



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 266 197**

51 Int. Cl.:
C12N 15/87 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01931696 .7**
86 Fecha de presentación : **15.05.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1294919**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **26.03.2003**

54 Título: **Procedimiento *in vitro* para la introducción de ácido nucleico en una célula (transfección) por medio de fosfato de calcio.**

30 Prioridad: **17.05.2000 DE 100 24 334**

73 Titular/es: **MediGene AG.**
Lochhamer Strasse 11
82152 Planegg/Martinsried, DE

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2007

72 Inventor/es: **Hörer, Markus;**
Rehberger, Bernd y
Moebius, Ulrich

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

74 Agente: **No consta**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento *in vitro* para la introducción de ácido nucleico en una célula (transfección) por medio de fosfato de calcio.

La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para la introducción de ácido nucleico en al menos una célula (transfección) por medio de fosfato de calcio (CaPi), mezclándose en primer lugar el ácido nucleico con una disolución de reacción, que presenta iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} , incubándose posteriormente la disolución de reacción, mediante lo cual se forma un precipitado, que presenta al menos el ácido nucleico, calcio y fosfato, añadiéndose posteriormente el precipitado a la célula e incubándose de nuevo la célula, mediante lo cual se absorbe el ácido nucleico en la célula. Además la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de la célula transfectada.

Con el creciente interés en la aclaración de la estructura y la función de genes y proteínas en el marco de la tecnología genética y la biotecnología se desarrollaron a nivel mundial en los laboratorios los más diversos métodos, para introducir ácidos nucleicos en células recién aisladas o cultivadas. Dependiendo del planteamiento que va a estudiarse pueden tratarse células con ácido nucleico añadido desde fuera (ácido nucleico externo) e integrar éste de manera permanente o bien en el genoma o presentarlo como una molécula de ácido nucleico extracromosómico en forma de anillo. En ambos casos se multiplica (replica) el ácido nucleico externo antes de la división celular y se transmite a la célula hija, por lo que también se denomina este método de transfección estable. Alternativamente a esto las células sólo pueden absorber ácido nucleico externo temporalmente (transfección transitoria), no multiplicándose el ácido nucleico añadido y por tanto no transmitiéndose a las células hijas en las divisiones celulares siguientes y perdiéndose según el número de copias más o menos rápidamente. Las células transfectadas de manera transitoria se abren (se recogen o se lisan) por regla general pocas horas o días tras la transfección. Posteriormente a esto se estudian en ensayos de laboratorio adicionales por ejemplo la función de las proteínas codificadas en el ácido nucleico externo, que se expresaron tras la transfección en la célula.

Independientemente del procedimiento, que se utiliza para la introducción de ácido nucleico en la célula, la eficacia tanto en el caso de la transfección estable como en el caso de la transitoria depende mucho del tipo de célula utilizado. Las células que ya se encuentran en cultivo durante un periodo de tiempo más largo (líneas celulares) se diferencian parcialmente en una pluralidad en su capacidad de absorber ácido nucleico externo y expresar las proteínas codificadas en ellas. Así puede ser un método de transfección, que se estableció para un tipo de célula y que conduce a buenas eficacias de transfección, completamente inadecuado en el caso de otro tipo de célula.

Uno de los procedimientos más antiguos para introducir ácidos nucleicos en células utiliza el polisacárido DEAE-dextrano como sustancia soporte para un ácido nucleico externo. El DEAE-dextrano se utilizó en células originariamente como mediador para la introducción de ácido ribonucleico (ARN) del virus de la polio (Vaheri y Pagano (1965) Virology 27:434) así como de ácido desoxirribonucleico (ADN) del virus de los simios (SV40) y de virus de polioma (McCutchan y Pagano (1968) J. Natl. Cancer Inst. 41:351; Warden y Thorne (1968) J. Gen. Virol. 3:371). El método se aplica también todavía hoy en día con escasas modificaciones para la transfección de genomas virales y de moléculas de ADN anulares (plásmidos), que portan secuencias de genes virales. Aunque no se conoce el mecanismo de acción exacto del DEAE-dextrano, se supone que el polímero une el ácido nucleico externo, en la mayoría de los casos ADN externo, y así impide el ataque de enzimas que destruyen el ácido nucleico celular (nucleasas) y/o se une el mismo a la superficie de las células y mediante esto favorece la absorción de ADN en la célula por medio de endocitosis. Las transfecciones mediadas por DEAE-dextrano se utilizan de manera habitual exclusivamente para la expresión transitoria de genes clonados y no para la transfección estable de células. Las líneas celulares establecidas tales como por ejemplo BSC-1, CV-1 y COS pueden transfectarse muy bien con DEAE-dextrano, mientras que otras líneas celulares establecidas tales como por ejemplo las células HeLa son inadecuadas posiblemente debido a la toxicidad del polímero. Para la transfección con DEAE-dextrano se utilizan por regla general cantidades reducidas de ADN externo, consiguiéndose eficacias de transfección máximas de 10^5 células con sólo 100 - 200 ng de ADN de plásmido. Cantidades mayores de ADN ($< 2 - 3 \mu\text{g}$) no muestran ningún aumento de efecto sino uno inhibitorio. En contraposición con otros procedimientos de transfección, que aún se describirán en lo sucesivo, que requieren elevadas concentraciones de ADN, no se añade para la transfección mediada por DEAE-dextrano ningún ADN soporte adicional tal como por ejemplo ADN de esperma de salmón o de arenque al ADN externo que va a transfectarse. Aunque este procedimiento de transfección se desarrolló ya hace más de 30 años, se realiza en la mayoría de los casos sólo con escasas modificaciones del procedimiento descrito originariamente. Sin embargo, mientras tanto se conoce que tanto la concentración del DEAE-dextrano utilizada como el tiempo, durante el cual están expuestas las células a la mezcla de ADN/DEAE-dextrano (tiempo de incubación), son críticos para el éxito de la transfección.

Dado que no se puede transfectar eficazmente con ayuda de DEAE-dextrano todas las líneas celulares establecidas, se desarrollaron métodos de transfección alternativos. En un procedimiento adicional se utiliza el polication polibreno como mediador sobre todo para la introducción de ADN en células, que han demostrado ser resistentes frente al DEAE-dextrano (Kawai y Nishizawa (1984) Mol. Cell. Biol. 4:1172; Chaney *et al.* (1986) Somatic Cell Mol. Genet. 12:237). En contraposición con la transfección mediada por DEAE-dextrano, el polibreno es adecuado no sólo para la transfección transitoria de células sino también para la estable. Sin embargo este procedimiento de transfección se limita a ácidos nucleicos con un peso molecular reducido, por ejemplo ADN de plásmido.

