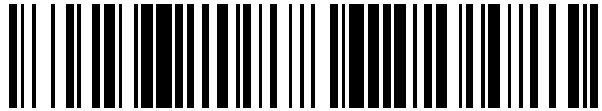


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 507 665**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/90** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2003 E 03785683 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014 EP 1565562**

54 Título: **Recombinación de ADN específica de secuencia en células eucariotas**

30 Prioridad:

**28.11.2002 CA 2413175**  
**05.12.2002 US 310695**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.10.2014**

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA GMBH & CO.  
KG (50.0%)**  
**Binger Strasse 173**  
**55216 Ingelheim am Rhein, DE y**  
**DRÖGE, PETER (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DRÖGE, PETER y**  
**ENENKEL, BARBARA**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 507 665 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

Recombinación de ADN específica de secuencia en células eucariotas

5 **[0001]** La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* para expresar al menos un gen de interés que codifica para uno o más producto(s)/polipéptido(s) deseado(s) en una célula eucariota, que comprende la introducción en una célula de un primer ADN que comprende una secuencia nucleotídica que contiene al menos una secuencia de recombinación, la introducción en el interior de una célula de un segundo ADN que comprende una secuencia nucleotídica que contiene al menos una secuencia de recombinación adicional y la realización de la  
10 recombinación específica de secuencia por una integrasa Int del bacteriófago lambda.

**[0002]** La manipulación controlada de genomas eucarióticos y la expresión de proteínas recombinantes a partir de vectores episómicos son procedimientos importantes para analizar las funciones de genes específicos en organismos vivos. Además, tales manipulaciones tienen importancia en los procedimientos de terapia genética en  
15 medicina. En este contexto, son de importancia particular la generación de animales transgénicos, el cambio de genes o los segmentos de gen (denominado «direccionamiento genético») y la integración dirigida de ADN exógeno en el genoma de eucariotas superiores. Recientemente, estas tecnologías han podido mejorarse por medio de caracterización y aplicación de sistemas de recombinación específica de secuencia.

20 **[0003]** Además, la integración específica de secuencia de casetes (secuencias cortas) de expresión, que codifican y expresan un polipéptido/producto deseado en el genoma de células anfitrionas pertinentes biotecnológicas, también adquiere más significación para la producción de sustancias biofarmacéuticas. El nivel de expresión para un polipéptido deseado en una estirpe celular transformada estable depende del sitio de integración. Mediante integración específica de secuencia, es posible utilizar preferentemente una alta actividad de transcripción.  
25 El procedimiento convencional para generar estirpes celulares de producción que expresan un polipéptido/producto deseado se basa en la integración aleatoria del vector de expresión recombinante en el genoma de la célula anfitriona. Las variaciones en el nivel de expresión de los genes integrados de interés en estirpes celulares transformadas estables se atribuye principalmente a diferencias en las ubicaciones cromosómicas y el número de copias. La integración aleatoria en la proximidad de la heterocromatina tiene como resultado niveles variables de  
30 expresión del transgén. Se cree que las ubicaciones del cromosoma que promueve la expresión de uno o varios de los genes integrados de interés son regiones transcripcionalmente activas de eucromatina. Esta condición aleatoria de la integración provoca una gran diversidad en la robustez, productividad y calidad de las células recombinantes, lo que obliga a realizar procesos elaborados de detección y separación sistemáticos (cribado) para identificar y aislar un clon celular adecuado que exprese el polipéptido deseado en gran cantidad. Además, la heterogeneidad también  
35 significa que para cada clon debe desarrollarse un procedimiento de producción optimizado, lo que vuelve el desarrollo de una estirpe celular de producción adecuada un proceso que consume tiempo, que requiere trabajo y que es costoso.

**[0004]** Las ADN recombinasas específicas de secuencia conservadoras se han dividido en dos familias. Los  
40 miembros de la primera familia, la denominada familia de «integrasas», catalizan la separación y la unión nuevamente de cadenas de ADN entre dos secuencias nucleotídicas definidas, las cuales se denominarán en lo sucesivo secuencias de recombinación. Las secuencias de recombinación pueden estar en dos moléculas de ADN diferentes o sobre una molécula de ADN, lo que se traduce en recombinación intermolecular e intramolecular, respectivamente. Para recombinación intramolecular, el resultado de la reacción depende de la orientación  
45 respectiva de las secuencias de recombinación entre sí. En el caso de una orientación invertida, es decir opuesta, de las secuencias de recombinación, se produce inversión de los segmentos de ADN que se encuentran entre las secuencias de recombinación. En el caso de secuencias repetidas directas, es decir, repeticiones en tándem de las secuencias de recombinación sobre un ADN sustrato, se produce la supresión. En el caso de la recombinación intermolecular, es decir, ambas secuencias de recombinación se localizan en dos moléculas de ADN diferentes, se  
50 puede producir la fusión de las dos moléculas de ADN. Aunque los miembros de la familia de las integrasas habitualmente catalizan la recombinación tanto intramolecular como intermolecular, las recombinasas de la segunda familia de las denominadas «invertasas/resolvasas» son únicamente capaces de catalizar la recombinación intramolecular.

