

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **3 021 241**

⑮ Int. Cl.:  
**C12N 15/85**  
(2006.01)

⑫

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2017 PCT/US2017/055583**

⑧7 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2018 WO18067964**

⑨6 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2017 E 17797462 (3)**

⑨7 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2025 EP 3523440**

---

⑮ Título: **Aislamiento temprano de células después de la transfección (EPIC) para la producción de productos biológicos**

⑩ Prioridad:

**07.10.2016 US 201662405392 P**

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.05.2025**

⑯ Titular/es:

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

⑯ Inventor/es:

**CAIRNS, VICTOR, R.;  
DEMARIA, CHRISTINE y  
VITKO, JASON**

⑯ Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

**ES 3 021 241 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

Aislamiento temprano de células después de la transfección (EPIC) para la producción de productos biológicos

5 **LISTADO DE SECUENCIAS**

La presente solicitud contiene un Listado de secuencias que Dicha copia en ASCII, creada el 5 de octubre de 2017, se llama 593804\_SA9\_179CPC\_ST25.txt y tiene un tamaño de 15.363 bytes.

10 **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 requerir mucho tiempo, requiriendo a menudo múltiples rondas de selección para obtener poblaciones que contienen clones que son adecuados para la fabricación de productos biológicos. Sigue existiendo la necesidad de métodos rápidos y fiables para generar tanto poblaciones celulares grandes como clones que produzcan títulos elevados de productos biológicos con menos impacto negativo en la célula hospedadora.

**SUMARIO DE LA INVENCIÓN**

25 En algunos aspectos, la divulgación proporciona métodos de selección de una población de células que expresan un polipéptido diana. Como se describe en el presente documento, se desarrollaron métodos de selección que se basaron en la clasificación de poblaciones poco después de su transfección. Por lo tanto, los métodos presentan la etapa de aislar una subpoblación de células transfectadas para la expresión detectable temprana del vector transfectado. En ciertas realizaciones, la selección se basa en la expresión temprana de un polipéptido de selección, que es diferente del polipéptido diana y detectable en la superficie de la célula.

30 Inesperadamente, se descubrió que los métodos descritos en el presente documento eran más rápidos que los métodos tradicionales que usan dos rondas de selección con MTX para generar un grupo, y más productivos que la amplificación con MTX tradicional, incluida la selección con MTX de una sola ronda.

35 Los métodos descritos en el presente documento son útiles, por ejemplo, para la generación de grupos de células 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.

40 Por consiguiente, en algunos aspectos, la divulgación proporciona un método de producción de una población de células productoras que expresan un polipéptido diana, comprendiendo el método: (a) transfectar células hospedadoras con uno o más vectores que codifican uno o más ARNm, en donde el uno o más ARNm codifican un polipéptido de selección y el polipéptido diana; (b) aislar de las células hospedadoras transfectadas, en 2 a 15 días después de la transfección, una subpoblación de células hospedadoras transfectadas pero no clonadas de expresión temprana que expresan el polipéptido de selección, en donde el aislamiento emplea clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o clasificación de células activadas por magnetismo (MACS); y (c) expandir la subpoblación aislada de células hospedadoras transfectadas pero no clonadas, produciendo así una población de células productoras transfectadas pero no clonadas que expresan el polipéptido diana.

50 En algunas realizaciones, la etapa (b) se realiza en medio sin selección de fármacos.

En algunas realizaciones, la etapa (c) se realiza en medio sin selección de fármacos.

55 En algunas realizaciones, cada una de la etapa (b) y etapa (c) se realiza en medio sin selección de fármacos.

En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el método comprende además aislar el polipéptido diana de la población de células productoras transfectadas pero no clonadas.

60 En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el método comprende además aislar una o más células hospedadoras productoras individuales de la población de células productoras transfectadas pero no clonadas y cultivar individualmente la una o más células hospedadoras transfectadas individuales para producir poblaciones clonales de la una o más células hospedadoras transfectadas individuales.

65 En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, al menos una de las poblaciones clonales de la o las células hospedadoras transfectadas individuales produce una mejora de 2 a 30 veces en la producción del

polipéptido diana en comparación con la de un grupo estable de células hospedadoras transfectadas pero no clonadas obtenidas en la etapa (c).

5 En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, las células hospedadoras transfectadas pero no clonadas sujetas a aislamiento en la etapa (b) contienen  $80-120 \times 10^6$  células.

10 En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el aislamiento en la etapa (b) se realiza menos de seis días después de la transfección. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el aislamiento en la etapa (b) se realiza entre dos y cuatro días después de la transfección. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el aislamiento en la etapa (b) se realiza dos días después de la transfección. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el aislamiento en la etapa (b) se realiza tres días después de la transfección.

15 En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, la subpoblación de células hospedadoras transfectadas pero no clonadas contiene  $0,5-6,0 \times 10^6$  células antes de la expansión en la etapa (c).

20 En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, la expansión en la etapa (c) es durante entre 4-31 días.

25 En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, un primero del uno o más vectores codifica el ARNm que codifica el polipéptido diana, y un segundo del uno o más vectores codifica el polipéptido de selección.

30 En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, un primero del uno o más vectores codifica el ARNm que codifica el polipéptido diana y el ARNm que codifica el polipéptido de selección están ambos codificados en un vector.

35 En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, un primero del uno o más vectores codifica el ARNm que codifica el polipéptido diana, y un segundo del uno o más vectores codifica el polipéptido de selección.

40 En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el polipéptido de selección es un polipéptido de selección por FACS y el aislamiento en la etapa (b) emplea FACS.

45 En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el polipéptido diana y el polipéptido de selección forman un polipéptido de fusión.

50 En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el ARNm es un 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 de selección y un segundo ORF que codifica el polipéptido diana, en donde el primer ORF está 5' con respecto al segundo ORF. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el primer ORF tiene un codón de inicio distinto de AUG. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el segundo ORF tiene un codón de inicio AUG. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el codón de inicio 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 de selección está desprovisto de cualquier secuencia AUG.

55 En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el polipéptido de selección es CD52 o CD59.

60 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.

65 En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, las células hospedadoras son células CHO, células HEK293 o células HeLa.

La **Fig. 1A** es un esquema que representa la comparación entre la transfección y selección tradicionales y la transfección y selección basadas en EPIC. La expresión temprana se refiere a la expresión temprana después de la transfección, antes de una integración genómica significativa.

5 La **FIG. 1B** 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 temprana aparente poco después de la transfección (por ejemplo, día 3-4) y después pasaron a una expresión estable tras finalizar la selección (día 18-21).

10 La **FIG. 2** 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.

15 La **FIG. 3** 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 de selección como el polipéptido diana RFP) o pGZ700-RFP (que codifica solo el polipéptido diana RFP).

20 La **FIG. 4** 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.

25 La **FIG. 5** es un gráfico que representa los títulos de lotes no alimentados del día 14 para grupos generados por EPIC en comparación con las metodologías de MTX tradicionales. También se muestran grupos generados por el proceso de carga rápida (RB n.º 1 y RB n.º 2).

30 La **FIG. 6** es un gráfico que representa los títulos de lotes no alimentados del día 14 de clones generados por EPIC que lograron una expresión máxima que varía de 1,5-2,0 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.

35 La **FIG. 7** 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 usó EPIC para dirigirse a la expresión temprana de RFP el día 2, lo que produjo un grupo estable con RFP mejorada (y expresión del indicador CD52) en comparación con las metodologías tradicionales de transfección/selección (MTX 0 nM).

40 La **Fig. 8** es un esquema que muestra las 3 metodologías diferentes para generar grupos para apoyar un proceso de dilución limitante de clones (CLD). Todas las metodologías usan células transfectadas de recuperación "agrupadas" similares para comenzar el proceso. EPIC y la carga rápida, que son ambos procesos independientes de MTX, también tienen plazos reducidos en comparación con el proceso de selección de MTX tradicional. Este esquema completo se completó para cada una de las tres proteínas recombinantes (mAb n.º 1, mAb n.º 2, FusiónFc n.º 1).

45 La **Fig. 9** es un gráfico que muestra la productividad clonal de tres moléculas diferentes usando grupos generados a partir de cada proceso mostrado en la **Fig. 8** (EPIC, carga rápida y MTX). El gráfico ilustra que ambos procesos independientes de MTX (EPIC y carga rápida) lograron clones de alta productividad similar a los producidos a partir del proceso de selección con MTX.

50 La **Fig. 10** es un gráfico que ilustra los plazos de cada proceso, de ADN a grupos y grupos a clones para tres moléculas diferentes que representan cada proceso (EPIC, carga rápida y MTX). Las generaciones de grupos EPIC se pueden lograr mucho más rápido (1 mes) que los grupos generados por MTX, lo que se traduce en plazos globales significativamente más cortos para la producción de clones.

55 La **Fig. 11A** es la superposición de histogramas de FACS que muestra las dianas de clasificación variable de la población transitoriamente positiva que se aisló para generar un grupo EPIC (en comparación con un control no clasificado). La **Fig. 11B** es un gráfico que muestra la productividad asociada con cada diana de clasificación EPIC y demuestra claramente que una mayor orientación transitoria produce una mayor productividad. Los datos respaldan la afirmación de que el enriquecimiento de los grupos EPIC es únicamente el resultado del aislamiento de poblaciones transitoriamente positivas. PoP = Estudio preliminar de eficacia

## 60 DESCRIPCIÓN DETALLADA

65 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, por ejemplo, Ausubel et al. ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y. (1987-2008), incluidos todos los suplementos, M.R.

Green y J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cuarta Edición), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York (2012); y Harlow et al., Antibody: A Laboratory Manual, Capítulo 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York (2013, 2.ª edición).

5 **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.

10 En general, las nomenclaturas usadas 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 usadas 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 15 según las especificaciones del fabricante, como se consigue normalmente en la técnica, o como se describe en el presente documento. Las nomenclaturas usada 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.

20 25 Para que la divulgación pueda entenderse más fácilmente, a continuación se definen términos específicos.

30 Como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido" indica una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, un gen o fragmento genético, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADN complementario (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.

35 40 Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" indica una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, una proteína, un fragmento de proteína, una proteína multimérica, una proteína de fusión, un anticuerpo (incluidos fragmentos del mismo) y un péptido.

45 Como se usa en el presente documento, un "polipéptido de selección" es un polipéptido que puede detectarse, directa o indirectamente, mediante cualquier método adecuado que incluye, por ejemplo y sin limitación, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), clasificación de células activadas por magnetismo (MACS), ClonePix y cromatografía de afinidad. En ciertas realizaciones, el polipéptido de selección se expresa en la superficie de una célula, es decir, es un polipéptido de superficie celular. Los ejemplos de polipéptidos de selección incluyen polipéptidos que incluyen un dominio extracelular (por ejemplo, CD52 o CD59) que son capaces de unirse a o por un compañero de unión detectable (por ejemplo, un anticuerpo marcado con fluorescencia). Otros ejemplos de polipéptidos de selección 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. En ciertas realizaciones, el polipéptido de selección puede detectarse convenientemente, directa o indirectamente, mediante citometría de flujo.

50 55 Como se usa en el presente documento, "clasificación de células activadas por fluorescencia" o "FACS" se refiere a un método de separación de una población de células en una o más subpoblaciones basándose en la presencia, ausencia o nivel de uno o más polipéptidos de selección 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.

60 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 de células de FACS a modo de ejemplo incluyen BD Influx™ (BD Biosciences) y otros clasificadores de células equivalentes producidos por otros proveedores comerciales, tales como Sony, Bio-Rad y Beckman Coulter.

65 Como se usa en el presente documento, un "polipéptido de selección por FACS" es un polipéptido que se puede detectar, directa o indirectamente, mediante citometría de flujo. Los ejemplos de polipéptidos de selección por FACS incluyen polipéptidos que incluyen un dominio extracelular (por ejemplo, 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 de selección 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 usa en el presente documento, clasificación de células activadas por fluorescencia o "FACS" se refiere a un método de separación de una población de células en una o más subpoblaciones basándose en la presencia, ausencia o nivel de uno o más polipéptidos de selección por MACS expresados por las células. La MACS se basa en las propiedades de susceptibilidad magnética de células individuales marcadas para clasificar las células en subpoblaciones. Los clasificadores de células 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 de células MACS de modo de ejemplo incluyen el citómetro de flujo MACSQuant® (Miltenyi Biotec).

10 Como se usa en el presente documento, un "polipéptido de selección por MACS" es un polipéptido que se puede detectar, directa o indirectamente, mediante clasificación de células activada por magnetismo. Ejemplos de polipéptidos de selección por MACS incluyen polipéptidos que incluyen un dominio extracelular (por ejemplo, CD52 o CD59) que pueden unirse a un compañero de unión magnéticamente susceptible (por ejemplo, una perla marcada con hierro, níquel o cobalto acoplada a un anticuerpo) para la detección directa o indirecta del polipéptido. En ciertas realizaciones, el polipéptido de selección puede detectarse convenientemente, directa o indirectamente, mediante citometría de flujo.

15 20 Como se usa en el presente documento, "ClonePix" se refiere a un método de separación y dispositivo para separar una población de células en una o más subpoblaciones basándose en la presencia, ausencia o nivel de uno o más polipéptidos de selección expresados por las células. ClonePix se basa en propiedades ópticas, incluyendo la detección de luz blanca y fluorescencia, de células individuales o colonias de células con el fin de clasificar las células en subpoblaciones. ClonePix se describe en, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 7.776.584; 8.034.612; 25 8.034.625; 8.293.520; 8.293.525; 8.293.526; y 8.293.527, cada una de Richmond et al., y está disponible comercialmente en Molecular Devices (Sunnyvale, CA).

30 35 Como se usa 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, por ejemplo, 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.

40 En ciertas realizaciones, el polipéptido de selección es un polipéptido de superficie celular, y el polipéptido diana es un polipéptido secretado.

45 Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a tales conjuntos (por ejemplo, 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.

50 55 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 químico, humanizado, totalmente humano, biespecífico o bifuncional. También se contempla cualquier fragmento de unión a antígeno o variante de un anticuerpo, tal como Fab, Fab', Fab2', regiones variables monocatenarias y variaciones de los mismos.

60 65 Como se usa en el presente documento, 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.

Como se usa en el presente documento, el término "célula productora" se refiere a una célula que expresa un polipéptido de interés. En ciertas realizaciones, una célula productora es una célula que expresa un polipéptido diana como se divulga en el presente documento. En ciertas realizaciones, una célula productora es una célula que expresa tanto un polipéptido de selección como un polipéptido diana como se divulga en el presente documento.

