



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 345 508**

51 Int. Cl.:
C12N 5/071 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06818078 .5**
96 Fecha de presentación : **15.11.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1948789**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.07.2008**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de líneas celulares humanas permanentes.**

30 Prioridad: **16.11.2005 DE 10 2005 054 628**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.09.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.09.2010

73 Titular/es: **CEVEC Pharmaceuticals GmbH**
Gottfried-Hagen Strasse 62
51105 Köln, DE

72 Inventor/es: **Schiedner, Gudrun y**
Volpers, Christoph

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 345 508 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

Procedimiento para la preparación de líneas celulares humanas permanentes.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de una línea celular humana permanente, en el que se transfectan células humanas primarias aisladas simultáneamente con una secuencia que permite la expresión de al menos un factor transformante celular y una secuencia que permite la expresión de al menos un polipéptido recombinante.

10 La producción de polipéptidos recombinantes con fines terapéuticos, de diagnóstico o técnicos en cultivo celular (*in vitro*) se realiza generalmente en líneas celulares estables establecidas duraderas o permanentes en las que se integra el ácido nucleico que codifica el polipéptido en el ADN cromosómico de la célula (denominada línea celular productora). Estas líneas celulares productoras deben presentar particularmente dos propiedades características: en primer lugar, deben crecer de forma duradera (permanente) en el cultivo celular y ser multiplicables, y en segundo lugar, deben expresar el gen que codifica el polipéptido deseado, que puede aislarse entonces de la célula o del sobrenadante de cultivo. Además de bacterias, levaduras y células de plantas, se usan particularmente células animales para la producción de polipéptidos recombinantes. Aproximadamente un 60-70% de todas las proteínas terapéuticas se producen hoy en día en células de mamífero (Wurm, *Nat. Biotechnology* 22, 1393-1398, 2004). La preparación de células productoras proviene generalmente de líneas celulares ya inmortalizadas o transformadas que crecen y se multiplican de forma duradera en cultivo celular como, por ejemplo, células CHO (ovario de hámster chino), BHK (riñón de cría de hámster), NS0 (mieloma de ratón) o células humanas HEK293 (riñón embrionario humano) o PER.C6. Estas líneas celulares, que son también obtenibles comercialmente, se generaron casi como primera etapa del procedimiento para el establecimiento de células productoras mediante manipulación genética de células primarias en cultivo o se aislaron a partir de un tumor natural.

25 En la obtención de las células productoras reales, se transfiere mediante transfección a estas líneas celulares ya establecidas por un lado el ácido nucleico que codifica el polipéptido recombinante (el denominado transgén), con los elementos reguladores de la transcripción necesarios, y por otro lado un segundo módulo de expresión con un gen que codifica un marcador de selección y cuyo producto génico procura una determinada ventaja selectiva a la célula. Pocos días después de la transferencia génica, mientras se cultivan las células en un medio de cultivo sin reactivo de selección, se añade al medio un reactivo de selección adecuado. En presencia del reactivo de selección, sobreviven y crecen sólo las células que han incorporado los ácidos nucleicos empleados para la transfección y que expresan el marcador de selección: son marcadores de selección empleados frecuentemente el gen de resistencia a neomicina, el gen de resistencia a higromicina y la dihidrofolato reductasa (DHFR) (Wurm, *Nat. Biotechnology* 22:1393-1398, 2004; Wurm y Jordan, 309-333 en: Makrides (Ed.), "Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells", Elsevier, Amsterdam, 2003). La selección se realiza correspondientemente en medio de cultivo con reactivos de selección como los antibióticos neomicina o higromicina o el glucocorticoide sintético metotrexato. Las células con el marcador de selección y el transgén que sobreviven al proceso de selección y proliferan (denominadas transformantes) se aíslan generalmente a continuación (se clonan) para asegurar que todas las células del cultivo son genéticamente idénticas y para separar las líneas celulares productoras deseadas con la mejor tasa de producción de las líneas celulares productoras menos buenas.

45 Los reactivos de selección deben añadirse al medio, según el proceso de preparación y según las circunstancias, no sólo durante la fase de selección, sino también después en el cultivo de las células clonadas para asegurar la estabilidad genética de las células productoras. El gen del polipéptido deseado (transgén) y el gen del marcador de selección se integran generalmente en el mismo sitio del genoma celular. A falta de presión selectiva durante la posterior expansión de las células o durante la fase de producción, existe el riesgo de que las células pierdan el marcador de selección, y por tanto también el transgén del polipéptido deseado. Esto se impide mediante la adición continua de reactivo de selección.

50 Las células primarias animales y humanas que se aportan al cultivo celular después de extracción del organismo o tejido, crecen generalmente sólo durante poco tiempo y pocos pases. Las células humanas son especialmente bien adecuadas para la preparación de productos bioterapéuticos humanos, ya que expresan péptidos complejos, en contraposición con otras células de mamífero o células animales, con un patrón de modificación postraducciona auténtico. El patrón de glucosilación de proteínas recombinantes complejas, o sea la estructura y disposición de los restos de azúcar en la molécula, reproduce esencialmente mejor en una preparación en células humanas el patrón del polipéptido humano auténtico que en una preparación en sistemas de producción no humanos. Este patrón de glucosilación es a menudo de importancia decisiva para propiedades importantes del polipéptido como actividad biológica, estabilidad, solubilidad e inmunogenicidad.

60 Se han aislado líneas celulares humanas establecidas de forma duradera (líneas celulares humanas permanentes), que podrían usarse para la expresión de polipéptidos recombinantes, a partir de tejido tumoral de pacientes (por ejemplo, células HeLa). Dichas células sin embargo no son adecuadas por consideraciones de seguridad y a causa de su inestabilidad genética para una producción industrial de polipéptidos terapéuticos para aplicación en seres humanos. Las líneas celulares humanas inmortalizadas espontáneamente no están prácticamente disponibles con pocas excepciones (por ejemplo, las denominadas células HaCaT). Son adecuadas con fines de producción biotecnológica en cambio las líneas celulares humanas permanentes que se generan mediante transformación de tejido primario mediante determinados productos génicos víricos. Mediante la expresión de polipéptidos transformantes de virus de ADN,

pueden convertirse células primarias en células en crecimiento permanente. El mecanismo de transformación requiere la interacción de los productos génicos codificados por virus con proteínas celulares que participan en la regulación de la división celular (denominados productos génicos supresores tumorales). Así, irrumpe un punto de detención del ciclo celular (fase G0/G1) y las células pasan a la fase S, lo que conduce a una proliferación incontrolada de las células (Helt & Falloway, *Carcinogenesis* 24:159-169, 2003). Son ejemplos de dichos productos génicos codificados por virus transformantes antígeno T del virus 40 de simio (SV40), E6/E7 del papilomavirus humano (HPV) o E1A/E1B de adenovirus. Estas proteínas víricas son comparables en su mecanismo de transformación: antígeno T, E6 y E1A inactivan los productos génicos de la familia de proteína de retinoblastoma celular (pRb), y antígeno T, E7 y E1B inactivan el supresor tumoral celular p53 (resumido en: zur Hausen, *J. Natl. Cancer Inst.*, 92, 690-698, 2000; Ludlow, *FASEB J.* 7: 866-871, 1993; Moran, *FASEB J.* 7, 880-885, 1993). Las líneas celulares así transformadas se vuelven así cultivables de forma duradera y son especialmente adecuadas con fines de producción biotecnológica.

Sólo muy pocos tipos de células humanas se han transformado hasta ahora con la región génica E1 de adenovirus. Pertenecen a ellas células neuronales en tejido renal embrionario humano (HEK293) (Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.* 36: 59-74, 1977), células de retina embrionaria humana (documento EP 833.934 B1) y amniocitos humanos (documento EP 1.230.354 B1).

El procedimiento descrito de preparación de líneas celulares productoras basado en líneas celulares inmortalizadas o transformadas existentes tiene desventajas en distintos aspectos. La adición de antibióticos, productos quimioterapéuticos u otros reactivos de selección al medio de cultivo durante la fase de selección, y según las circunstancias también en la fase de expansión antes de la producción, eleva los costes del procedimiento de producción. Mediante costosos análisis del proceso de producción, así como del producto final, debe asegurarse y demostrarse además que el producto final purificado y confeccionado no contiene ningún resto de los reactivos de selección. Esto significa requisitos adicionales al control de calidad para garantizar la seguridad del preparado terapéutico. Varios de los reactivos de selección utilizados tienen además influencia sobre la calidad o la estabilidad clonal de las células productoras. La adición continua de metotrexato como reactivo de selección al cultivo mantiene por ejemplo ciertamente en varias líneas celulares productoras la presión del fenotipo “estable” de la célula con respecto a su productividad. Sin embargo, estudios genéticos han mostrado que la presencia de este reactivo potencia la heterogeneidad citogenética de las células, lo que es indeseable particularmente con respecto a los requisitos regulatorios del proceso de autorización (Wurm *et al.*, *Dev. Biol. Stand.* 76: 69-82, 1992; Kim y Lee, *Biotechnol. Bioeng.* 64: 741-749, 1999). Puede considerarse otra desventaja del procedimiento clásico de generación de líneas celulares productoras que esté presente sólo una selección muy limitada de líneas celulares de partida permanentes en las que se basa el procedimiento de preparación (por ejemplo, CHO, BHK, HEK293). Todas estas células se han cultivado ya durante muchos años en innumerables pases y almacenado antes de su desarrollo a líneas celulares productoras. Estas operaciones conllevan siempre el riesgo de que, además de las modificaciones genéticas necesarias para la inmortalización inicial, se acumulen numerosas otras aberraciones cromosómicas y mutaciones genéticas que las hagan cada vez más distintas de las células de partida animales o humanas “naturales”. Las posibles consecuencias de estas modificaciones sobre aspectos relevantes de seguridad y/o técnicos de producción de la preparación genética de proteínas recombinantes no se han investigado detenidamente hasta ahora.

Por tanto, la invención se basa en el objetivo de procurar un procedimiento más sencillo, más económico y más seguro según aspectos de toxicidad para la preparación de líneas celulares humanas permanentes para la producción de polipéptidos recombinantes.

El objetivo se consigue mediante el objeto definido en las reivindicaciones.

Las siguientes figuras ilustran la invención.

La Fig. 1 muestra esquemáticamente la configuración del plásmido pGS119 para expresión de la función génica E1 y de la proteína estructural vírica pIX de adenovirus de serotipo 5.

La Fig. 2 muestra esquemáticamente la configuración del plásmido pGS116 para expresión de un ADNc de alfa-1-antitripsina humana (hAAT) bajo el control del promotor de citomegalovirus humano (CMV).

La Fig. 3 muestra el resultado de una transferencia Western para expresión de las proteínas E1A y E1B de Ad5 en siete líneas celulares productoras distintas basadas en amniocitos permanentes de alfa-1-antitripsina humana.