Además puede introducirse en éstas ADN clonado mediante la fusión de protoplastos, que se obtienen a partir de bacterias, que portan el ADN de plásmido de interés, con las células cultivadas (Schaffner (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:2163; Rassoulzadegan *et al.* (1982) *Nature* 295:257). Para este procedimiento se cultivan bacterias en presencia de cloranfenicol, para amplificar el ADN de plásmido, que portan las bacterias en su interior en un número de copias elevado. Posteriormente se tratan las bacterias con la enzima lisozima, mediante lo cual se destruye su pared celular. Los protoplastos así obtenidos se mezclan con las células que van a transfectarse, añadiéndose el polímero polietilenglicol (PEG), para favorecer la fusión de la célula y el protoplasto bacteriano. Durante este proceso llega tanto el ADN de plásmido como el ADN del cromosoma bacteriano en la célula que va a transfectarse, transportándose de una manera hasta ahora no aclarada el ADN de plásmido en el núcleo celular de la célula. Posteriormente se elimina el PEG y se mezclan las células con un medio de cultivo celular nuevo, que contiene un antibiótico, por regla general canamicina, para impedir el crecimiento de bacterias que han sobrevivido. El método de la fusión de protoplastos se utilizó tanto para la expresión transitoria de genes clonados como para el establecimiento de líneas celulares de mamífero. Cuando se mezclan bacterias y células de mamíferos en una razón de 10.000:1, se transfectaron de manera transitoria células de mamífero con una eficacia de aproximadamente el 6% (Schaffner (1980), anteriormente). Con esto el procedimiento de la fusión de protoplastos en comparación con otros métodos de transfección es comparativamente ineficaz, sin embargo es adecuado especialmente para la introducción de ADN en líneas celulares, que son resistentes frente a la endocitosis de ADN mediado por DEAE-dextrano. Además se observó, que la fusión de protoplastos con mucha frecuencia conduce a la integración de varias copias del ADN de plásmido en el cromosoma huésped (Robert de Saint Vincent *et al.* (1981) *Cell* 27:267).

El uso de un impulso eléctrico corto con una tensión elevada se utilizó igualmente, para introducir ADN en un gran número de bacterias, células vegetales y de mamíferos (Neumann *et al.* (1982) *EMBO J.* 1:841; Wong y Neumann (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107:584; Potter *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:7161; Fromm *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:5824; Fromm *et al.* (1986) *Nature* 319:791; Andreason y Evans (1988) *BioTechniques* 6:650). Este procedimiento de transfección se denomina electroporación (Neumann *et al.* (1982), anteriormente). Este procedimiento es adecuado tanto para la transfección de células transitoria como para la estable, sin embargo las eficacias de transfección conseguidas se diferencian en los informes individuales parcialmente en una pluralidad. Mediante el impulso se generan los poros más pequeños en el orden de magnitud de pocos nanómetros en la membrana plasmática de la célula que va a transfectarse, (Neumann *et al.* (1982), anteriormente; Zimmermann (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 694:227). El ADN externo se absorbe en el citoplasma de la célula o bien directamente a través de estos poros o bien como consecuencia de una reorganización de los componentes de membrana, que acompaña el cierre de nuevo de los poros generados. En contraposición con la transfección mediada por DEAE-dextrano o con la fusión de protoplastos, la electroporación conduce por regla general a líneas celulares, que presentan una o sólo ocasionalmente varias copias del ADN externo (Boggs *et al.* (1986) *Exp. Hematol.* 14:988). La eficacia de la transfección se influye precisamente en el caso de la electroporación por un gran número de factores. A este respecto se reconocieron como especialmente críticos la potencia del campo eléctrico aplicado (Patterson (1979) *Methods Enzymol.* 58:141), la duración del impulso eléctrico (Rabussay *et al.* (1987) *Bethesda Res. Lab. Focus* 9(3):1), la temperatura (Reiss *et al.* (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137:244; Chu *et al.* (1987) *Nucleic Acids Res.*, 15:1311), la conformación y la concentración del ADN externo (Neumann *et al.* (1982), anteriormente; Potter *et al.* (1984), anteriormente) así como la composición iónica del medio (Rabussay *et al.* (1987), anteriormente). Aunque con la ayuda de la electroporación en determinadas circunstancias pueden alcanzarse eficacias de transfección muy elevadas, el gran número de parámetros críticos muestra que precisamente este procedimiento debe ajustarse de manera muy exacta a las condiciones experimentales. Los ensayos previos necesarios para la optimación de la transfección mediante electroporación se dificultan adicionalmente mediante el hecho, de que los equipos de electroporación más diversos están disponibles en el comercio, que se diferencian claramente con respecto a los parámetros ajustables.

Un procedimiento alternativo para la introducción de ácido nucleico externo en células se basa en la microinyección directa de ADN en el núcleo celular (Capecchi (1980) *Cell* 22:479). Este procedimiento posee la ventaja, que el ADN externo no entra en contacto con compartimentos celulares, tal como por ejemplo los endosomas con un valor de pH bajo, que puede modificar químicamente el ADN introducido. Pero dado que en el contexto de la microinyección debe transfectarse con ADN cada célula independientemente, este procedimiento no es adecuado en ningún caso para una aplicación a escala industrial, pero que se necesita para los análisis bioquímicos. Por tanto el uso de la microinyección como procedimiento de transfección se mantiene limitado a la aplicación en el laboratorio de investigación y sólo se aplica, cuando los planteamientos especiales de un problema lo requieren.

Para la introducción de ácido nucleico externo en células se estudiaron además vesículas de membrana artificiales (liposomas) de manera intensa, determinándose que estas vesículas de transporte son adecuadas *in vitro* e *in vivo*, para introducir el ADN de interés en las células. En este procedimiento se incluye el ARN o ADN externo debido a su carga total negativa en liposomas. Posteriormente se mezclan los liposomas con las células que van a transfectarse, mediante lo cual se funde el lado exterior de los liposomas por su similitud con la membrana celular a ésta y se transporta el ácido nucleico al interior de la célula diana (artículo general: Mannino y Gould-Fogerite (1988) *BioTechniques* 6:682). Aunque esté procedimiento tanto puede realizarse fácilmente como conduce a buenos resultados con respecto a la eficacia de la transfección, no puede utilizarse a escala industrial debido al elevado precio de los liposomas necesarios.