65 En ciertas realizaciones, la expresión "células productoras" se refieren a células que son adecuadas para la producción de proteínas, por ejemplo, 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.

Como se usa en el presente documento, una "población de células productoras" es una población de células que un nivel elevado de uno o más polipéptidos, por ejemplo, un polipéptido de selección por FACS y un polipéptido diana que están codificados por el mismo ARNm multicistrónico. En ciertas realizaciones, una "población de células productoras" es una población de células que expresa un nivel mejorado de un polipéptido diana. En algunas realizaciones, el nivel mejorado es de al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1.000 veces o al menos 10.000 veces del uno o más polipéptidos en una población no seleccionada. En algunas realizaciones, el nivel mejorado es de al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1.000 veces o al menos 10.000 veces de un polipéptido de selección por FACS en una población no seleccionada mediante citometría de flujo (por ejemplo, en un clasificador de células BD Influx™). En algunas realizaciones, el nivel mejorado es al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1.000 veces o al menos 000 veces de un polipéptido de selección por MACS en una población no seleccionada como se detecta mediante citometría de flujo (por ejemplo, en un citómetro de flujo MACSQuant® (Miltenyi Biotec)). En el presente documento se describen métodos de generación de poblaciones de células productoras.

Como se usa en el presente documento, una "población de células productoras" es una población de células que expresa niveles variables de uno o más polipéptidos, por ejemplo, un polipéptido de selección por FACS y un polipéptido diana que están codificados por el mismo ARNm multicistrónico. En el presente documento se describen métodos de generación de poblaciones de células productoras.

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

Como se usa en el presente documento, un "medio sin selección de fármacos" es un medio de cultivo que carece de un fármaco (por ejemplo, metotrexato (MTX)) que se usa para seleccionar una población o subpoblaciones de células que expresan una proteína que confiere resistencia a fármacos (por ejemplo, dihidrofolato reductasa) a la población o subpoblación.

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 (por ejemplo, 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 excluido.

Como se usa en el presente documento, "medio deficiente en nucleótidos" es medio de cultivo que carece o contiene niveles bajos (por ejemplo, menos de 10 microgramos/ml) de una o más de las nucleobases 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)).

Como se usa 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.

Como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión "codón de inicio 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 de inicio AUG. El uso de codones de inicio 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 de inicio distintos de AUG tienen menor eficiencia de traducción en comparación con la de un AUG; por ejemplo, el codón de inicio 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 de inicio 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; Kozak (1989) Mol. Cell. Biol. 9(11): 5073-5080). La secuencia de consenso de ADN de Kozak completa es GCCRCCATGG (SEQ ID NO:1), donde el codón de inicio ATG (AUG en ARN) está en negrita, la A del codón de inicio ATG se designa como la posición +1 y la "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 de selección 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, por ejemplo, la secuencia de ADN ATG, por ejemplo, se correspondería con la secuencia de ARN AUG, y viceversa.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "clasificación de carga rápida" y "carga rápida" se refieren a métodos de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para seleccionar por lotes células productoras que expresan un polipéptido diana. Los métodos comprenden las etapas de (a) proporcionar una población heterogénea de células productoras, en donde las células productoras en la población expresan niveles variables de un polipéptido de selección 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 usando FACS, en donde las células productoras en la primera subpoblación heterogénea expresan el polipéptido de selección 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 de fármacos, produciendo de este modo una primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras.

El método de aumento rápido de volumen comprende además las etapas de (d) seleccionar de la primera subpoblación heterogénea expandida de células productoras en la etapa (c) una segunda subpoblación heterogénea de células productoras usando FACS, en donde las células productoras en la segunda subpoblación expresan el polipéptido de selección 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 la etapa (c); y (e) expandir la segunda subpoblación heterogénea de células productoras en un medio sin selección de fármacos, produciendo de este modo una segunda subpoblación heterogénea expandida de células productoras.

Como se usa en el presente documento, el término "EPIC" se refiere al aislamiento temprano de células después de la transfección, como se describe con más detalle en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "FLARE" se refiere a "expresión de indicador atenuada con citometría de flujo". FLARE es un sistema de expresión que utiliza un ARNm multicistrónico que contiene al menos dos marcos abiertos de lectura (ORF), un ORF cadena arriba que contiene un codón de inicio distinto de AUG y que codifica un polipéptido de selección por FACS y un ORF cadena abajo que contiene un codón de inicio AUG y que codifica un polipéptido diana. Véase la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2009/0239235.

Como se usa 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 usa el término "aproximadamente" para modificar un valor indicado, el intervalo indicado abarcará cualquier número dentro de ±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.

## II. MÉTODOS PARA LA SELECCIÓN TEMPRANA DE CÉLULAS PRODUCTORAS

La divulgación se refiere a un método de producción de una población de células productoras que expresan un polipéptido diana según la reivindicación 1. El método comprende:

- 40 (a) transfectar células hospedadoras con uno o más vectores que codifican uno o más ARNm, en donde el uno o más ARNm codifican un polipéptido de selección y el polipéptido diana;
- 45 (b) aislar de las células hospedadoras transfectadas, en 2 a 15 días desde la transfección, una subpoblación de células hospedadoras transfectadas pero no clonadas de expresión temprana que expresan el polipéptido de selección, en donde el aislamiento emplea clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o clasificación de células activadas por magnetismo (MACS) en el polipéptido de selección; y
- 50 (c) expandir la subpoblación aislada de células hospedadoras transfectadas pero no clonadas, produciendo así una población de células productoras transfectadas pero no clonadas que expresan el polipéptido diana.

Las células transfectadas de expresión temprana pueden comprender diferentes clases de ADN exógeno, parte del cual no se ha integrado en el ADN genómico de las células, y parte del cual se ha integrado en el ADN genómico de las células. Ambos de estos tipos de ADN tienen el potencial de conducir a la expresión del polipéptido o polipéptidos que codifican.

Las células hospedadoras se transfectan con uno o más vectores que codifican uno o más ARNm, en donde el uno o más ARNm codifican un polipéptido de selección y el polipéptido diana. Una célula productora se puede generar usando cualquier tipo de célula adecuada para la producción de un polipéptido diana a partir de un ARNm multicistrónico. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula eucariota. Los ejemplos de células eucariotas adecuadas para producir un polipéptido diana incluyen, pero no se limitan a, una línea celular de ovario de hámster chino (CHO), 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 hospedadoras adecuadas incluyen células de levadura, células de insecto (por ejemplo, células de *Drosophila* Schneider S2, células de insecto Sf9 (documento de patente WO 94/26087), células de insecto BTI-TN-5B (High Five™) (Invitrogen)), células vegetales, células aviares y células bovinas. Los ejemplos de

levaduras útiles para la expresión incluyen, pero no se limitan a, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Torulopsis*, *Yarrowia* y *Pichia*. Véanse, por ejemplo, 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 procariotas, incluidas células bacterianas, tales como *E. coli* (por ejemplo, cepa Dh5 $\alpha$ <sup>TM</sup>) Invitrogen, Carlsbad, CA),

5 PerC6 (Crucell, Leiden, NL), *B. subtilis* y/u otras bacterias adecuadas. Las células se pueden comprar a un proveedor comercial tal como la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) o cultivar a partir de una cepa aislada usando métodos conocidos en la técnica.

10 Para crear una célula productora, el o los polinucleótidos recombinantes se pueden insertar en la célula hospedadora usando cualquier técnica de transferencia adecuada (por ejemplo, por transformación, transfección, electroporación o transducción). Los vectores que codifican uno o más ARNm incluyen vectores de ADN. Los vectores que se pueden usar incluyen plásmidos, virus, fago, transposones y minicromosomas, de los que los plásmidos son una realización típica. Generalmente, dichos vectores incluyen además una secuencia señalizadora, 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) y virus adenoasociado (AAV). 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, por ejemplo, la solicitud de patente internacional n.º WO 95/27071. Otros vectores víricos para su uso en la 15 presente divulgación incluyen vectores derivados de la variolovacuna, virus del herpes (por ejemplo, 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.

20

25 Para uso en transfección, en ciertas realizaciones los vectores circulares pueden prelinealizarse, es decir, linealizarse antes de la introducción en la célula hospedadora, por ejemplo mediante restricción en uno o más sitios de endonucleasa de restricción. Se cree que la linealización es necesaria para la integración en el genoma, y esto puede efectuarse mediante prelinealización o de manera aleatoria por endonucleasas presentes naturalmente dentro de la 30 célula hospedadora. La prelinealización tiene la ventaja potencial de introducir un grado de control en el sitio de restricción. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, pueden introducirse vectores circulares, incluyendo vectores circulares superenrollados, en la célula hospedadora. En ciertas realizaciones según la presente invención, el uno o más vectores son lineales en el momento de la transfección.

35 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 de inicio de la traducción alternativos 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 40 posición inmediatamente 5' del codón de inicio para mejorar la expresión.

45 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 procariotas y eucariotas. Los promotores procariotas incluyen promotores lac, tac, T3, T7 para *E. coli*; 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, por ejemplo, enolasa, gliceralfdehido 3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa 6 fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa y glucocinasa. Los promotores eucariotas incluyen promotores de levadura inducibles tales como alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, metalotioneína y enzimas responsables del metabolismo del 50 nitrógeno o la utilización de la maltosa/galactosa; promotores de ARN polimerasa II, incluidos promotores víricos tales como polioma, viruela y adenovirus (por ejemplo, adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (CMV, en particular, el promotor génico temprano inmediato), retrovirus, virus de la hepatitis B, actina, promotor del virus del sarcoma Rous (VSR) y promotores tempranos o tardíos del virus de los simios 40 y no víricos, tales como EF-1 alfa (Mizushima y Nagata (1990) Nucleic Acids Res. 18(17):5322). Los expertos en la técnica podrán 55 seleccionar el promotor adecuado para expresar cualquier polipéptido dado en una célula hospedadora dada.

60 Cuando resulte adecuado, por ejemplo, para la expresión en células de eucariotas 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, metalotioneína e insulina. Como alternativa, se puede usar 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 2004/009823). Aunque dichos potenciadores a menudo se encuentran en el vector en un sitio cadena arriba del promotor, también 65 pueden ubicarse en otra parte, por ejemplo, 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 usada para la expresión.

Además, los vectores (por ejemplo, vectores de expresión) pueden comprender un marcador de selección 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 usar en células procariotas (por ejemplo, gen de f3-lactamasa (resistencia a ampicilina), gen tet (resistencia a tetraciclina)) y eucariotas (por ejemplo, genes de resistencia a la neomicina (G418 o geneticina), gpt (ácido micofenólico), ampicilina o higromicina B). 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 (por ejemplo, LEU2, URA3, HIS3) se usan a menudo como marcadores de selección en levadura. También se contempla el uso de vectores víricos (por ejemplo, baculovirus) o fagos, y vectores que son capaces de integrarse en el genoma de la célula hospedadora, tales como vectores retrovíricos.

En sistemas eucariotas, las señales de poliadenilación y terminación pueden unirse operativamente a un polinucleótido que codifica el ARNm multicistrónico como se describe en el presente documento. Dichas 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 (por ejemplo, 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 procariotas, 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 usada 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 específicos de células hospedadoras.

Las células productoras de la divulgación contienen un polinucleótido recombinante (por ejemplo, un ADNr recombinante) que codifica una molécula de ARNm multicistrónica a partir de la cual los polipéptidos diana y de selección se traducen por separado de diferentes ORF. En algunas realizaciones, el polipéptido de selección es un polipéptido de superficie celular. En ciertas realizaciones, las células productoras de la divulgación contienen una pluralidad de polinucleótidos recombinantes, cada uno de los cuales codifica una molécula de ARNm multicistrónica a partir de la cual un polipéptido diana y un polipéptido de selección se traducen por separado de diferentes ORF. Por lo tanto, cada polipéptido diana puede asociarse a un polipéptido de selección particular. En algunas realizaciones, el polipéptido de selección es un polipéptido de superficie celular.

Los ejemplos de polipéptidos de superficie celular incluyen, pero sin limitación, CD2, CD20, CD52 y CD59. A continuación se proporcionan secuencias de aminoácidos a modo de ejemplo, no limitantes, para los polipéptidos de superficie celular CD52 y CD59.

**40 Secuencia de aminoácidos para el polipéptido CD52 humano a modo de ejemplo:**

LERFLFLLLTISLLVLVQIQTGLSGQNDTSQTSSPSASSNISGGIFLFFVANAIHL.  
FCFS (SEQ ID NO: 2)

**45 Secuencia de aminoácidos para el polipéptido CD59 humano a modo de ejemplo (mutante aceptor de empalme):**

LGIQGGSVLFGLLLVLA VFCHSGHSLQCYNCPNPTADCKTAVNCSSDFDACLITKAGLQVYNNNCWKFEHCNFNDVTTRLRENELEYCCKKDLCNFNEQLENGG  
TSLSEKTVLLVTPFLAAWSLHP (SEQ ID NO: 3)

**50 Secuencia de aminoácidos para el polipéptido CD52 de ratón a modo de ejemplo:**

LKSFLFLTIIILVVIQIQTGSLGQATTAASGTNKNSTSTKTPLKSGASSIIDAG  
ACSFLLFANTLICLFYLS (SEQ ID NO:4)

En algunas realizaciones, se proporciona un primer ORF que codifica un polipéptido de selección, tal como CD52 o CD59. A continuación, se proporcionan secuencias de ORF a modo de ejemplo, no limitantes, para CD52 y CD59.

**55 Secuencia de nucleótidos para ORF de CD52 humano a modo de ejemplo:**

## Secuencia de nucleótidos para ORF de CD59 humano a modo de ejemplo:

ttgggaatccaaggagggtctgtcttgttggctgtgtctcgctctgtgtttctgcctatccggcatagccgtgc  
tacaactgtcttaacccaaactgtgtactgcaaaacagccgtcaaltgttcatgtgttttgacggtgtctcatccaaagctg  
gggttacaagggtataacaactgttggaaagtttgagcatgtcaalttcaacgacgtcacaacccgttgttggaaaacgact  
aacgtactactgtgtcaagaaggacgtgtactttacgaacagcttgtaaaacggaggacatctttatcagagaaaac  
agtttctctgtgtactccattttgttggcagcttggatgttgcattccctaa (SEQ ID NO: 6)

Secuencia de nucleótidos para ORF de CD52 de ratón a modo de ejemplo:

ttgaagagcttcctcttcctactatcatttcctcgtagtcattcagatacaaacaggatcccttaggacaagccactacgg  
cccggttcaggtaactaacaaaaacagcaccctccaccaaaaaacccccccttaaagagcggggccctatccatcatcgacg  
ggcgcgttgcagtttccttttcgtccaaatcccttatttgccttttcacccatcgatctaactgagtaa (SEQ ID NO:7)

Como se trata a continuación, cada uno de los ORF a modo de ejemplo anteriores se ha modificado para eliminar todos los tripletes ATG internos.