La Fig. 4 muestra el resultado de una transferencia Western para expresión de alfa-1-antitripsina humana (hAAT) en siete líneas celulares productoras distintas basadas en amniocitos permanentes. A, hAAT segregado de las células en el sobrenadante de cultivo; B hAAT intracelular.

La Fig. 5 muestra esquemáticamente la cantidad de alfa-1-antitripsina humana (hAAT) expresada por líneas celulares productoras seleccionadas en sobrenadante de cultivo (ELISA, ensayo de inmunosorción ligado a enzima). A, cantidad de hAAT en el pase 5 de los clones celulares individuales; B, estabilidad de la expresión durante varios pases en clones celulares seleccionados.

La Fig. 6 muestra el resultado de una transferencia Western para la glucosilación de alfa-1-antitripsina humana (hAAT) a partir de líneas celulares productoras basadas en amniocitos.

ES 2 345 508 T3

Se entiende por el término “amniocitos” en un sentido amplio, como se usa aquí, todas las células que están presentes en el líquido amniótico y que pueden obtenerse mediante punción amniótica. Proceden del amnios o de tejido fetal que está en contacto con el líquido amniótico. Se han descrito tres clases principales de amniocitos que se diferencian debido a criterios morfológicos: células de tipo fibroblasto (células F), células epitelioides (células E) y células de líquido amniótico (“Amniotic Fluid Cells”, células AF) (Hohn *et al.*, *Pediat. Res.* 8: 746-754, 1974). Las células AF son el tipo celular predominante. Pueden servir como células fuente de amniocitos células de punciones amnióticas (amniocentesis) que se llevan a cabo, por ejemplo, para un diagnóstico citogenético. Pueden servir también como células fuente de amniocitos células de extracciones de líquido amniótico que se toman en cantidades de líquido amniótico por encima de la media durante el embarazo (polihidramnios, polihidramnia).

Se entiende por el término “módulo de expresión” particularmente una molécula de ácido nucleico o un tramo de una molécula de ácido nucleico que contiene un elemento regulador o un promotor, una región codificante o un marco abierto de lectura que se encuentran antes de la región codificante, así como un elemento de terminación transcripcional que se encuentra después de la región codificante. El elemento regulador o el promotor que se encuentra antes de la región codificante puede ser un promotor constitutivo, es decir, activador permanente de la transcripción (por ejemplo, el promotor de CMV) o un promotor regulable, es decir, activable y/o desactivable (por ejemplo, el promotor regulable por tetraciclina). La región codificante del módulo de expresión puede ser un marco abierto de lectura continuo como en un ADNc con un codón de inicio en el extremo 5' y un codón de terminación en el extremo 3'. La región codificante puede consistir en una disposición genómica o recién combinada de exones codificantes e intrones intermedios no codificantes. La región codificante del módulo de expresión puede consistir en embargo también en varios marcos abiertos de lectura que están separados entre sí por los denominados IRES (sitios internos de entrada a ribosoma).

Se entiende por el término “líneas celulares permanentes”, como se usa aquí, células que están modificadas genéticamente de modo que pueden seguir creciendo permanentemente en cultivo celular en condiciones de cultivo adecuadas. Dichas células se llaman también células inmortalizadas.

Se entiende por el término “polipéptido” o “polipéptido recombinante”, como se usa aquí, péptidos de al menos dos aminoácidos. El polipéptido puede modificarse co- y/o postraduccionalmente, por ejemplo, mediante acoplamiento de restos de azúcar o mediante modificación de restos aminoacídicos. El polipéptido puede ser lineal, circular o ramificado. Además, el polipéptido puede consistir en más de una cadena aminoacídica, pudiendo adoptar las cadenas mediante enlaces intra- y/o intermoleculares estructuras espaciales más o menos complejas (por ejemplo, secundaria, terciaria, cuaternaria). Si el polipéptido consiste en una cadena aminoacídica, éste puede adoptar también mediante enlaces intramoleculares estructuras espaciales más o menos complejas. Los polipéptidos pueden ser polipéptidos farmacológica o inmunológicamente activos o polipéptidos usados con fines de diagnóstico.

Se entiende por el término “células primarias”, como se usa aquí, células que se han obtenido mediante extracción directa de un organismo o un tejido y se han mantenido en cultivo. Las células primarias poseen sólo una duración de vida muy limitada. Pueden ser células primarias, por ejemplo, amniocitos, células neuronales o células retinales.

Se entiende por el término “líneas celulares productoras”, como se usa aquí, líneas celulares permanentes que se han modificado genéticamente mediante la introducción de un transgén que codifica el polipéptido que se desea producir.

Se entiende por el término “marcador de selección”, como se usa aquí, un marcador genético que confiere a las células una ventaja de crecimiento en condiciones de selección. Dichas condiciones de selección pueden ser, por ejemplo, la presencia de un producto quimioterapéutico o un antibiótico u otra sustancia citotóxica dañina para el crecimiento en el medio. Son marcadores de selección empleados frecuentemente el gen de resistencia a neomicina, el gen de resistencia a higromicina y la dihidrofolato reductasa.

Se entiende por el término “transfección”, como se usa aquí, cualquier procedimiento que sea adecuado para introducir en las células el o los ácidos nucleicos citados. Han de citarse como ejemplos los procedimientos clásicos de fosfato de calcio, electroporación, sistemas liposómicos de cualquier tipo y combinaciones de estos procedimientos.

Se entiende por el término “transgén”, como se usa aquí, la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante.

Un objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de una línea celular humana permanente en el que se transfectan células humanas primarias aisladas con una molécula de ácido nucleico o al menos dos moléculas de ácido nucleico distintas, y en caso de transfectar una molécula de ácido nucleico, la molécula de ácido nucleico presenta una secuencia que permite la expresión de al menos un factor transformante celular y la expresión de un polipéptido recombinante, y en el caso de transfectar al menos dos moléculas de ácido nucleico distintas, una primera molécula de ácido nucleico presenta una secuencia que permite la expresión de al menos un factor transformante celular y una segunda molécula de ácido nucleico presenta una secuencia que permite la expresión de al menos un polipéptido recombinante.

Las células humanas primarias usadas para el procedimiento de la presente invención se obtienen mediante extracción directa del organismo o de uno de los tejidos extraídos del organismo y se mantienen en cultivo. Se prefieren

aquellas células humanas primarias que pueden transformarse bien mediante expresión con factores transformantes celulares en líneas celulares humanas permanentes, particularmente amniocitos.

Los factores transformantes celulares pueden ser antígeno T de SV40 (nº de referencia en Genbank J02400), el producto génico de E6 y E7 de HPV (por ejemplo, HPV16, nº de referencia en Genbank K02718) y los productos génicos de E1A y E1B de adenovirus humanos (por ejemplo, adenovirus humano de serotipo 5, nº de referencia en Genbank X02996). Si se usan para el procedimiento según la invención secuencias de ácido nucleico de los productos génicos de E6 y E7, las células humanas primarias deben transfectarse con las secuencias de ambos productos génicos. Si se usan para el procedimiento según la invención secuencias de ácido nucleico de los productos génicos de E1A y E1B, las células humanas primarias deben transfectarse con las secuencias de ambos productos génicos. En la expresión mediante un HPV presente de forma natural, E6 y E7 pueden expresarse a partir de un transcrito de ARN. Lo mismo es válido para la expresión de E1A y E1B de un adenovirus presente de forma natural. Los factores transformantes celulares como, por ejemplo, la función génica E1 adenovírica, causan la inmortalización o transformación y por tanto la capacidad de cultivo duradero de las células. Las células humanas primarias no transfectadas mueren de forma natural en el cultivo lo más tarde al cabo de pocas semanas, mientras que las células transfectadas evolucionan hasta colonias celulares reconocibles fenotípicamente debido al efecto inmortalizante, por ejemplo, de los productos génicos E1. La transferencia esencial para la inmortalización de las células de los factores transformantes celulares asume por tanto en el procedimiento según la invención la función de un marcador de selección, que permite el aislamiento de líneas celulares que expresan uno o varios polipéptidos recombinantes distintos sin presión de selección química externa adicional. La presente invención se refiere por tanto particularmente a un procedimiento para la preparación de una línea celular humana permanente sin transfección de un marcador de selección.

Las secuencias de ácido nucleico para la expresión de factores transformantes celulares se presentan en forma de un módulo de expresión.

Los módulos de expresión pueden contener promotores homólogos o secuencias de terminación transcripcional, por ejemplo, el promotor E1A natural y el sitio de poliadenilación E1A natural para la expresión de la función génica E1A adenovírica. Esto puede conseguirse conteniendo las moléculas de ácido nucleico empleadas para la transfección fragmentos del genoma vírico respectivo, por ejemplo, del genoma adenovírico, con las funciones génicas citadas, por ejemplo, E1A, E1B. Los módulos de expresión de los factores transformantes celulares pueden contener sin embargo también promotores o secuencias de terminación transcripcional heterólogos que no aparecen naturalmente con la región codificante usada. Pueden servir como promotores heterólogos, por ejemplo, el promotor CMV (citomegalovirus) (Makrides, 9-26 en: Makrides (Ed.), "Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells", Elsevier, Amsterdam, 2003), el promotor EF-1 α (Kim *et al.*, *Gene* 91: 217-223, 1990), el promotor CAG (un promotor híbrido del potenciador inmediato temprano del citomegalovirus humano y de un promotor de β -actina de gallina modificado con el primer intrón) (Niwa *et al.*, *Gene* 108:193-199, 1991), el promotor pgk (fosfoglicerato cinasa) humano o de murino (Adra *et al.*, *Gene* 60: 65-74, 1987), el promotor RSV (virus del sarcoma de Rous) (Makrides, 9-26 en: Makrides (Ed.), "Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells", Elsevier, Amsterdam, 2003) o el promotor SV40 (virus de simio 40) (Makrides, 9-26 en: Makrides (Ed.), "Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells", Elsevier, Amsterdam, 2003). Pueden servir como sitios de poliadenilación, por ejemplo, las secuencias de poliadenilación del antígeno T grande de SV40 (nº de acceso a Genbank J02400) o del gen G-CSF humano (factor estimulante de la colonia de granulocitos, "granulocyte colony stimulating factor") (Mizushima y Nagata, *Nucl. Acids Res.* 18:5322, 1990). Igualmente, pueden contener varios de los módulos de expresión de factores transformantes elementos de regulación homólogos y otros elementos de regulación heterólogos. Así, por ejemplo, el módulo de expresión de E1A puede presentar un promotor heterólogo, el módulo de expresión de E1B un promotor homólogo o a la inversa, o ambos módulos de expresión un promotor heterólogo.

También las secuencias de ácido nucleico para la expresión de al menos un polipéptido recombinante presentan al menos un módulo de expresión, en el que el tipo y selección de los promotores y las secuencias de terminación transcripcional corresponden a los factores transformantes celulares anteriormente citados.