Sin embargo el procedimiento para la introducción de ácido nucleico externo en células utilizado con diferencia con más frecuencia es la transfección mediada por fosfato de calcio (CaPi). Ya en el año 1973 se determinó por parte de Graham y van der Eb, que la absorción de ADN en células cultivadas puede aumentarse claramente, cuando estas

se encuentran como coprecipitado de fosfato de calcio - ADN (Graham y van der Eb (1973) Virology 52: 456). En estos ensayos iniciales se introdujo ADN de SV40 y adenovirus en células, que crecían en contacto fuerte con el suelo del recipiente de cultivo (células adherentes). Para esto se utilizó calcio en una concentración de 125 mM y ADN en una concentración de desde 5 hasta 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, observándose la formación óptima de un coprecipitado de CaPi - ADN con un valor de pH neutro de 7,05. El mecanismo exacto de la transfección de ADN mediada por CaPi es desconocido de manera similar tal como en el caso del DEAE-dextrano, sin embargo se supone que se absorbe el ADN transfectado por medio de endocitosis en el citoplasma de la célula huésped y se transporta desde allí en el núcleo celular. Adicionalmente a la determinación de los intervalos de concentración críticos de calcio y ADN habían fijado Graham y van der Eb el tiempo de reacción óptimo para la formación del coprecipitado de CaPi - ADN a 20 - 30 min y la incubación posterior de las células con el coprecipitado a 5 - 24 h. Estos trabajos iniciales fijaron los cimientos para el desarrollo de un procedimiento de transfección eficaz, que se modificó de múltiples maneras por parte de los laboratorios más diversos desde entonces en más de 30 años. Un aumento adicional de la eficacia de transfección se alcanzó por ejemplo mediante la introducción de un choque de glicerol adicional (Parker y Stark (1979) J. Virol. 31:360) y/o un tratamiento de cloroquina (Luthman y Magnusson (1983) Nucleic Acids Res. 11:1295). Igualmente se describió el uso de butirato de sodio como ventajoso para la expresión de proteínas de genes codificados sobre plásmidos, que presentan un potenciador SV40 (Gormann *et al.* (1983a) Nucleic Acids Res. 11:7631; Gormann *et al.* (1983b) Science 221:551).

En el contexto del gran número de modificaciones de la transfección de células mediadas por CaPi se combinó el tratamiento con cloroquina, que impide la degradación del ADN externo mediante hidrolasas lisosomales con la aplicación de un choque de glicerol, que aumenta la absorción del ADN externo en las células. Dependiendo del tipo de las células de partida pueden transfectarse simultáneamente con ayuda de CaPi de manera rutinaria el 90% de las células cultivadas. Por tanto la transfección mediada por CaPi es con frecuencia el método elegido tanto para la expresión transitoria de ADN externo en un gran número de células como para el establecimiento de líneas celulares estables, que tras la transfección presentan copias integradas del ADN externo.

La publicación US 7.156.579 (publicada el 2 de agosto de 1988) da a conocer la transformación de células de mamífero, que comprende la transfección mediada por fosfato de calcio con el control de ciertos parámetros críticos incluyendo la tasa de adición de fosfato de calcio, del valor de pH y del nivel de CO_2 durante la incubación, pudiendo producirse con este procedimiento líneas celulares transformadas estables con una eficacia del 10-50%.

La transfección mediada por CaPi es especialmente adecuada para la transfección eficaz de células de mamífero, que expresan el ADN externo tras la transfección de manera estable a través de muchos pasos de cultivo celular (Chen y Okayama (1987) Mol. Cell. Biol. 7:2745). En el contexto de este protocolo se formó el coprecipitado de CaPi - ADN lenta y escalonadamente durante la incubación con la células que van a transfectarse en el medio de cultivo celular sobre las células. Para una transfección eficaz se reconoció como crítico un valor de pH del tampón utilizado de 6,95 y una concentración de ADN circular de 20 - 30 μg por aproximadamente 10^6 células. Sin embargo estos resultados sólo pudieron conseguirse con ADN cerrado anular (ADN de plásmido), mientras que el ADN lineal no pudo transfectarse en las células con ayuda de este procedimiento. Los autores utilizaron para la transfección mediada por CaPi células de crecimiento exponencial, que se trataron con tripsina antes de la transfección y posteriormente se sembraron en bandejas de cultivo celular en una densidad de células de aproximadamente 5×10^6 células por 75 cm^2 . Las células se incubaron durante la noche con 10 ml de un medio de cultivo nutritivo normal. Al día siguiente se incubaron 10 - 30 μg del ADN de plásmido de interés con 0,5 ml de CaCl_2 0,25 M, 0,5 ml de solución salina tamponada 2 x BES (2 x BBS), que contenía BES 50 mM (pH 6,95), NaCl 280 mM y Na_2HPO_4 1,5 mM, durante 10 - 20 min a temperatura ambiente. El coprecipitado de CaPi - ADN formado en este intervalo de tiempo se añadió en una cantidad de 1 ml gota a gota al medio de cultivo celular de las células. Las bandejas de cultivo celular se agitaron de manera ligera posteriormente, para distribuir la mezcla de CaPi - ADN homogéneamente en el medio. Siguió una etapa de incubación durante 15 - 24 h a 35°C en una atmósfera de CO_2 al 2 - 4%. Después se eliminó el medio, y se lavaron las células dos veces en medio de cultivo nutritivo, posteriormente se mezcló con medio de cultivo nutritivo nuevo y se incubó de nuevo durante 24 h adicionales a $35 - 37^\circ\text{C}$ en una atmósfera de CO_2 al 5%. Las células se distribuyeron para la selección de transformantes estables en una razón de 1:10 sobre nuevos recipientes de cultivo celular.

Aunque los autores han descrito con este procedimiento por primera vez tanto una reducción de la temperatura de la primera fase de incubación de habitualmente 37°C hasta 35°C como la reducción de la atmósfera de CO_2 de habitualmente al 5% hasta al 2 - 4%, preferiblemente CO_2 al 3% (cambio de temperatura; cambio de CO_2), se mantiene la aplicación de su procedimiento a escala de laboratorio y no es adecuado para la aplicación a escala industrial.

En los procedimientos descritos en la literatura se parte generalmente, de que las células que se encuentran en cultivo se mantienen en un medio de cultivo nutritivo y una atmósfera de CO_2 fuertemente enriquecida (Taylor *et al.* (1973) *In Vitro* 7(5):295; Minshull y Strong (1985) Int. J. Biochem. 17(4):529). El aire, que rodea como mezcla de gases la tierra como cubierta, se compone además de aproximadamente el 77% de nitrógeno, el 21% de oxígeno de aproximadamente el 1,2% de vapor de agua, el 0,9% de argón, el 0,01% de hidrógeno y el 0,03% de dióxido de carbono (CO_2). (Der kleine Brockhaus Enzyklopädie, de dos tomos (1950) Wiesbaden, Alemania).

Una concentración de CO_2 aumentada aproximadamente 100 - 300 veces frente al aire normal (CO_2 al 3 - 10%) se considera esencial para un crecimiento eficaz de células en condiciones de cultivo celular, que se proporcionan en una incubadora de cultivo celular mediante la alimentación de CO_2 externo (Chen y Okayama, anteriormente; Chen y Okayama (1988) BioTechniques 6:632; Wilson (1995) Analytical Biochemistry 226:212).