55 **[0005]** Actualmente, las recombinasas que se utilizan para la manipulación de genomas eucarióticos pertenecen a la familia de las integrasas. Tales recombinasas son las recombinasas Cre del bacteriófago *P1* y la recombinasa Flp de levadura (Müller, U. (1999) *Mech. Develop.*, 82, pp. 3). Las secuencias de recombinación a las cuales se une la recombinasa Cre se denominan *loxP*. *LoxP* es una secuencia nucleotídica de 34 pares de base de longitud que consiste en dos secuencias nucleotídicas invertidas de 13 pares de bases de longitud y un separador

de 8 pares de bases de longitud que se encuentra entre las secuencias invertidas (Hoess, R. y cols. (1985) J. Mol. Biol., 181, pp. 351). Las secuencias de unión denominadas *FRT* para Flp se construyen de manera similar. No obstante, difieren de *loxP* (Kilby, J. y cols. (1993) Trends Genet., 9, pp. 413). Por lo tanto, las secuencias de recombinación no se pueden sustituir entre sí, es decir, Cre no es capaz de recombinar secuencias *FRT* y FLP no es capaz de recombinar secuencias *loxP*. Ambos sistemas de recombinación son activos sobre distancias grandes, es decir, el segmento de ADN que se va a invertir o suprimir y flanqueado por dos secuencias *loxP* o *FRT* puede ser de varias 10 000 pares de base de longitud.

**[0006]** Por ejemplo, una recombinación específica de tejido en un sistema de ratón, un desplazamiento cromosómico en plantas y animales y una inducción controlada de la expresión del gen se obtuvieron con los dos sistemas; revítese el artículo de Müller, U. (1999) Mech. Develop., 82, pp. 3. La ADN polimerasa  $\beta$  se suprimió en tejidos particulares en ratones de esta manera; Gu, H, y cols. (1994) Science, 265, pp. 103. Un ejemplo adicional es la activación específica del oncogén del ADN del virus de tumor SV40 en los cristalinos de ratón, que conduce a la formación de tumor exclusivamente en esos tejidos. Asimismo, se ha utilizado la estrategia Cre-*loxP* en relación con promotores inducibles. Por ejemplo, la expresión de la recombinasa se reguló con un promotor inducible por interferón, lo que condujo a la supresión de un gen específico en el hígado y no (o únicamente en un bajo grado) en otros tejidos; Kühn, R. y cols. (1995) Science, 269, pp.1427.

**[0007]** Hasta ahora se han utilizado tres miembros de la familia invertasa/resolvasa para la manipulación de genomas eucarióticos. Un mutante del bacteriófago Mu invertasa Gin puede catalizar la inversión de un fragmento de ADN en protoplastos vegetales sin cofactores. No obstante, se ha descubierto que este mutante es hiperrecombinogénico, es decir, cataliza las separaciones de la cadena de ADN también en otras secuencias diferentes a las secuencias de recombinación natural. Esto lleva a sucesos de recombinación parcialmente mortales no deseados en los genomas de protoplasto de planta. La recombinasa  $\beta$  de *Streptococcus pyogenes* cataliza la recombinación en cultivos de célula de ratón entre dos secuencias de recombinación como secuencias repetidas directas, lo que conduce a la escisión del segmento. No obstante, simultáneamente con la supresión, también se ha detectado la inversión, lo que hace que el uso controlado del sistema para la manipulación de genomas eucarióticos resulte inadecuado. Se ha demostrado que los mutantes de la resolvasa  $\gamma\delta$  de *E. coli* son activos en secuencias de recombinación genómicas episómicas e introducidas artificialmente, pero la eficacia de esta última reacción aún es bastante baja.