Las secuencias de ácido nucleico de los factores transformantes celulares y del polipéptido recombinante, incluyendo los elementos de regulación respectivos, pueden encontrarse en una o varias moléculas de ácido nucleico distintas. En una forma de realización preferida de la presente invención, las secuencias de los factores transformantes celulares, incluyendo los elementos de regulación respectivos, por ejemplo las funciones génicas E6 y E7 o las funciones génicas E1A y E1B, o del factor transformante celular, por ejemplo, el antígeno T de SV40, se encuentran en una molécula de ácido nucleico y las secuencias del polipéptido recombinante, incluyendo los elementos de regulación, en una segunda molécula de ácido nucleico distinta de la primera molécula de ácido nucleico. En otra forma de realización preferida, se encuentran también las secuencias de los factores transformantes E6 y E7 o E1A y E1B, incluyendo los elementos de regulación respectivos, en distintas moléculas de ácido nucleico. La secuencia del polipéptido recombinante, incluyendo los elementos de regulación, puede encontrarse en este caso en una tercera molécula de ácido nucleico distinta de la primera y segundas moléculas de ácido nucleico o en la primera o segunda moléculas de ácido nucleico que contienen la secuencia de uno de los factores transformantes celulares.

En una forma de realización preferida, se transfectan las células humanas primarias con una primera molécula de ácido nucleico que contiene el módulo de expresión de las funciones génicas E1A y E1B y una segunda molécula de ácido nucleico distinta de la primera molécula de ácido nucleico que presenta el módulo de expresión del polipéptido recombinante. En esta forma de realización, la primera molécula de ácido nucleico contiene el módulo de expresión

ES 2 345 508 T3

de E1A que contiene un promotor heterólogo y el elemento de terminación transcripcional homólogo, y la unidad de transcripción E1B el promotor homólogo y el elemento de terminación transcripcional homólogo. En una forma de realización especialmente preferida, la primera molécula de ácido nucleico contiene la secuencia nucleotídica del nucleótido 505 al nucleótido 4079 del adenovirus de serotipo 5. En otra forma de realización especialmente preferida, la primera molécula de ácido nucleico contiene la secuencia nucleotídica del nucleótido 505 al nucleótido 3522 del adenovirus de serotipo 5. En otra forma de realización especialmente preferida, la primera molécula de ácido nucleico contiene la secuencia nucleotídica del nucleótido 1 al nucleótido 4344 del adenovirus de serotipo 5, que corresponde al ADN adenovírico en células HEK293 (Louis *et al.*, *Virology* 233: 423-429, 1997).

La presencia del promotor propio de E1B y de la secuencia de poliadenilación propia de E1B (nucl. 4037-4070) debería conducir a una transcripción y expresión óptimas de E1B en esta forma de realización. Supone una ventaja adicional que el tramo de secuencia entre el codón de terminación de E1B y el sitio de poliadenilación de E1B contiene la función génica adenovírica pIX. El polipéptido pIX, una proteína estructural vírica, actúa como activador de la transcripción sobre distintos promotores víricos y celulares como, por ejemplo, el promotor de timidina cinasa y beta-globina. El efecto activador de la transcripción del polipéptido pIX expresado adicionalmente en las células puede conducir a una elevación de las tasas de expresión del polipéptido recombinante en las líneas celulares productoras según la invención, en caso de que la secuencia de codificación del polipéptido recombinante esté bajo el control de uno de los promotores citados anteriormente.

Los polipéptidos recombinantes pueden ser proteínas terapéuticas como, por ejemplo, alfa-1-antitripsina humana o factores de crecimiento como eritropoyetina o interleucina 2. La alfa-1-antitripsina humana (hAAT) es un inhibidor de proteinasa que inhibe elastasa y otras proteinasas y, con una gran deficiencia de hAAT, que conduce a daños pulmonares y hepáticos graves, es terapéuticamente eficaz. En la eritropoyetina, se trata de un factor de crecimiento importante para eritrocitos (glóbulos rojos sanguíneos) que tiene efecto formador de sangre en anemia así como en pacientes de trasplantes. La interleucina 2 (IL-2) se cuenta entre los mensajeros celulares del sistema inmunitario y tiene gran importancia en la activación de la respuesta inmunitaria celular, por ejemplo, en enfermedades tumorales. Se cuentan también entre los polipéptidos terapéuticamente activos los factores de coagulación sanguínea como, por ejemplo, factor VIII y factor IX, que se utilizan en pacientes de hemofilia con alteraciones de la coagulación. El polipéptido recombinante del procedimiento según la invención puede ser una hormona. Las hormonas preparadas por biotecnología se usan en terapia de sustitución en pacientes con alteraciones hormonales. Son ejemplos la hormona reductora de la presión sanguínea insulina, que se asigna a muchos pacientes de diabetes sacarina, la somatotropina (hormona de crecimiento) para el tratamiento del enanismo, y factores gonadotrópicos como hormona estimulante de folículo (FSH) u hormona luteinizante (LH) para el tratamiento de alteraciones de la fertilidad.

El polipéptido recombinante puede ser un anticuerpo recombinante que puede utilizarse con fines terapéuticos o de diagnóstico. Los anticuerpos contra el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) se utilizan en pacientes con artritis reumatoide, los anticuerpos contra el receptor celular del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se utiliza en pacientes de cáncer. Con fines de diagnóstico, los anticuerpos utilizados pueden ser, por ejemplo, componentes de kits de diagnóstico comerciales que se basan en procedimientos como ensayos de inmovilización acoplada a enzima (ensayo de inmunosorción ligado a enzima, ELISA) o ensayos de inmunoadsorción radiactiva (ensayo de radioinmunosorción, RIA). Los anticuerpos sirven en este procedimiento de ensayo para la detección de antígenos de agentes de infección como, por ejemplo, del virus de la hepatitis B humano.

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) se componen de una cadena pesada y una ligera, que están compuestas respectivamente por regiones o dominios variables y constantes. Las secuencias de ácido nucleico de las moléculas de ácido nucleico transfectadas para expresión de un anticuerpo pueden contener dos módulos de expresión separados, de los que uno codifica la cadena ligera y el otro la cadena pesada de la molécula de inmunoglobulina. Después de la expresión de ambas cadenas en la célula según la invención, se combinan éstas hasta una molécula de anticuerpo activa. Los módulos de expresión de ambas cadenas pueden encontrarse así en moléculas de ácido nucleico separadas o en la misma. Las secuencias de codificación de la cadena ligera y pesada pueden encontrarse sin embargo también dentro del mismo módulo de expresión y separadas por una secuencia IRES (“internal ribosome entry site”, sitio interno de entrada a ribosoma) que garantiza la expresión tanto de la cadena pesada como de la ligera. Las secuencias de codificación de las cadenas ligera y pesada pueden encontrarse en principio también dentro del mismo módulo de expresión y separadas por una secuencia que codifica un sitio de escisión enzimática de una proteinasa (por ejemplo, trombina), que se expresa entonces simultáneamente en la célula y escinde el polipéptido precursor en cadena ligera y pesada activas a partir de la secuencia de cadena ligera y pesada.

Los anticuerpos recombinantes que se codifican por la secuencia nucleotídica en las células según la invención pueden estar compuestos también por fragmentos de un anticuerpo en lugar de las cadenas ligera y pesada completas. Los denominados anticuerpos monocatenarios (scFV, “single chain variable fragments”) están compuestos por los dominios variables de una cadena pesada y una ligera, que están unidos por una secuencia aminoacídica (el denominado engarce) que garantiza una movilidad libre de ambos dominios. Mediante combinación intramolecular de ambos dominios, se crea una estructura de unión a antígeno que corresponde al tramo variable de una molécula de inmunoglobulina. Los anticuerpos monocatenarios biespecíficos (bis-scFv) están compuestos por dos de dichas disposiciones monocatenarias de los dominios variables de una cadena pesada y una ligera, que a su vez se asocian mediante una secuencia de unión y son móviles entre sí; dichas moléculas pueden unirse simultáneamente a dos sitios de unión a antígeno (epítomos) y unir así no covalentemente dos estructuras moleculares. Los diacuerpos biespecíficos están compuestos por dos cadenas individuales expresadas separadamente que contienen respectivamente los dominios variables

ES 2 345 508 T3

de una cadena ligera y una pesada, separados sólo por un engarce muy corto o incluso ninguno. El engarce corto o ausente impide la combinación intramolecular, mediante combinación intermolecular de un dominio variable pesado y ligero se crea a su vez una molécula activa con dos valencias de unión.

5 Los polipéptidos recombinantes codificados por las moléculas de ácido nucleico transfectadas en el presente procedimiento pueden ser proteínas víricas, bacterianas o parasitarias que deben producirse para uso como vacunas profilácticas o terapéuticas (vacunas). A este respecto, puede tratarse tanto de polipéptidos estructurales como de polipéptidos reguladores o enzimáticos activos de virus, bacterias o parásitos. Las proteínas víricas pueden ser, por ejemplo, el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (antígeno de superficie de HBV) o la proteína estructural L1 de papilomavirus humanos. Son proteínas bacterianas que se tienen en cuenta para expresión en líneas celulares productoras para la preparación de vacunas, por ejemplo, subunidades de enterotoxina de *Escherichia coli* enterotoxinogénica (ETFC) o proteínas de unión a transferrina (“Transferrin binding proteins”, Tbp A y B) de *Neisseria gonorrhoeae*.
10 Son polipéptidos de parásitos que podrían ser codificados por moléculas de ácido nucleico transfectadas en el presente procedimiento, por ejemplo, proteína de superficie de merozoítos (“Merozoite Surface Protein”, MSP) del agente de la malaria *Plasmodium falciparum* o glutation S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum*.
15

Los polipéptidos recombinantes codificados por moléculas de ácido nucleico transfectadas en el presente procedimiento pueden ser uno o varios polipéptidos víricos que actúan como factores de replicación y permiten una replicación episómica en las líneas celulares humanas, es decir independiente de cromosomas, de las moléculas de ácido nucleico introducidas después en la línea celular mediante transfección. Las moléculas de ácido nucleico introducidas después en la línea celular mediante transfección contienen un elemento genético designado como origen de replicación (ori, “origin of replication”) al que se une el o los polipéptidos que actúan como factores de replicación e inician así la replicación de la molécula de ácido nucleico episómica. La replicación episómica de moléculas de ácido nucleico, particularmente de ADN de plásmido, en células causa una fuerte multiplicación del número de copias de moléculas de ácido nucleico transfectadas y por tanto una elevación de la expresión de un polipéptido recombinante codificado por esta molécula, así como de su obtención mediante muchas divisiones celulares. Es uno de dichos factores de replicación víricos, por ejemplo, el antígeno T de virus de simio 40 (SV40) que, después de unión de la secuencia designada como origen de replicación de SV 40 (SV40 ori, “origin of replication”) a la molécula de ácido nucleico, por ejemplo el ADN de plásmido, inicia su replicación. La proteína EBNA-1 del virus de Epstein-Barr (antígeno 1 nuclear del virus de Epstein Barr) reconoce un origen de replicación designado como ori-P y cataliza la replicación extracromosómica de la molécula de ácido nucleico que porta el ori-P.
20
25
30