En algunas realizaciones, se proporciona un segundo ORF que codifica un polipéptido diana, tal como un anticuerpo, enzima o proteína de fusión de Fc. En algunas realizaciones, se realiza traducción separada mediante el uso de un codón de inicio distinto de AUG para el inicio de la traducción del polipéptido de selección y el uso de un codón de inicio 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 de selección. También se puede realizar una traducción separada usando un sitio interno de entrada de ribosomas (IRES). En algunas realizaciones, el elemento IRES está situado cadena arriba del polinucleótido que codifica el polipéptido diana y cadena abajo del polinucleótido que codifica el polipéptido de selección. En algunas realizaciones, el elemento IRES está situado cadena arriba del polinucleótido que codifica el polipéptido de selección y cadena abajo del polinucleótido que codifica el polipéptido diana.

En algunas realizaciones, un codón de inicio distinto de AUG está situado dentro del ADN que codifica el polipéptido de selección de tal manera que la traducción del polipéptido de selección es menos eficiente que la traducción del polipéptido diana. Para lograr una eficiencia de traducción reducida, el codón de inicio AUG del polipéptido de selección puede cambiarse a un codón de inicio alternativo distinto de AUG, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a: CUG, GUG, UUG, AUU, AUA y ACG.

Por lo tanto, cuando se usa un codón de inicio alternativo distinto de AUG, la expresión de un polipéptido de selección puede atenuarse con respecto a la de un polipéptido diana coexpresado. Además de la alteración del codón de inicio, el ADN que codifica el polipéptido de selección puede modificarse en todos los tripletes ATG internos para evitar el inicio interno de la traducción. En algunas realizaciones, el polipéptido de selección tiene una secuencia de aminoácidos corta (< 200 aminoácidos) y está codificado por un polinucleótido con pocos (< 10) tripletes ATG.

Si no deseas quedar ligado a la teoría, para iniciar la traducción del ARNm que codifica tanto el polipéptido de selección como el polipéptido diana, los ribosomas comienzan a leer en la estructura de caperuza 5' del ARNm, leyendo la mayoría más allá del codón de inicio alternativo (por ejemplo, UUG) y, en su lugar, inician la traducción en el codón de inicio AUG cadena abajo. Sin embargo, el inicio de la traducción puede producirse en el codón de inicio alternativo, aunque con una frecuencia muy baja, de modo que también se expresa un nivel bajo del polipéptido de selección.

De las células hospedadoras transfectadas se selecciona una subpoblación de células hospedadoras transfectadas pero no clonadas de expresión temprana que expresan niveles detectables del polipéptido de selección. Durante la transfección, las células hospedadoras individuales absorberán diferentes cantidades de polinucleótido exógeno, por ejemplo, ADN, de una manera esencialmente aleatoria. Algunas células absorberán muchas copias del polinucleótido exógeno, otras absorberán menos copias y algunas no absorberán ninguna. La cantidad de ADN absorbido en una célula dada afecta el destino del ADN, incluyendo su expresión temprana y su integración en el genoma.

50 Despues de la transfección con ADN, al menos parte del polinucleótido que se ha introducido en la célula se transloca en el núcleo donde se transcribe en ARNm. En los primeros días, la expresión del ADN introducido puede ser expulsada de una o más clases de ADN, algunas de las cuales aún no se han integrado en el genoma de la célula

hospedadora, y algunas de las cuales se han integrado en el genoma de la célula hospedadora. En este punto, se cree que el grado de expresión es principalmente proporcional a la "dosis" de ADN introducida en la célula hospedadora y su núcleo. Cuanto mayor sea la cantidad de ADN exógeno absorbido por la célula hospedadora, mayor será el grado de expresión temprana. Sin embargo, una pequeña cantidad de ADN que se ha introducido en la célula hospedadora, particularmente una vez que es lineal, puede integrarse en el genoma de la célula hospedadora. Por lo tanto, en los primeros días después de la transfección, hay una competencia entre la degradación y pérdida del ADN exógeno, por un lado, y la integración estocástica del ADN exógeno en el genoma, por otro lado. La integración puede incluir copias individuales o múltiples de ADN introducido. Cuanto mayor sea la cantidad de ADN exógeno absorbido por la célula hospedadora, mayor será la posibilidad (y el grado) de su integración. En última instancia, es el ADN integrado que es responsable de la expresión productiva a largo plazo, es decir, la expresión después de que todo el ADN no integrado (por ejemplo, el plásmido o el ADN episómico) se degrada hasta el punto de ser incapaz de una expresión significativa.

Por lo tanto, en los primeros 2 a aproximadamente 15 días (por ejemplo, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días) después de la transfección, hay células hospedadoras transfectadas de expresión temprana que expresan cantidades detectables del polipéptido de selección. Particularmente en los primeros 2-6 días, más particularmente en los primeros 2-4 días, e incluso más particularmente en los primeros 2-3 días, se cree que esta expresión temprana es en gran parte, pero no necesariamente exclusivamente, expulsada del ADN exógeno que aún no se ha integrado en el genoma de la célula hospedadora. Durante este período temprano después de la transfección, puede haber algún grado de integración de ADN exógeno en el genoma de la célula hospedadora. Debido a que esta expresión temprana depende de la "dosis" de ADN absorbida por la célula hospedadora y su núcleo, y la dosis es esencialmente aleatoria entre las células transfectadas, durante este período temprano las células hospedadoras transfectadas incluyen subpoblaciones de células que expresan diferentes cantidades de polipéptido codificado por el ADN exógeno. También durante este período temprano, las subpoblaciones de células que expresan mayores cantidades de polipéptido codificado por el ADN exógeno presumiblemente absorbieron mayores cantidades de ADN exógeno y, por lo tanto, tienen una mayor probabilidad de incorporar el ADN en su genoma.

Por consiguiente, el término "expresión temprana" o "expresión temprana", como se usa en el presente documento, se refiere a expresión detectable en los primeros 2 a aproximadamente 15 días (por ejemplo, 2-15 días, 2-14 días, 2-13 días, 2-12 días, 2-11 días, 2-10 días, 2-9 días, 2-8 días, 2-7 días, 2-6 días, 2-5 días, 2-4 días, 2-3 días, 3-15 días, 3-14 días, 3-13 días, 3-12 días, 3-11 días, 3-10 días, 3-9 días, 3-8 días, 3-7 días, 3-6 días, 3-5 días, 3-4 días, 4-15 días, 4-14 días, 4-13 días, 4-12 días, 4-11 días, 4-10 días, 4-9 días, 4-8 días, 4-7 días, 4-6 días, 4-5 días, 5-15 días, 5-14 días, 5-13 días, 5-12 días, 5-11 días, 5-10 días, 5-9 días, 5-8 días, 5-7 días, 5-6 días, 6-15 días, 6-14 días, 6-13 días, 6-12 días, 6-11 días, 6-10 días, 6-9 días, 6-8 días, 6-7 días, 7-15 días, 7-14 días, 7-13 días, 7-12 días, 7-11 días, 7-10 días, 7-9 días, 7-8 días, 8-15 días, 8-14 días, 8-13 días, 8-12 días, 8-11 días, 8-10 días, 8-9 días, 9-15 días, 9-14 días, 9-13 días, 9-12 días, 9-11 días, 9-10 días) después de la transfección. En ciertas realizaciones, el término "que se expresa temprano" o "expresión temprana" se refiere a expresión detectable en los primeros 2 a aproximadamente 10 días después de la transfección. En ciertas realizaciones, el término "que se expresa temprano" o "expresión temprana" se refiere a expresión detectable en los primeros 2 a aproximadamente 6 días después de la transfección. En ciertas realizaciones, el término "que se expresa temprano" o "expresión temprana" se refiere a expresión detectable en los primeros 2 a aproximadamente 5 días después de la transfección. En ciertas realizaciones, el término "que se expresa temprano" o "expresión temprana" se refiere a expresión detectable en los primeros 2 a aproximadamente 4 días después de la transfección. En ciertas realizaciones, el término "que se expresa temprano" o "expresión temprana" se refiere a expresión detectable en los primeros 2 a aproximadamente 3 días después de la transfección.

Se puede usar 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 superficie celular se pone en contacto directa o indirectamente con las células hospedadoras transfectadas en condiciones que permiten o favorecen la unión de anticuerpo al polipéptido de selección y, por lo tanto, seleccionan una subpoblación de células hospedadoras transfectadas de expresión temprana. La selección del anticuerpo u otro agente de unión está determinada por: 1) su capacidad para unirse selectivamente al polipéptido de selección 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.

En una realización alternativa, un primer agente puede ser una proteína o péptido que se une al polipéptido de selección, cuyo primer agente también unirse a su vez a un segundo agente que puede marcarse de manera detectable (por ejemplo, incorporando un marcador fluorescente, enzimático, colorimétrico, magnéticamente susceptible u otro detectable). Se pretende, aunque no siempre se indica explícitamente, que la unión "indirecta" al polipéptido de selección incluya el uso de cualquier número de compañeros intermedios. En ciertas realizaciones, la unión "indirecta" al polipéptido de selección incluye el uso de un compañero intermedio, por ejemplo, un anticuerpo no marcado u otro agente de unión.

En algunas realizaciones, el anticuerpo u otro agente de unión se une directamente al marcador de superficie celular y comprende un marcador fluorescente. Los marcadores fluorescentes adecuados incluyen, pero no se limitan a,

isocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, tetrametilrodamina, eosina, ficoeritrina (PE), eritrosina, alococianina (APE), cumarina, metilcumarinas, pireno, verde de malaquita, estílbeno, Lucifer Yellow, Cascade Blue y Texas Red. Se describen otros colorantes ópticos adecuados en el manual de Molecular Probes®, 11.<sup>a</sup> edición, 2010.

5 En algunas realizaciones, el marcador fluorescente está funcionalizada para facilitar la unión covalente al anticuerpo u otro agente. Los grupos funcionales adecuados incluyen, pero sin limitación, grupos isocianato, grupos amino, grupos haloacetilo, maleimidas, ésteres de succinimidilo y haluros de sulfonilo, todos los cuales se pueden usar para unir el marcador fluorescente a una segunda molécula. La elección del grupo funcional del marcador fluorescente dependerá del sitio de unión al anticuerpo u otro agente de unión, el polipéptido de selección o el segundo agente de marcado.

10 La unión del marcador fluorescente puede ser directa o a través de un conector al anticuerpo u otro agente de unión. En un aspecto, el conector es un resto de acoplamiento relativamente corto que generalmente se usa para unir moléculas. En esta realización, la unión del primer resto de marcado 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.

15 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) Biotechnol. 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.

20 25 Los pares de unión adecuados para su uso en la unión indirecta del marcador al agente (que, a su vez, se une al polipéptido de selección) incluyen, pero no se limitan a, antígenos/anticuerpos, incluyendo digoxigenina/anticuerpo, dinitrofenol (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 de células u otro sistema de detección usado en relación con la divulgación.

30 35 Por lo tanto, en algunos aspectos, los primeros restos de marcado (cuando se usan segundos restos de marcado) incluyen, pero no se limitan a, haptenos, tales como biotina. La biotinilación de moléculas diana es bien conocida, por ejemplo, se conoce un gran número de agentes de biotinilación, incluidos agentes reactivos a amina y reactivos a tiol, para la biotinilación de proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono y ácidos carboxílicos. Del mismo modo, también se conoce un gran número de otros reactivos de haptenilación.

40 Los anticuerpos usados en un método descrito en el presente documento se pueden producir en cultivo celular, en fagos o en diversos animales, incluidos, pero no se limitan a, ratones, ratas, hámsteres, cobayas, conejos, ovejas, cabras, caballos, vacas, camélidos, monos, chimpancés, etc., siempre que los anticuerpos conserven la especificidad de unión para el polipéptido de selección. 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.

45 50 En realizaciones en las que el anticuerpo u otro agente de unión para el polipéptido de selección no está marcado directamente, el anticuerpo o agente de unión también contiene preferentemente y conserva la capacidad de unirse a un agente secundario que es detectable después de unirse a la célula a través del polipéptido de selección.

55 En algunas realizaciones, cuando el polipéptido de selección es CD52, el polipéptido de selección puede detectarse usando 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. 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-CD52 están disponibles en el mercado (por ejemplo, anticuerpos conjugados con un marcador fluorescente, tales como los comercializados por los proveedores comerciales AbCam, SeroTec y BioLegend).

60 65 En algunas realizaciones, cuando el polipéptido de selección es CD59, el polipéptido de selección puede detectarse usando 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. Además, varios anticuerpos anti-CD59 están disponibles en el mercado (por ejemplo, anticuerpos conjugados con un marcador fluorescente, tales como los comercializados por los proveedores comerciales Abcam, SeroTec y BioLegend).

70 En una realización particular, cuando el polipéptido de selección es CD20, el polipéptido de selección puede detectarse usando un anticuerpo anti-CD20. "Anticuerpo anti-CD52" se refiere a un anticuerpo que reconoce y se une específicamente a 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 Pharmigen; 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., catálogo n.º 302301, clon: 21-7, isotipo: IgG2b, κ); EMD Biosciences, Inc., marca CALBIOCHEM® (San Diego, Calif., clon 2H7 n.º de catálogo 217670, isotipo: IgG2b); y Anaspec (San José, Calif., n.º de catálogo 29587).

Para uso en MACS, donde hay un número más limitado de perlas magnéticas específicas de antígeno, se puede usar un anticuerpo primario marcado o no marcado u otro agente de unión (por ejemplo, proteína de fusión de Fc) para unirse al polipéptido de selección, seguido de la unión por, por ejemplo, una perla magnética específica de isotipo. Por ejemplo, Miltenyi Biotec vende microperlas CD20 y microperlas IgG anti-ratón, pero ni las microperlas CD52 ni CD59; las microperlas IgG anti-ratón podrían usarse para etiquetar IgG de ratón primario anti-CD52 humano o IgG de ratón anti-CD59 humano.