**[0008]** La manipulación de genomas eucarióticos con la recombinasa Cre y Flp, respectivamente, muestra desventajas significativas. En caso de supresión, es decir, la recombinación de dos secuencias de recombinación *loxP* o *FRT* repetidas en tándem en un genoma, existe una pérdida irreversible del segmento de ADN que se encuentra entre las secuencias repetidas en tándem. De esta manera, un gen que se localice en este segmento de ADN se perderá permanentemente para la célula y el organismo. Por lo tanto es imposible la reconstrucción del estado original para un nuevo análisis de la función del gen, es decir, en una etapa de desarrollo posterior del organismo. La pérdida irreversible del segmento de ADN causada por la supresión se puede evitar mediante una inversión del segmento de ADN respectivo. Se puede inactivar un gen mediante una inversión sin que se pierda y se puede activar nuevamente en una etapa de desarrollo posterior o en el animal adulto por medio de una expresión regulada en tiempo de la recombinasa mediante una retrorrecombinación. No obstante, el uso de recombinasas tanto Cre como FLP en este procedimiento modificado tiene la desventaja de que la inversión no se puede regular, dado que las secuencias de recombinación no se alterarán como resultado del suceso de recombinación. Por lo tanto, los sucesos de recombinación repetida que se presentan provocan la inactivación del gen respectivo debido a la inversión del segmento de ADN respectivo únicamente en algunas, y en el mejor de los casos en el 50 %, de las células diana en el equilibrio de la reacción. Se han realizado esfuerzos destinados a resolver este problema, al menos en parte, mediante la construcción de secuencias *loxP* mutadas, las cuales no se pueden utilizar para reacción adicional después de una recombinación sencilla. No obstante, la desventaja es la condición única de la reacción, es decir, no existe activación subsecuente por retrorrecombinación después de la inactivación del gen por inversión.

**[0009]** Una desventaja adicional de la recombinasa Flp es su estabilidad térmica reducida a 37 °C, y de esta manera se limita significativamente la eficacia de la reacción de recombinación en eucariotas superiores, p. ej., en ratones con una temperatura corporal de aproximadamente 39 °C. No obstante, incluso estas enzimas Flp mutantes aún muestran una eficacia de recombinación menor en comparación con la recombinasa Cre.

**[0010]** Un uso adicional de las recombinasas específicas de secuencia se encuentra en el campo médico, por ejemplo en la genoterapia, en donde las recombinasas integran un segmento de ADN deseado en el genoma de una célula diana humana respectiva de una manera estable y controlada. Tanto Cre como Flp pueden catalizar la

recombinación intermolecular. Ambas recombinasas recombinan un ADN plasmídico que presenta una copia de su secuencia de recombinación respectiva con una secuencia de recombinación correspondiente la cual ha sido insertada anteriormente dentro del genoma eucariótico por medio de recombinación homóloga. No obstante, es deseable que esta reacción incluya una secuencia de recombinación que se presenta de manera «natural» en el genoma eucariótico. Debido a que *loxP* y *FRT* tienen una longitud de 34 y 54 nucleótidos, respectivamente, es estadísticamente improbable la presentación de coincidencias exactas de estas secuencias de recombinación como parte del genoma. Incluso si estuviera presente una secuencia de recombinación, aún existe la desventaja de la reacción inversa mencionada anteriormente, es decir, las recombinasas tanto Cre como Flp pueden cortar el segmento de ADN insertado después de la integración satisfactoria por recombinación intramolecular.

10 **[0011]** Por lo tanto, un problema de la presente invención consiste en dar a conocer un sistema de recombinación sencillo y controlable y el medio de elaboración necesario. Un problema adicional de la presente invención consiste en el desarrollo de un sistema de recombinación y el medio de elaboración necesario, lo cual se puede llevar a cabo en una integración estable y dirigida de la secuencia de ADN deseada. Tal sistema de recombinación se da a conocer en el documento WO 01/16345. WO 01/16345 da a conocer dicho procedimiento de recombinación de ADN específica de secuencia en una célula eucariota para dos propósitos: en primer lugar, para la manipulación controlada de genomas eucariotas para la investigación de las funciones de genes específicos en los organismos vivos y, en segundo lugar, para procedimientos terapéuticos genéticos en medicina. WO 01/16345 no describe que dicho procedimiento de recombinación específica de secuencia se pueda usar para la producción a gran escala de polipéptidos terapéuticos. Y mucho menos, WO 01/16345 no da a conocer ninguna característica que permita usar el procedimiento de recombinación específica de secuencia para dicha producción a gran escala de polipéptidos terapéuticos. Por consiguiente, un problema adicional de la presente invención consiste en desarrollar procedimientos que permitan la generación de un sistema de expresión de proteínas mejorado sobre la base de uno de estos sistemas de recombinación.

25 **[0012]** Tales problemas quedan resueltos por el objeto caracterizado en las reivindicaciones.

**[0013]** La invención se describe con más detalle con las siguientes ilustraciones.

30 La figura 1 muestra una presentación esquemática de las reacciones de recombinación, específicamente la integración y la escisión, catalizados por la integrasa Int natural. Se muestra un ADN plasmídico superhelicoidal (parte superior) que presenta una copia de la secuencia de recombinación *attP*. *attP* consta de cinco denominados sitios de unión a brazo para Int (P1, P2, P1', P2', P3'), dos sitios de unión Int a núcleo (C y C'; marcados con flechas negras), tres sitios de unión para IHF (H1, H2, H'), dos sitios de unión para Xis (XI, X2) y la denominada región de superposición (rectángulo abierto), en donde se lleva a cabo el intercambio de cadena de ADN propiamente dicho. La secuencia asociada natural para *attP*, *attB* se muestra sobre un segmento de ADN lineal en la parte inferior y consiste de dos sitios de unión a núcleo para Int (B y B'; marcados con flechas abiertas) y una región de superposición. Para la recombinación entre *attB* y *attP*, son necesarios Int e IHF, lo que lleva a la integración del plásmido en el segmento de ADN que presenta *attB*. De esta manera, se forman dos secuencias de recombinación híbridas nuevas, *attL* and *attR*, las cuales sirven como secuencias objetivo para la escisión. En la situación natural, esta última reacción requiere Int e IHF, y un cofactor adicional XIS codificado por el fago lambda.

