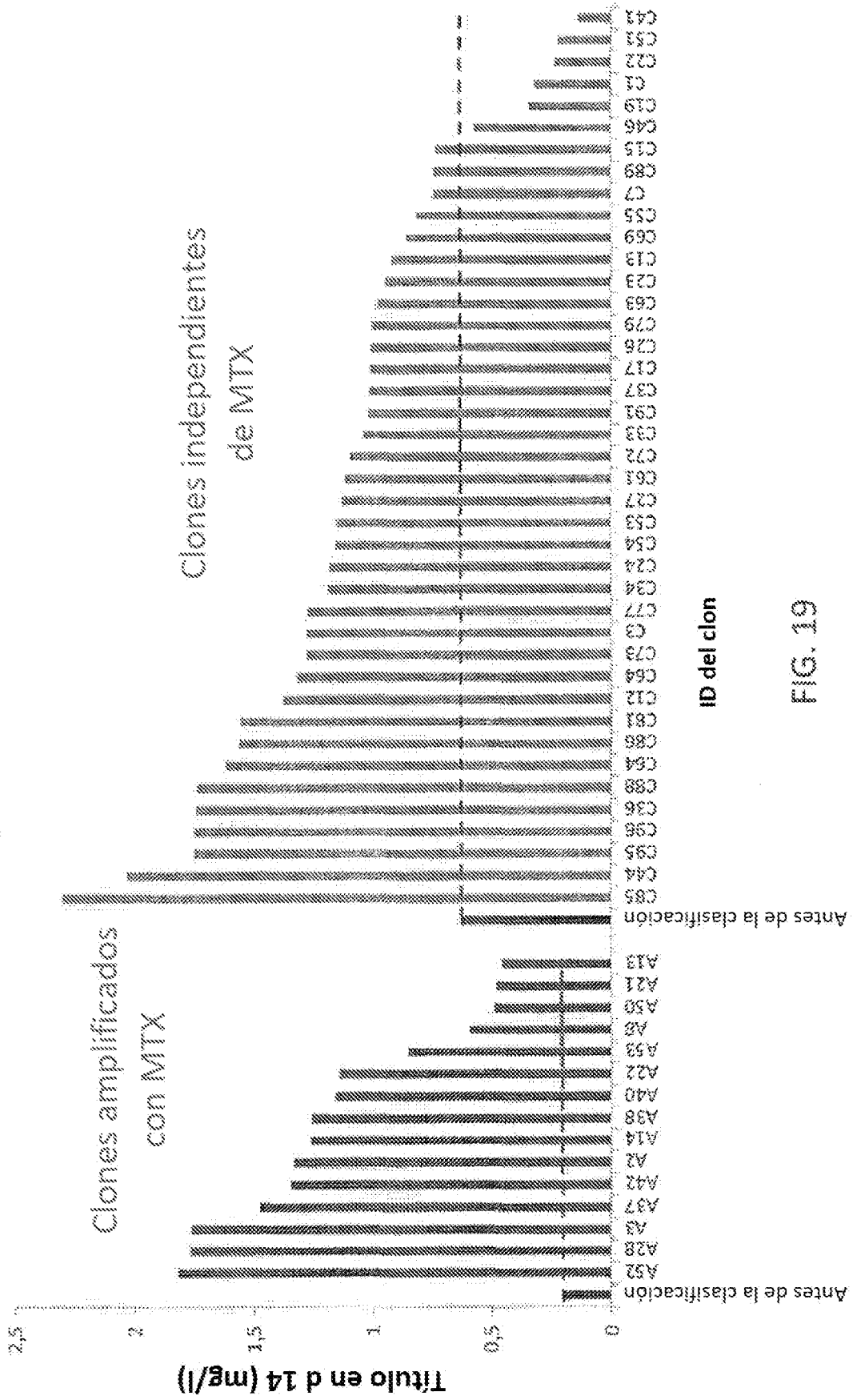


FIG. 19

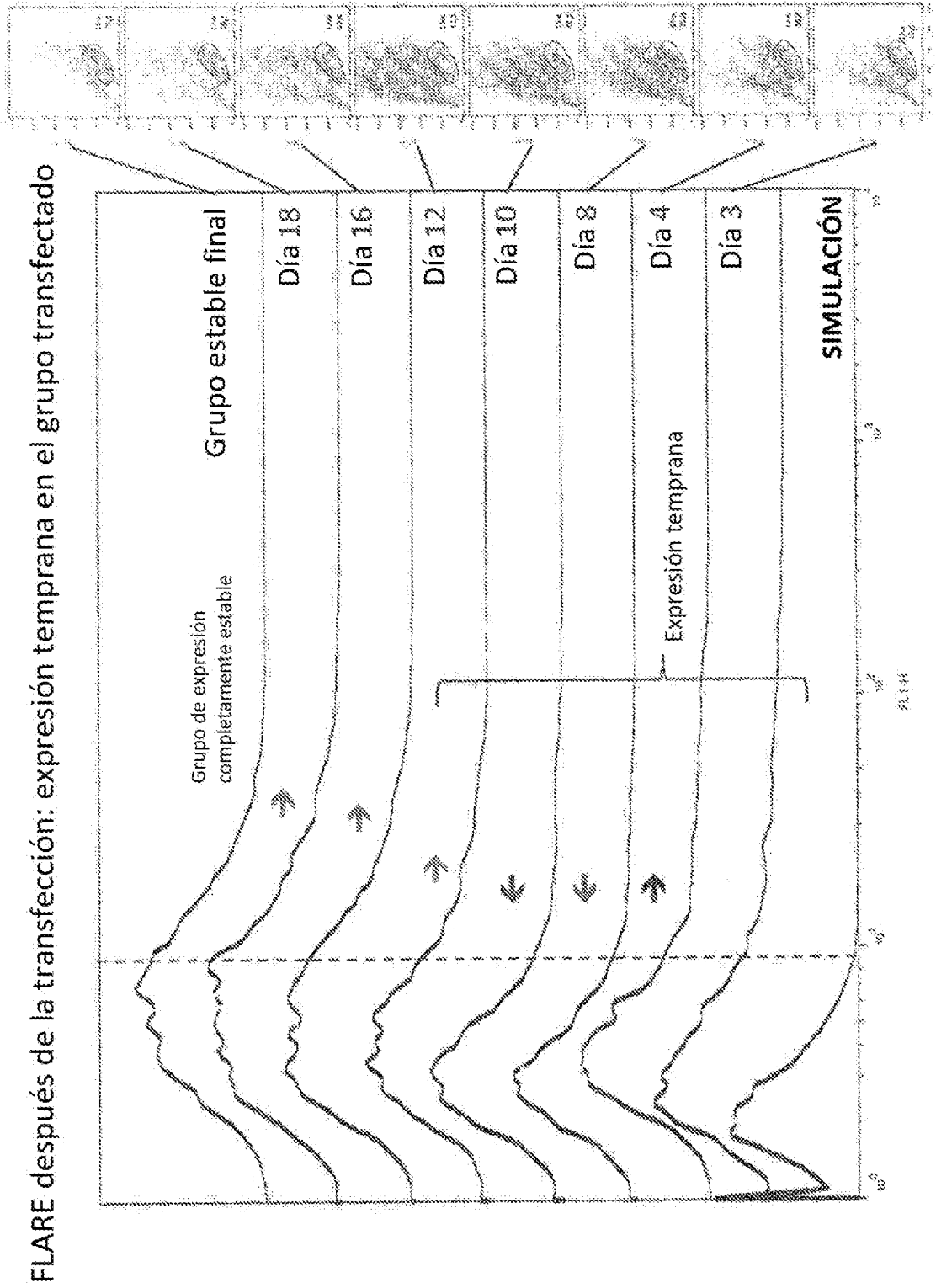