En un método a modo de ejemplo, no limitante, una población de células hospedadoras transfectadas como se describe en el presente documento se pone en contacto con un agente que reconoce y se une directa o indirectamente al polipéptido de selección, 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 de selección. Las células que se unen al agente o anticuerpo se seleccionan a continuación para usar un método adecuado, tal como FACS (por ejemplo, seleccionando células que expresan el polipéptido de selección por FACS a un nivel alto, tal como un nivel que es al menos el 80 % del nivel de la población) y se usan para crear una subpoblación de células hospedadoras transfectadas, pero no clonadas, de expresión temprana. Alternativamente, las células que se unen al agente o anticuerpo se seleccionan a continuación para usar un método adecuado, tal como MACS (por ejemplo, seleccionando células que expresan el polipéptido de selección por MACS a un nivel alto, tal como un nivel que es al menos el 80 % del nivel de la población) y se usan para crear una subpoblación de células hospedadoras transfectadas, pero no clonadas, de expresión temprana.

La subpoblación seleccionada de células hospedadoras transfectadas, pero no clonadas, de expresión temprana se cultiva entonces en condiciones que dan como resultado la expansión de la subpoblación para producir una población de células productoras transfectadas, pero no clonadas, que expresan el polipéptido diana.

En ciertas realizaciones, la etapa de aislar de las células hospedadoras transfectadas, en 2 a 15 días desde la transfección, una subpoblación de células hospedadoras transfectadas, pero no clonadas, de expresión temprana que expresan el polipéptido de selección se realiza en medio sin selección de fármacos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la etapa de aislar de las células hospedadoras transfectadas, en 2 a 15 días desde la transfección, una subpoblación de células hospedadoras transfectadas, pero no clonadas, de expresión temprana que expresan el polipéptido de selección se realiza en medio MTX 0 nM (es decir, sin MTX).

En ciertas realizaciones, la etapa de expandir la subpoblación seleccionada de células hospedadoras transfectadas, pero no clonadas, se realiza en medio sin selección de fármacos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la etapa de expandir la subpoblación seleccionada de células hospedadoras transfectadas, pero no clonadas, se realiza en medio MTX 0 nM (es decir, sin MTX).

En ciertas realizaciones, tanto la etapa de (b) aislar de las células hospedadoras transfectadas, en 2 a 15 días desde la transfección, una subpoblación de células hospedadoras transfectadas, pero no clonadas, de expresión temprana que expresan el polipéptido de selección, como la etapa de (c) expandir la subpoblación aislada de células hospedadoras transfectadas, pero no clonadas, se realizan en medio sin selección de fármacos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, tanto la etapa de (b) aislar de las células hospedadoras transfectadas, en 2 a 15 días desde la transfección, una subpoblación de células hospedadoras transfectadas, pero no clonadas, de expresión temprana que expresan el polipéptido de selección, como la etapa de (c) expandir la subpoblación aislada de células hospedadoras transfectadas, pero no clonadas, se realizan en medio MTX 0 nM (es decir, sin MTX).

Las células, incluidas las células productoras, se pueden cultivar en matraces giratorios, matraces de agitación, frascos rotatorios, reactores de ondas (por ejemplo, System 1000 de wavebiotech.com) o sistemas de fibra hueca, o, para la producción a gran escala, se usan reactores de tanque con agitación o reactores de bolsa (por ejemplo, Wave Biotech, Somerset, Nueva Jersey, EE. UU.), particularmente para cultivos en suspensión. Los reactores de tanque con agitación se pueden adaptar para aireación usando, por ejemplo, rociadores, deflectores o impulsores de cizallamiento bajo. Para columnas de burbujas y reactores de transporte aéreo, se puede usar aireación directa con burbujas de aire u oxígeno. Cuando las células hospedadoras se cultivan en un medio de cultivo sin suero, el medio se puede complementar con un agente protector celular, tal como poloxámero 188 (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 usar microportadores como sustratos de cultivo para líneas celulares dependientes de anclaje, o las células se pueden adaptar 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

5 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 UltraCHO™ (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 se adapten a condiciones sin suero (véase, por ejemplo, Scharfenberg, K. et al. (1995) en: *Animal Cell Technology: Developments Towards the 21st Century* (Beuvery, E.C. et al., eds), pág. 619-623, Kluwer Academic publishers).

10 En ciertas realizaciones, el método comprende además aislar el polipéptido diana de la población de células productoras transfectadas, pero no clonadas. El polipéptido diana se puede aislar usando cualquier método conocido en la técnica y se puede purificar adicionalmente, por ejemplo, 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 15 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,5 % o más. Un polipéptido diana según las realizaciones descritas puede secretarse en el medio y recuperarse y purificarse a partir del mismo usando diversas técnicas para proporcionar un grado de purificación adecuado para el uso previsto. Por ejemplo, el uso de un polipéptido diana (por ejemplo, un anticuerpo o proteína de fusión de 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 usando centrifugación seguida de una etapa de clarificación del sobrenadante usando, por ejemplo, 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 diáisis y electroforesis en gel, y técnicas cromatográficas, tales como hidroxiapatita (HA), cromatografía de afinidad (que implica opcionalmente un sistema de marcado de afinidad, tal como polihistidina) y/o cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) (véase el documento de patente US 5.429.746). En una realización, un polipéptido diana, tal como un anticuerpo o proteína de fusión de Fc, después de diversas etapas de clarificación, se captura usando cromatografía de afinidad 20 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. 25 También se pueden emplear diversas etapas de eliminación de virus (por ejemplo, nanofiltración usando, por ejemplo, un filtro DV-20). Siguiendo estas diversas etapas, se proporciona un preparado purificado que comprende al menos 30 10 mg/ml o más, por ejemplo, 100 mg/ml o más, del polipéptido diana descrito en el presente documento.

35 En ciertas realizaciones, los métodos de la invención incluyen además la etapa de aislar una o más células hospedadoras transfectadas individuales de la población de células productoras transfectadas, pero no clonadas, y cultivar la una o más células hospedadoras transfectadas individuales para producir poblaciones clonales de la una o más células hospedadoras transfectadas individuales. En ciertas realizaciones, los métodos de la invención incluyen 40 además la etapa de aislar una o más células hospedadoras transfectadas individuales de la población de células productoras transfectadas, pero no clonadas, y cultivar la una o más células hospedadoras transfectadas individuales para producir una o más poblaciones clonales de células productoras que expresan el polipéptido diana. 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 dejarlas crecer durante un periodo de tiempo (por ejemplo, normalmente 7-28 45 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 de selección y/o la expresión del polipéptido diana en dicha población clonal y seleccionar una o más poblaciones clonales con un nivel alto de expresión del polipéptido de selección y/o 50 polipéptido diana, seleccionando de este modo una o más poblaciones clonales que expresan de manera estable el polipéptido diana. En ciertas realizaciones, la población clonal se cultiva 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 anticuerpo detectable u otro agente de unión que reconoce y se une directa o indirectamente al polipéptido de selección, si está presente, en la superficie de la célula clonal en 55 condiciones que permiten o favorecen la unión del anticuerpo u otro agente de unión con el polipéptido de selección, y seleccionar o detectar una o más células que están unidas directa o indirectamente al anticuerpo u otro agente de unión. Estas células seleccionadas de este modo también se pueden aislar y cultivar. El método puede incluir además analizar la expresión del polipéptido diana del uno o más clones, por ejemplo, usando cribado de proteína A (tal como 60 cuando el polipéptido diana es un anticuerpo o proteína de fusión de Fc), transferencia de Western, SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con azul de Coomassie o tinción con plata, o un ensayo de actividad enzimática.

65 En ciertas realizaciones, la subpoblación de células hospedadoras transfectadas, pero no clonadas, sujetas a aislamiento en la etapa (b) comprende al menos  $80-120 \times 10^6$  células. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la subpoblación de células hospedadoras transfectadas, pero no clonadas, sujetas a aislamiento en la etapa (b) comprende al menos aproximadamente  $80 \times 10^6$  células; en determinadas realizaciones, la subpoblación de células hospedadoras transfectadas pero no clonadas sujetas a aislamiento en la etapa (b) comprende al menos

aproximadamente  $90 \times 10^6$  células; en ciertas realizaciones, la subpoblación de células hospedadoras transfectadas pero no clonadas sujetas a aislamiento en la etapa (b) comprende al menos aproximadamente  $100 \times 10^6$  células; en determinadas realizaciones, la subpoblación de células hospedadoras transfectadas pero no clonadas sujetas a aislamiento en la etapa (b) comprende al menos aproximadamente  $110 \times 10^6$  células; y en ciertas realizaciones, la subpoblación de células hospedadoras transfectadas pero no clonadas sujetas a aislamiento en la etapa (b) comprende al menos aproximadamente  $120 \times 10^6$  células. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la subpoblación de células hospedadoras transfectadas, pero no clonadas, sujetas a aislamiento en la etapa (b) comprende aproximadamente  $80 \times 10^6$  a aproximadamente  $800 \times 10^6$  células, aproximadamente  $100 \times 10^6$  a aproximadamente  $800 \times 10^6$  células, aproximadamente  $200 \times 10^6$  células a aproximadamente  $800 \times 10^6$  células, aproximadamente  $300 \times 10^6$  a aproximadamente  $800 \times 10^6$  células, aproximadamente  $400 \times 10^6$  a aproximadamente  $800 \times 10^6$  células, aproximadamente  $500 \times 10^6$  a aproximadamente  $800 \times 10^6$  células, aproximadamente  $600 \times 10^6$  células, aproximadamente  $100 \times 10^6$  a aproximadamente  $600 \times 10^6$  células, aproximadamente  $200 \times 10^6$  a aproximadamente  $600 \times 10^6$  células, aproximadamente  $300 \times 10^6$  a aproximadamente  $600 \times 10^6$  células, aproximadamente  $400 \times 10^6$  a aproximadamente  $600 \times 10^6$  células, aproximadamente  $500 \times 10^6$  a aproximadamente  $600 \times 10^6$  células, aproximadamente  $600 \times 10^6$  células, aproximadamente  $80 \times 10^6$  a aproximadamente  $500 \times 10^6$  células, aproximadamente  $100 \times 10^6$  a aproximadamente  $500 \times 10^6$  células, aproximadamente  $200 \times 10^6$  a aproximadamente  $500 \times 10^6$  células, aproximadamente  $300 \times 10^6$  a aproximadamente  $500 \times 10^6$  células, aproximadamente  $400 \times 10^6$  a aproximadamente  $500 \times 10^6$  células, aproximadamente  $500 \times 10^6$  a aproximadamente  $500 \times 10^6$  células, aproximadamente  $600 \times 10^6$  células, aproximadamente  $100 \times 10^6$  a aproximadamente  $600 \times 10^6$  células, aproximadamente  $200 \times 10^6$  a aproximadamente  $600 \times 10^6$  células, aproximadamente  $300 \times 10^6$  a aproximadamente  $600 \times 10^6$  células, aproximadamente  $400 \times 10^6$  a aproximadamente  $600 \times 10^6$  células, aproximadamente  $500 \times 10^6$  a aproximadamente  $600 \times 10^6$  células, aproximadamente  $600 \times 10^6$  células, aproximadamente  $80 \times 10^6$  a aproximadamente  $400 \times 10^6$  células, aproximadamente  $100 \times 10^6$  a aproximadamente  $400 \times 10^6$  células, aproximadamente  $200 \times 10^6$  a aproximadamente  $400 \times 10^6$  células, aproximadamente  $300 \times 10^6$  a aproximadamente  $400 \times 10^6$  células, aproximadamente  $80 \times 10^6$  a aproximadamente  $250 \times 10^6$  células, aproximadamente  $100 \times 10^6$  a aproximadamente  $250 \times 10^6$  células, aproximadamente  $200 \times 10^6$  a aproximadamente  $250 \times 10^6$  células, aproximadamente  $250 \times 10^6$  células, aproximadamente  $80 \times 10^6$  a aproximadamente  $200 \times 10^6$  células, o aproximadamente  $100 \times 10^6$  a aproximadamente  $200 \times 10^6$  células.

En ciertas realizaciones, el aislamiento en la etapa (b) se realiza en menos de 6 días después de la transfección. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el aislamiento en la etapa (b) se realiza entre dos y cuatro días después de la transfección. En ciertas realizaciones, el aislamiento en la etapa (b) se realiza dos días después de la transfección. En ciertas realizaciones, el aislamiento en la etapa (b) se realiza tres días después de la transfección.

En ciertas realizaciones, la subpoblación de células hospedadoras transfectadas, pero no clonadas, comprende aproximadamente  $0,5-6,0 \times 10^6$  células antes de la expansión en la etapa (c). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la subpoblación de células hospedadoras transfectadas, pero no clonadas, comprende aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  células, aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $3,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $4,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  células, o aproximadamente  $6,0 \times 10^6$  células antes de la expansión en la etapa (c). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la subpoblación de células hospedadoras transfectadas, pero no clonadas, comprende aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  a aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  a aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  a aproximadamente  $3,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  a aproximadamente  $4,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  a aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  a aproximadamente  $6,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  a aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  a aproximadamente  $3,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  a aproximadamente  $4,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  a aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $1,0 \times 10^6$  a aproximadamente  $6,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  a aproximadamente  $4,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  a aproximadamente  $6,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $2,0 \times 10^6$  a aproximadamente  $8,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $3,0 \times 10^6$  a aproximadamente  $4,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $3,0 \times 10^6$  a aproximadamente  $6,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $3,0 \times 10^6$  a aproximadamente  $8,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $4,0 \times 10^6$  a aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $4,0 \times 10^6$  a aproximadamente  $6,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $4,0 \times 10^6$  a aproximadamente  $8,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  a aproximadamente  $6,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  a aproximadamente  $8,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $6,0 \times 10^6$  a aproximadamente  $8,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $6,0 \times 10^6$  a aproximadamente  $10,0 \times 10^6$  células, antes de la expansión en la etapa (c). En ciertas realizaciones, la subpoblación de células hospedadoras transfectadas, pero no clonadas, contiene más de  $6,0 \times 10^6$  células antes de la expansión en la etapa (c). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la subpoblación de células hospedadoras transfectadas, pero no clonadas, comprende aproximadamente  $7,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $8,0 \times 10^6$  células, aproximadamente  $9,0 \times 10^6$  células o aproximadamente  $10,0 \times 10^6$  células, antes de la expansión en la etapa (c).