45 La figura 2 muestra reacciones de recombinación intermoleculares. (A) Recombinación integrante intramolecular (*attB* x *attP*). (B) Recombinación integrante intermolecular (*attB* x *attP*). (C) Recombinación escisional intramolecular (*attL* x *attR*). (D) Recombinación escisional intermolecular (*attL* x *attR*). Los vectores del sustrato y los productos de recombinación esperados se esquematizan en la parte superior de cada panel. La fracción de células que expresan GFP se determinó por FACS en tres puntos en el tiempo después de la cotransfección del sustrato y los vectores de expresión. Se muestran valores medios de tres ensayos, estando indicadas las desviaciones estándar por las líneas verticales.

50 La figura 3 muestra que la presencia de secuencias de ADN unión a brazo de Int en los sitios *att* estimula la recombinación intermolecular. (A) Pares de vectores de sustrato para recombinación intermolecular contienen ya sea *attB* o *attP* en diferentes combinaciones y generan productos que expresan GFP activados por el promotor de CMV. (B) Diversas combinaciones de vectores de sustrato se cotransfectaron con vectores de expresión para Int natural, Int-h mutante o Int-h/218. A las 48 h se analizaron las células por FACS y se determinó la proporción de células que expresan GFP para dos pares de sustratos. La recombinación entre *attP* y *attP* sirvió como referencia, como se ha indicado. Se muestran valores medios de tres ensayos, estando indicadas las desviaciones estándar por las líneas verticales. Los valores medios reales de células que expresan GFP (%) para Int fueron 0,08 (B x B), 1,24 (P x P) y 0,81 (P x B). Los correspondientes a Int-h fueron: 1,15 (B x B), 8,07 (P x P) y 9,90 (P x B). Los

correspondientes a Int-h/218 fueron: 4,01 (B x B), 17,62 (P x P) y 16,45 (P x B).

La figura 4 muestra que la proteína IHF purificada estimula la recombinación integrante intramolecular e intermolecular por Int natural. (A) representación esquemática de vectores de sustrato que se incubaron con o sin IHF antes de su transfección en células HeLa que expresan de manera transitoria Int natural o Int-h. (B) a las 48 horas después de la transfección, las fracciones de células que expresan GFC se analizaron por FACS. Se representa gráficamente la proporción de estas fracciones como activación de recombinación por IHF. La gráfica muestra los valores medios de tres ensayos con desviaciones estándar indicados por líneas verticales. Los valores medios reales de células que expresan GFP (%) en presencia y ausencia de IHF, respectivamente, fueron, para Int (7,93/1,26) y para Int-h (17,57/13,14) en el caso de recombinación intramolecular, y para Int (13,94/3,47) e Int-h (20,33/16,83) al analizar la recombinación intermolecular.

La figura 5 muestra esquemáticamente ejemplos de diseños de vector de expresión para la recombinación de ADN específico de secuencia en células CHO-DG44. El término «P/E» significa una unidad compuesta que contiene un elemento mejorador y un promotor, «P» indica un elemento promotor y «T» indica un sitio de terminación de transcripción requerido para la poliadenilación del ARN mensajero transcrito. «GOI» se refiere a un gen de interés, «dhfr» a un marcador seleccionable amplificable de dihidrofolato reductasa, «FP» a una proteína fluorescente tal como ZsGreen y «npt» a un marcador seleccionable de neomicina fosfotransferasa. Una flecha indica el sitio de inicio de transcripción dentro de una unidad de transcripción. La recombinación específica de secuencia entre el sitio de recombinación *attP* o *attB* que se localiza en el primer ADN y el sitio de recombinación *attP* o *attB* que se localiza en el segundo ADN se muestra con una cruz y está mediado por la integrasa de bacteriófago lambda. El término «*att*» se refiere a los sitios de unión que resultan de la recombinación mostrada a título de ejemplo entre *attP* y *attP*, *attP* y *attB*, *attB* y *attP*, o *attB* y *attB* que se localizan en el primer y segundo ADN, respectivamente.