Los polipéptidos recombinantes codificados por moléculas de ácido nucleico transfectadas en el presente procedimiento pueden ser además proteínas víricas que permiten una producción de vectores de transferencia génica vírica recombinante en las líneas celulares. Estas proteínas, citadas también como factores de complementación víricos, se expresan en la línea celular y son componentes enzimáticos o estructurales necesarios para la producción de vectores de transferencia génica que no se codifican por la molécula de ácido nucleico del vector de transferencia génica. En dichos vectores de transferencia génica, se eliminan generalmente determinadas funciones génicas víricas por razones de seguridad. Pertenecen a los vectores de transferencia génica cuyos factores de complementación pueden codificarse por transgenes introducidos con el procedimiento descrito, por ejemplo, vectores que se basan en adenovirus, virus asociado a adenovirus (AAV) o herpesvirus. Los factores de complementación expresados en la línea celular pueden complementar también la producción de virus con delección o recombinantes, que no contienen gen para transferir y por tanto no funcionan como vectores de transferencia génica sino que, por ejemplo, se usan como vacuna.
35
40

En caso de vectores de transferencia génica basados en adenovirus, pueden expresarse en las células según la invención, por ejemplo, las funciones génicas pIX, E2, E3, y/o E4. La delección de la correspondiente función génica en el genoma del vector eleva la seguridad de los vectores y aumenta su capacidad de incorporación de secuencias de ácido nucleico extrañas. La función génica pIX es una proteína estructural adenovírica, es decir, un componente de la cápsida vírica. Las funciones génicas víricas E2, E3 y E4 codifican polipéptidos reguladores expresados en la fase temprana de la multiplicación vírica. Son vectores adenovíricos de primera generación los de delección de E1 y/o E3 únicamente. Los vectores adenovíricos de segunda generación carecen adicionalmente de las funciones génicas E2 y/o E4. Las líneas celulares que complementan las funciones génicas víricas totales serían capaces en principio de complementar vectores de transferencia génica adenovíricos de la generación designada como vectores “vacíos” o vectores adenovíricos de alta capacidad, que por sí mismos no poseen ninguna función génica codificada, sino sólo las secuencias designadas como repeticiones terminales invertidas (ITR, “Inverted Terminal Repeats”) para la replicación del ácido nucleico del vector.
45
50
55

El ácido nucleico transfectado en la célula humana primaria con el presente procedimiento puede codificar además un polipéptido receptor que está localizado particularmente en la superficie de la célula y es responsable de la infección de la célula por un virus o de la transducción de la célula mediante un vector de transferencia génica vírico. Como receptor vírico para la etapa inicial de infección de células con el adenovirus de serotipo 2 ó 5, de los que derivan la mayoría de los vectores adenovíricos convencionales, se ha identificado al denominado receptor de Coxsackie y adenovirus. CAR, (Bergelson *et al.*, *Science* 275: 1320-1323, 1997). La suficiente expresión de CAR en la superficie es un requisito para que una célula sea adecuada como célula productora para vectores de transferencia génica adenovíricos. En una forma de realización preferida, el polipéptido recombinante es el receptor de Coxsackie y adenovirus (CAR). La sobreexpresión del polipéptido receptor puede mejorar claramente la capacidad de infección y por tanto la eficacia de producción de estas células respecto a vectores adenovíricos. Además, la molécula de ácido nucleico puede codificar aparte de CAR receptores secundarios o receptores de internalización como, por ejemplo, determinadas integrinas
60
65

que median la incorporación del virus o vector de transferencia génica en la célula y cuya expresión adicional en la preparación de células productoras para vectores adenovíricos es valiosa.

Las moléculas de ácido nucleico empleadas para transfección de células humanas primarias en el presente procedimiento que codifican al menos un polipéptido recombinante, o las moléculas de ácido nucleico que codifican los factores transformantes celulares, pueden contener “regiones de unión a matriz” (MAR). Estos elementos genéticos designados también como “regiones de unión al armazón” (SAR) desempeñan un papel en la regulación de la expresión génica, ya que están asociados a unidades de transcripción y elementos reguladores en el genoma. Las MAR tienen la capacidad de proteger a genes extraños introducidos en una célula frente a una mutación transcripcional o deactivación de la transcripción en las células transfectadas, y por tanto de reforzar su expresión (Girod y Mermod, pág. 359-379, en S.C. Makrides (Ed.) “Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells”. 2003. Elsevier, Amsterdam).

Mediante la transfección simultánea de células humanas primarias con moléculas de ácido nucleico que contienen secuencias de ácido nucleico expresables de un factor transformante celular o dos factores funcionales unidos entre sí y una secuencia de ácido nucleico expresable de al menos un polipéptido recombinante, los inventores han tenido éxito en generar líneas celulares humanas permanentes para la producción de polipéptidos recombinantes sin adición de reactivos de selección. La presente invención se refiere además por tanto a un procedimiento para la preparación de una línea celular humana permanente para expresión de al menos un polipéptido deseado, preferiblemente sin transfección de un marcador de selección. La invención se refiere además a las células humanas permanentes preparadas con el procedimiento según la invención. Las células pueden usarse, entre otras cosas, para la producción de polipéptidos terapéuticos, factores de coagulación sanguínea y de crecimiento, hormonas y anticuerpos, así como polipéptidos víricos, bacterianos o parasitarios para uso como vacunas. Además, las células según la invención son utilizables para la producción de proteínas de diagnóstico relevantes como, por ejemplo, antígenos víricos, bacterianos o parasitarios o los correspondientes anticuerpos específicos. Además, las células según la invención son utilizables para la producción de proteínas técnica o industrialmente relevantes, por ejemplo, de enzimas para la catálisis de procesos de síntesis técnicos o para la degradación de sustancias tóxicas. Las células según la invención pueden expresar uno o también varios polipéptidos recombinantes distintos. El número de polipéptidos expresables depende de cuántas secuencias de ácido nucleico distintas codificantes de polipéptido recombinante se transfecten en las células con el procedimiento según la invención.

La fuerza de expresión de un transgén en una célula productora depende decisivamente de la región genómica en la que se integre el transgén después de la introducción en la célula. Aunque en algunos sitios del genoma celular se desactiva después de un tiempo relativamente corto la expresión del transgén, el módulo de expresión permanece transcripcionalmente activo durante largo tiempo con alta eficacia en otros sitios, denominados “puntos calientes” de transcripción. El mantenimiento del fenotipo transformado en las células permanentes preparadas según la invención requiere la expresión continua del factor transformante celular. En las células humanas permanentes, se encuentra pues el sitio de integración del correspondiente módulo de expresión en un “punto caliente” de transcripción en el genoma celular. Otro aspecto de la presente invención se refiere por tanto a un procedimiento para la preparación de una célula humana permanente en el que la molécula de ácido nucleico que presenta la secuencia del o de los factores transformantes celulares comprende además secuencias de reconocimiento de un sistema de recombinación específico de secuencia. En una etapa posterior, puede introducirse en las líneas celulares humanas permanentes otro módulo de expresión de un transgén, con expresión simultánea de la correspondiente recombinasa, que contiene igualmente la correspondiente secuencia de reconocimiento de recombinasa o secuencias de reconocimiento de recombinasa. Esto conduce a una integración del módulo de expresión en el “punto caliente” específico y por tanto a una expresión alta y duradera del transgén. Podrían usarse líneas celulares productoras producidas del modo descrito con alta eficacia de producción detectada para generar muy rápidamente células productoras eficaces de otro transgén. Otro aspecto de la presente invención se refiere al aislamiento de estos sitios calientes específicos mediante análisis de secuencia de los sitios de integración y a su uso en vectores de expresión. Esto permite el aislamiento de secuencias de puntos calientes hasta ahora desconocidas a partir de células humanas. Mediante recombinación homóloga, pueden integrarse módulos de expresión específicos en estas secuencias.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de una línea celular humana permanente en el que la molécula de ácido nucleico que presenta la secuencia que permite la expresión de un polipéptido recombinante, además del módulo de expresión del polipéptido recombinante o de la secuencia codificante del polipéptido recombinante, presenta una o varias secuencias de reconocimiento de recombinasa. Por ejemplo, las secuencias de reconocimiento de recombinasa pueden encontrarse en los extremos 5' y 3' de la secuencia respectiva. El polipéptido recombinante puede ser en este caso un gen indicador, es decir, un gen cuyo producto génico pueda detectarse y determinarse cuantitativamente con facilidad. Después de la selección de una línea celular estable con fuerte expresión de la proteína indicadora, es decir, del producto génico codificado por el gen indicador, puede introducirse en la célula mediante transfección en la célula en una segunda etapa una molécula de ácido nucleico que comprende un módulo de expresión de otro polipéptido recombinante. El módulo de expresión contiene igualmente secuencias de reconocimiento de la misma enzima de recombinación. Después de una expresión temporal de la recombinasa, se crea una nueva línea celular productora mediante la escisión de la original e integración del polipéptido recombinante recién transfectado en la célula con una eficacia de producción igualmente alta. Este procedimiento acorta el proceso laborioso de selección de líneas celulares productoras con buena expresión. Son ejemplos de recombinasas y las correspondientes secuencias de reconocimiento: recombinasa Cre y secuencia de reconocimiento loxP del bacteriófago P1, integrasa y secuencia de reconocimiento attB/attP del bacteriófago Φ C31 o recombinasa Flp y secuencia de reconocimiento frt de levaduras (Groth *et al.*, *PNAS* 97: 5995-6000, 2000; Araki *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 25: 868-872,

ES 2 345 508 T3

1997; O’Gorman *et al.*, *Science* 251: 1351-1355, 1991). A menudo, no son ventajosas para una integración eficaz las propias secuencias de reconocimiento, sino “pseudo” lox (Araki *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 25: 868-872, 1997) o “pseudo” att (Thyagarajan *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 21: 3926-3934, 2001).

5 Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no han de considerarse como limitantes. A menos que se indique otra cosa, se usaron procedimientos estándares de biología molecular como se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 1989, “Molecular cloning: A Laboratory Manual” 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

10

1. Clonaciones

a) Plásmido pSTK146

15 Se ha descrito detalladamente el plásmido pSTK146 en el documento EP 1.230.354 B1 y comprende el promotor de fosfoglicerato cinasa de murino (pgk), las secuencias nucleotídicas (nt) 505 a 3522 de adenovirus de serotipo 5 (Ad5) y la señal de corte y empalme y poliadenilación de SV40.

b) Plásmido pGS119 (Fig. 1)

20

El plásmido pGS119 contiene el promotor pgk de murino, las secuencias de nt 505-3522 de Ad5 que contienen la región E1 completa, la señal de corte y empalme y poliadenilación 3’ de SV40 y la región pIX de Ad5 (nt. 3485-4079).