En el documento WO 96/07750 se describe igualmente un procedimiento para la transfección eficaz de células huésped eucariotas con ADN mediante la transfección mediada por CaPi. Aunque en esta solicitud de patente internacional se describe un procedimiento, con el que se obtiene partículas de coprecipitado de CaPi - ADN lo más grandes posibles, se parte también aquí de condiciones de cultivo normales con respecto a la atmósfera de CO₂ utilizada (CO₂ al 5%). Se consideran como especialmente críticos por el contrario para la transfección mediada por CaPi la concentración de Ca²⁺ y PO₄³⁻, el valor de pH y la temperatura (35°C). Frente a esto puede conseguirse una reducción de las partículas de coprecipitado de CaPi - ADN, reduciendo el valor de pH de medio de cultivo nutritivo lentamente con motivo del CO₂ producido a través de las células (formación de HCO₃⁻ mediante el CO₂ y H₂O que se encuentran en el medio de cultivo nutritivo) así como la producción endógena de ácido láctico de las células. Sin embargo el pequeño tamaño de partícula del coprecipitado de CaPi - ADN así obtenido sólo es adecuado para la transfección de determinados tipos de células, de modo que este procedimiento no es aplicable generalmente para las líneas celulares normales. Aunque esta solicitud de patente internacional describe la aplicación a escala industrial de la transfección de ADN mediada por CaPi en células en un biorreactor de hasta 40 l, debe añadirse a éste también CO₂ externo, para permitir un crecimiento celular eficaz.

Por consiguiente todos los numerosos procedimientos de transfección de CaPi - ADN descritos en el estado de la técnica parten de una gasificación de CO₂ externa de las células cultivadas, para lo cual se utilizan espacios de incubación especiales (incubadoras, biorreactores), que poseen una entrada de CO₂ regulable. Pero precisamente para la aplicación a escala industrial deben conseguirse especialmente bajo el aspecto de los costes, condiciones de reacción sencillas y con poco esfuerzo.

Por tanto la presente invención se basó en el objetivo de conseguir un procedimiento para la introducción eficaz de ácido nucleico en una célula mediante una transfección mediada por CaPi, que pueda realizarse de manera económica a escala industrial.

Ahora bien se encontró sorprendentemente que el ácido nucleico puede introducirse en las células por medio de una transfección mediada por CaPi de manera eficaz, cultivándose las células en el sistema de cultivo cerrado sin gasificación de CO₂ externa.

Por tanto es un objeto de la presente invención un procedimiento *in vitro* para la introducción de al menos un ácido nucleico en al menos una célula por medio de fosfato de calcio (CaPi), que comprende las etapas de:

- (a) mezclar el (los) ácido(s) nucleico(s) mencionado(s) con al menos una disolución de reacción, que presenta iones Ca²⁺ y PO₄³⁻;
- (b) incubar la(s) disolución(ones) de reacción, mediante lo cual se forma un precipitado, que presenta al menos ácido nucleico, calcio y fosfato;
- (c) añadir el precipitado a la célula mencionada;
- (d) incubar la célula de la etapa (c) con aire en sistema cerrado sin dióxido de carbono (CO₂) adicional, mediante lo cual se absorbe(n) el (los) ácido(s) nucleico(s) en la célula.

En otra forma de realización preferida se transfectan sucesivamente dos o más ácidos nucleicos diferentes, especialmente dos o tres ácidos nucleicos diferentes. A este respecto se prefiere especialmente que en el caso de una nueva transfección se utilice un medio nuevo.

Puesto que la incubación en la etapa (d) tiene lugar con aire en sistema cerrado sin dióxido de carbono (CO₂) adicional, se consigue especialmente que el procedimiento de transfección mediado por CaPi pueda realizarse a escala industrial en condiciones sencillas y económicas.

Por las denominaciones “transfección mediada por fosfato de calcio (CaPi)” y “coprecipitado de CaPi - ADN” se entienden en el sentido de la presente invención la introducción de ácido nucleico externo en una célula huésped con ayuda de un coprecipitado, que se compone de iones Ca²⁺ y PO₄³⁻ así como del ácido nucleico que va a introducirse. A este respecto el precipitado presenta hidroxiapatita (con la fórmula química de manera nutricional de (Ca₅OH(PO₄)₃)₂).

Como ácido nucleico externo puede utilizarse tanto cualquier tipo de ARN (ARNm, ARNr, etc.) como cualquier tipo de ADN, sin embargo preferiblemente ADN genómico, ADNc, ADN lineal o ADN de plásmido. Se prefiere especialmente el uso de ADN de plásmido cerrado circular, que se obtiene según procedimientos habituales a partir de bacterias transformadas.

El ácido nucleico, que es preferiblemente ADN de plásmido, se utiliza en el contexto de la presente invención en una cantidad de aproximadamente 0,2 µg - 20 µg, preferiblemente de aproximadamente 1 µg - 20 µg, especialmente de aproximadamente 2 µg - 10 µg, pero sobre todo de aproximadamente 6 µg por aproximadamente 10⁶ células. Dentro de estas cantidades utilizadas se consiguen eficacias de transfección elevadas.

En una forma de realización especialmente preferida pueden transfectarse con ayuda del procedimiento según la invención simultánea o sucesivamente dos o más ácidos nucleicos externos diferentes, especialmente dos o tres ácidos nucleicos externos diferentes. Para esto se mezclan los ácidos nucleicos de interés y se utilizan para la formación del coprecipitado de CaPi - ADN. A este respecto se prefiere especialmente el uso de dos o tres ADN de plásmido diferentes (cotransfección).

Además es especialmente ventajoso, ajustar el valor de pH de la disolución de reacción en la etapa (b) a temperatura ambiente a entre aproximadamente 6,8 - 7,1, preferiblemente a entre aproximadamente 6,86 - 7,05, especialmente hasta aproximadamente 7,05, mediante lo cual se consigue la mayor eficacia de transfección.

Igualmente se prefiere realizar la incubación de la disolución de reacción en la etapa (b) a temperatura ambiente (aproximadamente 18 - 24°C) durante aproximadamente 5 - 30 min, preferiblemente durante aproximadamente 10 - 20 min, especialmente durante aproximadamente 15 min. A este respecto se obtienen tamaños de partícula de coprecipitado de CaPi - ADN, que han demostrado ser especialmente ventajosos para una transfección eficaz.

En otra forma de realización especialmente preferida la incubación de las células tiene lugar en la etapa (d) a aproximadamente 37°C en una estufa durante aproximadamente 20 - 72 h, de manera preferible aproximadamente 30 - 72 h, de manera especial aproximadamente 24 - 48 h, sobre todo aproximadamente 40 - 48 h. Este periodo de tiempo ha demostrado ser óptimo, para que las células puedan “recuperarse” antes del tratamiento con el coprecipitado de CaPi - ADN y la absorción que ha tenido lugar del ácido nucleico externo, antes de que se utilicen para estudios adicionales del ácido nucleico externo o de la expresión de los genes codificados sobre el ácido nucleico.