FIG. 20

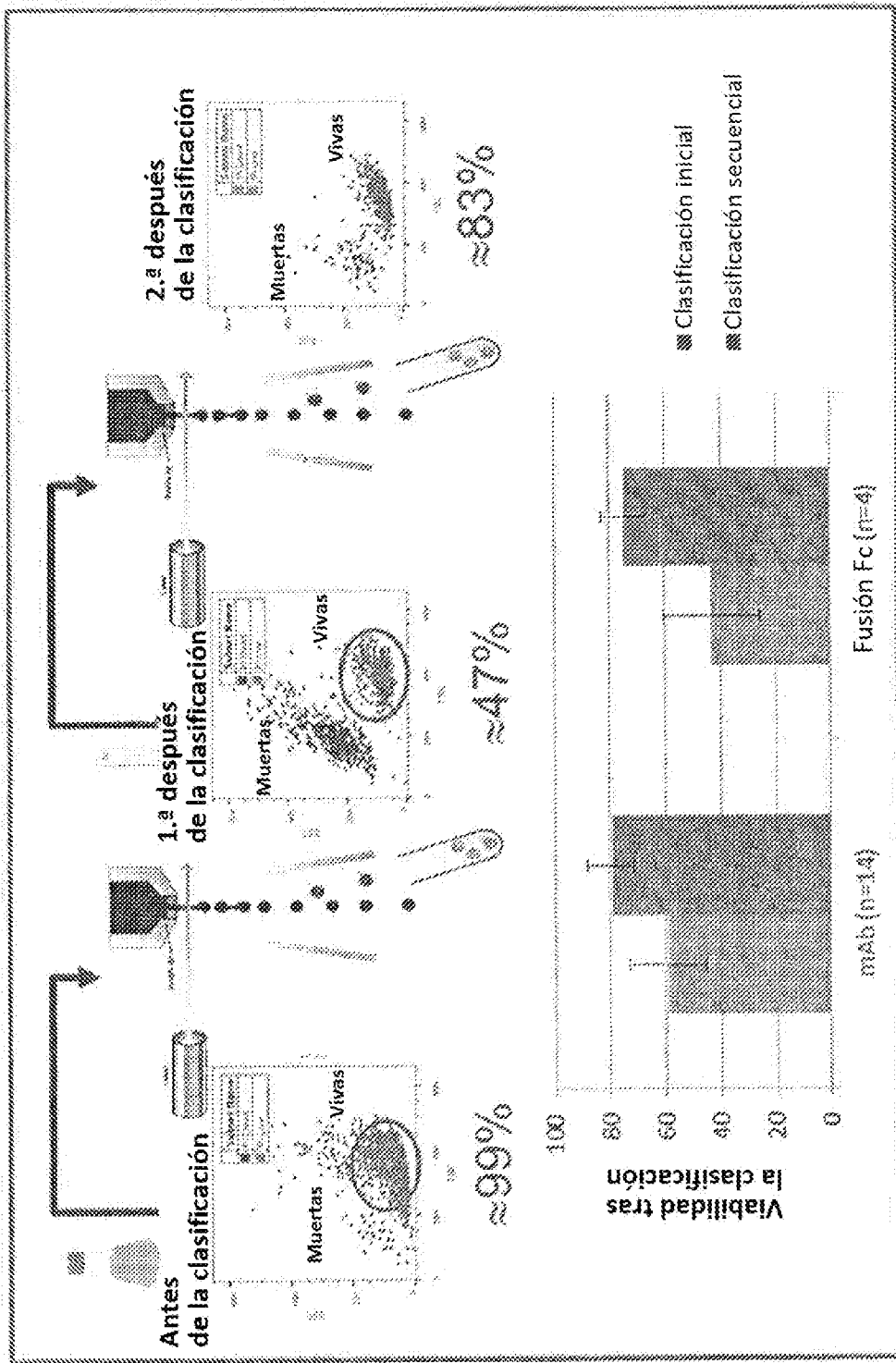


FIG. 21