**[0014]** Los términos «transformación» o «transformar», «transfección» o «transfectar», como se utilizan en este documento, significa cualquier introducción de una secuencia de ácido nucleico en el interior de una célula, lo que tiene como resultado células modificadas genéticamente, recombinantes, transformadas o transgénicas. La introducción se puede realizar por cualquier procedimiento bien conocido en la técnica y descrito, p. ej., en Sambrook, J. y cols. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York o Ausubel, F.M. y cols. (actualizado en 1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. Los procedimientos incluyen, entre otros, lipofección, electroporación, transfección por poliacetato (tal como la mediada por DEAE-dextrano), fusión de protoplastos, infecciones virales y microinyección, o se puede llevar a cabo por medio del procedimiento de calcio, el procedimiento de electrochoque, inyección intravenosa/intramuscular, inhalación de aerosol o inyección de un ovocito. La transformación puede tener como resultado una transformación transitoria o estable de las células anfitrionas. El término «transformación» o «transformar» también significa la introducción de una secuencia de ácido nucleico viral de una manera que es la natural para el virus respectivo. La secuencia de ácido nucleico viral no necesita estar presente como una secuencia de ácido nucleico desnudo sino que se puede empaquetar en una envoltura de proteína viral. Por lo tanto, el término se relaciona no solo con el procedimiento que habitualmente se conoce con el término «transformación» o «transformar». Se favorecen procedimientos de transfección que proporcionan una frecuencia óptima de transfección y expresión del ácido nucleico introducido. Los procedimientos adecuados se pueden determinar por procedimientos sistemáticos. Para los transfectantes estables, las construcciones (plásmido recombinantes) se integran en el genoma de la célula anfitriona o un cromosoma/minicromosoma artificial o bien se localizan episómicamente de manera que se mantienen establemente dentro de la célula anfitriona.

**[0015]** El término «secuencias de recombinación», como se utiliza en este documento, se relaciona con las secuencias de *attB*, *attP*, *attL* y *attR* y derivados de las mismas. Un ejemplo de una secuencia *attB* se especifica en SEQ ID n.º 13, un ejemplo de una secuencia *attP* se especifica en la SEQ ID n.º 14, un ejemplo de una secuencia *attL* se especifica en la SEQ ID n.º 15 y un ejemplo de una secuencia *attR* se especifica en la SEQ ID n.º 16.

**[0016]** El término «derivado» como se utiliza en este documento, se relaciona con secuencias de *attB*, *attP*, *attL* y *attR* que tienen una o más sustituciones, preferiblemente siete, de manera más preferible dos, tres, cuatro, cinco o seis en la región de superposición o en la región de núcleo, en contraste con las secuencias *attB*, *attP*, *attL* y *attR* que se presentan de manera natural. El término «derivado» también se relaciona con por lo menos un sitio de unión Int a núcleo de *attB*, *attP*, *attL* o *attR*. El término «derivado» también se relaciona con por lo menos un sitio de unión Int a núcleo de *attP*, *attL* o *attR* más una o más copias de sitio unión a brazo para Int. El término «derivado» también se relaciona con por lo menos un sitio de unión Int a núcleo de *attP*, *attL* o *attR* más una o más copias de los sitios de unión de factor IHF, FIS o XIS. El término «derivado» también se relaciona con una combinación de estas

características. Además, el término «derivado» se relaciona con cualquier fragmento funcional del mismo y con secuencias nucleotídicas endógenas en células eucariotas que soportan la recombinación específica de secuencia, p. ej., *attH* identificada en el genoma humano (véase, p. ej., WO 01/16345). El término «derivado» en general incluye las secuencias *attB*, *attP*, *attL* o *attR* adecuadas para llevar a cabo el uso propuesto de la presente invención, lo que  
5 significa que la secuencia media sucesos de recombinación específica de secuencia activados por una integrasa (naturaleza o modificada) del bacteriófago lambda.

**[0017]** El término «fragmento funcional» se relaciona con secuencias *attB*, *attP*, *attL* y *attR* que tienen sustituciones, supresiones o inserciones (que incluye la presencia o ausencia de sitios de unión de proteína natural o  
10 modificadas), las cuales no afectan significativamente al uso de dichas secuencias en los sucesos de recombinación activados por una integrasa natural o modificada del bacteriófago lambda. La funcionalidad no se ve afectada de manera significativa cuando la frecuencia de recombinación es de al menos aproximadamente el 70 %, de manera preferente al menos aproximadamente el 80 %, de manera más preferente aproximadamente el 90 %, y de manera más preferente adicional al menos aproximadamente el 95 %, y de manera mucho más preferente más de  
15 aproximadamente el 100 % en comparación con las secuencias de recombinación correspondientes que existen en la naturaleza utilizando la misma recombinasa en las mismas condiciones (por ejemplo uso *in vitro* o *in vivo*, un tipo de célula anfitriona idéntica, condiciones de transfección idénticas, presencia o ausencia de los mismos factores del anfitrión, las mismas condiciones de tampón, temperatura idéntica, etc.). De manera alternativa, las sustituciones, supresiones o inserciones de las secuencias *attB*, *attP*, *attL* y/o *attR* confieren al menos una mejora de los sucesos  
20 de recombinación activados por la integrasa natural o modificada del bacteriófago lambda, por lo que la mejora puede consistir, p. ej., en: (i) incrementar la eficacia de sucesos de recombinación (integración y/o escisión), (ii) incrementar la especificidad de recombinación, (iii) favorecer sucesos de recombinación escisionales, (iv) favorecer sucesos de recombinación integrantes, (v) liberar de los requerimientos para algunos o todos los factores del anfitrión, en comparación con las secuencias de recombinación correspondientes que existen en la naturaleza  
25 utilizando la misma recombinasa en las mismas condiciones (véase más arriba).