25 Las secuencias génicas de pIX de Ad5 proceden del plásmido pXC1 (Microbix Biosystems Inc, nº de catálogo PD-01-03), que contiene las secuencias de nt. 22-5790 de Ad5. Con ayuda de este plásmido y de los cebadores p9.3485-3504 (CTGGCTCGAGCTCTAGCGATGAAGATACAG; SEC ID N° 1) y p9.4079-4060 (GCTGCTCGAG CACTTGCTTGATCCAAATCC; SEC ID N° 2), se amplificaron las secuencias génicas de nt. 3485-4079 de Ad5 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se escindieron con XhoI (por un sitio de corte de XhoI localizado en los cebadores) y se insertaron en los sitios de corte de XhoI de pSTK146.

30

c) Plásmido pGS122

35 El plásmido pGS122 contiene las secuencias de pb 1-4344 de Ad5. En una primera etapa, se aislaron las secuencias de nt. 356-3826 de Ad5 mediante digestión con SacII a partir de pXC1 (Microbix Biosystems Inc, nº de catálogo PD-01-03) y se insertaron en el sitio de corte de SacII de pSTK31 (contiene un sitio de corte de PmeI seguido de las secuencias de pb 1-440 de Ad5 en pBluescript). Se linealizó el plásmido pGS120 así creado con pBstEII y se insertó el fragmento de BstEII de pXC1 que contiene las secuencias de pb 1914-5185 de Ad5 (pGS121). Se hibridaron dos oligonucleótidos Ad5_4297-4344.PX (GCTGGGCGTGGTGCCTAAAAAT GTCTTTCAGTAG CAAGCTGATTGCCAGTTTAAAC; SEC ID N° 3) y Ad5_4344-4297 (TCGAGTTTAAACTGGCAATCAGCTTGC TACTGAAAGACATTTTTAGGCACCCAGCCAGC T; SEC ID N° 4) hasta cadena doble. Se digirió el plásmido pGS121 con AfeI y XhoI y se insertó el oligonucleótido anteriormente citado. Se seleccionó la secuencia del oligonucleótido de modo que con la inserción en el extremo 5’ de pGS121 se mantuviera intacto el sitio de corte de AfeI, y en el extremo 3’ resultara un sitio de corte de PmeI a partir del sitio de corte de XhoI regenerado. Por tanto, las secuencias de Ad5 en pGS122 están flanqueadas directamente cada una por un sitio de corte de PmeI.

45

d) Plásmido pGS124

50 El plásmido pGS124 contiene el promotor SV40 y la secuencia génica del antígeno T de SV40. Mediante la digestión de ADN de SV40 con BamHI y KpnI, se cortó un fragmento de 3 kb del genoma de SV40 y se insertó en pBluescript, digerido con BamHI y KpnI. El plásmido pGS124 expresa por tanto el antígeno T de SV40.

e) Plásmidos pGS116 (Fig. 2), pGS129, pGS131, pGS132, pGS133

55 Los plásmidos pGS116, pGS129, pGS131, pGS132 y pGS133 expresan la alfa-1-antitripsina humana (hAAT) bajo el control de distintos promotores.

60 El plásmido pGS116 (2) contiene el promotor temprano de citomegalovirus humano (CMV), seguido de un sitio donante de corte y empalme/aceptor de promotor y empalme de SV40, ADN de hAAT y el sitio de poliadenilación de SV40 (poliA). Las secuencias de CMV y SV40 proceden del plásmido pCMV β (BD Clontech, nº de catálogo 61771-1). El gen de β -galactosidasa en pCMV β se retiró mediante digestión con NotI y posterior reacción de relleno del saliente 5’ y se sustituyó con el ADNc de hAAT, que se había aislado mediante digestión con EcoRI del plásmido Ad/PGK-hAAT (Kay *et al.*, *Hepatology* 21: 815-819, 1995).

65 El plásmido pGS129 contiene el ADNc de hAAT anteriormente descrito bajo el control del promotor humano del factor de elongación EF-1 α . Mediante la digestión de pGS116 con XhoI y EcoRI y posterior reacción de relleno del saliente 5’, se retiró el promotor de CMV de pGS116 y se sustituyó por un fragmento de 1,3 kb que contenía el promotor de EF-1 α .

ES 2 345 508 T3

El plásmido pGS131 contiene el ADNc de hAAT-cDNA bajo el control de un promotor híbrido compuesto por el potenciador de CMV y el promotor de β -actina de gallina (promotor CAG). Mediante la digestión de pGS116 con XhoI y EcoRI y posterior reacción de relleno del saliente 5', se intercambi6 el promotor de CMV por el promotor de CAG de 1,1 kb de tama6o.

El plásmido pGS132 contiene el ADNc de hAAT-cDNA bajo el control del promotor de virus del sarcoma de Rous (RSV). Se retir6 el promotor de CAG en pGS116 mediante digesti6n de restricci6n con XhoI y EcoRI y posterior reacci6n de relleno del saliente 5', y se sustituy6 por el promotor de RSV de 0,58 kb de tama6o.

En el plásmido pGS133, se controla la expresi6n del ADNc de hAAT por el promotor temprano del virus de simio 40 (SV40). Mediante digesti6n con XhoI y EcoRI y posterior reacci6n de relleno del saliente 5', se retir6 el promotor de CMV de pGS116 y se sustituy6 por el promotor SV40 de 0,23 kb de tama6o.

f) Plásmido pGS126

El plásmido pGS126 contiene los siguientes elementos: el m6dulo de expresi6n E1 compuesto por el promotor de pgk, las secuencias de nt. 505-3522 de Ad5, poliA de SV40, el m6dulo de expresi6n de pIX compuesto por las secuencias de nt. 3485-4079 de Ad5 y el m6dulo de expresi6n de hAAT compuesto por el promotor de CMV, ADNc de hAAT y poliA de SV40. Mediante digesti6n del plásmido pGS116 (véase 1e) con EcoRI y HindIII y posterior reacci6n de relleno, se aisl6 el m6dulo de expresi6n de hAAT y se insert6 en el plásmido pGS119 (véase 1b), despu6s de digesti6n con BamHI y reacci6n de relleno del saliente 5'. El plásmido pGS126 expresa por tanto las prote6nas E1 y pIX de Ad5 y hAAT.

g) Plásmido pGS123

El plásmido pGS123 contiene, adem6s del m6dulo de expresi6n de hAAT, una regi6n asociada a matriz (MAR). Esta MAR se localiza en un fragmento EcoRI/Spel de 2085 pb de tama6o de la regi6n intr6nica del locus g6nico de AAT humana (acceso a GenBank K02212). Este fragmento se presenta clonado en pBluscript (pGS58) y se insert6 en el sitio de corte de EcoRI despu6s de reacci6n de relleno del saliente 5' de pGS116 (véase 1e).

h) Plásmido pGS127

El plásmido pGS127 contiene el promotor de CMV, el ADNc de eritropoyetina humana (Epo) y la secuencia poliA de SV40. Con ayuda de una digesti6n con NotI, se retir6 el gen de β -galactosidasa y se sustituy6 por ADNc de Epo.

2. Comprobaci6n de los constructos

a) An6lisis de secuencia

Se comprob6 la totalidad de todos los plásmidos anteriormente descritos mediante digesti6n de restricci6n. Adem6s, se confirm6 la secuencia correcta de los fragmentos adenov6ricos en pGS119, pGS122 y pGS126 mediante an6lisis de secuencia; no se encontraron modificaciones en la secuencia en comparaci6n con la secuencia de tipo natural de Ad5.

b) Expresi6n

Se transfectaron los plásmidos pGS116, pGS129, pGS131, pGS132, pGS133, pGS123 y pGS126 en c6lulas HEK293 y se detect6 la expresi6n y secreci6n de alfa-1-antitripsina humana (hAAT) en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA (véase el cap6tulo 6b). Se transfectaron los plásmidos pGS119 y pGS122 en c6lulas HeLa y se analiz6 la expresi6n de la prote6na E1A mediante transferencia Western usando un anticuerpo monoclonal (véase el cap6tulo 6a). Se transfect6 el plásmido pGS124 en c6lulas HeLa y HEK293 y se detect6 la expresi6n del ant6geno T mediante transferencia Western y un anticuerpo monoclonal (Abcam, Cambridge, RU).

3. Cultivo de c6lulas

a) L6neas celulares

Se adquirieron los reactivos de cultivo celular, si no se indica otra cosa, en la compa6a Invitrogen GmbH. Se cultivaron las c6lulas HEK293 y HeLa en medio de Eagle modificado (MEM) con 10% de suero fetal de ternero (FCS), 1x penicilina/estreptomizina a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO₂.

b) Amniocitos primarios

Se obtuvieron amniocitos primarios, mediante procedimientos correspondientemente rutinarios, en el marco de una punci6n de l6quido amni6tico. Se cultivaron 1-2 ml de esta punci6n con 5 ml de medio F10 de Ham, 10% de FCS, 2% de 2% Ultrosor G (CytoGen GmbH), 1x antibi6tico/antimic6tico a 37°C y 5% de CO₂ en placas de cultivo celular

ES 2 345 508 T3

Primaria de 6 cm (Falcon). Después de 4-6 días, empezaron a volverse adherentes los amniocitos, y se añadieron 3 ml de medio fresco más aditivos (véase anteriormente). Cuando las células estaban completamente adherentes, se retiró el medio y se sustituyó por 5 ml de medio fresco más aditivos. Para los pases posteriores, se lavaron las células con PBS, se despegaron con tripsina (TrypleSelect, Invitrogen) y se traspasaron a 10 ó 25 ml de medio fresco más aditivos en placas de 10 cm o 15 cm.