En una forma de realización adicional se mantiene el ácido nucleico externo absorbido de manera permanente en la célula transfectada (transfección estable). A este respecto se multiplica por ejemplo como partícula de ADN episomal, extracromosómico, en la célula mediante un origen de replicación adecuado y se transmite a la célula hija de manera controlada en la división celular.

Alternativamente a esto puede integrarse el ácido nucleico externo introducido también, cuando no presenta ningún origen de replicación, de manera dirigida o no dirigida en el genoma de la célula, mediante lo cual se mantiene igualmente estable, se replica antes de la división celular junto con el genoma de la célula huésped y posteriormente se transmite a la célula hija en la división celular.

En una forma de realización alternativa se mantiene el ácido nucleico externo absorbido sólo en la célula transfectada. Dado que no presenta ningún origen de replicación adecuado, no se replica y no se transmite de manera dirigida a la célula hija en la división celular (transfección transitoria). Este procedimiento alternativo es sobre todo ventajoso cuando sobre el ácido nucleico externo se expresan genes codificados en la célula huésped, para posteriormente analizarse en ensayos adicionales. Además este procedimiento alternativo es adecuado para el estudio de genes, cuyos productos génicos (proteínas) son tóxicos para la célula, de modo que la célula no sobreviviría en caso de un paso de cultivo celular.

En una forma de realización preferida se utiliza como célula de partida para la transfección especialmente una célula eucariota, preferiblemente una célula de mamífero y especialmente una célula humana, tal como por ejemplo una célula HeLa.

Como células de partida para el procedimiento según la invención pueden utilizarse especialmente células de cultivos celulares de crecimiento adherente, que crecen en contacto constante con el recipiente de cultivo, especialmente sobre el suelo del recipiente de cultivo en un “césped”. Por lo demás las células pueden crecer de manera adherente sobre microsoportes. Líneas celulares preferidas son por ejemplo líneas epidérmicas tales como células HeLa o 293.

Pero en una forma de realización alternativa pueden utilizarse también células que crecen y se multiplican sin contacto constante con el recipiente de cultivo en el medio de cultivo celular, tal como por ejemplo células sanguíneas o células del sistema linfático, que en el organismo natural tampoco necesitan ningún contacto célula-célula para el crecimiento y cuyo crecimiento es independiente de la dirección. Además son adecuadas líneas celulares que se adaptaron al crecimiento en cultivo de suspensión.

Otro objeto de la presente invención es un procedimiento *in vitro* para la producción de una célula transfectada, introduciéndose el al menos un ácido nucleico en al menos una célula por medio de CaPi según el procedimiento según la invención, así como la célula transfectada, que se obtiene con ayuda del procedimiento según la invención.

La célula transfectada puede utilizarse especialmente para la producción de virus adenoasociados recombinantes (rVAA). Una descripción detallada de la producción de los rVAA con ayuda del procedimiento según la invención se describe en los ejemplos, pretendiendo los ejemplos únicamente explicar con más detalle la invención, sin limitarla a los mismos.

ES 2 266 197 T3

Ejemplos

1. Materiales utilizados

5	Células HeLa-t	MediGene Master Cell Bank
	Placas (de pocillos) de 6 orificios	NUNC; N° Cat. 152795
	Frascos de cultivo celular T25	NUNC; N° Cat. 136196
	Frascos de cultivo celular T185	NUNC; N° Cat. 144903
10	Apilamiento de cubas	NUNC; N° Cat. 164327
	Medio de cultivo celular DMEM	LifeTechnologies; N° Cat. 41965-039
	Suero de ternera fetal (STF)	PAA; N° Cat. A15-653
	FKS-América del Norte	Gibco; N° Cat. 10084-169
15	L-glutamina	LifeTechnologies; N° Cat. 25030-024
	Antibiótico/Antimicótico (AB/AM)	PAA; N° Cat. P11-002
	Gentamicina	Gibco; N° Cat. 15750-037
	CaCl ₂	Sigma; C-7902
20	H ₂ O	Sigma; W-3500
	0,2 µm filtro de aire	NUNC; Gelman 4210
	2 x tampón BBS	BES 50 mM, NaCl 280 mM, Na ₂ HPO ₄ 0,75 mM, NaH ₂ PO ₄ 0,75 mM, pH 6,8-7,1 óptimo),
25	Reactivo luciferasa	Promega E1501
	Tampón de lisis tritón	Promega E1501
	Equipo de medición luciferasa	Berthold Lumat LB 9501

30 2. Plásmidos utilizados

	Plásmido auxiliar pSVori	Chiorini <i>et al.</i> (1995) Hum Gene Ther 6 (12):1531
	Plásmido auxiliar pUC“rep/fs/cap”(RBS)Δ37	DE19905501
	Plásmido auxiliar pUC“rep/cap”Δ37	DE19905501
35	Plásmido auxiliar pUC“rep/cap”(RBS)Δ37	DE19905501
	Plásmido transgénico VAA-(B7.2libre/GMCSF)	DE19905501
	Plásmido pCI-luc	Ejemplo 5
	Plásmido transgénico pVAA-GFP	Ejemplo 5
40	Plásmido transgénico pVAA-(B7.2)	Ejemplo 5
	Adenovirus-5	ATCC

3. Transfección con gasificación de CO₂ con y sin cambio de temperatura y CO₂

45 Se sembraron 3 x 10⁵ células HeLa-t en 3 ml de medio completo DMEM (500 ml de DMEM + 50 ml de FKS + 5 ml de L-glutamina + 5 ml de AB/AM) en cada caso en un orificio (pocillo) de una placa de 6 pocillos y se incubaron durante 16 - 24 h a 37°C/CO₂ al 5%. Se realizaron todas las transfecciones en tripletes, realizándose en total cuatro transfecciones distintas: con o sin cambio de la temperatura o de la atmósfera de CO₂ en combinación con o sin cambio de medio. El cambio de medio tuvo lugar directamente antes de la adición de los precipitados de ADN - CaPi. A este respecto se cambió el medio usado por 3 ml de medio completo nuevo, sin gasificar, precalentado.

Formación de precipitados de ADN - CaPi

55 Por cada pocillo se mezclaron bien 6 µg de ADN pCI-luc con 150 µl de CaCl₂ 260 mM y después se mezclaron con cuidado con 150 µl de 2 x BBS. La disolución se dejó reposar durante 15 min a temperatura ambiente. Después se pipetearon por cada pocillo respectivamente 300 µl de la mezcla de ADN - CaPi rápidamente a los 3 ml de medio en un pocillo.

60 Se incubaron las muestras sin cambio de temperatura/CO₂ directamente a 37°C/CO₂ al 5%. Por el contrario se incubaron las muestras con cambio durante 16 - 20 h a 35°C/CO₂ al 3% y sólo después a 37°C/CO₂ al 5%.