**[0018]** La funcionalidad de los sitios de recombinación modificados o de la integrasa modificada se pueden demostrar de manera que dependen de la característica particular deseada y se conocen en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo de cotransfección como se describe en la presente invención (véanse los resultados 5.1  
30 o el ejemplo 3 de WO 01/16345) para caracterizar la recombinación mediada por integrasa de ADN extracromosómico en una diversidad de estirpes celulares. Brevemente, las células se cotransfectan con un vector de expresión que codifica para la proteína integrasa y un sustrato vector que es un sustrato para la recombinasa, que codifica para un gen indicador funcional/no funcional (p. ej., una proteína fluorescente como GFP) y que contiene al menos una secuencia de recombinación en la misma. Tras la expresión de la integrasa por el vector de  
35 expresión, la función del gen indicador se volverá no funcional/funcional. Por lo tanto, la actividad de recombinación se puede analizar ya sea por recuperación del sustrato vector recombinado y buscando evidencias de la recombinación a nivel de ADN (por ejemplo realizando una PCR, análisis de secuencia de la región recombinada, análisis de enzima de restricción, análisis de transferencia Southern) o buscando evidencias de la recombinación a nivel de proteína (p. ej., ELISA, transferencia Western, radioinmunoensayo, inmunoprecipitación, inmunotinción,  
40 análisis FACS de proteínas fluorescentes).

**[0019]** El término «región de superposición» como se utiliza en este documento define la secuencia de las secuencias de recombinación en donde se lleva a cabo un intercambio de cadena de ADN, incluyendo separación y  
45 unión nuevamente de la cadena, y se relaciona con una secuencia de ADN de consenso 5'-TTTATAC-3' en sitios *att* naturales o dicha secuencia con sustituciones nucleotídicas funcionales. El único prerrequisito es que la secuencia de la región de superposición sea idéntica entre secuencias asociadas recombinantes.

**[0020]** El término «sitio de unión de núcleo» se relaciona con dos copias repetidas de manera imperfecta en una orientación invertida, separadas por la región de superposición en cada conjunto de sitios *att* naturales. Los sitios de  
50 unión de núcleo son esenciales para la recombinación por unión de la integrasa a baja afinidad. Cada sitio de unión de núcleo consiste en nueve pares de bases contiguos y se relaciona con secuencias de ADN que consiste en la secuencia B de la secuencia nucleotídica 5'-CTGCTTTTT-3', para la secuencia B' de la secuencia nucleotídica 5'-CAAGTTAGT-3' (cadena complementaria inversa), para la secuencia C de la secuencia nucleotídica 5'-CAGCTTTTT-3' y para la secuencia C' de la secuencia nucleotídica 5'-CAACTTAGT-3' (cadena complementaria  
55 inversa) en sitios *att* naturales o dichas secuencias con sustituciones nucleotídicas funcionales.

**[0021]** El término «sitio de unión a brazo para Int» o «sitios de unión a brazo», como se utilizan en este documento, se relacionan con la secuencia de consenso 5'-C/AAGTCACTAT-3' o la secuencia que tiene sustituciones nucleotídicas funcionales. El sitio de unión a brazo para Int se puede colocar a diversas distancias

aguas arriba o aguas arriba del(de los) sitio(s) de unión Int a núcleo.

**[0022]** El término «homólogo» u «homólogos» o «similar» como se utiliza en este documento con respecto a las secuencias de recombinación, sitios de unión a brazo y sitios de unión de factor de anfitrión se relacionan con una secuencia de ácido nucleico que es idéntica en aproximadamente el 70 %, preferentemente en aproximadamente el 80 %, de manera más preferente en aproximadamente el 85 %, de manera mucho más preferente en aproximadamente el 90 %, de manera aún más preferente en aproximadamente el 95 % y de manera mucho más preferente en aproximadamente el 99 % de las secuencias de recombinación que se encuentran en la naturaleza, los sitios de unión a brazo y los sitios de unión de factor de anfitrión. Con el término homólogo o similar se consideran secuencias las cuales, p. ej., utilizando parámetros estándar en el algoritmo de similitud BLAST o NCBI (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul y cols., Journal of Molecular Biology 215, 403-410 (1990)) muestran una probabilidad de  $P < 10^{-5}$  cuando se comparan con las secuencias de recombinación.