En ciertas realizaciones, la expansión en la etapa (c) es durante entre 4-31 días. Por ejemplo, en diversas realizaciones, la expansión es durante 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31 días.

En ciertas realizaciones, un primero del uno o más vectores codifica el ARNm que codifica el polipéptido diana, y un segundo del uno o más vectores codifica el ARNm que codifica el polipéptido de selección. Cuando el uno o más vectores que codifican el ARNm que codifica el polipéptido diana y el ARNm que codifica el polipéptido de selección son vectores separados, en ciertas realizaciones, los vectores se seleccionan independientemente de plásmidos, virus, fagos, transposones y minicromosomas.

En ciertas realizaciones, el ARNm que codifica el polipéptido diana y el ARNm que codifica el polipéptido de selección están ambos codificados en un vector. Según estas realizaciones, un solo vector codifica un ARNm policistrónico que codifica tanto el polipéptido diana como el polipéptido de selección. También según estas realizaciones, en ciertas realizaciones, el ARNm que codifica el polipéptido de selección puede estar cadena arriba (es decir, 5') del ARNm que codifica el polipéptido diana. Alternativamente, en ciertas realizaciones, el ARNm que codifica el polipéptido diana puede estar cadena arriba (es decir, 5') del ARNm que codifica el polipéptido de selección.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el polipéptido diana y el polipéptido de selección están codificados por un único ARNm multicistrónico. En ciertas realizaciones, el ARNm multicistrónico comprende un primer marco abierto de lectura (ORF) que codifica el polipéptido de selección y un segundo ORF que codifica el polipéptido diana, en donde el primer ORF está 5' con respecto al segundo ORF.

En ciertas realizaciones, el primer ORF tiene un codón de inicio distinto de AUG. En ciertas realizaciones, el codón de inicio distinto de AUG es un UUG, GUG o CUG en una secuencia de consenso de Kozak. Se puede instalar un codón de inicio distinto de AUG usando técnicas de biología molecular estándar, tales como son bien conocidas en la técnica.

En ciertas realizaciones, el segundo ORF tiene un codón de inicio AUG.

En ciertas realizaciones, el primer ORF tiene un codón de inicio distinto de AUG, y el segundo ORF tiene un codón de inicio AUG.

En ciertas realizaciones, el ORF que codifica el polipéptido de selección está desprovisto de cualquier secuencia AUG. Las secuencias AUG pueden convertirse en otras secuencias triplete, distintas de los codones de parada, usando técnicas de biología molecular estándar tales como son bien conocidas en la técnica; por ejemplo, y sin limitación, las secuencias AUG pueden convertirse independientemente en CUG (L), GUG (V), UUG (L), AAG (K), ACG (T), AGG (R), AUA (I), AUC (I), AUU (I), GCA (A), GCC (A), GCG (A) O GCU (A).

En ciertas realizaciones, el polipéptido diana y el polipéptido de selección forman una proteína de fusión. En ciertas realizaciones, la proteína de fusión está unida a membrana. Cuando la proteína de fusión está unida a membrana, en ciertas realizaciones, el polipéptido de selección está presente en una forma detectable, es decir, la porción de polipéptido diana de la proteína de fusión no prohíbe la detección de la porción de polipéptido de selección de la proteína de fusión. También cuando la proteína de fusión está unida a membrana, en ciertas realizaciones, el polipéptido diana está presente en una forma funcional, es decir, la porción de polipéptido de selección de la proteína de fusión no prohíbe la función de la porción de polipéptido diana de la proteína de fusión. En ciertas realizaciones, la proteína de fusión se libera de la célula hospedadora como una proteína soluble. En ciertas realizaciones, la proteína de fusión se expresa como una proteína de superficie, pero se puede escindir para liberar el polipéptido diana en una forma soluble y funcional.

En ciertas realizaciones, el polipéptido diana es un agente terapéutico, por ejemplo, un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo, una proteína de fusión de Fc, una hormona o una enzima. Las hormonas polipeptídicas incluyen, sin limitación, hormona adrenocorticotrópica (ACTH), hormona antidiurética (vasopresina), péptido natriurético auricular (ANP), colecistoquinina, hormona estimulante del folículo (FSH), gastrina, glucagón, hormona de crecimiento, insulina, leptina, hormona luteinizante (LH), oxitocina, prolactina, somatostatina y hormona estimulante de la tiroideas (TSH). Las enzimas incluyen, sin limitación, alfa-glucosidasa ácida, adenosina desaminasa, alfa-galactosidasa, alfa-L-iduronidasa, arilsulfatasa B, beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa, galactosa-6-sulfato sulfatasa, glucocerebrosidasa, heparán sulfamidasa, heparán-alfa-glucosaminida N-acetyltransferasa, hialuronidasa, iduronato-2-sulfatasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, N-acetilglucosamina 6-sulfatasa y N-acetilglucosaminidasa.

En algunas realizaciones, el polipéptido diana es una proteína secretada.

En algunas realizaciones, las células hospedadoras son células de mamífero. En ciertas realizaciones, las células hospedadoras se seleccionan del grupo que consiste en células CHO, células BHK-21, células NIH/3T3, células HEK293, células HeLa, células SP2/0, células NS0, células C127, células COS, células Vero y células U937. Todas estas células (líneas celulares) están disponibles comercialmente de fuentes tales como American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). En ciertas realizaciones, las células hospedadoras se seleccionan del grupo que consiste en células CHO, células HEK293 y células HeLa.

Un aspecto de la invención es una población clonal de células hospedadoras transfectadas que expresan un polipéptido de selección y un polipéptido diana obtenibles mediante el método de la invención. En ciertas realizaciones, la población clonal de células hospedadoras transfectadas expresa un polipéptido de selección por FACS y un polipéptido diana obtenible mediante el método de la invención.

En ciertas realizaciones, la población clonal produce una mejora de 2 a 30 veces en la producción del polipéptido diana en comparación con la de un conjunto estable de células hospedadoras transfectadas, pero no clonadas, obtenidas en la etapa (c).

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la población clonal produce 2 a 30 veces, 3 a 30 veces, 5 a 30 veces, 10 a 30 veces, 15 a 30 veces, 20 a 30 veces, 25 a 30 veces, 2 a 25 veces, 3 a 25 veces, 5 a 25 veces, 10 a 25 veces, 15 a 25 veces, 20 a 25 veces, 2 a 20 veces, 3 a 20 veces, 5 a 20 veces, 10 a 20 veces, 15 a 20 veces, 2 a 15 veces, 3 a 15 veces, 5 a 15 veces, 10 a 15 veces, 2 a 10 veces, 3 a 10 veces, 5 a 10 veces, mejora de 2 a 5 veces, de 3 a 5 veces o de 2 a 3 veces en la producción del polipéptido diana en comparación con la de un conjunto estable de células hospedadoras transfectadas, pero no clonadas, obtenidas en la etapa (c). En ciertas realizaciones, la población clonal produce una mejora superior a 30 veces en la producción del polipéptido diana en comparación con la de un conjunto estable de células hospedadoras transfectadas, pero no clonadas, obtenidas en la etapa (c). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la población clonal produce hasta 40 veces, hasta 50 veces, hasta 60 veces, hasta 70 veces, hasta 80 veces, mejora de hasta 90 veces o hasta 100 veces en la producción del polipéptido diana en comparación con un conjunto estable de células hospedadoras transfectadas, pero no clonadas, obtenidas en la etapa (c).

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

La población heterogénea de células productoras se produce usando el método 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 una ronda de selección basada en el medio para seleccionar células que expresan niveles variables (por ejemplo, una variación de al menos 10, 100, 1.000 o 10.000 veces) del ARNm multicistrónico. En algunas realizaciones, el vector contiene además un marcador de selección de fármacos, por ejemplo, un gen de dihidrofolato reductasa (DHFR), y la selección basada en medio es metotrexato (MTX, por ejemplo, MTX 1 nM-100 nM), medio deficiente en nucleótidos o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el vector contiene además un gen de la glutamina sintetasa (GS) y la selección basada en el medio es metionina sulfoximina (MSX, por ejemplo, MSX 25-100  $\mu$ M). En algunas realizaciones, el vector carece de un marcador de selección por fármacos, por ejemplo, carece de un gen de DHFR o un gen de GS.

En algunas realizaciones, se usa FACS para seleccionar células que expresan niveles variables del ARNm multicistrónico, por ejemplo, usando el nivel de polipéptido de selección por FACS para seleccionar las células.

### 30 EJEMPLOS

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

#### 35 **Ejemplo 1: Clasificación para el aislamiento de células después de la transfección temprana (EPIC) - estudio preliminar de eficacia**

Este ejemplo demuestra la viabilidad de un método de clasificación para dirigirse a una población de expresión temprana transfectada no seleccionada para el enriquecimiento a granel antes de la selección. Este método de clasificación se denomina "clasificación corta" o EPIC (aislamiento temprano de células después de la transfección) y está diseñado para aislar por clasificación 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. 1A** representa un esquema general para EPIC. La **FIG. 1B** 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 (por ejemplo, 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. 1A**, EPIC puede ejecutarse transfectando una población y permitiendo que se desarrolle una expresión temprana, que puede ser objetivo de aislamiento usando citometría de flujo u otros medios de clasificación de células. Estas subpoblaciones 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 de estas subpoblaciones de expresión temprana después de la transfección antes de la selección produce una productividad mejorada con respecto a las metodologías estándar de transfección/selección solas (por ejemplo, como se muestra en la **Fig. 1A**).

Para demostrar el estudio preliminar de eficacia 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 proteína roja fluorescente (RFP) como CD52 (pGZ729-RFP) y solo RFP (pGZ700-RFP) para la evaluación de la expresión temprana. En este sistema, CD52 corresponde al polipéptido detectable, y RFP corresponde al polipéptido diana.

La secuencia del esqueleto del vector pGZ729 (que incluye secuencia que codifica CD52, pero no RFP) se muestra a continuación, seguida de anotaciones de la secuencia.

#### 65 **Secuencia del vector de expresión pGZ729 (SEQ ID NO: 8):**



tcttcacctagatcctttaaattaaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtataatgagtaaactt  
 ggtctgacagttaccaatgcttaatcagtggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatca  
 tagttgectgactccccgtctgttagataactacgatacggggagggttaccatctggccccagtgctg  
 caatgataccgcgagaccacgcgtccgggtccagattatcagcaataaaccagccagccggaaagg  
 ccgagcgcagaagtggctctgcacatttatecgccatccagtttattatgttgcggaaagcta  
 gagtaagttagttcgccagttaatagtttgcacaaacgttgtccattgtcaggcatctgggttgcac  
 gctcgctgttggatggcttcatcagctccgttccaaacgatcaaggcagttacatgatccccca  
 tgggtgtcaaaaaagcggttagctccgtccgttccatcgatgtgtcagaagtaagttgcccgcagtt  
 tatactcatcggttatggcggactgcataatttcttactgtcatgcacatcgtaagatgttttctg  
 tgactggtagactcaacaaactcgttccatctggaaatagttgtatgcggccggcggcggcggcgg  
 cgtcaacacggataataccgcgcacatcggaaactttaaatgttgcatttggaaaacgttctt  
 cggggcggaaaactctcaaggatcttaccgtgttggatccaggatgtatgttgcacccactcgtgcacca  
 actgatcttcagcatcttacttccaccagcgttctgggttggatccaggatgttgcacccactcgtgcacca  
 caaaaaaaaaggaaataaggcgacacggaaaatgttgcataactcataactcttccatatttgc  
 gcatattatcagggttattgtctcatgagccgatacatatttgcattttgcattattatcatgacattaa  
 cctataaaaataggcgatcagggcccttcgttcaagaattggggaccaagacagaaccataag  
 ccagtggatagatcagaatgttccaggggtggatggggccaggtgcctgccccttgcaccgtccc  
 aggaccagaggtgacaatgttgcacacaggcttgcctggatctgtctgtacttagttaa  
 gtcgcctgggtcacaacaagggcccccacttatttcgtgcacccctgggtggtaggtggcgttctcc  
 ctgcagccacaggctccctggagaacacgtccggcagtcgttgcatttgcacccgcgttgc  
 cccccccacctgtgaaatgttccagggttgcaggcgttgcacccgcgttgcacccactgaga  
 gatacaggccggccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcgg  
 tctctcaggcccagggttgtactcggatccatcttgcgggttgcaccccttgcacccacttgc  
 ccctgaacgtgggggttgtctccatacttgcgggttgcaccccttgcacccacttgc  
 ttcaaaatgtctgttccaccatcagcacaaggaaatgttgcgggttgcaccccttgcacccacttgc  
 cagtccatataatggactaaggcccttgcacccatcttgcacccacttgcacccacttgc  
 gcaagccggagacaggcccttgcacccatcttgcacccatcttgcacccacttgc  
 ctttctcccaaggaggttgttgcacccatcttgcacccatcttgcacccacttgc  
 ccttagttaggtatcagcgttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 gggccatgtttaggagagcagggttgcggggggggatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 ctactcttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 tgggtgtgcacataactacacaggatlagatgttgggttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 agccacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 ggactccatgacaatgttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 gggagacatcttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 ctgagtcctcaagtggccaaacctgttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 caacacacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 gggggagtgactccggccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 aaaccggccatcttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 ggttctgggtgggttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 cacaaggccggaggccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 ccttcttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 gggggagggggaaaaaatgttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 ggcgttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 ggcacacgcgcacactgttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 ccgttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 tgaccggcgttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 ccggcggcgttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 ggttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 gtggggcgttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 caaggcgttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 ctttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 gtttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 ctcccaagttaaacttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 gccgttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 tggccctccgcgcgcacactggccggccggccggccggccgg  
 gggccggccggccggccggccggccggccggccggccggccgg  
 gggccggccggccggccggccggccggccggccggccggccgg  
 gccggccggccggccggccggccggccggccggccggccgg  
 cctgtatagttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc

actcaccatcagccctctcgtttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 aaccaggccatcttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 aatccacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 ggcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 tctatgtactcggggatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 aaacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 tgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc  
 gcatattatgttgcacccatcttgcacccatcttgcacccatcttgc

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

Nucleótidos 1-325 - promotor temprano de SV40 (para transcripción de DHFR)

5 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

10 Nucleótidos 3464-4123 - gen de resistencia a ampicilina

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

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

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

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

20 Nucleótidos 7882-8123 - poliA temprana de SV40

Como se muestra en la **FIG. 2**, 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 los días 2-3 es adecuado para el aislamiento de subpoblaciones de expresión temprana de células hospedadoras transfectadas. Para demostrar que estas señales de intensidad de fluorescencia relativamente baja eran de hecho expresión de CD52, se analizaron células CHO transfectadas con pGZ729-RFP o pGZ700-RFP para la expresión de RFP y CD52. Como se muestra en la **FIG. 3**, 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), las células CHO transfectadas con pGZ700-RFP esencialmente no expresaron ningún CD52 detectable (parte inferior derecha). Estos resultados respaldan la noción de que estas señales de intensidad de fluorescencia relativamente baja 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 usando 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 usó 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. 7**, 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.