65 Tras un total de aproximadamente 40 - 48 h se recogieron las células y se midió la expresión de luciferasa. Además de esto se lavaron las células con 500 µl de PBS, se lisaron en 500 µl de tampón de lisis tritón a temperatura ambiente y se separaron de la superficie con una rasqueta de células. Se llevó el lisado a un tubito de centrifugación de 1,5 ml y se centrifugó durante 2 min con un índice de giro máximo. Se añadieron 2 µl del residuo a 50 µl de reactivo luciferasa y se midieron inmediatamente.

ES 2 266 197 T3

Se dividió el valor de medición entre el número de las células transfectadas (= células sembradas x 2) y se multiplicó por 1×10^6 , de modo que el valor se refiere a 1×10^6 células.

TABLA 1

Comparación de una transfección con (+) y sin (-) cambio de temperatura/ CO_2 , sin (-) y tras (+) el cambio de medio. Se utilizó como gen indicador el gen luciferasa (luc). Se expresan los valores de medición en unidades de luciferasa relativas (ULR) por 1×10^6 células. Los valores porcentuales indican la eficacia de transfección en comparación con el método habitual (columna izquierda = + cambio - cambio de medio = 100%). Ya se han extraído los valores vacíos. Se promediaron en cada caso 3 mezclas básicas de prueba

+ cambio de temperatura/ CO_2		- cambio de temperatura/ CO_2	
- cambio de medio	+ cambio de medio	- cambio de medio	+ cambio de medio
$9,12 \times 10^8$	$7,15 \times 10^8$	$6,93 \times 10^8$	$7,49 \times 10^8$
100%	78%	76%	82%

Este experimento hace evidente que el método habitual con cambio de temperatura/ CO_2 y sin cambio de medio muestra una eficacia de transfección similar que las mezclas básicas de prueba restantes (véase la tabla 1).

4. Transfección con y sin gasificación de CO_2 , con y sin cambio de temperatura

Se cultivaron células HeLa-t en medio completo de DMEM (500 ml de DMEM + 50 ml de FKS + 5 ml de L-glutamina + 5 ml de AB/AM) a $37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$ al 5%. Se sembraron 5×10^5 células por frasco T25 en 5 ml de medio completo. Se incubaron las células durante 16 - 24 h a $37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$ al 5%. Después se cambió el medio usado por 3 ml de medio nuevo, sin gasificar, calentado.

Mezcla básica de la mezcla de ADN - CaPi

Por cada T25 se mezclaron 6 μg de ADN con 150 μl de CaCl_2 260 mM y posteriormente se mezclaron con cuidado con 150 μl de 2 x BBS. Se dejó reposar la disolución durante 15 min a temperatura ambiente. Después se pipetearon por cada frasco T25 respectivamente 300 μl de la mezcla de ADN - CaPi rápidamente a los 3 ml de medio en el frasco.

Se incubaron las muestras sin cambio de temperatura y sin gasificación con CO_2 en una incubadora a 37°C sin gasificación de CO_2 . Además de esto se cerraron las tapas adicionalmente con parafilm de tres capas. Se incubaron las muestras con cambio de temperatura durante 16 - 20 h a $35^\circ\text{C}/\text{CO}_2$ al 3% y sólo después a $37^\circ\text{C}/\text{CO}_2$ al 5%.

Tras un total de 40 - 48 h de incubación se recogieron las células y se midió la expresión de luc. Además de esto se lavaron las células con 2.000 μl de PBS, se lisaron en 1.000 μl de tampón de lisis tritón a temperatura ambiente y se separaron de la superficie con una rasqueta de células. Se llevó el lisado a un tubito de centrifugación de 1,5 ml y se centrifugó durante 2 min a un índice de giro máximo. Se añadieron 2 μl del residuo en 50 μl de reactivo luciferasa y se midieron inmediatamente.

Se dividió el valor medido entre el número de células transfectadas (= células sembradas x 2) y se multiplicó por 1×10^6 , de modo que se obtiene un valor que se refiere a 1×10^6 células.

TABLA 2

Comparación de transfecciones con (+) y sin (-) cambio de temperatura y con (+) y sin (-) gasificación de CO_2

Se realizaron 2 experimentos independientes con respectivamente 3 mezclas básicas de prueba promediadas. Se mantuvieron las células sin gasificación de CO_2 libres de CO_2 durante la transfección. Antes de las transfecciones tuvo lugar en cada caso un cambio de medio. Se expresan los valores de medición en cada caso en ULR por 1×10^6 células. Se igualaron al 100% los valores con CO_2 y cambio (= patrón).

Ensayo 1		Ensayo 2	
+ CO_2 + cambio de temperatura	- CO_2 - cambio de temperatura	+ CO_2 + cambio de temperatura	- CO_2 - cambio de temperatura
$5,64 \times 10^8$	$5,06 \times 10^8$	$2,54 \times 10^8$	$2,76 \times 10^8$
100%	90%	100%	109%

Estos resultados muestran que la transfección sin gasificación de CO₂ y sin cambio de temperatura es igual de eficaz que el método habitual con gasificación de CO₂ y con cambio de temperatura (véase la tabla 2).

5. Clonación de los plásmidos

1) Se clonó pCI-luc de la manera siguiente:

Se cortó el vector pBL (Hoppe-Seyler *et al.* (1991) J. Virol. 65:5613-; Butz y Hoppe-Seyler (1993) J. Virol. 67:6476) con las enzimas de restricción SmaI y PvuII, para aislar el gen luciferasa (inserto). Se linealizó el vector pCI (Promega GmbH, Mannheim, Alemania) con SmaI y se desfosforiló (vector). Se ligaron ambos fragmentos (inserto y vector) para dar pCI-Luc.

2) Se produjo pVAA-GFP tal como sigue:

El plásmido de partida para la subclonación de la “proteína de fluorescencia verde” (GFP/green fluorescence protein) era el vector pEGFP-N3 (Clontech, Heidelberg, Alemania). Se amplificó con los oligonucleótidos (cebadores) GFP/SpeI y GFP/MluI a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) un fragmento con un tamaño aproximadamente de 3.000 pb, que se cortó posteriormente con SpeI y MluI. Se clonó este fragmento en el vector base de VAA, mediante lo cual se generó pVAA-GFP. Se describe la producción del vector base en el documento DE 19905501. (En resumen: se cortó pAV2 (Laughlin *et al.* (1983) Gene 23:65) con BglII y se utilizó el fragmento de VAA en pUC 19 a través del sitio de corte BamHI. En el pUCAV2 así generado se delecionaron los nucleótidos de VAA 192-4497 y se sustituyeron por los nucleótidos de pCI 4002-4008 así como 1-1351, que contienen el casete de expresión CMV-poliA. Se denomina este constructo vector base de VAA).

