



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 281 133**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C07K 14/505 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98942592 .1**

86 Fecha de presentación : **22.07.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **1000154**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **17.05.2000**

54 Título: **Identificación de líneas celulares humanas para la producción de proteínas humanas mediante la activación endógena de genes.**

30 Prioridad: **23.07.1997 EP 97112640**
01.12.1997 EP 97121073
10.07.1998 US 113692

73 Titular/es: **Roche Diagnostics GmbH**
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, DE

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2007

72 Inventor/es: **Brandt, Michael;**
Franze, Reinhard y
Pessara, Ulrich

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2007

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 281 133 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

Identificación de líneas celulares humanas para la producción de proteínas humanas mediante la activación endógena de genes.

La invención se refiere a un procedimiento para la selección de células humanas para la obtención de proteínas humanas mediante la activación endógena de genes, para producir proteínas humanas con rendimientos económicos y en una forma que es apropiada para la obtención de un preparado farmacéutico. Además, la invención se refiere a un procedimiento para la obtención de proteínas humanas en una línea celular identificada de esta manera.

Ya es conocida la obtención de proteínas humanas mediante la activación endógena de genes. Así, las patentes WO93/09222, WO94/12650 y WO95/31560 describen por ejemplo la producción de eritropoyetina humana y otras proteínas humanas en líneas celulares humanas mediante la activación endógena de genes.

En los documentos citados, no existe ninguna indicación de que en la selección para la obtención de proteínas humanas las líneas celulares empleadas deban tener en cuenta determinados criterios. Por ello no se puede establecer con seguridad que la proteína humana deseada pueda obtenerse en la línea celular escogida para su producción con el rendimiento y forma deseados así como libre de contaminaciones. Correspondientemente, se logran en los documentos citados más arriba en general solamente pequeños rendimientos en proteínas humanas.

Es un objetivo de la presente invención solventar las desventajas del estado actual de la técnica, y en particular, poner a punto criterios para la selección de líneas celulares humanas de partida, que sean apropiados para la activación endógena de un gen diana predeterminado.

Este problema se resuelve mediante un procedimiento para la selección de líneas celulares humanas para la obtención de proteínas humanas mediante la activación de un gen diana endógeno presente en la línea celular, caracterizado porque

(a) se analiza una línea celular humana para determinar la presencia de las siguientes características:

(i) un gen diana con la secuencia de ácidos nucleicos deseada,

(ii) por lo menos 5 duplicaciones de la población dentro de 14 días en un cultivo en suspensión, y

(iii) por lo menos 5 duplicaciones de la población dentro de los 14 días en un medio de cultivo exento de suero, y

(b) se emplea una línea celular que satisface las características (i), (ii), y (iii), como línea celular de partida para la activación endógena del gen diana.

Cuando se está frente al problema de activar un gen diana humano en una línea celular humana mediante dirección selectiva al gen diana, en situación de producir una célula que para la producción de la proteína diana en un rendimiento satisfactorio y en la forma deseada, se analizan según la invención varias líneas celulares para determinar la presencia de algunas de las características que estas líneas celulares deben satisfacer, para ser candidatas adecuadas para la posterior producción a escala industrial de la proteína diana. Preferentemente se analizan para esta finalidad líneas celulares como p. ej., líneas celulares inmortalizadas, en particular líneas celulares de tumores, puesto que éstas presentan importantes ventajas frente a células no inmortalizadas, con respecto a la facilidad para su cultivo.

Según la característica (i) se investigó la línea celular humana, sobre si el gen diana, es decir, el gen que hay que activar mediante la activación endógena del gen, presenta verdaderamente la secuencia de ácidos nucleicos deseada, que es en general, la secuencia de ácidos nucleicos del gen diana natural. Las líneas celulares tumorales y otras líneas celulares en cultivo permanente muestran a menudo una serie de mutaciones en su genoma. Por ello, un aspecto importante en la selección de una línea celular apropiada, es si las células poseen un gen correcto para el producto deseado. La determinación de la secuencia puede lograrse mediante el cultivo de las células de manera habitual, y la secuenciación del gen diana. Eventualmente puede lograrse una amplificación del gen diana antes de la secuenciación, mediante una PCR u otros métodos de amplificación.

Otra característica importante para la selección de una línea celular es la facilidad de su cultivo en suspensión. Las células en suspensión son más fáciles de fermentar, y la fermentación se puede adaptar más fácilmente a las grandes dimensiones, p. ej., en un fermentador grande con un volumen de por ejemplo 10 litros a 50.000 litros. Por ello las células seleccionadas deberían ser o bien células en suspensión o deberían poderse adaptar fácilmente a un cultivo en suspensión. Para ello se cultivan las células durante 14 días en reposo continuo. Cuando las células muestran dentro de este período de tiempo por lo menos cinco duplicaciones de la población, se consideran apropiadas para un cultivo en suspensión. La determinación del número de duplicaciones de la población puede lograrse mediante determinaciones periódicas del número de células p. ej., mediante el conteo de células o midiendo la densidad óptica de la suspensión celular.

Otra característica importante para la selección de células humanas es la facilidad de su cultivo en un medio exento de suero. Puesto que la purificación de proteínas a partir de cultivos celulares exentos de suero es más fácil, y en un cultivo exento de suero no existe ningún peligro de contaminación con patógenos animales, p. ej., virus, las células seleccionadas deberían poderse cultivar en cultivos exentos de suero. Para ello las células se cultivan durante 14 días a una densidad de $1 \text{ a } 10 \times 10^5$ células por ml en recipientes de cultivo en un medio exento de suero (p. ej., RPMI 1640 con ITS de Boehringer Mannheim). Cuando durante este cultivo las células muestran por lo menos 5 duplicaciones de la población, las cuales pueden determinarse mediante conteo celular, se consideran apropiadas para el cultivo exento de suero.

Otra característica importante y preferida según la invención es el tiempo de generación (iv). Así, las células seleccionadas en medios como por ejemplo el DMEM 10% de suero bovino fetal, o respectivamente RPMI 1640 con 10% de suero bovino fetal, deberían presentar una alta proliferación, es decir, en una semana de cultivo deberían presentar de 16 a 256 duplicaciones de población, preferentemente de 64 a 128 duplicaciones de población. Para ello, las células se siembran en una concentración de $0,1 \text{ a } 10 \times 10^5$ por ml, de preferencia $0,5 \text{ a } 2 \times 10^5$ células por ml en cápsulas de cultivo y el número de células se determina cada dos o tres días con ayuda de una cámara celular, o respectivamente sin tripsinización. Las células que presentan un tiempo de generación suficientemente corto, son particularmente apropiadas para la producción a escala industrial de proteínas humanas mediante activación endógena de los genes.

Otra característica preferida es la falta de una expresión endógena detectable, es decir, transcripción y traducción, del gen diana (v). De preferencia se seleccionan para la activación endógena de los genes, aquellas líneas celulares que esencialmente no presentan ninguna expresión endógena del gen diana. Para ello pueden sembrarse las células durante 24 horas a una densidad celular de $0,01 \text{ a } 2 \times 10^6$ células/ml, de preferencia $0,5 \text{ a } 1 \times 10^6$ células/ml de medio de cultivo. Después de un período de tiempo predeterminado, p. ej., 24 horas, se retira el sobrenadante celular, se desprecian las células y el contenido de proteína diana se determina en el sobrenadante celular por medio de procedimientos de análisis ya conocidos, p. ej., análisis ELISA. En el caso del EPO, el límite de detección por ejemplo es de 10 pg/EPO/ml. Aquellas células que en una siembra de 10^6 células/ml sintetizan menos de 10 pg de proteína, se consideran como no productivas y son particularmente adecuadas.

Todavía otra característica importante y preferida es la polisomía del gen diana y la célula a seleccionar (vi). La existencia de más de dos copias cromosómicas del gen diana en la célula eleva el rendimiento de la recombinación homóloga de manera significativa. Para la producción de EPO cuyo gen está en el cromosoma 7, por ejemplo las células Namalwa (Nadkarni *et al.*, Cancer 23 (1969), 64-79) ó HeLa S3 (Puck *et al.*, J. Exp. Med. 103 (1956), 273-284), las cuales tienen tres veces el cromosoma 7, se han acreditado como particularmente apropiadas. Otros ejemplos de líneas celulares que contienen el cromosoma 7 en un número de copias más elevado, se encuentran en las líneas celulares del adenocarcinoma de colon SW-480 (ATCC CCL-228; Leibovitz *et al.*, Cancer Res. 36 (1976), 4562-4567), la línea celular del melanoma maligno SK-MEL-3 (ATCC HTB 69; Fogh y Tremp: Células tumorales humanas *in vitro* pp 115-159, Fogh (ed.), Plenum Press, Nueva York 1975), el adenocarcinoma de colon Colo-320 (ATCC CCI-220; Quinn *et al.*, Cancer Res. 39 (1979), 4914-4924)), la línea celular del melanoma MEL-HO (DSM ACC 62; Holzmann *et al.*, Int. J. Cancer 41 (1988), 542-547) y la línea celular del carcinoma de riñón A-498 (DSM ACC 55; Girad *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. 51 (1973), 1417.1423).