**[0023]** El término «vector», como se utiliza en este documento, se relaciona con construcciones (plásmidos recombinantes) que se encuentran en la naturaleza o generados sintéticamente para captación, proliferación, expresión o transmisión de ácidos nucleicos en una célula, p. ej., plásmidos, fagémidos, cósmidos, cromosomas artificiales/minicromosomas, bacteriófagos, virus o retrovirus. Los procedimientos utilizados para construir vectores son bien conocidos por los expertos en la materia y se describen en diversas publicaciones. En particular las técnicas para construir vectores adecuados incluyen una descripción de los componentes funcionales y reguladores tales como promotores, mejoradores, señales de terminación y poliadenilación, marcadores de selección, orígenes de replicación y señales de empalme, se revisan con detalle considerable en Sambrook, J. y cols. (1989), más arriba, y las referencias citadas allí. Los vectores de expresión eucarióticos típicamente contendrán también secuencias procarióticas que faciliten la propagación del vector en la bacteria tal como un origen de replicación o genes de resistencia a antibióticos para selección en bacterias. Una diversidad de vectores de expresión eucarióticos que contienen un sitio de clonación en el cual se puede enlazar operativamente un polinucleótido son bien conocidos en la técnica y algunos están disponibles comercialmente de compañías tales como Stratagene, La Jolla, CA; Invitrogen, Carlsbad, CA; Promega, Madison, WI o BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA.

**[0024]** Los términos «gen de interés», «secuencia deseada» o «gen deseado», como se utilizan en este documento, tienen el mismo significado y se refieren a una secuencia polinucleotídica de cualquier longitud que codifica para un producto de interés. La secuencia seleccionada puede ser de longitud completa o un gen truncado, un gen de fusión o marcado y puede ser ADNc, ADN genómico o un fragmento de ADN, preferentemente ADNc. Puede ser una secuencia nativa, es decir, formas que se presentan en la naturaleza o puede estar mutado o modificado de alguna otra manera; según se desee. Estas modificaciones incluyen optimizaciones de codones para optimizar el uso de codones en la célula anfitriona seleccionada, humanización o marcado. La secuencia seleccionada puede codificar para un polipéptido secretado, citoplásmico, nuclear, unido a membrana o de superficie celular. El término «producto de interés» incluye proteínas, polipéptidos, fragmentos de los mismos, péptidos, ARN antisentido todos los cuales se pueden expresar en la célula anfitriona seleccionada.

**[0025]** El término «secuencia de ácido nucleico», «secuencia nucleotídica» o «secuencia de ADN», como se utiliza en este documento, se refiere a un oligonucleótido, nucleótido o polinucleótido y fragmentos y porciones del mismo y a ADN o ARN de origen genómico o sintético, el cual puede ser de cadena sencilla o doble y representar una cadena transcrita (directa, sentido) o complementaria (antisentido). La secuencia puede ser una secuencia no codificante, una secuencia codificante o una mezcla de ambas. Los polinucleótidos de la invención incluyen regiones de ácido nucleico en donde uno o más codones han sido sustituidos por sus sinónimos.

**[0026]** Las secuencias de ácido nucleico de la presente invención se pueden preparar utilizando técnicas estándar bien conocidas por los expertos en la materia. El término «que codifica» o «codificante» se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un ácido nucleico, tales como un gen en cromosoma o un ARNm, que sirven como plantillas para las síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (es decir, ARNr, ARNt u otras moléculas de ARN) o aminoácidos y las propiedades biológicas que resultan de los mismos. Por lo tanto, un gen codifica para una proteína si la transcripción y traducción del ARNm producido por dicho gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, la secuencia nucleotídica de la cual es idéntica a la secuencia de ARNm y habitualmente se proporciona en listas de secuencias así como la cadena no codificante, utilizada como la plantilla para la transcripción de un gen o ADNc, se pueden denominar codificante de la proteína u otro producto de dicho gen o ADNc. Un ácido nucleico que codifica para una proteína incluye ácidos nucleicos que tienen secuencias nucleotídicas diferentes pero que codifican para la misma secuencia de aminoácidos de la proteína debido a la degeneración del código genético. Los ácidos nucleicos y las secuencias nucleotídicas que codifican para proteínas

pueden incluir intrones.