Secuencias de cebadores

GFP/SpeI: 5' - GGG ATC CAT CAC TAG TAT GGT GAG CAA GG - 3'

GFP/MluI: 5' - CAA ACG ACC CAA CAC CAC GCG TTT TAT TCT GTC - 3'

3) Se produjo pVAA-(B7.2) a través de dos etapas de clonación tal como sigue:

En primer lugar se cortaron los vectores pCI, y pLL279 (Lanier *et al.* (1995) J Immunol 154(1):97) con las enzimas de restricción XhoI y NotI y se ligó el inserto B7.2 de pLL279 con el vector pCI para dar pCI-B7.2. Se amplificó con los cebadores B7.2/NheI y B7.2/MluI a partir de pCI-B7.2 mediante PCR un fragmento con un tamaño de aproximadamente 3.000 pb, que se cortó posteriormente con NheI y MluI. Se clonó este fragmento en el vector base de VAA (véase el ejemplo 5.2), mediante lo cual se generó pVAA-(B7.2).

Secuencias de cebadores

B7.2/NheI: 5' - GCA TTT GTG CTA GCA CTA TGG GAC TGA G - 3'

B7.2/MluI: 5' - CGG TTC ACG CGT ATC AAG GCG AGT TAC ATG - 3'

6. Empaquetamiento de rVAA-GFP (cultivo celular en frascos de cultivo T25 sin gasificación de CO₂)

Se cultivaron células HeLa-t en medio completo de DMEM (500 ml de DMEM + 50 ml de FKS + 5 ml de L-glutamina + 5 ml de AB/AM) a 37°C/CO₂ al 5%. Se sembraron 5 x 10⁵ células por frasco T25 (T25) en 5 ml de medio completo. Se incubaron las células durante 16 - 24 h a 37°C/CO₂ al 5%. Después se cambió el medio usado por 3 ml de medio nuevo, sin gasificar, calentado.

Mezcla básica de la mezcla de ADN - CaPi (para la cotransfección)

Por cada T25 se mezclaron 2 µg de pVAA-GFP con 4 µg de ADN de pSVori y 150 µl de CaCl₂ 260 mM y posteriormente se mezclaron con cuidado con 150 µl de 2 x BBS. Se dejó reposar la disolución durante 15 min a temperatura ambiente. Después se pipetearon por cada T25 respectivamente 300 µl de la mezcla de ADN - CaPi rápidamente a los 3 ml de medio en el frasco.

Se incubaron las muestras sin cambio de temperatura y sin gasificación de CO₂ en una incubadora a 37°C sin gasificación de CO₂. Además de esto se cerraron las tapas adicionalmente con parafilm de tres capas. Se incubaron las otras mezclas básicas durante 16 - 20 h a 35°C/CO₂ al 3% y sólo después a 37°C/CO₂ al 5%.

Tras un total de 40 - 48 h de incubación se infectaron las células con adenovirus. Además de esto se eliminó el medio de los frascos y se sustituyó por 1,5 ml de medio nuevo. Se diluyó la disolución de adenovirus hasta 2 x 10⁹ partículas/ml. En cada frasco se le añadieron 50 µl del virus diluido a los 1,5 ml de medio. Se cerraron los frascos y se incubaron correspondientemente durante 2 h. Después se añadieron 3 ml de medio completo nuevo y se incubó durante 20 h adicionales. Siguió un nuevo intercambio del medio usado por 5 ml de medio nuevo.

ES 2 266 197 T3

Posteriormente se incubó durante 60 - 70 h adicionales (correspondientemente con o sin CO₂, o sea con y sin cierre de parafilm adicional). Después se recogieron las células y el residuo. Además de esto se lavaron del suelo de los frascos las últimas células aún adheridas y se llevaron a un tubito de centrifugación de base puntiaguda de 15 ml. Finalmente se lisaron las células mediante una congelación y descongelación de las células tres veces seguidas (en N₂ líquido o a 37°C en baño de agua).

Determinación del título

Para la determinación del título se sembraron $1,5 \times 10^5$ células HeLa-t en respectivamente un pocillo de una placa de 12 pocillos y se incubaron en 1 ml de medio completo durante 16 - 20 h (37°C/CO₂ al 5%). Después se inactivaron las células mediante radiación γ o UV. Se inactivó por calor el lisado de virus durante 10 min a 60°C, posteriormente se centrifugó y se utilizó el residuo para la titulación del virus. Además de esto se infectaron las células con cantidades distintas del lisado y se incubaron durante 40 - 48 h a 37°C/CO₂ al 5%. Después de recogieron las células, absorbiéndose el residuo, lavándose las células con PBS y separándose del recipiente de cultivo celular mediante el tratamiento con EDTA/tripsina. Por medio de la "citometría de flujo activada por fluorescencia" (FACS/fluorescence activated cell sorting) se determinó finalmente el porcentaje de las células GFP positivas y así el título de virus.

TABLA 3

Se cotransfectaron las células tal como se describió en 4. con el plásmido transgénico pVAA-GFP y el plásmido auxiliar pSVori (n = 39). El empaquetamiento adicional tuvo lugar según lo habitual, sin embargo con - CO₂ - cambio de temperatura todavía sin gasificación de CO₂. Se igualaron los valores del patrón al 100%. Como medida se determinó la cantidad de virus producida por célula

	+ CO ₂ + cambio de temperatura	- CO ₂ - cambio de temperatura
Partículas transducidas por célula	12	14
Índice de rendimiento	100%	117%

Según esto el empaquetamiento de rVAA-GFP sin gasificación de CO₂ y sin cambio de temperatura es comparablemente eficaz como con gasificación de CO₂ y cambio de temperatura (véase la tabla 3).

7. Comparación de empaquetamientos en apilamientos de cubas (AC) con y sin CO₂

Se cultivaron células HeLa-t en frascos de cultivo celular T185 a 37°C/CO₂ al 5%. Se recogieron las células con EDTA/tripsina y se resuspendieron en medio completo de DMEM (500 ml de DMEM + 50 ml de FKS + 5 ml de L-glutamina 200 mM) (posible adición de 50 µg/ml de gentamicina). Se absorbieron de $0,9 \times 10^8$ a $1,4 \times 10^8$ células HeLa-t en 900 ml de medio completo. Con esta suspensión celular se llenó un apilamiento de cubas. Para la transfección sin gasificación de CO₂ ni cambio de temperatura se cerraron las dos conexiones de los apilamientos de cubas con parafilm o una pieza de filtro de aire que puede cerrarse herméticamente. La incubación tuvo lugar durante 22 - 30 h a 37°C sin CO₂. Se incubaron las mezclas básicas con gasificación de CO₂ y con cambio de temperatura durante el mismo periodo de tiempo a 37°C/CO₂ al 5%.

Tras la incubación se absorbió el residuo. Siguió la primera transfección con el plásmido auxiliar correspondiente (véase la tabla 4). Además de esto se disolvieron 1.800 µg de ADN en 45 ml de CaCl₂ 270 mM y se mezclaron bien. Después se añadieron 45 ml de 2 x BBS y se mezclaron con cuidado. Se dejó reposar la mezcla de ADN - CaPi durante 20 +/- 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron los 90 ml de la disolución de ADN - CaPi rápidamente a 900 ml de medio completo de DMEM precalentado (con o sin gentamicina). Se traspasó el medio con los precipitados al apilamiento de cubas y se incubaron de nuevo las células durante 20 - 30 h a 37°C sin gasificación.