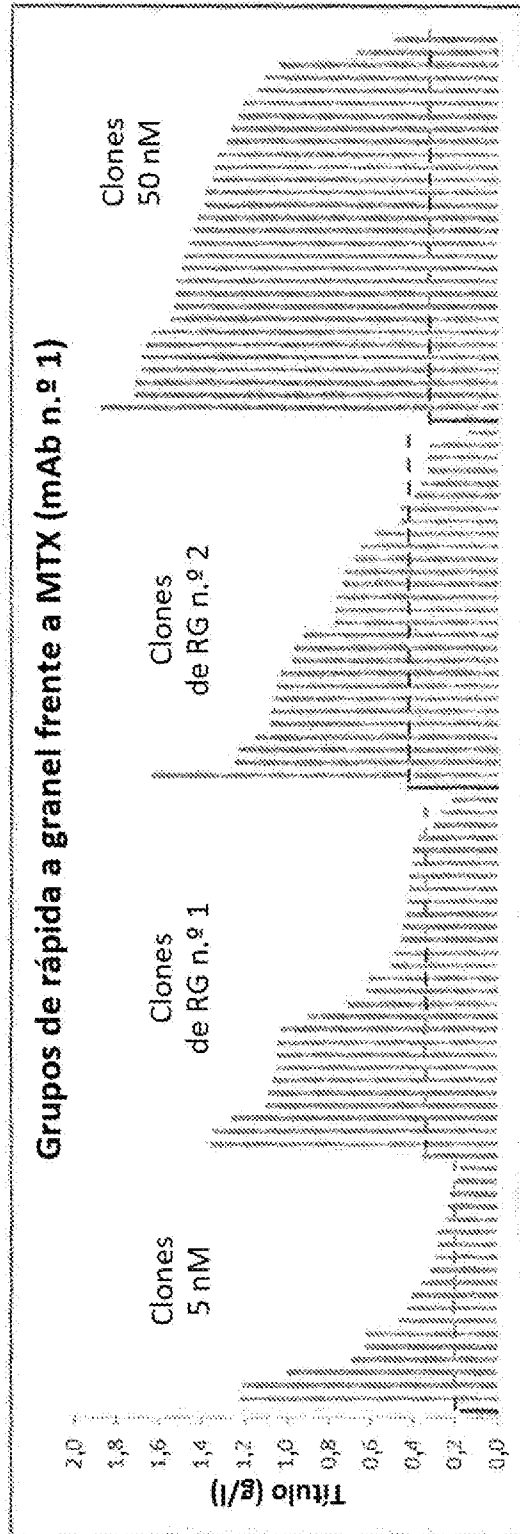
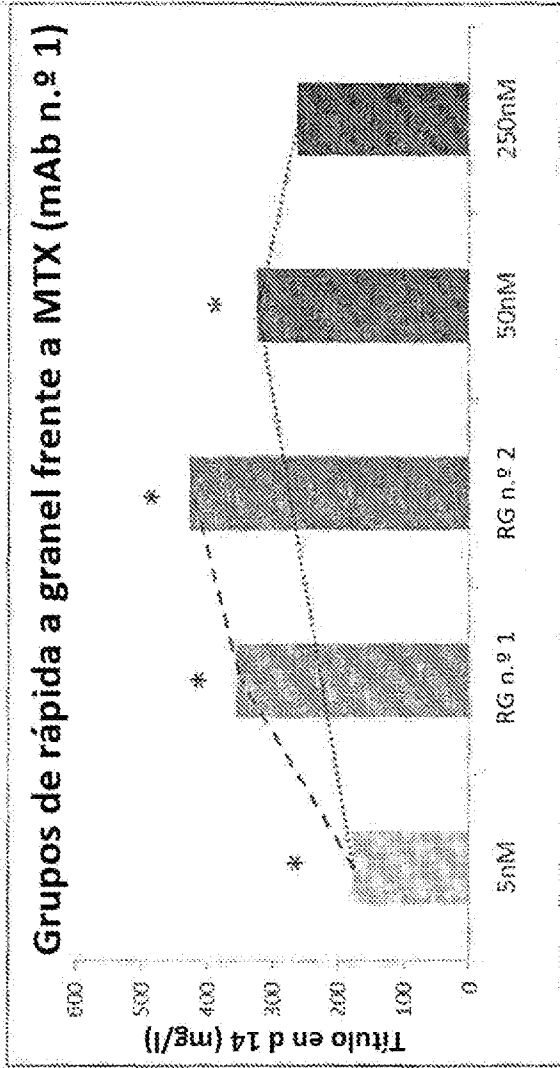