La comprobación del número de cromosomas en el genoma de una línea celular puede efectuarse mediante el empleo de sondas de ADN, las cuales son específicas para el cromosoma correspondiente o/y el "locus" ("lugar") del gen diana.

Todavía otra característica preferida de una línea celular de partida empleada para la activación endógena de los genes es una correcta glicosilación de la proteína diana deseada (vii). De preferencia se emplea una línea celular humana, la cual sintetiza la proteína diana con una muestra comparativa de glicosilación en particular con respecto al número de radicales de ácido siálico como la proteína diana que existe en la naturaleza. El análisis sobre la existencia de una correcta glicosilación tiene lugar de preferencia de forma que la célula que se analiza, se transfiere transitoriamente con un vector extracromosómico el cual contiene el gen diana deseado bajo el control de un promotor activo celular. Después de la expresión transitoria del gen diana, el sobrenadante de las células o/y el desdoblamiento celular se analiza mediante enfoque isoeléctrico. En el ejemplo del EPO es muy clara la existencia de una correcta glicosilación. Así, el EPO no glicosilado, p. ej., el EPO recombinante de células *E. coli*, posee en experimentos *in vitro*, una actividad comparable a la del EPO glicosilado. Sin embargo, en experimentos *in vivo*, el EPO no glicosilado es esencialmente menos activo. Para la determinación de si una línea celular de partida está en condiciones para la obtención de EPO con una correcta glicosilación, puede efectuarse una comparación con EPO urinario, pero también con EPO recombinante a partir de células CHO, del cual es sabido que presenta en el ser humano una forma activa de glicosilación, y por su glicosilación es ampliamente idéntico con el EPO urinario. La comparación de la glicosilación tiene lugar de preferencia mediante enfoque iso-eléctrico.

Todavía otra característica preferida para la selección de una línea celular humana es la independencia de la línea celular investigada de contaminaciones infecciosas (viii), p. ej., de partículas virales infecciosas o mico-plasmas. Las investigaciones sobre la presencia de contaminaciones víricas pueden efectuarse mediante cultivo celular, análisis *in vivo* o/y detección de proteínas virales específicas.

La invención se refiere además a un procedimiento para la obtención de proteínas humanas mediante la activación endógena de genes en una línea celular humana, el cual procedimiento se caracteriza porque se emplea una línea celular la cual cumple con las características antes mencionadas (i), (ii) y (iii), así como además de preferencia por lo menos una de las características (iv), (v), (vi) y (vii), como se ha indicado anteriormente.

El procedimiento según la invención se emplea particularmente para la obtención de factores humanos, por ejemplo EPO, trombopoyetina (TPO), factores estimuladores de colonias como G-CSF ó GM-CSF, proteínas que influyen sobre la coagulación de la sangre como la tPA, interferones como IFN- α , IFN- β ó IFN- γ , interleucinas como IL-1 hasta IL-18, quimoquinas como MIP, factores neurotrofos como NGF ó BDNF, proteínas que influyen sobre el crecimiento óseo como IFG-BPs, proteína Hedgehog (IgeI), factores de crecimiento tumoral como TFG- β , hormonas de crecimiento como HGH, ACTH, encefalina, endorfina, receptores como por ejemplo receptores de interleucina o insulina en forma soluble o/y permanente en la membrana, y otras proteínas de unión a proteínas. Particularmente preferido es el procedimiento empleado para la obtención de EPO.

La propia activación endógena de genes puede lograrse por métodos ya conocidos y comprende de preferencia los pasos siguientes:

(a) Preparación de líneas celulares humanas de partida, las cuales contienen por lo menos una copia de un gen diana endógeno con la secuencia deseada de ácidos nucleicos e identificación mediante la comprobación de los criterios de selección según la invención, de que son apropiadas para la expresión del gen diana,

(b) Transfección de las células con una construcción de ADN que contiene:

(i) dos secuencias de ADN flanqueantes, las cuales son homólogas a la región del locus del gen diana, para permitir una recombinación homóloga,

(ii) un gen marcador de selección positiva

(iii) eventualmente, un gen marcador de selección negativa,

(iv) eventualmente un gen de amplificación, y

(v) una secuencia de control de expresión heteróloga, la cual es activa en las células humanas,

(c) cultivo de las células transfectada en condiciones en las que tiene lugar una selección respecto a la presencia del gen marcador de selección positiva y eventualmente respecto a la ausencia del gen marcador de selección negativa,

(d) análisis de las células seleccionables según el paso anterior,

(e) identificación de las células productoras de la proteína diana deseada, y

(f) eventualmente, amplificación del gen diana en las células seleccionadas.

La construcción de ADN empleada por las células productoras para la obtención de la proteína humana deseada, contiene dos secuencias de ADN homólogas que flanquean la región del locus del gen diana. La selección de las secuencias flanqueantes apropiadas tiene lugar por ejemplo según los métodos descritos en las patentes WO90/11354 y WO91/09955. De preferencia, las secuencias flanqueantes tienen una longitud de por lo menos 150 bp. Se escogen con particular preferencia las secuencias de ADN homólogas de la región 5' del gen diana, p. ej., secuencias 5' no traducidas, exones codificadores de secuencias señal e intrones localizados en esta región, p. ej., exón 1 e intrón 1.

El gen marcador de selección positiva puede ser uno cualquiera del gen marcador de selección apropiado para células eucarióticas, el cual conduce en la expresión a un fenotipo seleccionable, p. ej., resistencia al antibiótico, auxotrofia, etc. Un gen marcador de selección positiva particularmente preferido es el gen de la neomicinafosfo-transferasa.

Eventualmente, puede estar también presente un gen marcador de selección negativa como por ejemplo el gen de la HSV-timidinaquinasa que puede ser destruido por sus células de expresión en presencia de un medio de selección. El gen marcador de selección negativa está colocado además de las dos regiones de secuencias homólogas flanqueantes.

Cuando se desea una amplificación del gen diana activado endógeno en la célula humana, la construcción de ADN recibe un gen de amplificación. Ejemplos de genes de amplificación adecuados son el gen de la dihidrofolato-reductasa, el gen de la adenosinadesaminasa, el gen de la ornitina descarboxilasa, etc. Un gen de amplificación particularmente preferido es el gen de la dihidrofolato-reductasa, en particular un gen que codifica un mutante de dihidrofolato-reductasa-arginina, el cual posee una alta sensibilidad para el agente selectivo (metotrexato) como el gen de tipo salvaje (Simonsen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983), 2495).

Además, contiene la construcción de ADN empleada para la activación endógena del gen, una secuencia heteróloga de control de expresión, la cual es activa en una célula humana. La secuencia de control de expresión contiene un

promotor y de preferencia otras secuencias para mejorar la expresión, p. ej., un potenciador. El promotor puede ser un promotor regulable o constitutivo. De preferencia el promotor es un promotor vírico potente, p. ej., un promotor SV-40 ó un promotor CMV. Particularmente preferido es el promotor/potenciador CMV.

5 La invención se refiere además al empleo de líneas celulares humanas identificadas por el procedimiento antes descrito por activación de un gen diana presente endógeno en la célula para la obtención del polipéptido codificado por el gen diana activado, de preferencia para la obtención del polipéptido en un procedimiento a escala industrial, p. ej., el empleo de un fermentador de gran tamaño.

10 Todavía otro objetivo de la invención es una célula humana que contiene una copia de un gen endógeno en conexión operativa con una secuencia heteróloga de control de expresión activa en la célula humana, y es capaz de producir sin previa amplificación del gen una producción de por lo menos 200 ng del polipéptido/10⁶ células/24 horas codificado por el gen endógeno. De preferencia la célula humana según la invención es capaz de una producción de 200 a 3000 ng de polipéptido/10⁶ células/24 horas y con la máxima preferencia para la producción de 1000 a 3000 ng de polipéptido/10⁶ células/24 horas.