Después tuvo lugar la transfección del plásmido transgénico correspondiente (véase la tabla 4). Ésta tuvo lugar exactamente tal como se describió para el plásmido auxiliar.

ES 2 266 197 T3

TABLA 4

Combinación de los plásmidos transgénicos y plásmidos auxiliares utilizados del experimento de la tabla 5 (véase a continuación)

Plásmido auxiliar	Plásmido transgénico	Número de experimentos
pUC“rep/fs/cap”(RBS)Δ37	pVAA-GFP	1
pUC“rep/fs/cap”(RBS)Δ37	PVAA-(B7.2)	1
pUC“rep/cap”(RBS)Δ37	pVAA-(B7.2libre/GMCSF)	1
pUC“rep/cap”Δ37	pVAA-(B7.2libre/GMCSF)	2

Tras 20 - 30 h de incubación se añadió a las células adenovirus con una unidad de infección (multiplicidad de infección (MOI)) de 2 - 3. Tras 20 - 30 h adicionales de incubación a 37°C sin gasificación se cambió el residuo por 900 ml de medio nuevo sin FKS. Tras este último cambio de medio de incubó el apilamiento de cubas durante 60 - 68 h adicionales a 37°C. Después tuvo lugar la recogida del virus mediante la lisis por congelación/descongelación de las células.

En comparación con esto en el método habitual no tuvo lugar antes de la transfección con el plásmido auxiliar ningún intercambio de medio. Además a este respecto se gasificaron las células mediante un filtro de aire de 0,2 μm. Tras la adición de las mezclas de ADN - CaPi se incubaron las células en primer lugar durante una noche a 35°C/CO₂ al 3%, antes de que se cambiaran a 37°C/CO₂ al 5%. Excepto por estas diferencias los métodos fueron idénticos.

TABLA 5

Comparación de apilamientos de cubas (AC), que se utilizaron con (+) y sin (-) gasificación de CO₂/cambio de temperatura para el empaquetamiento de diferentes vectores. En cinco experimentos se compararon AC con y sin cambio de temperatura/CO₂ directamente entre sí (= por lo demás producción idéntica y simultánea). Se midió el número de las partículas transducidas por apilamiento de cubas

	+ CO ₂ + cambio de temperatura	- CO ₂ - cambio de temperatura
Número de experimentos	5	5
AC/partículas transducidas en promedio	9,75 x 10 ⁹	10,01 x 10 ⁹

También en apilamientos de cubas, que son adecuados para el cultivo a escala industrial de células con crecimiento adherente, los rendimientos en la producción de VAA recombinante sin gasificación de CO₂ y sin cambio de temperatura son comparables con los del método habitual con gasificación de CO₂ y con cambio de temperatura (véase la tabla 5).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento *in vitro* para la introducción de al menos un ácido nucleico en al menos una célula por medio de fosfato de calcio (CaPi), que comprende las etapas:
 - (a) mezclar el (los) ácido(s) nucleico(s) mencionado(s) con al menos una disolución de reacción, que presenta iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} ;
 - 10 (b) incubar la(s) disolución(ones) de reacción, mediante lo cual se forma un precipitado, que presenta al menos ácido nucleico, calcio y fosfato;
 - (c) añadir el precipitado a la célula mencionada;
 - 15 (d) incubar la célula de la etapa (c) con aire en sistema cerrado sin dióxido de carbono (CO_2) adicional, mediante lo cual se absorbe(n) el (los) ácido(s) nucleico(s) en la célula.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se utiliza como ácido nucleico ARN o ADN, preferiblemente ADN genómico, ADNc, ADN lineal o ADN de plásmido, especialmente ADN de plásmido circular.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque se utiliza el ácido nucleico en una cantidad de 0,2 μg - 20 μg , preferiblemente de 1 μg - 20 μg , especialmente de 2 - 10 μg , sobre todo de 6 μg por cada 10^6 células.
- 25 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque se utilizan simultánea o sucesivamente dos o más ácidos nucleicos diferentes, preferiblemente dos o tres ácidos nucleicos diferentes, especialmente dos o tres ADN de plásmido diferentes.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque el valor de pH de la disolución de reacción en la etapa (b) a temperatura ambiente asciende a 6,8-7,1, preferiblemente a 6,86-7,05, especialmente a 7,05.
- 30 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque la incubación de la disolución de reacción tiene lugar en la etapa (b) a temperatura ambiente durante 5 - 30 min, preferiblemente durante 10 - 20 min, especialmente durante 15 min.
- 35 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque la incubación de las células tiene lugar en la etapa (d) a 37°C durante 20 - 72 h, preferiblemente 30 - 72 h, especialmente durante 24 - 48 h, sobre todo 40 - 48 h.
- 40 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque el ácido nucleico absorbido presenta un origen de replicación, se mantiene de manera episomal en la célula transfectada y se transmite durante la división celular a la célula hija de manera controlada.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque el ácido nucleico absorbido no presenta ningún origen de replicación y se integra de manera de una manera dirigida o no dirigida en el genoma de la célula y porque se transmite durante la división celular a la célula hija.
- 45 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque el ácido nucleico absorbido no presenta ningún origen de replicación y por consiguiente no se transmite durante la división celular directamente a la célula hija.
- 50 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque se utiliza como célula una célula eucariota, preferiblemente una célula de mamífero, especialmente una célula humana.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** porque la célula crece y se multiplica en contacto constante con el recipiente de cultivo en el medio de cultivo celular.
- 55 13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** porque la célula crece y se multiplica sin contacto constante con el recipiente de cultivo en el medio de cultivo celular.
- 60 14. Procedimiento *in vitro* para la producción de un célula transfectada, **caracterizado** porque se introduce al menos un ácido nucleico en al menos una célula por medio de CaPi según el procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13.

ES 2 266 197 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> MediGene Sociedad Anónima	
5	<120> Procedimiento <i>in vitro</i> para la introducción de ácido nucleico en una célula (transfección) por medio de fosfato de calcio	
	<130> M32752PC	
	<140> PCT/EP 01/05531	
10	<141> 2001-05-15	
	<150> DE 10024334.7	
	<151> 2000-05-17	
	<160> 4	
15	<170> PatentIn versión 3.1	
	<210> 1	
	<211> 29	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
25	<400> 1	
	gggatccatc actagtatgg tgagcaagg	29
30	<210> 2	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 2	
40	caaacgaccc aacaccacgc gttttattct gtc	33
	<210> 3	
45	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Cebador	
	<400> 3	
	gcatttgtgc tagcactatg ggactgag	28
55	<210> 4	
	<211> 30	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
65	<400> 4	
	cggttcacgc gtatcaaggc gagttacatg	30