**Ejemplo 2: Clasificación para el aislamiento temprano de células después de la transfección (EPIC) - Generación de grupos de células productoras**

50 EPIC se intentó inicialmente usando 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 estándar. Como se muestra en la **FIG. 4**, en el día 8, la clasificación por EPIC produjo una población ligeramente enriquecida como se observa por la expresión del indicador de CD52 en comparación con la selección estándar. Sin embargo, a medida que continuó la selección de ambas poblaciones, esta pequeña subpoblación EPIC se hizo más prominente con el tiempo. De hecho, la subpoblación CD52-negativa se había eliminado casi por completo al finalizar la selección. En comparación, el método de selección estándar demostró una ligera mejora en la expresión del indicador de CD52 que es históricamente típica. La clasificación para EPIC, o aislamiento de expresión temprana, produjo una subpoblación de expresión positiva que tuvo una capacidad de supervivencia preferencial sobre las células menos expresivas, lo que a su vez produjo un grupo estable más productivo.

Los grupos seleccionados por EPIC y de forma convencional se usaron para establecer cultivos discontinuos sin aportación para determinar los títulos de mAb n.º 1. Como se muestra en las **Fig. 4** y **5**, el grupo generado por EPIC produjo un título de 502 mg/l, superando con creces cualquier grupo generado por amplificación con MTX, de nuevo sin usar MTX durante los procesos. En comparación, el grupo generado mediante selección estándar 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 hasta una 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 (eliminararse), prolongando los tiempos de selección/expansión.

**Ejemplo 3: Clasificación para el aislamiento temprano de células después de la transfección (EPIC) - generación de clones**

Este grupo generado por EPIC del Ejemplo 2 se usó a continuación para generar clones usando FLARE como se ha descrito anteriormente (véase, por ejemplo, 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 usó FLARE para aislar y sembrar en células individuales el 3-5 % superior de las células que expresan el indicador de cada grupo usando FACS. A continuación, se examinaron los clones expandidos (tomando el 30 % con mayor expresión positiva), usando 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. 6**, los clones generados por EPIC de expresión superior lograron títulos similares a los de los mejores clones de métodos tradicionales, por ejemplo, usando conjuntos amplificados con MTX (casi 2,0 g/l). Los resultados demostraron 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. Alternativamente, EPIC también se presta a la introducción de MTX durante la selección/expansión de subpoblaciones generadas por EPIC, con el potencial de impulsar una expresión incluso mayor en estas poblaciones enriquecidas.

**Ejemplo 4: Aislamiento temprano de células después de la transfección (EPIC) para la generación de clones - comparación directa con otros métodos**

Se realizó un estudio exhaustivo para comparar directamente el proceso EPIC (independiente de MTX), el proceso de carga rápida (independiente de MTX) y un proceso de selección de MTX estándar (proceso de selección directa) para la generación de clones. Se realizaron tres experimentos independientes para cada proceso, usando cada experimento una proteína recombinante diferente (dos anticuerpos monoclonales y una proteína de fusión de Fc). La **Fig. 8** representa el esquema general para el estudio comparativo, siendo cada uno de los tres procesos iniciado a partir de un único conjunto fuente de células transfectadas.

En el "proceso EPIC", se permitió que una porción de las células transfectadas agrupadas continuara la recuperación durante dos días adicionales antes de clasificar el aislamiento de la población de expresión positiva para indicador de la superficie celular. Las células aisladas por clasificación se colocaron en medio deficiente de nucleótidos (sin MTX) para la expansión para generar un conjunto de EPIC estable. En el "proceso de carga rápida", una parte de las células transfectadas agrupadas se colocó en medio deficiente de nucleótidos (sin MTX) para generar una población que luego se enriqueció a granel dos veces (que tiene como objetivo el 10 % superior), mediante aislamiento por clasificación basado en los niveles de expresión del indicador de la superficie celular que terminaron con el conjunto de carga rápida n.º 2. En el "proceso de selección directa", una porción de las células transfectadas agrupadas se colocó en medio con MTX para un procedimiento de selección estándar. El grupo resultante se sometió a pasos en medios deficientes en nucleótidos antes de la generación de clones. Cada brazo representa un método independiente para preparar una población de células (conjuntos) transfectadas de forma estable adecuada para la generación de clones.

Para cada uno de los tres procesos independientes, el grupo generado al final del proceso se usó para generar clones usando FLARE como se describió previamente (véase, por ejemplo, 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 usó FLARE para aislar y sembrar en células individuales el 3-5 % superior de las células que expresan el indicador de cada grupo usando FACS. A continuación, se examinaron los clones expandidos (tomando el 30 % con mayor expresión positiva), usando de nuevo FLARE, para identificar solo los clones de título superior para expandir para la evaluación del título del polipéptido diana.

La **Fig. 9** muestra la distribución de los títulos de polipéptido diana (mAb n.º 1, mAb n.º 2 o FusiónFc n.º 1) para los clones generados usando los tres procesos independientes.

Los resultados para mAb n.º 1 y mAb n.º 2 demuestran claramente que los clones generados a partir de procesos EPIC y de carga rápida, ambos de los cuales no usan MTX, tienen una productividad similar a la de los clones generados a partir de un proceso de selección con MTX estándar. Para la proteína de fusión de Fc, el intervalo de títulos de clones del proceso EPIC es similar al de los procesos de selección de carga rápida (sin MTX) y MTX estándar, excepto en el extremo superior del intervalo, las mejores títulos de clones EPIC son menores que los mejores títulos de clones de los otros dos procesos. A pesar de esto, el proceso EPIC todavía generó clones con título de hasta 1,8 g/l (en cultivo por lotes no controlado). Además, los clones de proteína de fusión de Fc del proceso de carga rápida (sin MTX) lograron títulos tan altos como los del proceso de selección con MTX. Si bien hay una mayor frecuencia de mayores productores asociados con el proceso de selección de MTX, esto puede indicar que el proceso con MTX da como resultado un grupo menos diverso de clones, que tal vez es de origen genético similar con integraciones transgénicas similares. Alternativamente, los métodos EPIC y de carga rápida, que son procesos de enriquecimiento por clasificación en lugar de un proceso de selección por fármacos/muerte celular, pueden producir un grupo más diverso de clones con diferentes sitios de integración de transgenes y, por lo tanto, un mayor intervalo de productividad. A menudo es preferible un mayor grado de diversidad de clones al identificar líneas celulares que son adecuadas para un proceso de fabricación.

Este ejemplo también demuestra el importante ahorro de tiempo logrado por el proceso EPIC. La **Fig. 10** muestra el número de días desde la transfección hasta el conjunto usado para la clonación (negro) y desde el conjunto hasta los clones finales (gris).

Con respecto al tiempo desde la transfección hasta el conjunto final, el proceso EPIC genera los grupos un mes más rápido que el proceso de selección por MTX estándar. Es en esta etapa de generación de grupos donde se consigue los ahorros de tiempo más significativos, y la generación más rápida de conjuntos con esta metodología independiente de MTX se traduce en un plazo general del proceso de CLD reducido en 1 mes.

Este ejemplo demuestra que la metodología EPIC independiente de MTX puede generar clones con una productividad comparable y plazos significativamente reducidos en comparación con un proceso de selección de MTX estándar. Además de ser un proceso más rápido, la ausencia de MTX podría dar como resultado clones más robustos y estables en comparación con clones similarmente productivos de un proceso con MTX.

#### **Ejemplo 5: Direccionamiento de clasificación variable para el aislamiento temprano de células después de la transfección (EPIC) - EPIC aísla subpoblaciones transitoriamente positivas**

Los experimentos se diseñaron para obtener una mejor comprensión de cómo funciona EPIC. Se planteó la hipótesis de que la clasificación temprana de las células después de la transfección se dirige a y aísla una subpoblación o subpoblaciones de expresión transitoria altamente positiva. Sin embargo, no se podía descartar que la expresión indicadora de direccionamiento en este marco temporal también podría aislar células con una integración estable temprana (en el genoma celular), lo que ayudaría a producir grupos EPIC significativamente enriquecidos. Se realizaron dos experimentos para demostrar que EPIC resulta del aislamiento de subpoblaciones de expresión transitoria. En primer lugar, la clasificación de EPIC se realizó durante un transcurso de tiempo para mostrar que los aislamientos durante el período de expresión transitoria máxima (días 2 a 4; véase la **Fig. 2**) produjeron enriquecimientos de conjuntos EPIC óptimos.

En segundo lugar, el direccionamiento de clasificación variable para EPIC se realizó a los 2 días después de la transfección, con el objetivo de aislar una población de expresión transitoria cada vez más positiva para, a su vez, producir un conjunto EPIC más enriquecido.

Usando una población de expresión transitoria del día 2 (máxima), las clasificaciones independientes se dirigieron a una población de expresión transitoria positiva completa (+) y una subpoblación de expresión transitoria más altamente positiva (++) . Los datos demuestran concluyentemente que el aislamiento de una subpoblación transitoria más positiva da como resultado un mayor enriquecimiento en el conjunto EPIC final que se generó. Estando en el día 2 después de la transfección, todavía no habría células con expresión integrada de manera estable, ya que esto es antes de la pérdida de expresión transitoria y la aparición de expresión estable (**Fig. 2**). Por lo tanto, la relación correlativa (**Fig. 11A y 11B**) en este punto de tiempo temprano específico proporciona evidencia de que los enriquecimientos de grupos EPIC resultan directamente de aislamientos de subpoblaciones transitorias de expresión transitoria máxima (o casi máxima) poco después de la transfección.

## REIVINDICACIONES

1. Un método de producción una población de células productoras que expresan un polipéptido diana, comprendiendo el método las etapas de:
  - 5 (a) transfectar células hospedadoras con uno o más vectores que codifican uno o más ARNm, en donde el uno o más ARNm codifican un polipéptido de selección y un polipéptido diana;
  - (b) aislar de las células hospedadoras transfectadas, en 2 a 15 días desde la transfección, una subpoblación de células hospedadoras transfectadas pero no clonadas de expresión temprana que expresan el polipéptido de selección, en donde el aislamiento emplea clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o clasificación de células activadas por magnetismo (MACS) en el polipéptido de selección; y
  - 10 (c) expandir la subpoblación aislada de células hospedadoras transfectadas pero no clonadas, produciendo así una población de células productoras transfectadas pero no clonadas que expresan el polipéptido diana.
2. El método de la reivindicación 1, en donde las etapas (b) y (c) se realizan cada una en medio sin selección de fármacos.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o 2, que comprende además aislar el polipéptido diana de la población de células productoras transfectadas, pero no clonadas.
- 20 4. El método de la reivindicación 1 o 2, que comprende además aislar una o más células hospedadoras transfectadas individuales de la población de células productoras transfectadas, pero no clonadas, y cultivar la una o más células hospedadoras transfectadas individuales para producir poblaciones clonales de la una o más células hospedadoras transfectadas individuales.
- 25 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las células hospedadoras transfectadas, pero no clonadas, sujetas a selección en la etapa (b) contienen al menos  $80-120 \times 10^6$  células.
- 30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el aislamiento en la etapa (b) se realiza entre dos y cuatro días después de la transfección.
- 35 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la subpoblación de células hospedadoras transfectadas, pero no clonadas, contiene  $0,5-6,0 \times 10^6$  células antes de la expansión en la etapa (c).
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la expansión en (c) es durante entre 4-31 días.
- 35 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el ARNm que codifica el polipéptido diana y el ARNm que codifica el polipéptido de selección están codificados en un vector.
- 40 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el polipéptido de selección es un polipéptido de selección por FACS y el aislamiento en la etapa (b) emplea FACS.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el polipéptido diana y el polipéptido de selección forman un polipéptido de fusión.
- 45 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el polipéptido diana y el polipéptido de selección están codificados por un único ARNm multicistrónico.
- 50 13. El método de la reivindicación 12, en donde el ARNm multicistrónico comprende un primer marco abierto de lectura (ORF) que codifica el polipéptido de selección y un segundo ORF que codifica el polipéptido diana, en donde el primer ORF está 5' con respecto al segundo ORF.
14. El método de la reivindicación 13, en donde el primer ORF tiene un codón de inicio distinto de AUG.
- 55 15. El método de la reivindicación 13 o 14, en donde el segundo ORF tiene un codón de inicio AUG.
16. El método de la reivindicación 15, en donde el primer ORF está desprovisto de cualquier secuencia AUG.
17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde el polipéptido diana es un agente terapéutico.