15 Finalmente todavía otro objetivo de la presente invención es una célula humana la cual puede obtenerse mediante la amplificación del gen de la célula antes citada, y contiene varias copias de un gen endógeno siempre en unión operativa con una secuencia heteróloga de control de expresión activa en la célula humana y es capaz de la producción de por lo menos 1000 ng del polipéptido/10⁶ células/24 horas codificado por el gen endógeno. Es particularmente preferida la línea celular humana obtenible por amplificación del gen, capaz para la producción de 1000 a 25000 ng de polipéptido/10⁶ células/24 horas y con la máxima preferencia para la producción de 5000 a 25000 ng/polipéptido/10⁶ células/24 horas.

25 Un ejemplo de una célula según la invención es el clon "Aladin" que produce EPO, el cual fue registrado el 15.07.1997 según las prescripciones del Tratado de Budapest, en la "Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, con el número de referencia DSM ACC 2320.

Además, la invención se aclara mediante los siguientes ejemplos y figuras y protocolos de secuencias.

30 Las figuras representan:

Figura 1: Una representación esquemática de la amplificación de regiones homólogas del gen de EPO a partir de la región de las secuencias 5' no traducidas, exón 1 e intrón 1;

35 Figura 2: Una representación esquemática de un plásmido, el cual contiene regiones de homología con EPO a partir de la región de las secuencias 5' no traducidas, exón 1 e intrón 1;

40 Figura 3: Una representación esquemática de una secuencia de activación del gen, la cual contiene el promotor del Rous Sarcomavirus (RSV), el gen de la neomicinafosfo-transferasa (NEO), la temprana región de poliadenilación de SV40 (SVI_{pA}), los tempranos promotor SV40 (SVI), gen de la dihidrofolatoredutasa (DHFR) y promotor inmediato temprano Cytomegalovirus, y el potenciador (MCMV);

Figura 4a: La obtención del vector dirigido selectivamente al gen de EPO p176;

45 Figura 4b: La obtención de los vectores dirigidos selectivamente al gen de EPO p179 y p187;

Figura 4c: La obtención del vector dirigido selectivamente al gen de EPO p189;

Figura 4d: La obtención del vector dirigido selectivamente al gen de EPO p190;

50 Figura 4e La obtención del vector dirigido selectivamente al gen de EPO p192;

SEQ ID NO. 1 y NO. 2 Secuencias de nucleótidos del cebador empleado para la obtención del producto 1 de la PCR (figura 1);

55 SEQ ID NO. 3 y NO. 4 Secuencias del cebador empleado para la obtención del producto 2 de la PCR (figura 1).

Ejemplos

60 Ejemplo 1

Métodos de selección

1.1 Determinación del tiempo de generación

65 Las líneas celulares analizadas se sembraron con una concentración de 0,1 - 5 x 10⁵ por ml, de preferencia con 0,5 - 2 x 10⁵ células por ml en cápsulas de cultivo con DMEM y 10% de FKS ó respectivamente RPMI 1640 y 10% de FKS y se determinó el número de células por cultivo en un medio recomendado por la ATCC para cada una de

ES 2 281 133 T3

las células correspondientes, y en condiciones adecuadas cada dos hasta tres días con una cámara de conteo, p. ej., Neubauer, sin o respectivamente con tripsinización. Las células que en el intervalo de una semana de cultivo presentan de 16 a 256 duplicaciones de población, de preferencia de 64 a 128 duplicaciones de población, se valoran como positivas (+, ++ ó +++).

1.2 Facilidad de cultivo en suspensión

Para la determinación de la facilidad de cultivo en suspensión se cultivaron las células durante 14 días con agitación continua en un medio (ver 1.1 con y sin adición de suero, p. ej., suero bovino fetal) en un Bellco-Spinner con los correspondientes accesorios a 37°C y 7% de CO₂. Las células que durante esta fase mostraron por lo menos 5 duplicaciones de la población, fueron valoradas como apropiadas para un cultivo en suspensión (+).

1.3 Facilidad de cultivo en un medio exento de suero

Para determinar la facilidad de cultivo de las células en un medio exento de suero, se cultivaron las células durante 14 días con una densidad de $1 - 10 \times 10^5$ células/ml en recipientes de cultivo en un medio básico p. ej., recomendado por la ATCC para las correspondientes células (es decir sin adición de suero) con ITS (Boehringer Mannheim, artículo de catálogo n° 1074547) en condiciones según 1:1. Las células que durante este tiempo presentaron por lo menos 5 duplicaciones de población (determinadas por conteo celular), se validaron como adecuadas para el cultivo exento de suero (+).

1.4 Determinación de la expresión endógena del gen diana

Para determinar si la proteína diana se produce en la línea celular seleccionada, se sembraron las células durante 24 horas con una densidad celular de 0,01 a 2×10^6 células/ml de preferencia 0,5 a 1×10^6 células/ml de medio de cultivo. 24 horas más tarde se retiró el sobrenadante de las células, se desecharon las células y se determinó el contenido de proteína celular en el sobrenadante celular según métodos ya conocidos, p. ej., por medio de un inmunoensayo específico para la correspondiente proteína.

En el caso del EPO, se determinó el contenido mediante un análisis ELISA. Para ello se recubrieron las placas de microtitulación recubiertas de estreptavidina con anticuerpos biotinilados anti EPO (Boehringer Mannheim), y para el bloqueo de condiciones no específicas, se incubaron con una solución que contenía una proteína (1% p/v). A continuación, se añadieron 0,1 ml de sobrenadante del cultivo y se incubaron durante la noche. Después de lavar, se añadieron anticuerpos de EPO monoclonales conjugados con peroxidasa (Boehringer Mannheim) durante dos horas. La reacción de la peroxidasa se efectuó empleando ABTS® como sustrato en un fotómetro Perkin Elmer a 405 nm.

El límite de detección de EPO en este ensayo fue de 10 pg de EPO/ml. Las células que, en una siembra de 10^6 /ml, produjeron menos de 10 pg de EPO/ml, fueron valoradas como no productivas y como apropiadas (+).

1.5 Determinación del número de copias del gen diana

Para la comprobación del número de copias del gen diana en la línea celular, se aisló ADN genómico humano con aproximadamente 10^8 células y se cuantificó (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning. A Laboratory Manual ("Clonación molecular. Un Manual de Laboratorio") (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press). Después de la escisión del ADN mediante enzimas de restricción, p. ej., AgeI y AscI ó respectivamente BamHI, HindIII y SalI, se separaron los fragmentos de ADN según su tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa y finalmente se transfirieron sobre una membrana de nylon y se inmovilizaron.

El ADN inmovilizado se hibridó con una sonda de ADN marcada con digoxigenina, la cual era específica para el locus del gen diana o el cromosoma sobre el cual se encuentra el gen diana, y se lavó en condiciones restrictivas. Las señales de hibridación específica fueron detectadas con ayuda de un procedimiento de quimioluminiscencia con el empleo de films sensibles a la radiación.

1.6 Determinación de la secuencia de ácidos nucleicos del gen diana

A partir de aproximadamente 10^7 células se aisló el ADN genómico mediante el empleo de un kit de aislamiento de ADN (p. ej., QIAGEN Blood & Cell Culture DNA Kit).

Se emplearon un par de cebadores de PCR para la amplificación del gen diana. Por ello, las secuencias del cebador fueron complementarias a las secuencias que flanqueaban la región codificadora del gen diana. Por este motivo pudo ser amplificada la totalidad de la región codificadora del gen diana.

El producto de la PCR fue sometido directamente a análisis secuencial o clonación dentro de un vector y a continuación se secuenció. A este respecto se emplearon cebadores secuenciadores cuyas secuencias son complementarias a las secuencias de las regiones de intrones del gen diana, de manera que las secuencias de las regiones de exones del gen diana pueden ser completamente obtenidas. La secuenciación tuvo lugar en un secuenciador automático PE/ABI, con empleo p. ej., de los kits de secuenciación "Prism™ Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing" Kits (PE/ABI, Forster City, U.S.A.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

1.7 Determinación de la muestra de glicosilación

Para la determinación de la muestra de glicosilación del EPO se transfectaron las líneas celulares a analizar con el plásmido pEPO 227, el cual contiene un fragmento HindIII/EciRI de 4 kb de la secuencia del gen de EPO humano bajo el control del promotor SV40 (Jacobs *et al.*, Nature 313 (1985), 806; Lee-Huang *et al.*, Gene 128 (1993), 272). A este respecto las células se transfectaron en presencia de Lipofektamin con el empleo de un kit de reactivos que puede adquirirse en el comercio, según las instrucciones del fabricante. En el sobrenadante obtenido de las células obtenido 2 ó 5 días más tarde, se determinó el contenido de EPO mediante un análisis ELISA.