FIG. 22

Expresión temprana de pGZ729-RFP

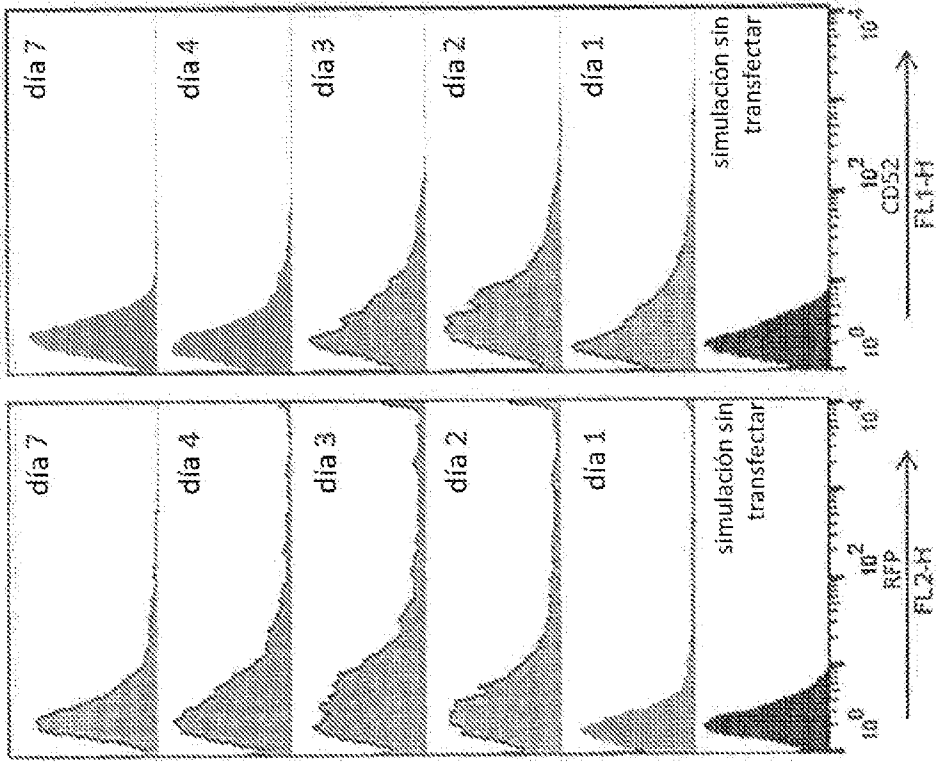


FIG. 23

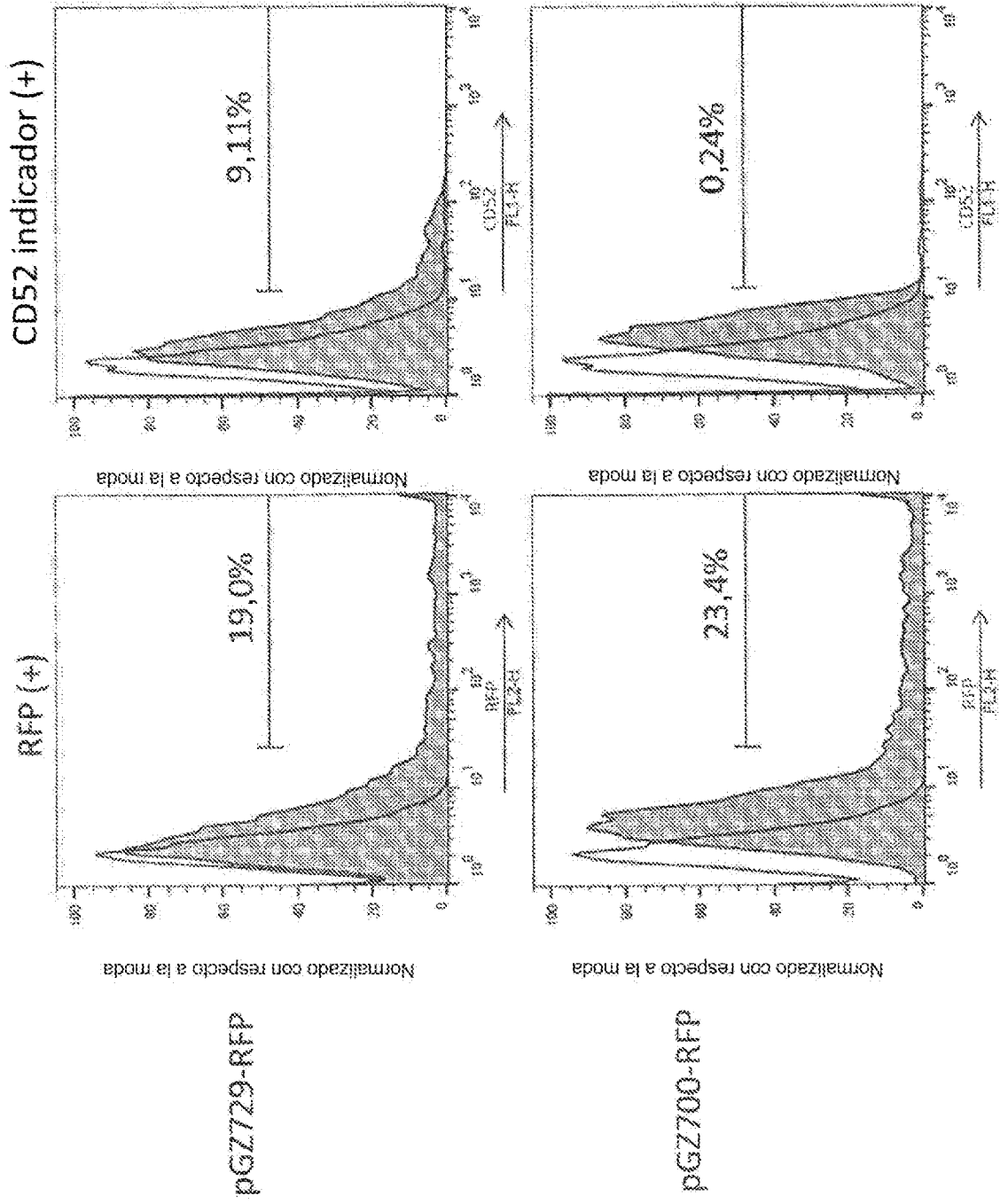


FIG. 24

Transfección: mAb n.º 1 (día 0)