Fig. 1A

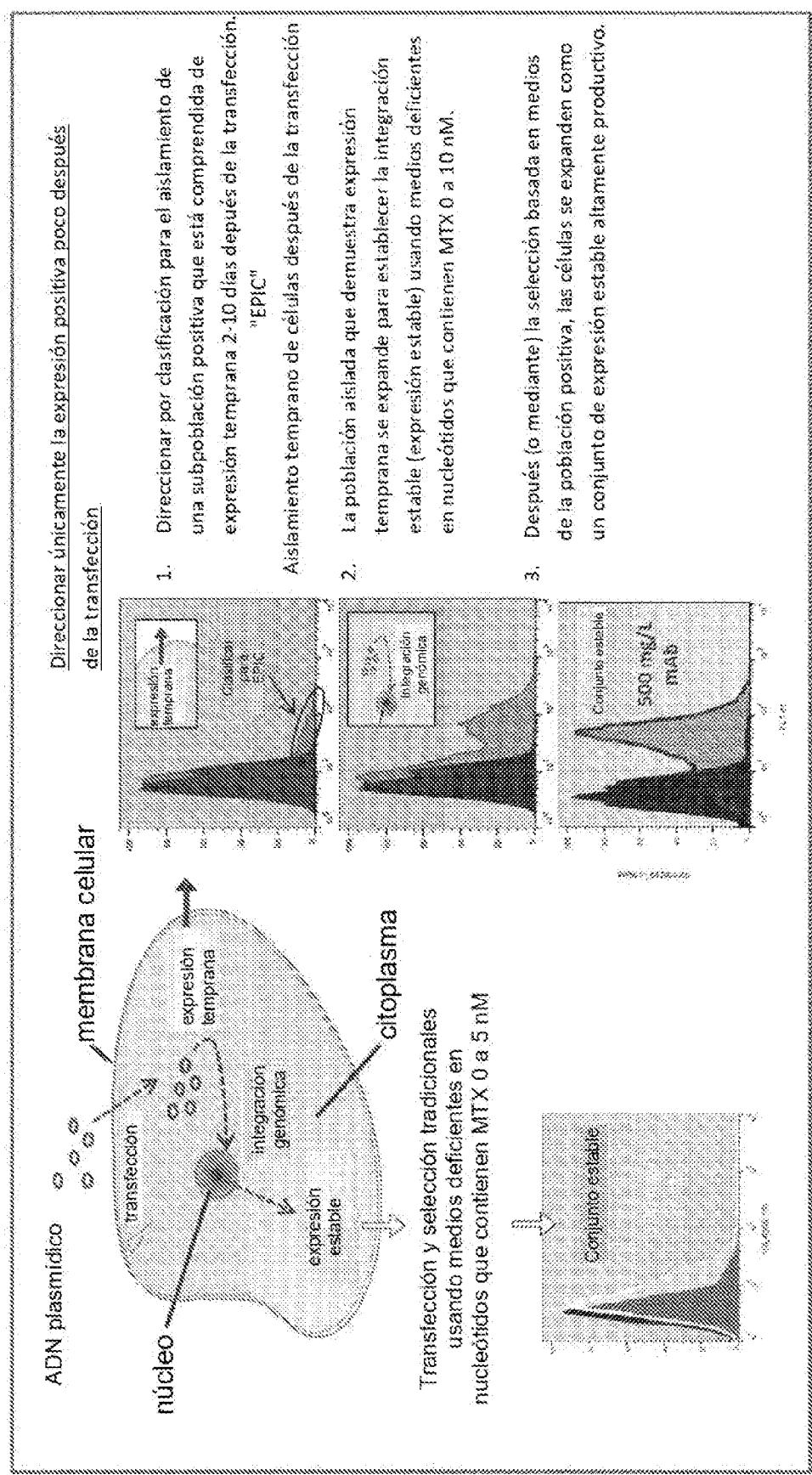


Fig. 18

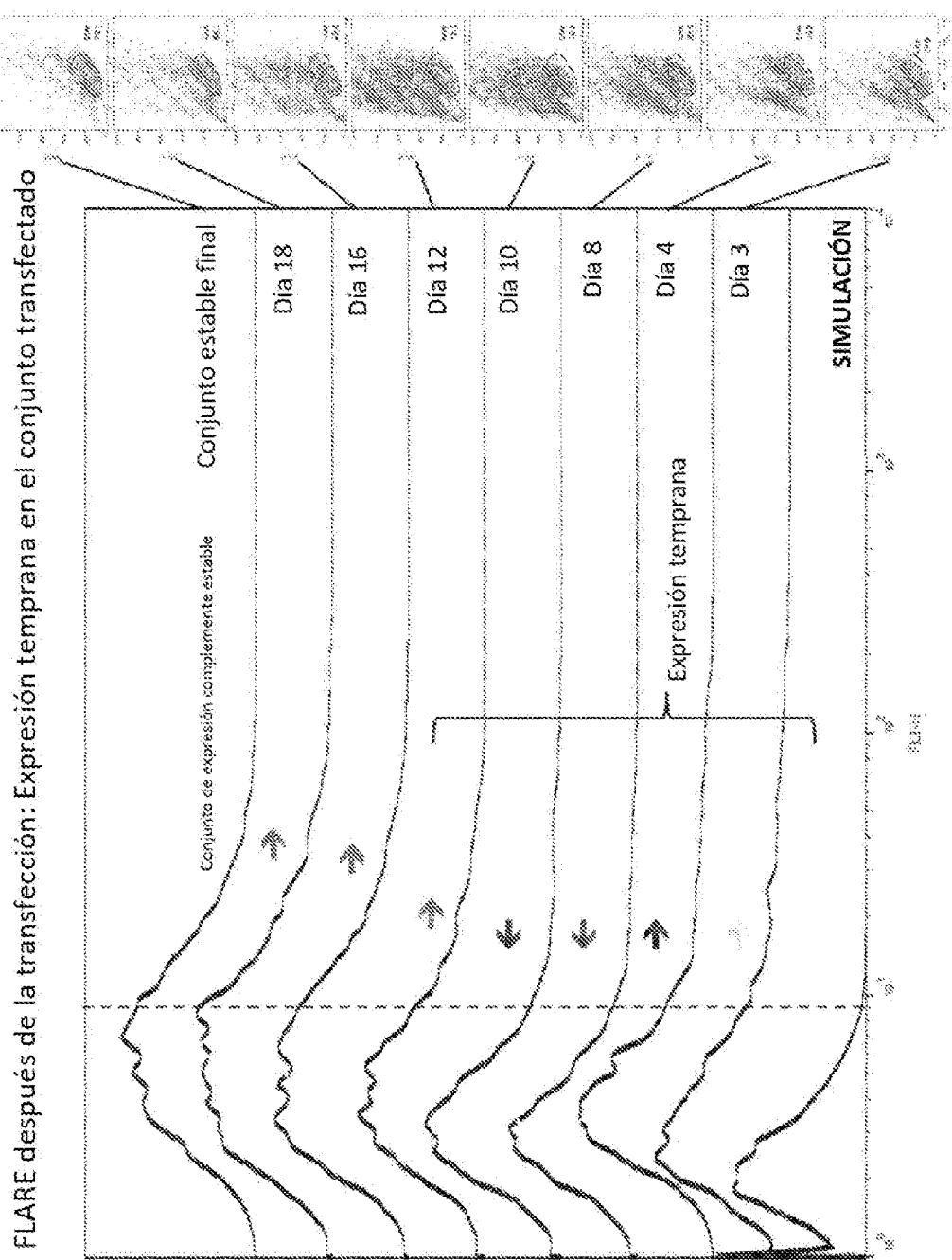
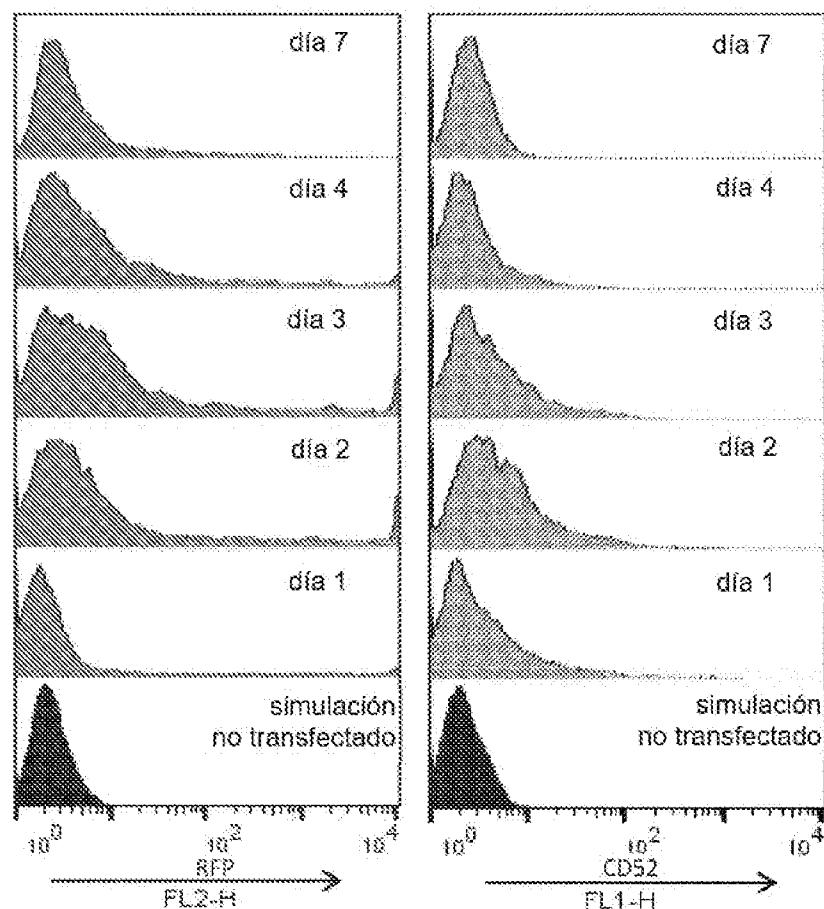