El sobrenadante de las células se concentró y se comparó mediante enfoque isoeléctrico (Righetti P.G., en Work T.S., Burdon R.M. (ed), Isoelectric focusing: Theory, methodology and applications ("Enfoque isoeléctrico: teoría, metodología y aplicaciones"), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam (1983)), con productos de EPO ya conocidos. Las células humanas las cuales proporcionaron una muestra de glicosilación comparable a los productos de EPO ya conocidos, p. ej., al EPO urinario, se valoraron como apropiados (+).

1.8 Determinación de las contaminaciones víricas

1.8.1 Análisis mediante cultivo celular

Para la determinación de posibles contaminaciones víricas infecciosas en la línea celular humana que se ensaya, se incubó un lisado de células con una línea celular humana, para poder detectar efectos citopáticos. Adicionalmente se efectuaron análisis de hemoadsorción.

Para la obtención del lisado se lisó una suspensión de 10^6 células en 1 ml de tampón mediante un proceso rápido de congelación-descongelación. El residuo celular se separó por centrifugación y el sobrenadante se añadió a las líneas celulares detectoras. Como líneas celulares detectoras se emplearon las células HepG2 (ATCC HB-8065; Nature 282 (1979), 615.616), MCR-5 (ATCC-1587) y Vero (ATCC CCL-171; Jacobs, Nature 227 (1970), 168-170). Como controles positivos se emplearon virus del tipo polio SV y de la gripe. Como controles negativos se emplearon líneas detectoras, las cuales fueron cultivadas sin el lisado. Para la determinación de efectos citopáticos se investigaron las líneas celulares detectoras regularmente durante un período de tiempo de por lo menos 14 días.

Para los análisis de hemoadsorción se emplearon células Vero que se incubaron con lisados de células o respectivamente con los controles, después de 7 días con eritrocitos de pollo, cerdo o seres humanos. Una sujeción de los eritrocitos a las monocapas de las células cultivadas indicó una contaminación vírica de los cultivos.

1.8.2 Análisis *in vivo*

Se prepararon lisados de las líneas celulares que se investigan, como se ha indicado en 1.8.1, y se inyectaron en ratones recién nacidos por vía intraperitoneal o "intaracribal" en una cantidad de 0,1 ml. Durante un período de tiempo de 14 días los ratones fueron observados con respecto a la morbilidad y la mortalidad.

1.8.3 Detección específica de proteínas víricas

Se analizó la presencia de proteínas víricas específicas, p. ej., la proteína del virus Epstein-Barr (proteína nuclear o antígeno capsular), en la cual se añadió a las células inmovilizadas de la línea celular que se está analizando, suero humano de bandas EBV positivas. La detección del antígeno del virus se efectuó a continuación mediante la adición de complemento y del correspondiente complemento anti-humano conjugado de fluoresceína C3 (para la detección del antígeno capsular).

Ejemplo 2

Resultados de la selección

Se analizaron las líneas celulares humanas HepG2, HT1080, Namalwa, Hela y HelaS3 mediante los métodos indicados en el punto 1. Los resultados están representados en la siguiente tabla 1.

TABLA 1

	HepG2	HT1080	Namalwa	Hela	Hela S3
Comportamiento al crecimiento					
Tiempo de duplicación	+	++	++	+++	+++
Cultivo de suspensión	-	+	+	+/-	+
posible exento de suero	+/-	+	+	+	+
Producción de EPO					
endógeno	+	-	-	-	-
transiente/ml	53 ng	65 ng	70 ng	100 ng	480 ng
Glicosilación de ECO (transiente)	-	+	+	+	+
Análisis de contaminaciones infecciosas víricas	no analizado	libre	libre	no analizado	libre

A partir de la tabla 1 puede verse que las líneas celulares HT1080, Namalwa y Hela S3 deben considerarse como apropiadas para la activación endógena de genes de EPO. Son particularmente apropiadas Namalwa y Hela S3.

Ejemplo 3

Clonación de regiones de homología de ECO

Se amplificaron regiones de homología del gen de EPO mediante PCR empleando un ADN genómico de placenta (Boehringer Mannheim). A este respecto, se obtuvieron a partir de una región de homología de 6,3 kB de longitud, de la región de las secuencias 5' no traducidas del gen de EPO, el exón 1 y el intrón 1, dos productos de la PCR (ver figura 1). Los cebadores empleados para la obtención del cebador empleado del producto 1 de la PCR tenían las secuencias siguientes: 5'-CGC GGC GGA TCC CAG GGA GCT GGG TTG ACC GG-3' (SEQ ID NO. 1) y 5'-GGC CGC GAA TTC TCC GCG CCT GGC CGG GGT CCC TCA GC-3' (SEQ ID NO. 2). Los cebadores empleados para la obtención del producto 2 de la PCR tenían las siguientes secuencias: 5'-CGC GGC GGA TCC TCT CCT CCC TCC CAA GCT GCA ATC-3' (SEQ ID NO. 3) y 5'-GGC CGC GAA TTC TAG AAC AGA TAG CCA GGC TGA GAG-3' (SEQ ID NO. 4).

A partir de los productos 1 y 2 de la PCR se escindieron los segmentos deseados mediante escisión por restricción (producto 1 de la PCR: HindIII; producto 2 de la PCR: HindIII y Eco RV) y se clonaron en el vector pCRII (Invitrogen) el cual se había escindido mediante HindIII y Eco RV). El vector recombinante obtenido de esta forma recibió el nombre de 5epopcr1000 (ver figura 2).

Ejemplo 4

Construcción de los vectores selectivos del gen de EPO

4.1 Una secuencia de activación del gen, el cual contiene el gen de NEO, el gen de la DHFR y un promotor/potenciador del CMV (ver figura 3), se insertó en el lugar del plásmido 5epocr1000 que contiene la región de homología de EPO, en donde estaba contenido el plásmido p176 (ver figura 4a). Para llevar el promotor CMV lo más cerca posible al lugar de partida de la traducción del gen de EPO, se suprimió un segmento de 963 bp de longitud entre los lugares de restricción AscI y AgeI (escisión parcial), en donde el plásmido p179 estaba contenido (figura 4b).

4.2 Para lograr una optimización de la expresión, se substituyeron nucleótidos en el exón 1, los cuales codifican el comienzo de la secuencia EPO líder Met-Gly-Val-His, por la secuencia sintética Met-Ser-Ala-His. Esta secuencia se obtuvo mediante la amplificación de una secuencia genómica del ADN de EPO, p. ej., del plásmido pEPO148, el cual contiene un fragmento BstEII/EcoRI de 3,5 kB (inclusive los exones 1-5) de la secuencia del gen del EPO humano bajo el control del promotor SV40 (Jacobs *et al.*, Nature 313 (1985), 806 y Lee-Huang *et al.*, Gene 128(1993), 227), como matriz con los correspondientes cebadores. Con ello se obtuvo el plásmido p187 (figura 4b).

4.3 El plásmido p189 se obtuvo a partir del plásmido p187 mediante la inserción del gen de la timidinaquinasa del virus del Herpes Simplex (HSV-TK), el cual procedía de Psvtk-1 (fragmento PvuII/NarI) (figura 4c). El gen de la

HSV-TK se encuentra bajo el control del promotor SV40 en el extremo 3' del intrón 1 (Eco RV/ClaI) en orientación opuesta con respecto al promotor del CMV y se utiliza para la selección negativa de una recombinación homóloga.

4.4 Para la construcción del plásmido p190 se subclonó un fragmento SfiI/BglIII de pHEAVY, un plásmido el cual contiene el ADNc de un mutante de arginina descrito por Simonsen *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci USA 80 (1983), 2495), de la DHFR, y el plásmido pGenak-1 cortado por SfiI y BglIII, el cual contiene el gen de NEO bajo el control del promotor RSV y el lugar tardío de la poliadenilación como terminador, el gen de la DHFR de rata bajo el control del promotor SV40 temprano y el lugar temprano de la poliadenilación del SV40 como terminador (Kaufmann *et al.*, Mol. Cell. Bio. 2 (1982), 1304; Okayama *et al.*, Mol. Cell. Biol. 3 (1983), 280 y Schimke, J. Biol. Chem. 263 (1988), 5989) y el promotor de CMV (Boshart *et al.*, Cell 41 (1995), 521). A continuación, se ligó un fragmento HpaI, el cual contenía el ADNc que codificaba el mutante de DHFR-arginina, en el plásmido p189 cortado con HpaI, mediante lo cual se obtuvo el plásmido p190 (figura 4d).