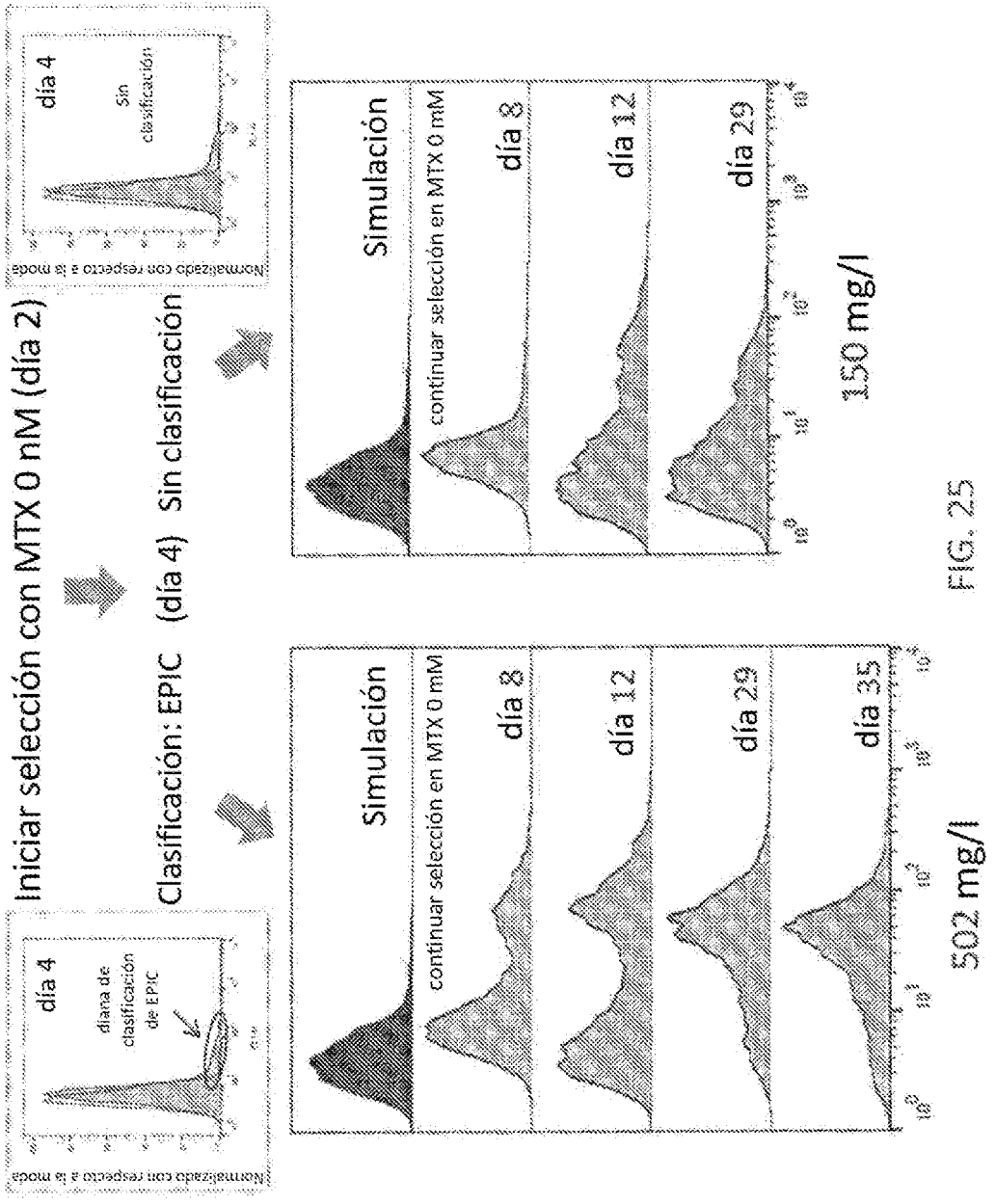


FIG. 25