4. Transfección y transformación de amniocitos primarios

Se transfectaron amniocitos primarios mediante la transfección de distintas combinaciones de los plásmidos anteriormente descritos, se aislaron las líneas celulares transformadas y se analizó la expresión del transgén. A continuación, se describe con detalle la preparación de líneas celulares que expresan hAAT con ayuda de los plásmidos pGS116 y pGS119. Se prepararon otras líneas celulares de la misma forma con las siguientes combinaciones de ácidos nucleicos:

- pSTK146 (contiene las secuencias de nt. 505 a 3522 de Ad5) y pGS116 (contiene el módulo de expresión de CMV-hAAT)
- pGS119 (contiene las secuencias de nt. 505 a 4079 de Ad5) y pGS129 (contiene el módulo de expresión de EF- α -hAAT)
- pGS119 y pGS131 (contiene el módulo de expresión de CAG-hAAT)
- pGS119 y pGS32 (contiene el módulo de expresión de RSV-hAAT)
- pGS119 y pGS133 (contiene el módulo de expresión de SV40-hAAT)
- pGS119 y pGS123 (contiene el módulo de expresión de CMV-hAAT y secuencias MAR)
- pGS122 (contiene las secuencias de nt. 1 a 4344 de Ad5) y pGS116 (módulo de expresión de CMV-hAAT)
- pGS126 (contiene las secuencias de nt. 505 a 4079 de Ad5 y el módulo de expresión de CMV-hAAT)
- pGS119 y pGS127 (contiene el módulo de expresión de CMV-Epo)
- pGS124 (expresa T-Ag) y pGS116

Para la transfección, se linealizaron previamente todos los plásmidos excepto pGS122 mediante digestión con nucleasas de restricción adecuadas. El plásmido pGS122 se digirió antes de la transfección con PmeI, ya que un sitio de corte PmeI flanquea cada secuencia adenovírica en pGS122. Si se transfectaban dos plásmidos, se usó 1 μ g de cada plásmido; en la transfección de sólo un plásmido (pGS126), se emplearon 2 μ g. Con todas las combinaciones de ácidos nucleicos pudieron obtenerse clones celulares transformados y aislarse y ensayarse clones individuales. El número de clones celulares transformados dependía de la molécula de ácido nucleico usada que codificaba el factor transformante celular. Así, se obtuvieron sorprendente e inesperadamente con el uso del plásmido pGS119 claramente más clones celulares transformados que con pSTK146. Además, la transfección con moléculas de ácido nucleico con E1 como factor transformante celular condujo claramente a más clones celulares transformados que expresaban el antígeno T de SV40 (pGS124). La expresión del polipéptido recombinante dependía a su vez del promotor usado, produciendo el uso del promotor SV40 en pGS133 las menores tasas de expresión.

A continuación se describe con detalle la preparación de líneas celulares que expresan hAAT con la ayuda de los plásmidos pGS116 y pGS119.

Se adaptaron los amniocitos por etapas a medio Opti-Pro con 2% de Ultrosor antes de la transfección. Para ello, se mezclaron las células siempre después de 2-3 días respectivamente con medio F10 de HAM fresco (con aditivos) más medio Opti-Pro (con 2% de Ultrosor) en relación 75:25%, 50:50%, 25:75% y 0:100%. Para la transfección, se distribuyeron las células de una placa de 15 cm confluyente aproximadamente al 80% en 6 placas de 6 cm, lo que correspondía a un recuento celular de $5-7 \times 10^5$ células por placa. El día siguiente, se transfectaron las células en 5 placas con 1 μ g cada una de pGS116 y pGS119, ambos linealizados con ScaI, usando el reactivo de transfección Effectene (Qiagen) según los datos del fabricante. Se cultivó además una placa sin transfectar como control. El día siguiente, se lavaron las células con PBS, se despegaron con TrypleSelect y se transfirieron a una placa de 15 cm. Se cultivaron las células durante otros 10-15 días, sustituyéndose cada 3-4 días el medio por medio fresco. Durante este tiempo, se redujo la adición de Ultrosor al 1%. Después de aproximadamente 10-15 días, las células eran confluentes y se hicieron reaccionar sobre dos placas de 15 cm cada una como se describe anteriormente.

ES 2 345 508 T3

5. Aislamiento de los clones celulares transformados

Pocas semanas después de la transfección, se observaron islotes celulares clonales que se diferenciaban morfológicamente con claridad de los amniocitos no transformados. Se recogieron estos islotes celulares y se transfirieron a placas de 24 pocillos (corresponde al pase 1). Se multiplicaron además las células y se transfirieron primero a placas de 6 cm y después de 15 cm.

Al principio, se aislaron aproximadamente 40 clones que se diferenciaron morfológicamente con claridad en parte en el cultivo adicional. Algunos de estos clones mostraban a un cultivo más largo una clara “crisis”, es decir, se comportaban muy inestablemente en su crecimiento. Los experimentos adicionales de cultivo adicional y análisis se limitaron a 7 clones celulares morfológicamente estables. Estos se designaron como sigue: 2AI.2, 2AI.3, 2AI.6, 2AI.12, 2AI.15, 2AI.17, 2AI.18.

6. Caracterización de las líneas celulares

a) Expresión del gen E1 (transferencia Western)

Se detectó la expresión de proteínas E1A y E1B de 21 kDa en 7 líneas celulares clonales en análisis de transferencia Western usando anticuerpos monoclonales.

Para ello, se sembraron 7×10^5 células de cada clon celular individual en una placa de 6 pocillos. 72 horas después, se sedimentaron las células disueltas en Tris-solución salina/EDTA 4 mM, se recogieron en 100 μ l de Tris-disolución salina y se lisaron mediante la adición de 30 μ l de 4 x tampón de carga SDS (40% de glicerina, mercaptoetanol 1,4 M, 8% de SDS, Tris/HCl 250 mM pH 7). Se usó como control negativo lisado que se había preparado a partir del mismo número de amniocitos primarios. Sirvió como control positivo lisado de células HEK293. Se separaron electroforéticamente de cada una de estas mezclas de proteínas 10 μ l en un gel de poliacrilamida-SDS al 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se hicieron visibles las proteínas unidas a membrana mediante incubación con un anticuerpo anti-E1A o anti-E1B de 21 kDa (Oncogene Research) y un anticuerpo anti-ratón acoplado con HRP (E1A, Jackson ImmunoResearch Laboratories) o anti-rata (E1B-21 kDa, Oncogene Research) y posterior incubación con quimioluminiscencia (ECL, Amersham). Se representan en 3 los resultados de las transferencias Western con E1A y E1B y muestran que todas las líneas celulares analizadas expresan la proteína E1A (3 bandas a 30-50 kDa) y la proteína E1B de 21 kDa.

b) Expresión de hAAT (transferencia Western)

Se detectó la expresión de hAAT intracelular (en las líneas celulares clonales) o después de secreción (en el medio) igualmente con ayuda de análisis de transferencia Western usando un anticuerpo monoclonal específico de hAAT. Para ello, se sembraron 7×10^5 células de cada clon celular individual en una placa de 6 pocillos. Se usó como control negativo el mismo recuento celular de un clon celular que se había preparado mediante transfección de amniocitos primarios sólo con pGS119. Sirvieron como controles positivos en el siguiente ensayo 50 ng de hAAT purificada de plasma humano.

72 horas después, se retiraron los sobrenadantes de cultivo celular, se sedimentaron las células despegadas con Tris-solución salina/EDTA 4 mM, se recogieron en 100 μ l de Tris-solución salina y se lisaron mediante la adición de 30 μ l de 4 x tampón de carga de SDS. Para la detección de la hAAT intracelular, se separaron electroforéticamente 10 μ l de la mezcla de proteínas de las células lisadas y se hicieron visibles con la ayuda de un anticuerpo monoclonal de hAAT (ICN Biomedicals) y un anticuerpo anti-cabra acoplado a HRP (Pierce) con posterior coloración con quimioluminiscencia. Para la detección de la hAAT segregada, se mezclaron 10 μ l del medio de cultivo celular con 2 x tampón de carga de SDS, se separó electroforéticamente y se detectó como se describe anteriormente.

La Fig. 4A muestra la hAAT segregada por las células en el sobrenadante de cultivo, la expresión intracelular de hAAT se representa en 4B. El lisado para la detección intracelular de hAAT está concentrado aprox. 20 veces en contraposición con el sobrenadante de cultivo celular. Esto significa que la hAAT se segrega muy eficazmente de las células.

c) Cantidad y estabilidad de la expresión de hAAT en varios pases (ELISA)

Se determinó cuantitativamente la cantidad de hAAT segregada en el medio con ayuda del procedimiento ELISA (ensayo de inmunosorción ligado a enzima). Para ello, se sembraron 7×10^5 células cada vez de distintas líneas clonales en una placa de 6 pocillos y se retiraron los sobrenadantes de cultivo celular después de 72 horas. Se determinó la cantidad de hAAT mediante ELISA usando anticuerpos policlonales anti-hAAT (no acoplados y acoplados con HRP; ICN Biomedicals). Se usó como control hAAT purificada de plasma humano (ICN Biomedicals). La Fig. 5A muestra la cantidad de hAAT por célula, expresada en el pase 5 del clon celular individual. Se representa en la Fig. 5B la estabilidad de la expresión en clones celulares seleccionados durante varios pases. Las líneas celulares analizadas expresan constantemente durante el periodo comprendido de aprox. 20 pases entre 0,2 y 4 pg de hAAT por célula.

ES 2 345 508 T3

d) *Glucoanálisis de hAAT*

Ya que se trata en hAAT de una glucoproteína, se analizó el grado de glucosilación de hAAT en los clones celulares individuales. Para ello, se adaptaron los clones celulares primero por etapas a medio Opti-Pro sin Ultrosor, lo que causa que las células ya no sean adherentes, sino que crezcan en suspensión. Para ensayar si la hAAT segregada en el sobrenadante de cultivo se glucosila, se llevó a cabo una digestión con la enzima péptido-N-glucosidasa F (PNGasa F). Esta enzima escinde restos de azúcar pendientes de restos de asparagina (N-ligados), con lo que reduce el peso molecular de la proteína. Se mezclaron 22,5 μ l del sobrenadante de cultivo celular del clon celular individual con 2,5 μ l de tampón de desnaturalización (10x: 5% de SDS, 10% de β -mercaptoetanol) y se desnaturalizó la proteína durante 10 minutos a 100°C. Después, se añadieron a las proteínas 3,5 μ l de tampón de reacción G7 (10x: fosfato de sodio 500 mM pH 7,5), 3,5 μ l de NP-40 al 10% y 3 μ l de PNGasa F (New England Biolabs; 500 unidades/ μ l) y se incubaron durante 60 minutos a 37°C. Se desnaturalizaron como controles 45 ng de hAAT purificada de plasma humano en 25 μ l de medio Opti-Pro como se describe anteriormente y se mezclaron con PNGasa F o H₂O. Se detectaron las modificaciones del peso molecular de hAAT finalmente como se describe en 6b) mediante análisis de transferencia Western usando un anticuerpo monoclonal específico de hAAT. La Fig. 6 muestra la modificación del peso molecular después de digestión con PNGasa F de hAAT, expresada en 4 clones celulares distintos, o la hAAT purificada de plasma humano. Estos experimentos muestran claramente que la hAAT producida en clones celulares individuales está glucosilada.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para la preparación de una línea celular humana permanente, en el que se transfectan simultáneamente amniocitos aislados con

- (i) una molécula de ácido nucleico o
- (ii) al menos dos moléculas distintas de ácido nucleico,

10 y en caso de transfectar una molécula de ácido nucleico, la molécula de ácido nucleico presenta una secuencia que permite la expresión de E1A y E1B de adenovirus humano y la expresión de un polipéptido recombinante, y en caso de transfectar al menos dos moléculas distintas de ácido nucleico, la primera molécula de ácido nucleico presenta una secuencia que permite la expresión de E1A y E1B de adenovirus humanos y la segunda molécula de ácido nucleico presenta una secuencia que permite la expresión de al menos un polipéptido recombinante.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la secuencia de E1A y E1B de adenovirus humanos comprende los nucleótidos 1 a 4344, 505 a 3522 o los nucleótidos 505 a 4079 del adenovirus humano de serotipo 5.