4.5 Para la obtención de un vector de transfección sin el gen HSV-TK, se ligó un fragmento AscI/NheI del plásmido p190, el cual contenía la secuencia de activación del gen, en un fragmento AscI/NheI que contenía el exón 1, del plásmido p187. El plásmido resultante recibió el nombre de p192 (figura 4e).

Ejemplo 5

Transfección de las células

Se seleccionaron diferentes líneas celulares para la producción de EPO y se transfectaron con vectores selectivos.

5.1 Células Namalwa

Las células se cultivaron en frascos de cultivo de tejidos T150 y se transfectaron mediante electroporación (1×10^7 células/800 μ l de tampón de electroporación, a saber, 20 mM de Hepes, 138 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 0,7 mM de Na_2HPO_4 , 6 mM de monohidrato de D-glucosa de pH 7,0, 10 μ g de ADN linealizado, con las condiciones 960 μ F, 260 V, pulsador de genes BioRad). Después de la electroporación se cultivaron las células en RPMI 1640, 10% (v/v) de suero fetal bovino (FCS), 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio en cuarenta placas de 96 pocillos. Después de dos días se cultivaron las células durante 10 a 20 días en un medio que contenía 1 mg/ml de G-418. El sobrenadante se analizó en un ELISA de fase sólida para determinar la producción de EPO (ver ejemplo 1.4). Los clones productores de EPO se expandieron en placas de 24 pocillos y frascos de cultivo de tejidos T-25. Se congelaron alícuotas y las células se subclonaron mediante FACS (Ventage, Becton Dickinson). Los subclones se analizaron por repetido para determinar la producción de EPO.

5.2 Células HT 1080

Las condiciones fueron como se ha descrito para las células Namalwa, a excepción de que las células HT1080 se cultivaron en DMEM, 10% (v/v) de FCS, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio. Para la transfección mediante electroporación se despegaron las células mediante tripsinización de las paredes de los recipientes de cultivo. Después de la electroporación se cultivaron 1×10^7 células en DMEM, 10% (v/v) de FCS, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, en 5 placas de 96 pocillos.

5.3 Células HeLa S3

Las condiciones fueron como las descritas para las células Namalwal, a excepción de que las células HeLaS3 se cultivaron en RPMI 1640, 10% (v/v) de FCS, 2 mM de L-glutamina, 1% (v/v) de aminoácidos NEM no esenciales (Sigma), 1 mM de piruvato de sodio. Para la transfección mediante electroporación las células se despegaron de las paredes de los recipientes de cultivo mediante tripsinización. Las condiciones para la electroporación fueron de 960 μ F/250 V. Después de la electroporación se cultivaron las células en RPMI 1640, 10% (v/v) de FCS, 2 mM de L-glutamina, 1% (v/v) de NEM, 1 mM de piruvato de sodio en frascos de cultivo de tejidos T75. 24 horas después de la electroporación se tripsinizaron las células y se cultivaron durante 10 a 15 días en un medio que contenía 600 μ g/ml de G-418 en 10 placas de 96 pocillos.

Ejemplo 6

Amplificación del gen de EPO

Para aumentar la expresión de EPO se cultivaron los clones productores de EPO en presencia de concentraciones crecientes (100 pM -1000 nM) de metotrexato (MTX). En cada concentración de MTX se analizaron los clones mediante un análisis ELISA (ver por ejemplo 1.4) para determinar la producción de EPO. Los mayores productores fueron sub-clonados mediante una dilución limitada.

ES 2 281 133 T3

Ejemplo 7

Caracterización de las líneas celulares productoras de EPO

5 Se seleccionaron tres líneas celulares distintas (Namalwa, HeLa S3 y HT 1080) para la activación del gen de EPO. Los clones productores de EPO se obtuvieron mediante transfección con los plásmidos p179, p187, p189, p190 ó p192 (ver ejemplos 2 y 3).

10 Se analizaron aproximadamente 160.000 clones NEO- resistentes para determinar la producción de EPO, de los cuales 12-15 EPO segregaron reproduciblemente con un rendimiento significativo en el sobrenadante celular.

15 De los mismos, se pudieron identificar sorprendentemente sin amplificación del gen, mediante MTX en total 7 clones de EPO, los cuales produjeron EPO en suficiente cantidad para una producción a escala industrial. La producción de EPO de estos clones fue del orden de 200 ng/ml hasta más de 1000 ng/ml/10⁶ células/24 horas.

Después de la amplificación del gen con 500 nM MTX pudo aumentarse la producción de EPO de los clones de EPO identificados hasta más de 3000 ng/ml/10⁶ células/24 horas. Otro aumento de la concentración de MTX hasta 1000 nM condujo a una producción de hasta más de 7000 ng/ml/10⁶ células/24 horas.

20 Los clones obtenidos mostraron también una producción de EPO en condiciones de cultivo exentas de suero y en ausencia de MTX.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la selección de líneas celulares humanas para la obtención de proteínas humanas mediante activación endógena de un gen diana que es endógeno en la célula,

caracterizado porque,

(a) se analiza una línea celular humana respecto a la presencia de las siguientes características:

(i) un gen diana con la secuencia de ácidos nucleicos deseada

(ii) por lo menos 5 duplicaciones de la población en el período de 14 días en un cultivo en suspensión, y

(iii) por lo menos 5 duplicaciones de la población en el período de 14 días en un medio de cultivo exento de suero, y

(b) se emplea una línea celular que satisface las características (i), (ii) y (iii) como línea celular de partida para la activación endógena del gen diana.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque,

se emplea una línea celular humana la cual (iv) presenta un tiempo de generación de 16 a 256 duplicaciones de la población en el período de una semana en un medio de cultivo.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque,

se emplea una línea celular humana la cual presenta de 64 a 128 duplicaciones de la población en el período de una semana en un medio de cultivo.

4. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes,

caracterizado porque,

se emplea una línea celular humana, la cual (v) no presenta esencialmente ninguna expresión endógena del gen diana.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes,

caracterizado porque,

se emplea una línea celular humana, la cual (vi) contiene más de 2 copias cromosómicas del gen diana.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes,

caracterizado porque,

se emplea una línea celular humana, la cual (vii) sintetiza la proteína celular con una muestra de glicosilación comparable a la proteína diana que se encuentra en la naturaleza.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes,

caracterizado porque,

se emplea una línea celular humana, la cual (viii) está libre de contaminaciones infecciosas comprobables.

8. Procedimiento para la obtención de una proteína humana mediante activación endógena del gen, en una célula humana,

caracterizado porque,

mediante un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, se selecciona una línea celular, la cual satisface las características (i), (ii) y (iii) como se han definido en la reivindicación 1, y emplea la línea celular así seleccionada.

9. Procedimiento según la reivindicación 8,

caracterizado porque,

ES 2 281 133 T3

se emplea una línea celular la cual además satisface por lo menos una de las características (iv), (v), (vi), (vii) y (viii) como se definen en una de las reivindicaciones 2, 4, 5, 6 y 7.

5 10. Procedimiento según la reivindicación 8 ó 9, para la obtención de un factor humano seleccionado de EPO, TPO, factores estimuladores de colonias, proteínas que influyen sobre la coagulación sanguínea, interferonas, interleucinas, quemoquinas, factores neutrotróficos, proteínas que influyen sobre el crecimiento óseo, proteínas Hedgehog, factores de crecimiento tumoral, hormonas de crecimiento, ACTH, encefalinas, endorfinas, receptores y otras proteínas que se unen con proteínas.

10 11. Procedimiento según la reivindicación 10, para la obtención de EPO.

12. Procedimiento para la obtención de un polipéptido,

15 **caracterizado** porque,

mediante un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, se identifica una línea celular humana, en la cual un gen diana que codifica un deseado polipéptido, es endógeno, tiene lugar una activación del gen diana y entonces se obtiene el polipéptido codificado por el gen diana.

20 13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el cual la obtención del polipéptido tiene lugar en un fermentador grande.