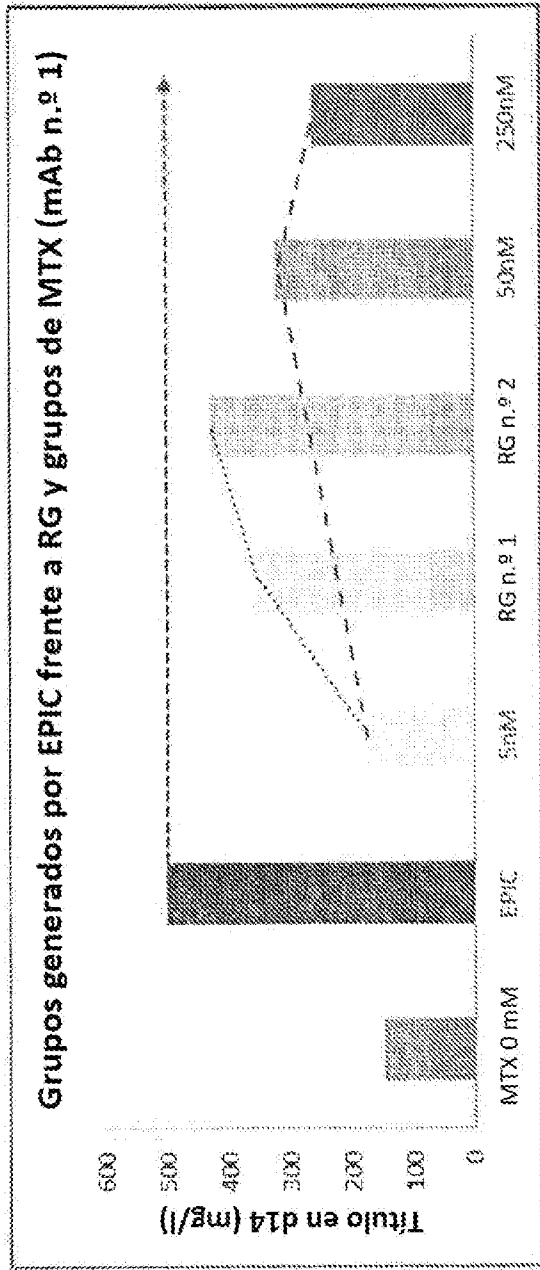


FIG. 26

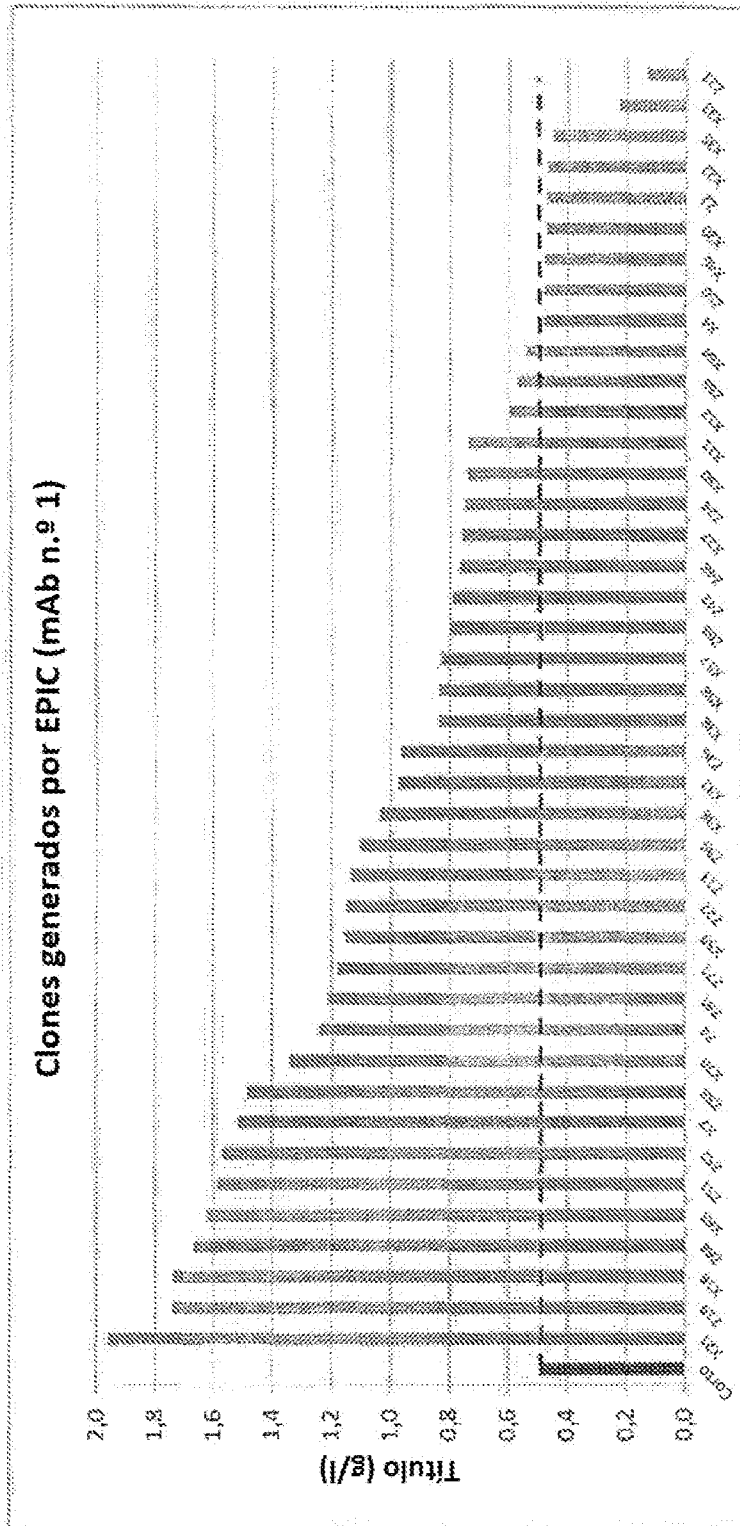