20 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el polipéptido recombinante es una hormona, un factor de coagulación sanguínea, un factor de crecimiento, el receptor de Coxsackie y adenovirus (CAR), un anticuerpo, un antígeno vírico, bacteriano o parasitario, o factores de complementación para la preparación de virus recombinantes.

25 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que las secuencias para E1A se encuentran en una molécula de ácido nucleico y las secuencias para E1B en otra molécula distinta de ácido nucleico.

30 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que las secuencias para el polipéptido recombinante se encuentran en una de las dos moléculas de ácido nucleico para E1A y E1B.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la secuencia que permite la expresión de E1A y E1B de un polipéptido recombinante presenta un promotor heterólogo y/o un elemento de terminación transcripcional heterólogo.

35 7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el promotor es el promotor de CMV (citomegalovirus), el promotor de EF-1 α , el promotor de CAG, el promotor de pgk humano o murino, el promotor de RSV o el promotor de SV40, y el elemento de terminación transcripcional es las secuencias de poliadenilación del antígeno T grande de SV-40 o del gen de G-CSF humano.

40 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la secuencia que permite la expresión del polipéptido recombinante contiene secuencias de reconocimiento de recombinasas que flanquean la secuencia de codificación del polipéptido recombinante o el módulo de expresión completo del polipéptido recombinante.

45 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que las secuencias de reconocimiento son secuencias loxP, attB/attP o Frt.

10. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que las moléculas de ácido nucleico transfectadas no codifican secuencias que presenten un marcador de selección.

50 11. Líneas celulares humanas permanentes obtenibles según un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, en las que el procedimiento se ha llevado a cabo sin transfección de un marcador de selección.

12. Uso de líneas celulares según la reivindicación 11 para la preparación de un polipéptido.

55 13. Uso de líneas celulares según la reivindicación 11 para la preparación de vectores de transferencia génica víricos.