25

30

35

40

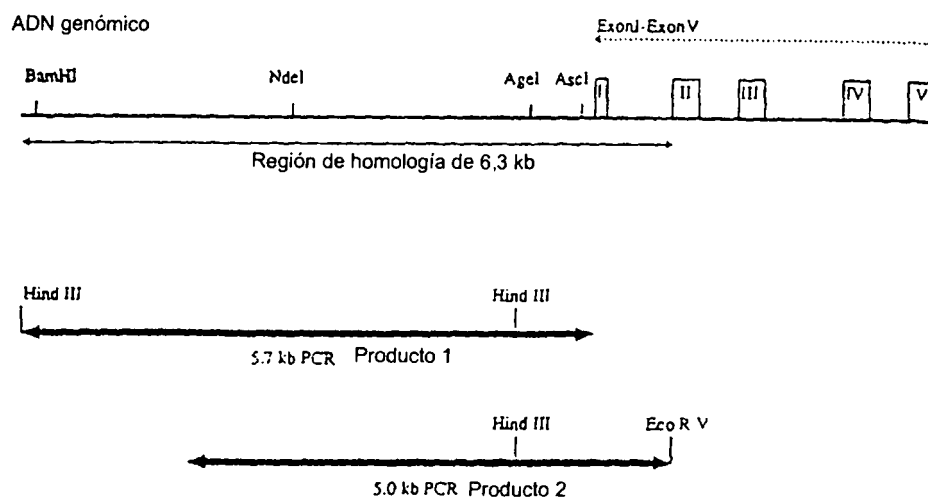
45

50

55

60

65



Cebador para el producto 1 de la PCR
 5' CGC GGC GGA TCC CAG GGA GCT GGG TTG ACC GG 3'
 5' GGC CGC GAA TTC TCC GCG CCT GGC CGG GGT CCC TCA GC 3'

Cebador para el producto 2 de la PCR
 5' CGC GGC GGA TCC TCT CCT CCC TCC CAA GCT GCA ATC 3'
 5' GGC CGC GAA TTC TAG AAC AGA TAG CCA GGC TGA GAG 3'

FIGURA 1

ADN genómico de 6 kb del gen de EPO clonado en el vector

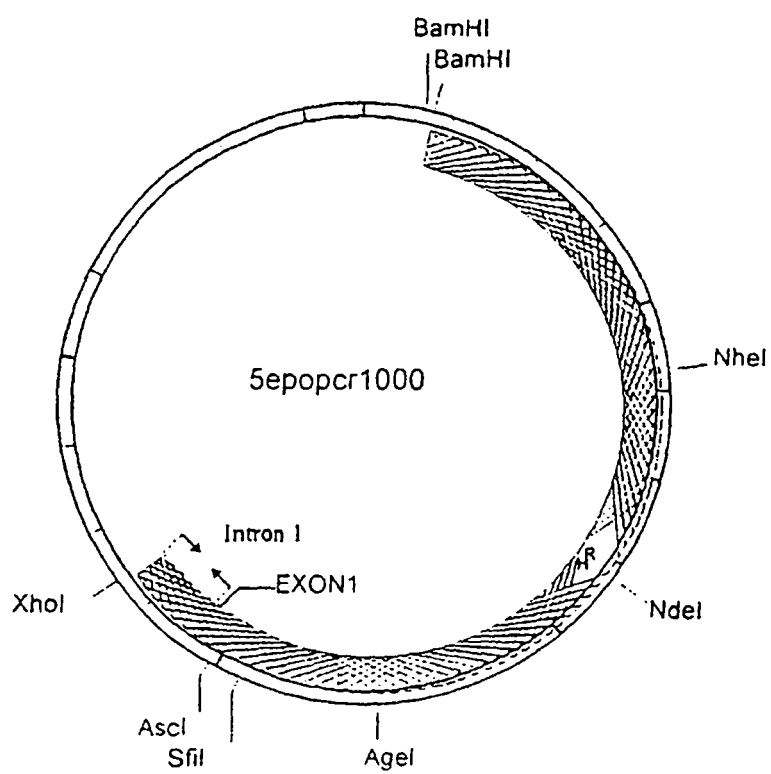


FIGURA 2

Secuencia de activación del gen

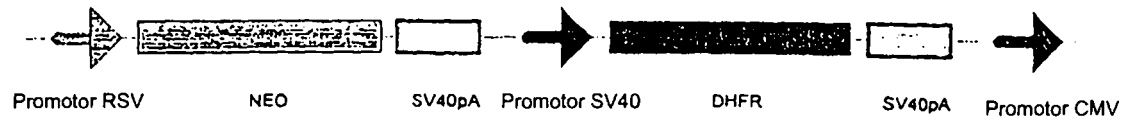


FIGURA 3

Construcción de vectores selectivos para genes EPO

Secuencia de activación del gen

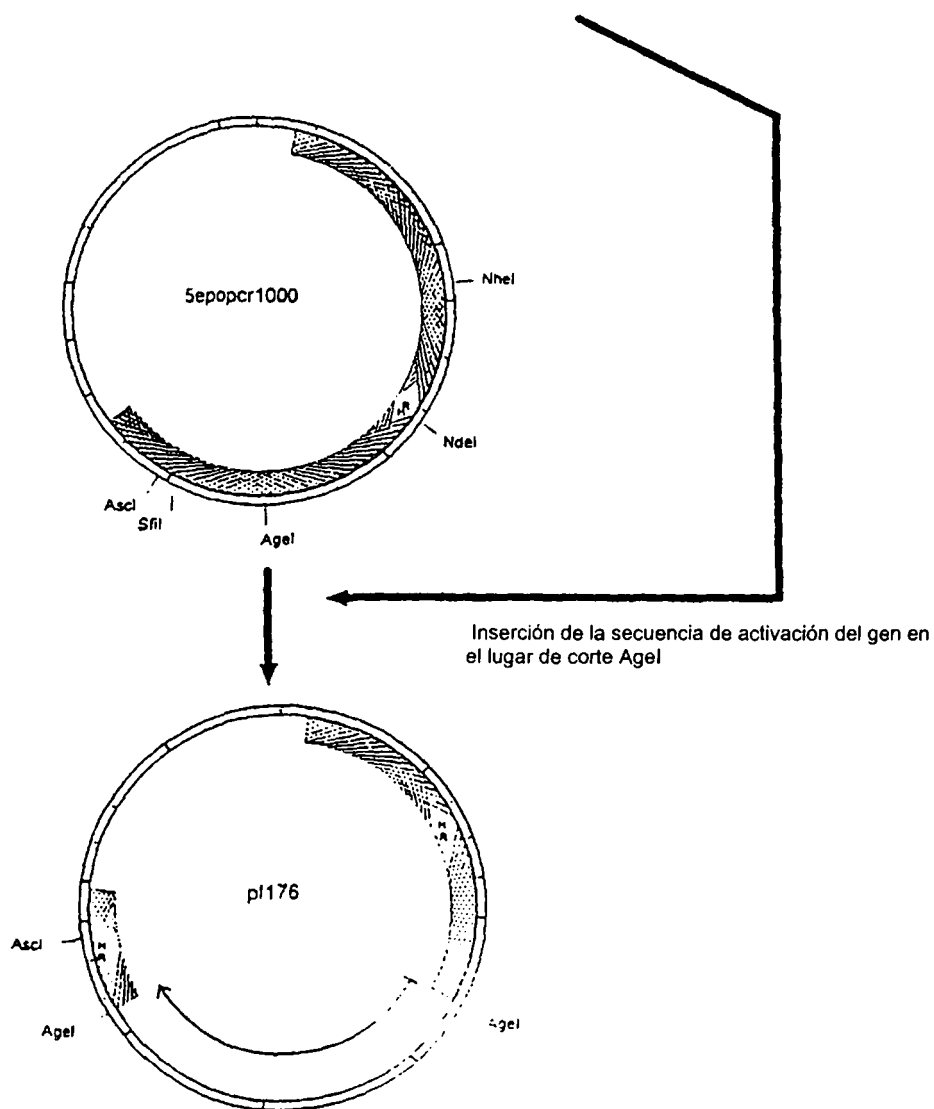
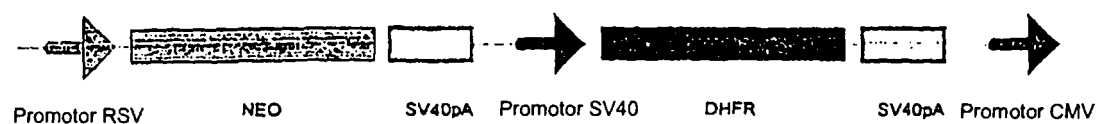