FIG. 27

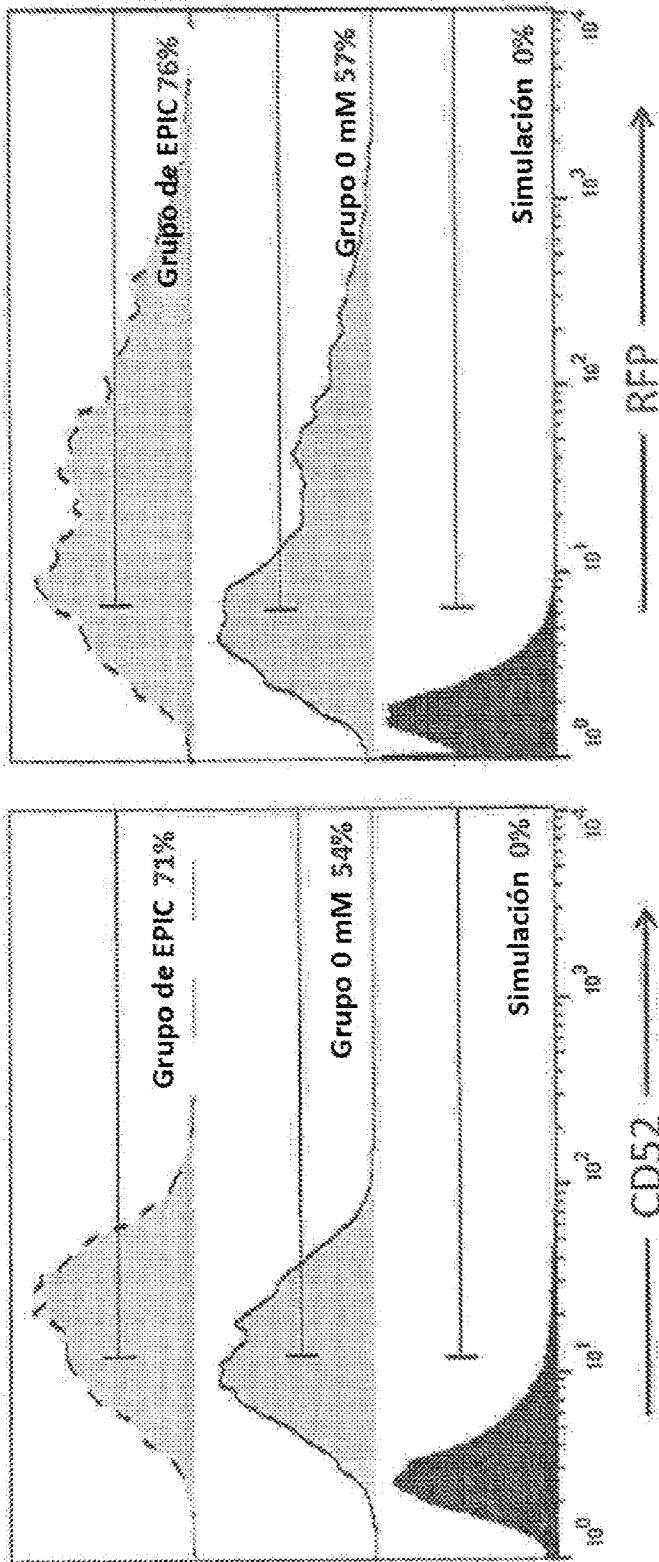