60

65

Fig. 1

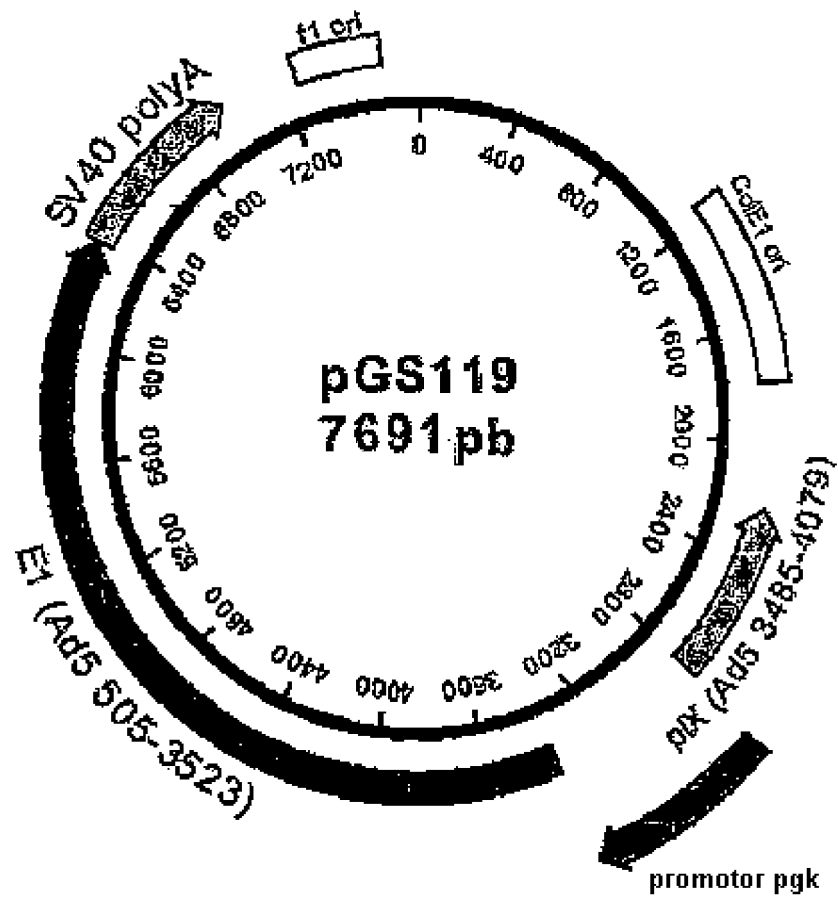


Fig. 2

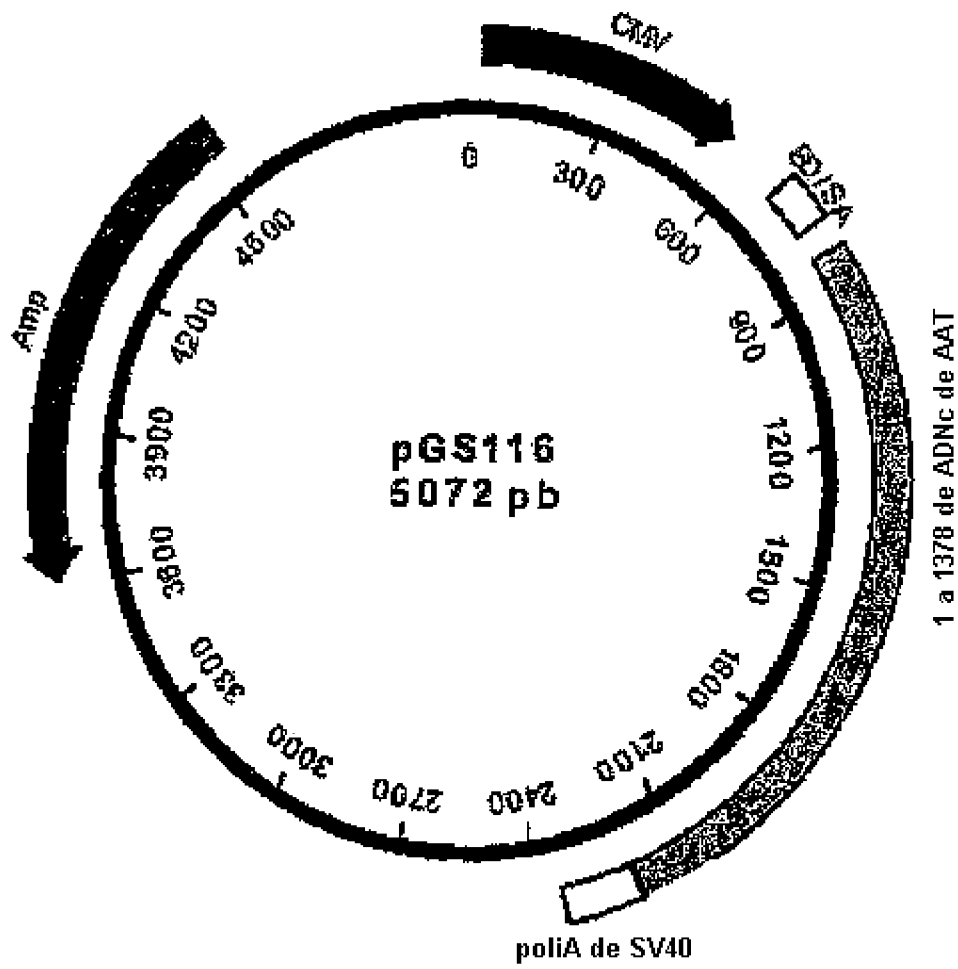


Fig. 3

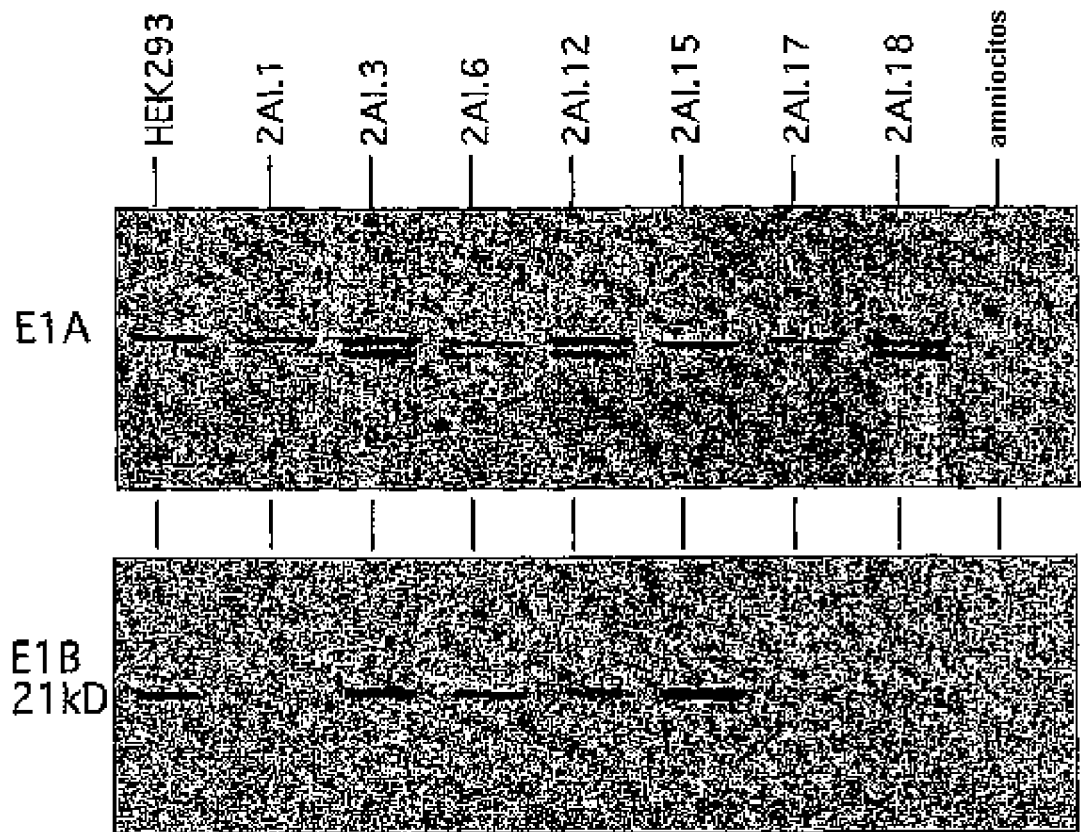


Fig. 4

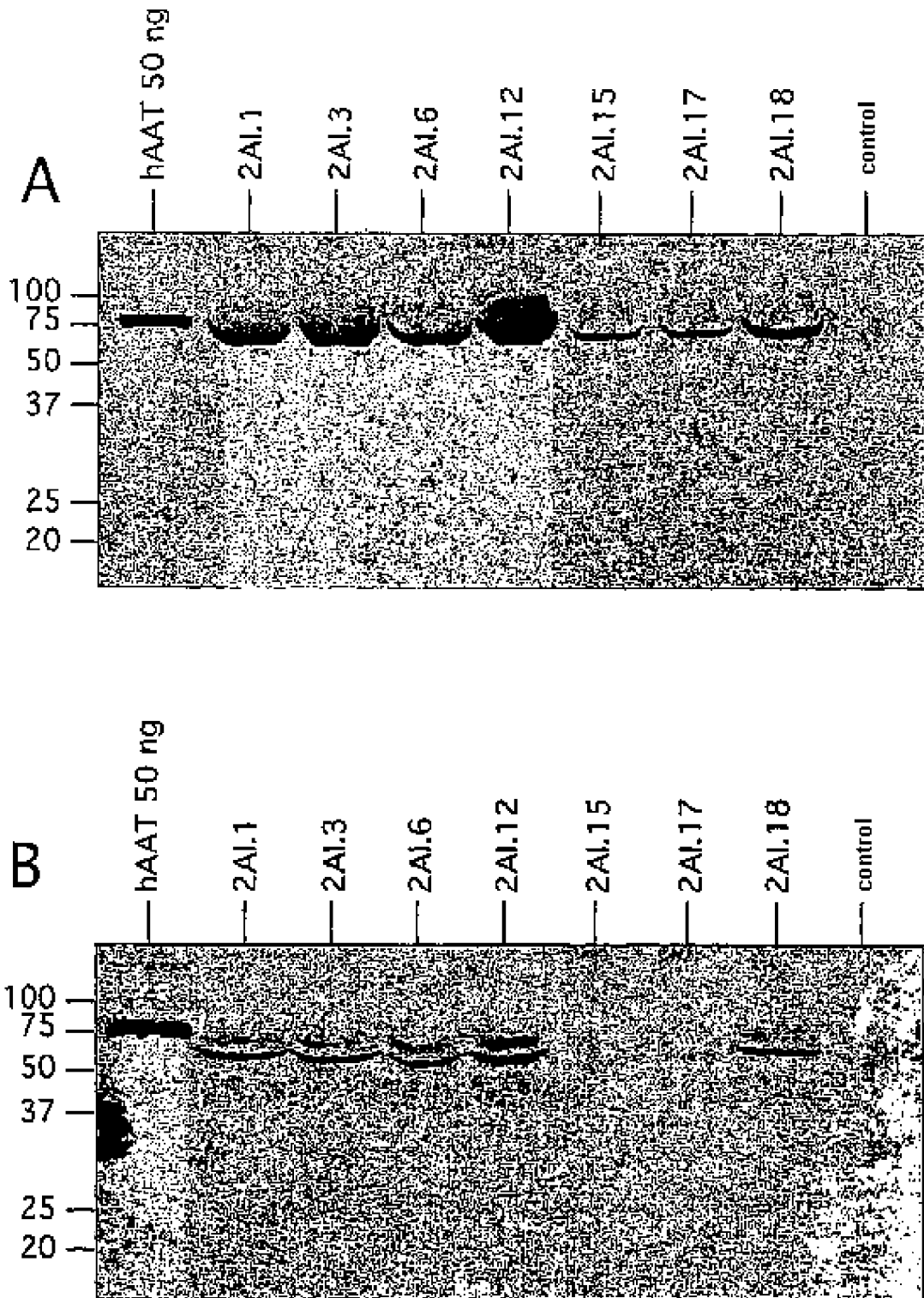


Fig. 5

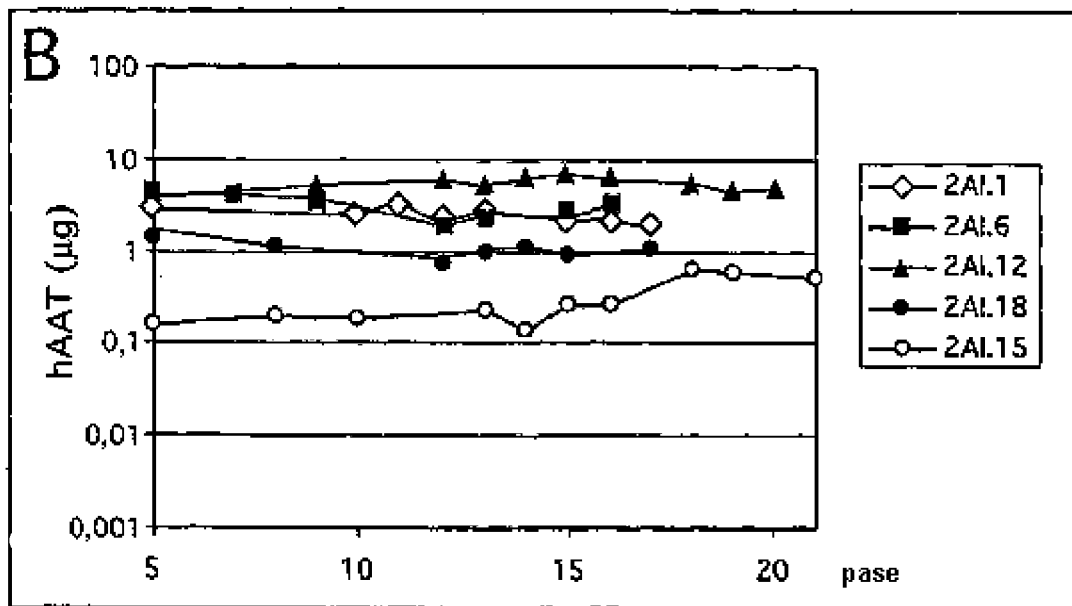
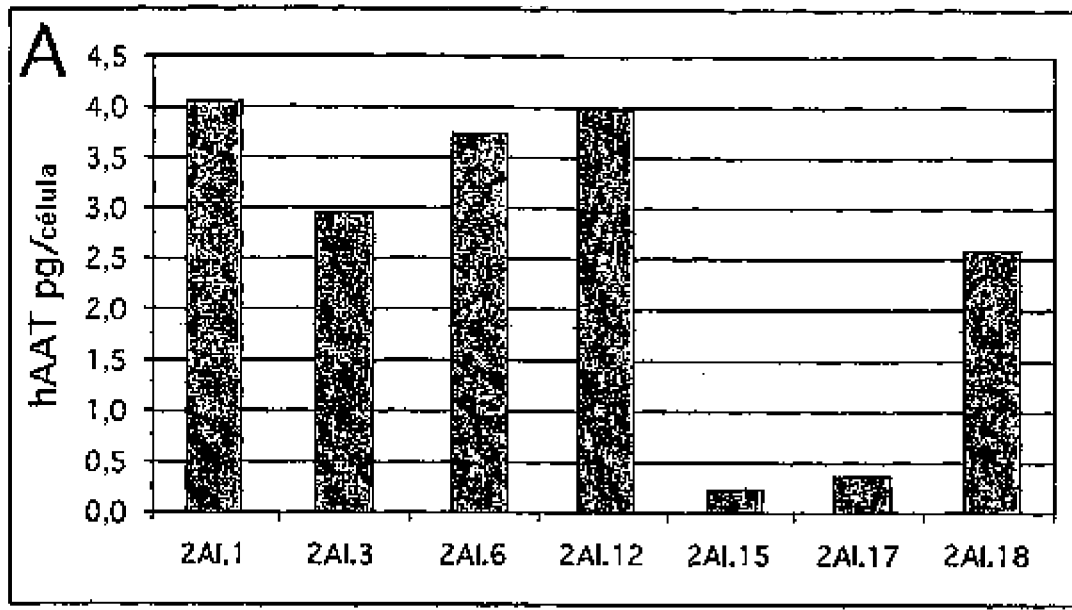
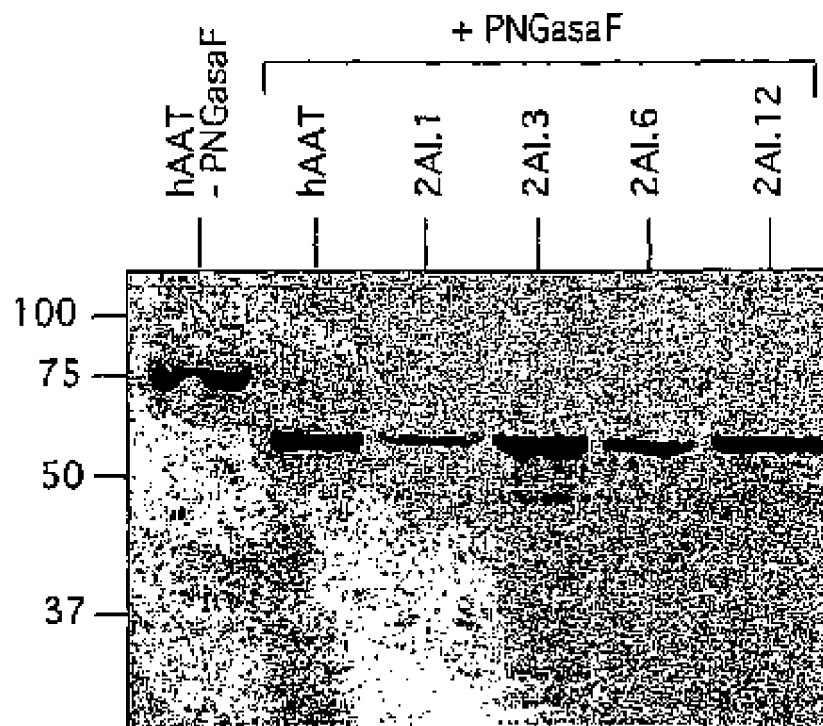


Fig. 6



ES 2 345 508 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> CEVEC Pharmaceuticals GmbH	
5	<120> Procedimiento para la preparación de líneas celulares humanas permanentes	
	<130> CMV-011 PCT	
	<140> desconocido	
	<141> 15-11-2006	
10	<150> DE 10 2005 054 628.5	
	<151> 16-11-2005	
	<160> 4	
	<170> PatentIn versión 3.3	
15	<210> 1	
	<211> 30	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
25	<400> 1	
	ctggctcgag ctctagcgat gaagatacag	30
30	<210> 2	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
40	<400> 2	
	gctgctcgag cacttgcttg atccaaatcc	30
45	<210> 3	
	<211> 56	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
55	<400> 3	
	gctggcgctg gtcctaaaa atgtcttca gtagcaagct gattgccagt taaac	56
60	<210> 4	
	<211> 61	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	