Fig. 2

Expresión temprana de pGZ729-RFP



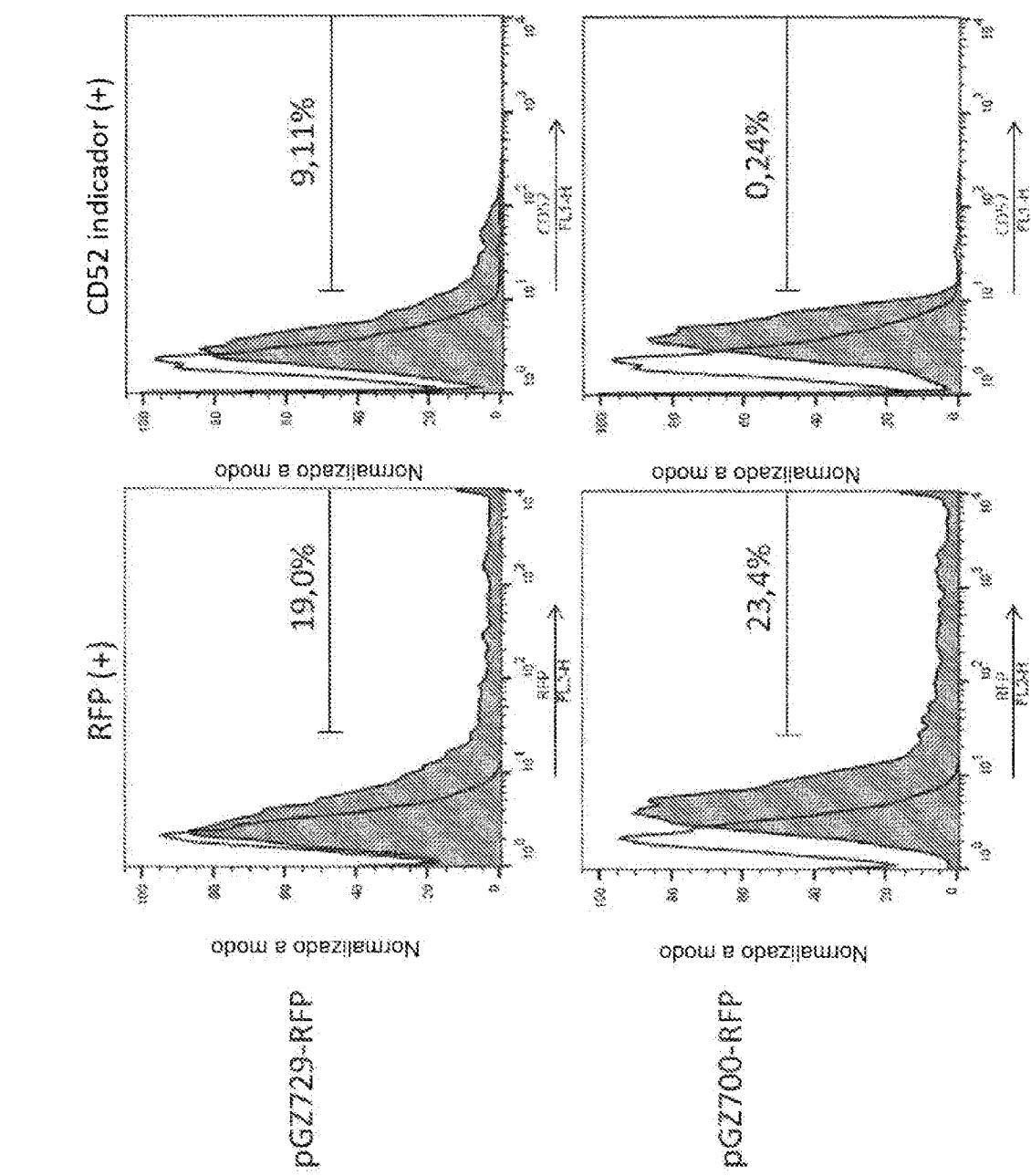


Fig. 3

Fig. 4

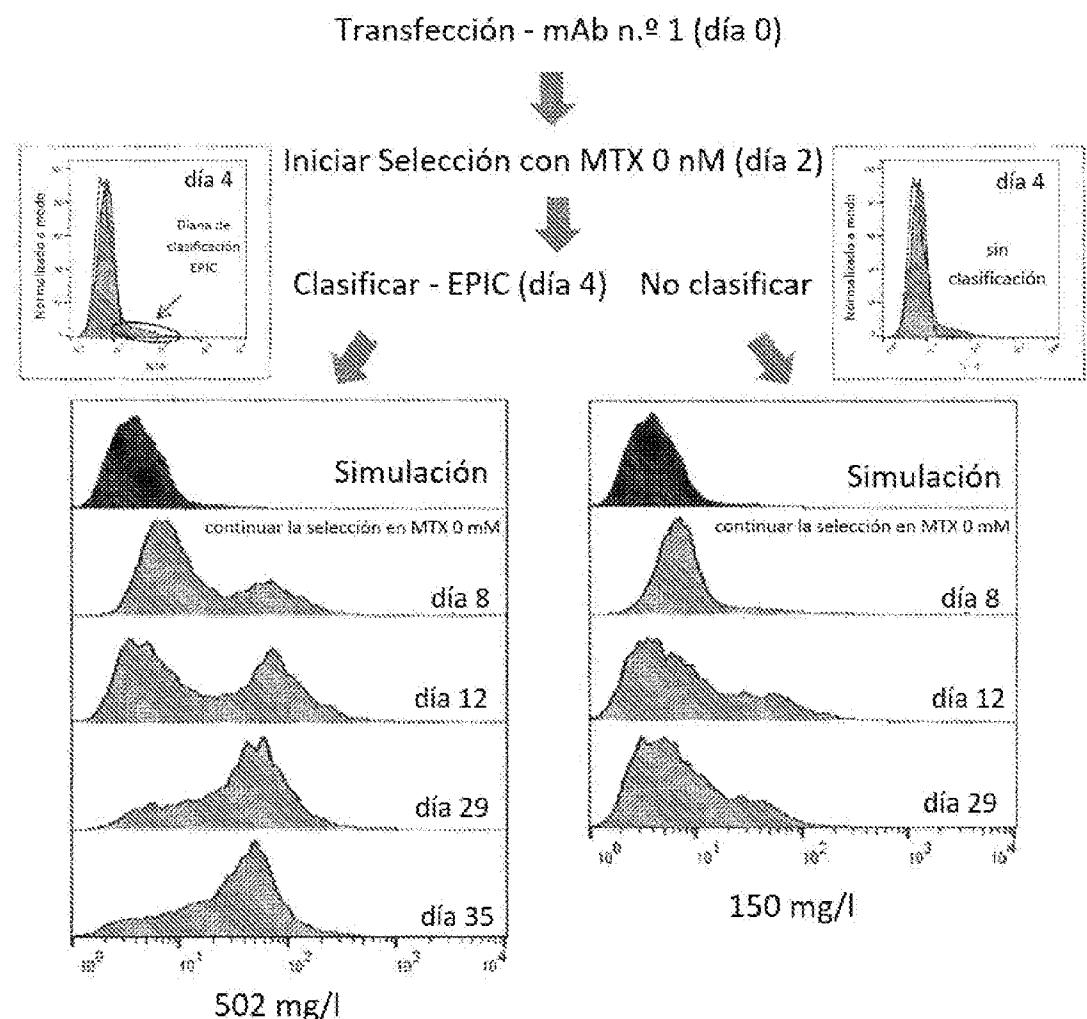


Fig. 5

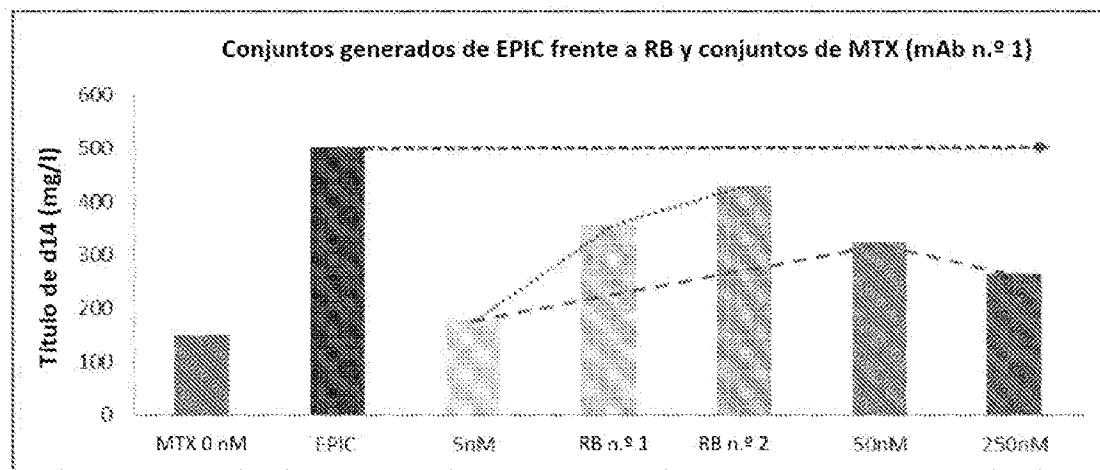


Fig. 6

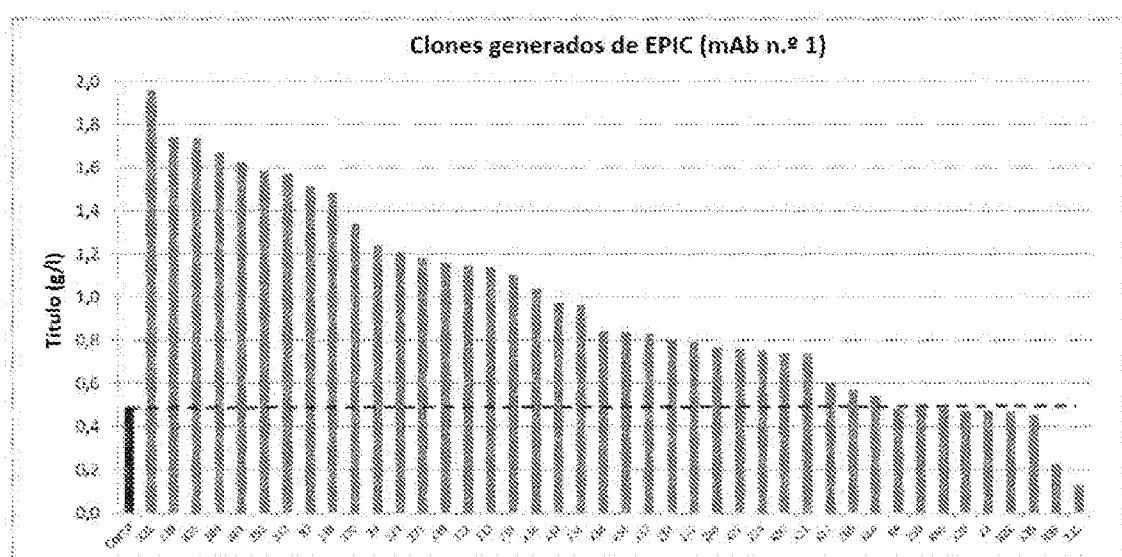


Fig. 7

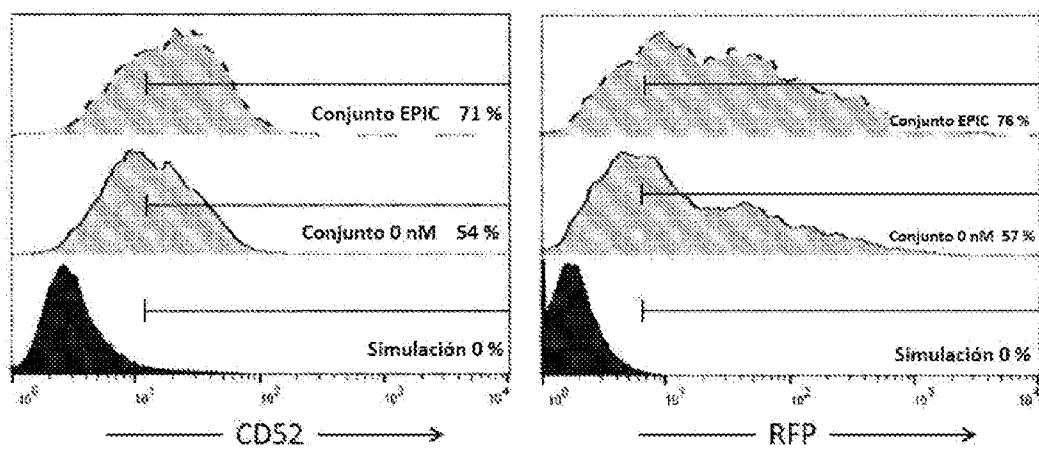


Fig. 8

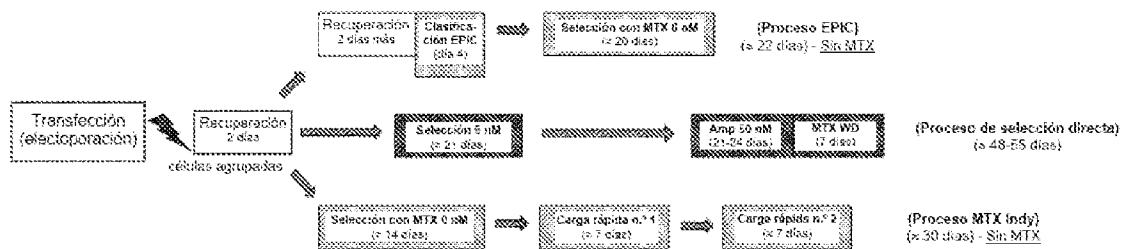


Fig. 9

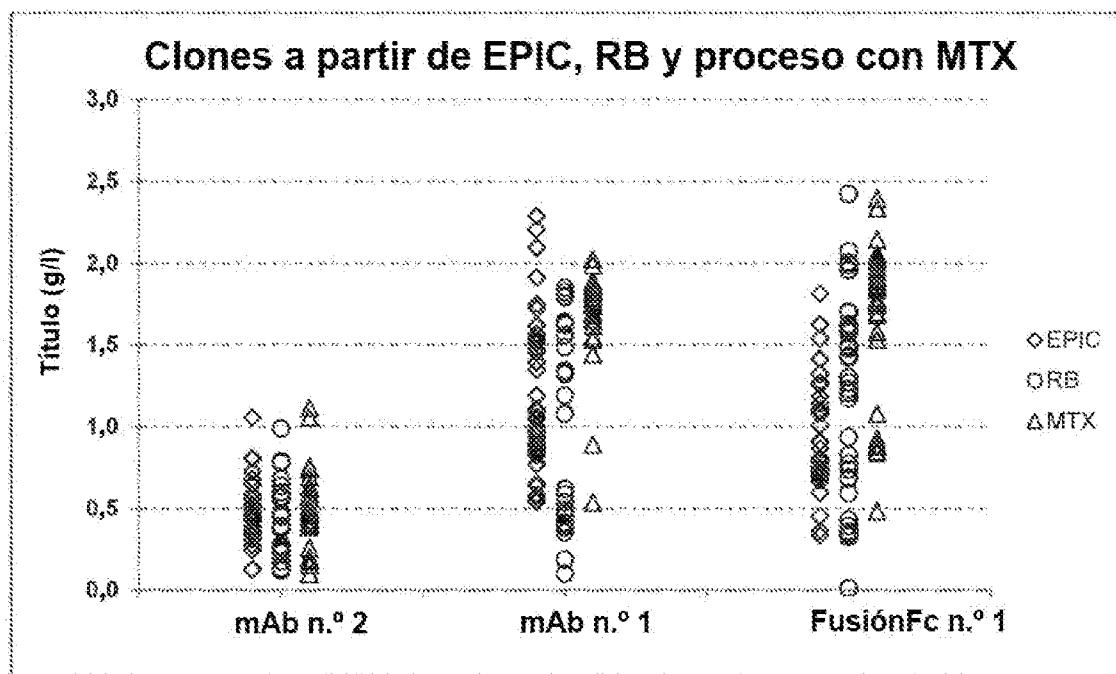


Fig. 10

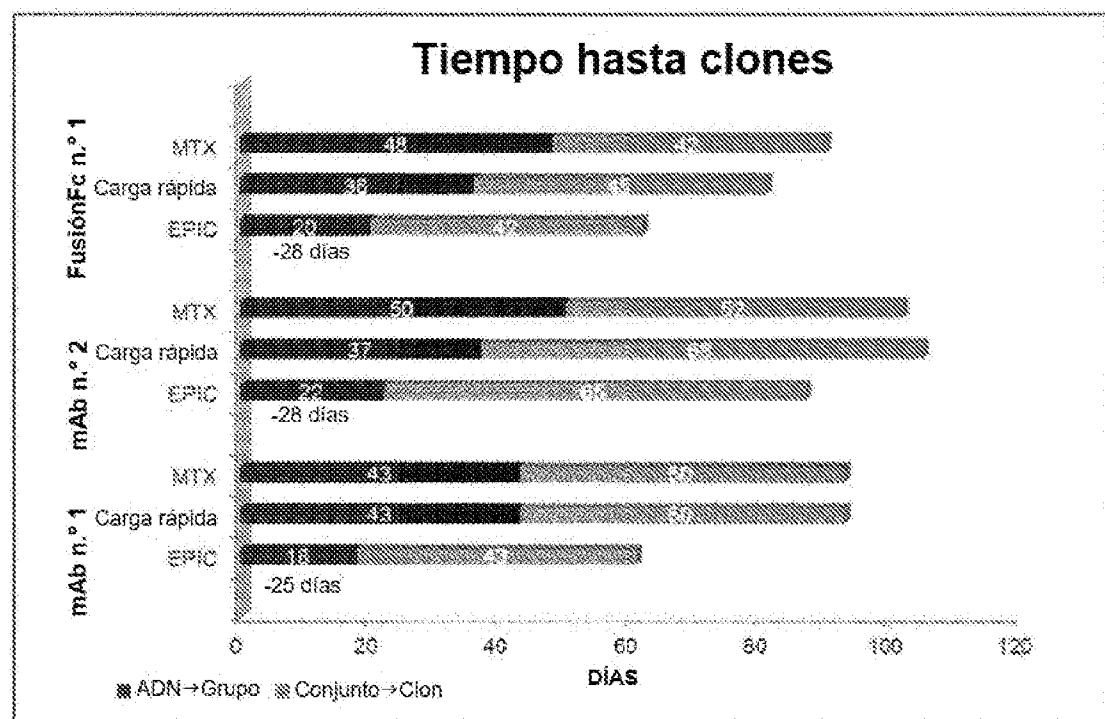


Fig. 11A

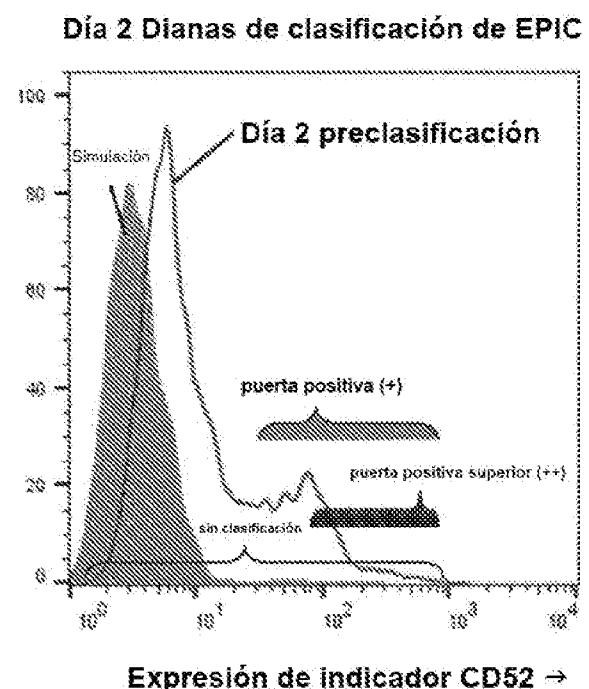


Fig. 11B