FIGURA 4a

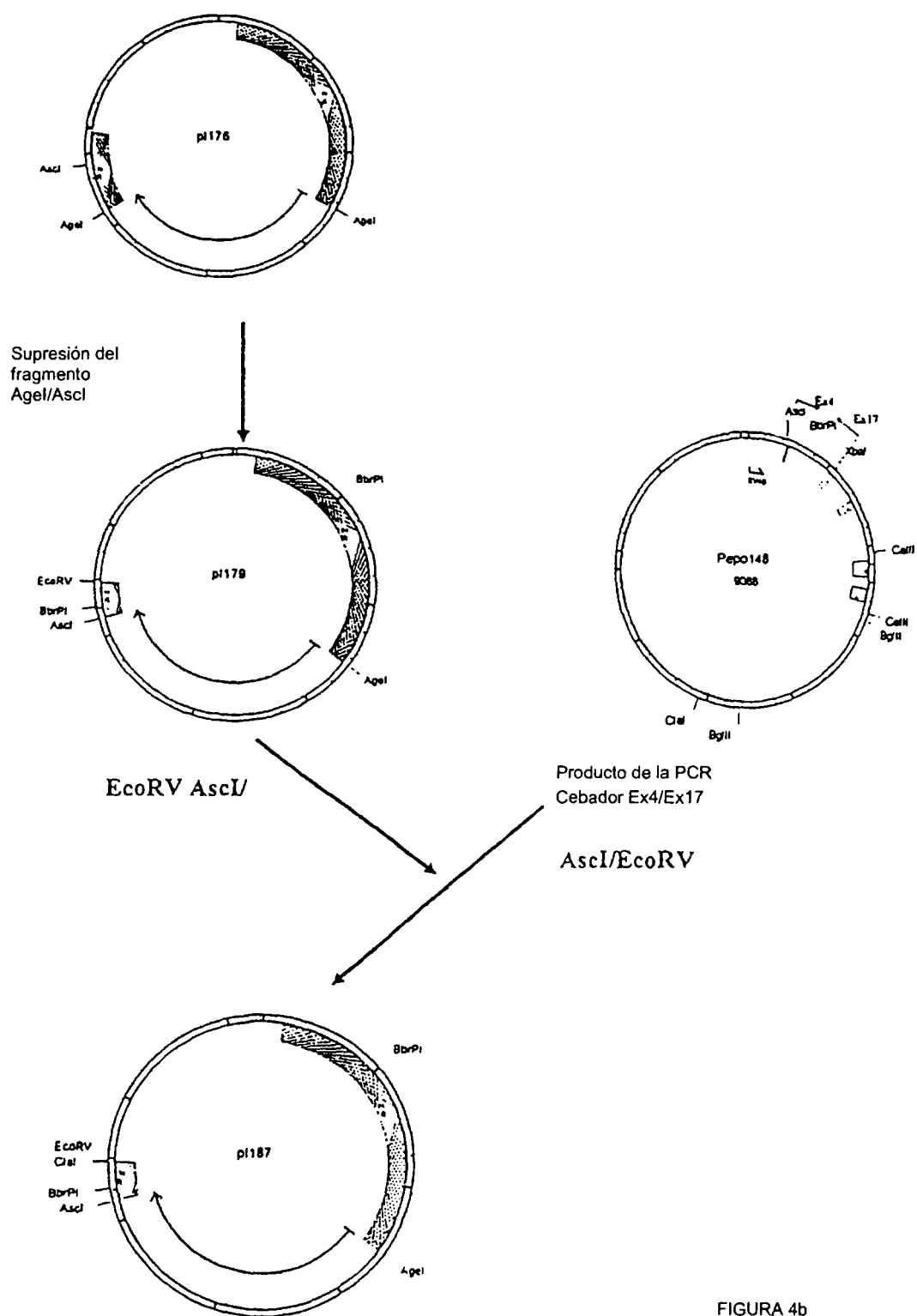


FIGURA 4b

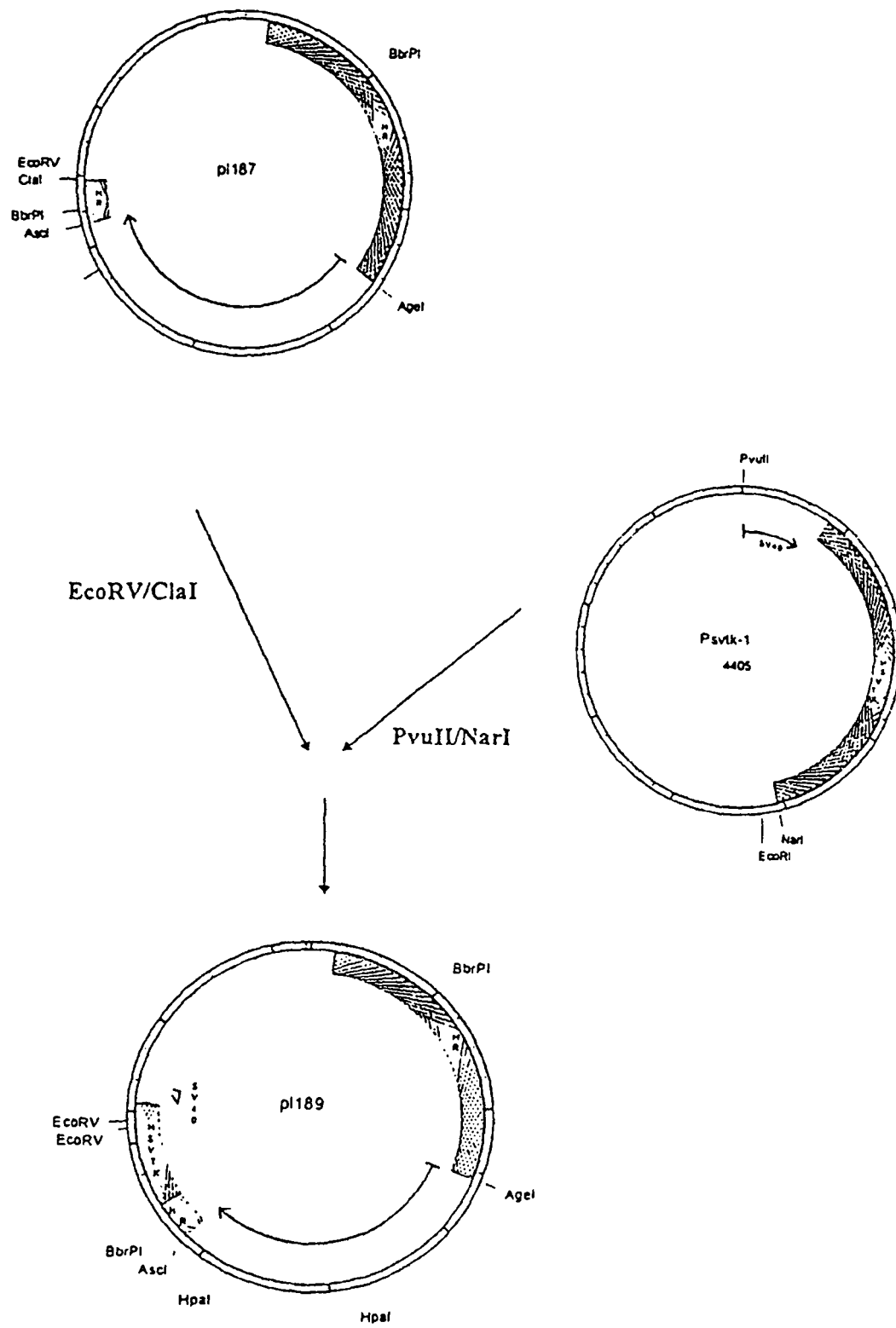
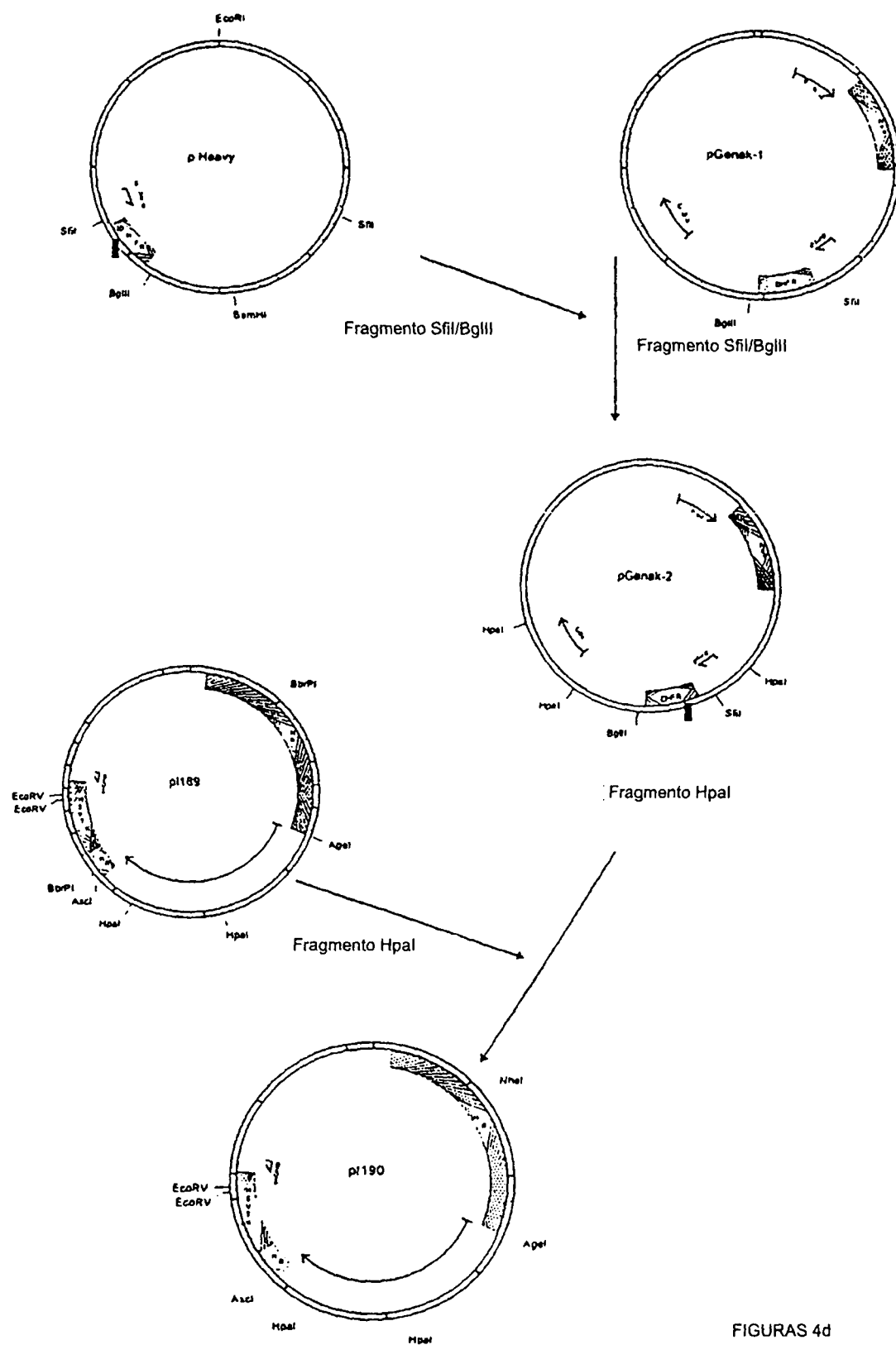
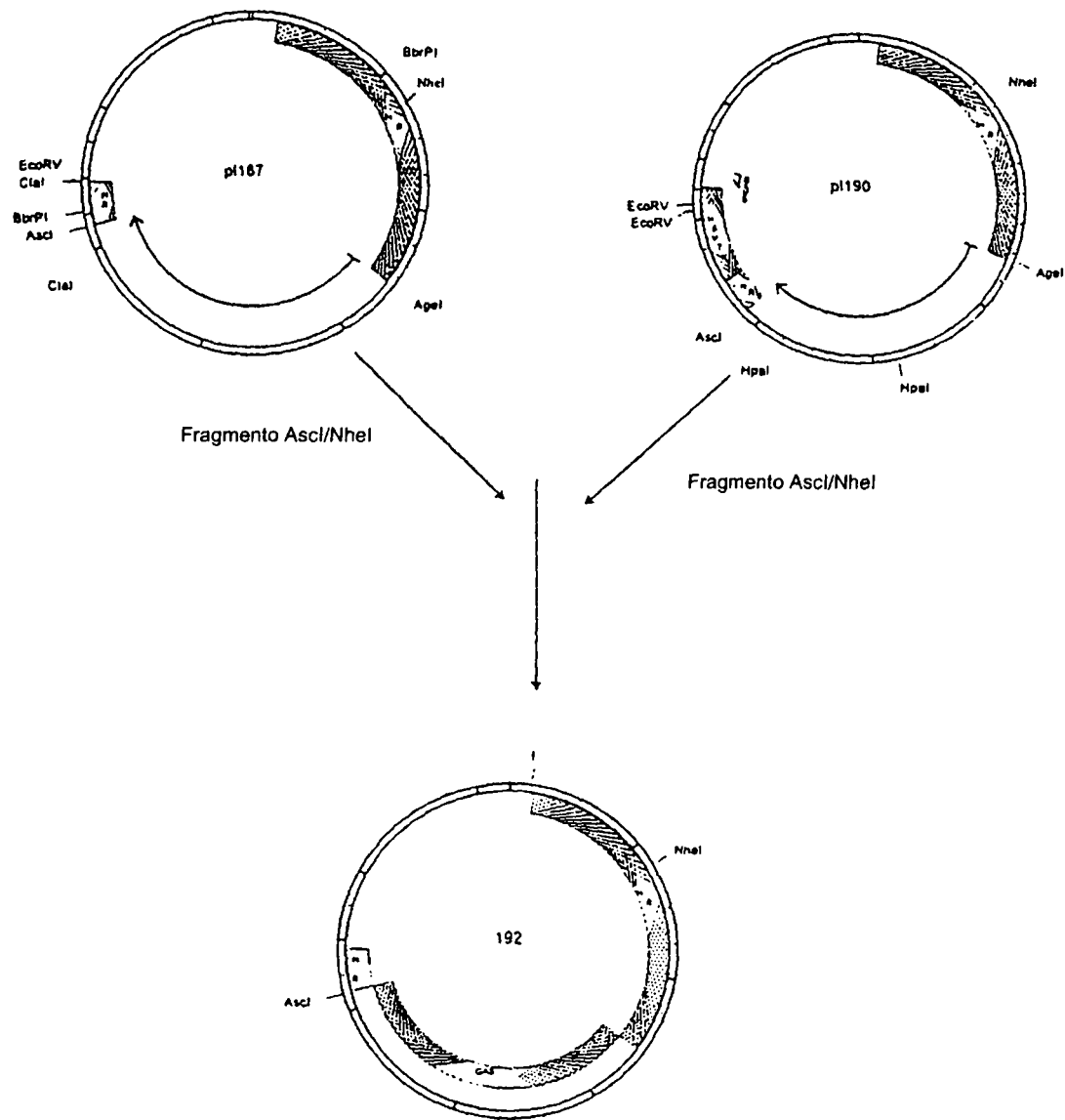


FIGURA 4c



FIGURAS 4d



FIGURAS 4e

LISTA DE SECUENCIAS

(1) DATOS GENERALES:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: Boehringer Mannheim GmbH
- (B) CALLE: Sandhofer Str. 112-132
- 10 (C) POBLACIÓN: Mannheim
- (E) PAÍS: Alemania
- (F) CÓDIGO POSTAL: 68305
- 15 (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Identificación de líneas celulares humanas para la producción de proteínas humanas mediante activación endógena de los genes
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 4
- 20 (iv) MODALIDAD DE LECTURA DEL ORDENADOR
- (A) SOPORTE DE DATOS: disco flexible
- (B) ORDENADOR: PC IBM compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- 25 (D) PROGRAMA: PatentIn Release #1.0, versión #1.30 (EPA)

(2) DATOS PARA LA SEQ ID NO: 1:

- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 32 pares de bases
- (B) CLASE: nucleótido
- 35 (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

40 CGCGGCGGAT CCCAGGGAGC TGGGTTGACC GG 32

(2) DATOS PARA LA SEQ ID NO: 2:

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 38 pares de bases
- (B) CLASE: nucleótido
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- 50 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

55 GGCCGCGAAT TCTCCGCGCC TGGCCGGGGT CCCTCAGC 38

(2) DATOS PARA LA SEQ ID NO: 3:

- 60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 36 pares de bases
- (B) CLASE: nucleótido
- (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria
- 65 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

ES 2 281 133 T3

CGCGGCGGAT CCTCTCCTCC CTCCCAAGCT GCAATC

36

(2) DATOS PARA LA SEQ ID NO: 4:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) CLASE: nucleótido

10 (C) TIPO DE CADENA: monocatenaria

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

15 GGCCGCGAAT TCTAGAACAG ATAGCCAGGC TGAGAG

36

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65