FIG. 28

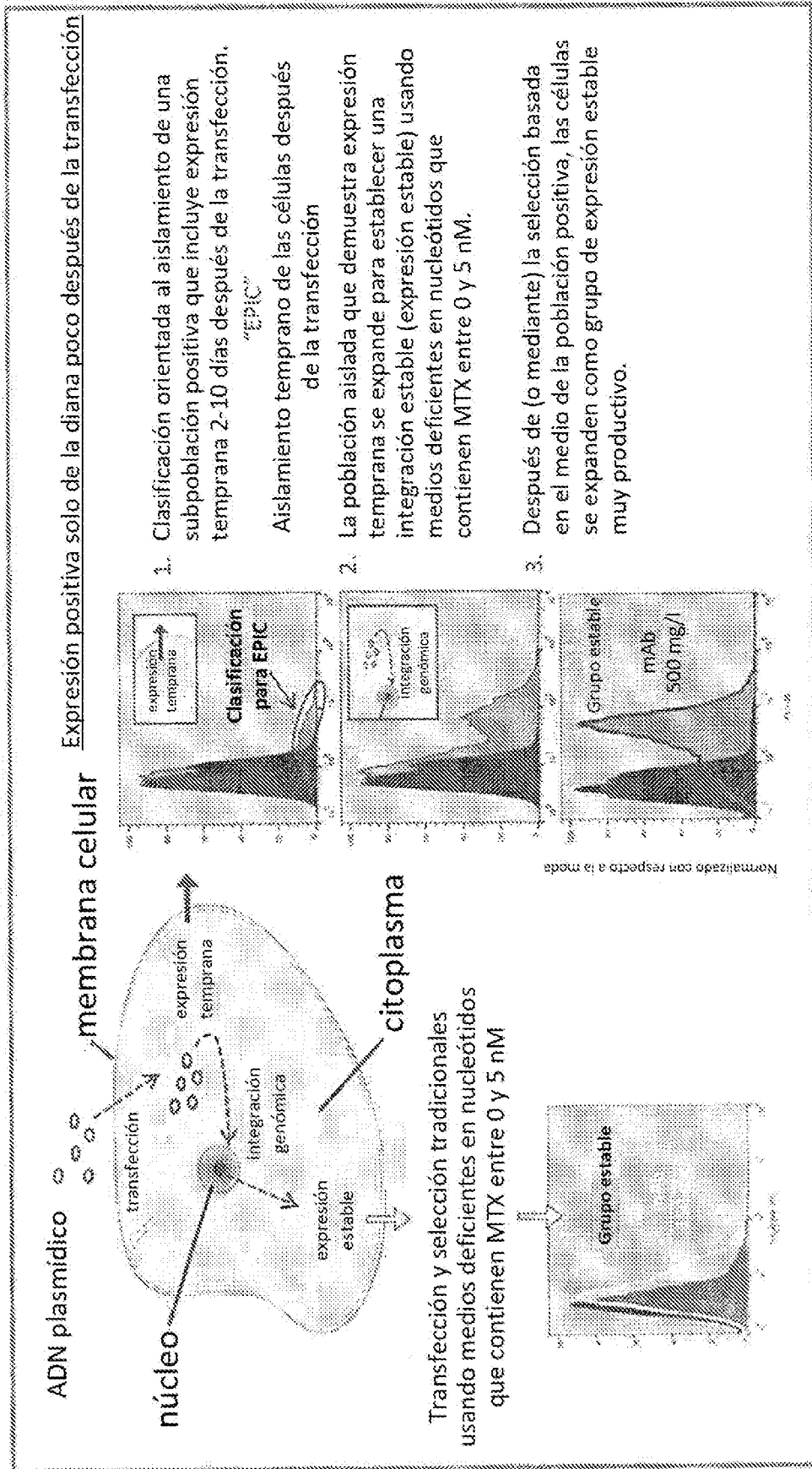


FIG. 29