**[0027]** El término «polipéptido» se utiliza de manera intercambiable con las secuencias de residuos de aminoácidos o proteínas y se refiere a polímeros o aminoácidos de cualquier longitud. Estos términos también incluyen proteínas que son modificadas después de la traducción mediante reacciones que incluyen, entre otras, glucosilación, acetilación, fosforilación o procesamiento de proteínas. Se pueden realizar modificaciones y cambios, por ejemplo fusiones a otras proteínas, sustituciones, supresiones o inserciones en la secuencia de aminoácidos, en la estructura de un polipéptido mientras la molécula mantenga su actividad funcional biológica. Por ejemplo, ciertas sustituciones en la secuencia de aminoácidos se pueden realizar en un polipéptido o en su secuencia codificante de ácido nucleico subyacente y se puede obtener una proteína con propiedades similares. Se pueden preparar modificaciones de aminoácidos, por ejemplo, realizando mutagénesis específica de sitio o mutagénesis mediada por reacción en cadena de polimerasa sobre su secuencia de ácido nucleico subyacente.

**[0028]** El término «expresión» como se utiliza en este documento se refiere a la transcripción y/o traducción de una secuencia heteróloga de ácido nucleico dentro de una célula anfitriona. El nivel de expresión de un producto deseado en una célula anfitriona se puede determinar sobre la base de la cantidad de ARNm correspondiente que está presente en la célula o de la cantidad del polipéptido deseado codificado por la secuencia seleccionada. Por ejemplo, el ARNm transcrito de una secuencia seleccionada se puede cuantificar por hibridación de transferencia Northern, protección de ARN de ribonucleasa, hibridación in situ a ARN celular o por PCR (véase Sambrook, y cols. (1989), más arriba; Ausubel, F.M. y cols. (actualizada en 1994), más arriba). Las proteínas codificadas por una secuencia seleccionada se pueden cuantificar por diversos procedimientos, p. ej., por ELISA, por transferencia Western, por radioinmunoensayos, por inmunoprecipitación, realizando ensayos para determinar la actividad biológica de la proteína o por inmunotinción de la proteína seguida por PCR y análisis FACS (véase Sambrook, J. y cols. (1989), más arriba; Ausubel, F.M. y cols. (actualizada en 1994), más arriba).

**[0029]** Un «casete de expresión» define una región dentro de una construcción (plásmido recombinante) que contiene uno o más genes que se van a transcribir, en donde los genes contenidos dentro del segmento están unidos operativamente entre sí y se transcriben desde un promotor simple, y como resultado, los diferentes genes están enlazados al menos transcripcionalmente. Se puede transcribir y expresar desde cada unidad de transcripción más de una proteína o producto. Cada unidad de transcripción comprenderá los elementos reguladores necesarios para la transcripción y traducción de cualquier secuencia seleccionada que esté contenida dentro de la unidad.

**[0030]** El término «enlazado operativamente» significa que dos o más secuencias de ácido nucleico o elementos de secuencia se colocan de manera tal que permitan que funcionen de la manera que se desea. Por ejemplo, un promotor y/o mejorador está unido operativamente a una secuencia codificante si actúa en cis para controlar o modular la transcripción de la secuencia enlazada. De manera general, aunque no necesariamente, las secuencias de ADN que están unidas operativamente son contiguas y, cuando es necesario, se unen a dos regiones codificantes proteínicas o en el caso de un líder secretor, contiguas en una fase de lectura.

**[0031]** El término «gen marcador de selección» se refiere a un gen que solo permite seleccionar específicamente la presencia o ausencia de células que transporten el gen en presencia de un agente de selección correspondiente. A modo de ilustración, se puede utilizar un gen de resistencia a antibióticos como gen marcador seleccionable positivo que permite que la célula anfitriona transformada con el gen sea seleccionada positivamente en presencia del antibiótico correspondiente; una célula anfitriona no transformada no será capaz de crecer o sobrevivir en las condiciones de cultivo seleccionadas. Los marcadores seleccionables pueden ser positivos, negativos o bifuncionales. Los marcadores seleccionables positivos permiten seleccionar células que transporten el marcador al conferir resistencia a un medicamento o compensar un defecto metabólico o catabólico en la célula anfitriona. Por el contrario, los marcadores de selección negativos permiten eliminar selectivamente las células que transporten el marcador. Por ejemplo, utilizando el gen HSV-tk como marcador provocará que las células se vuelvan sensibles a agentes tales como aciclovir y ganciclovir. Los genes marcadores seleccionables utilizados en este documento, incluyendo los genes seleccionables amplificables, incluyen mutantes sometidos a ingeniería de manera recombinante y variantes, fragmentos, equivalentes funcionales, derivados, homólogos y fusiones del gen marcador seleccionable nativo en la medida en que el producto codificado retenga la propiedad seleccionable. En general, los derivados útiles tienen una similitud de secuencia sustancial (a nivel de aminoácidos) en regiones o dominios del marcador seleccionable asociados a la propiedad seleccionable. Se ha descrito una diversidad de genes marcadores que incluyen marcadores bifuncionales (es decir, positivo/negativo) (véase, p. ej., WO 92/08796 y WO 94/28143), incorporados como referencia en este documento. Por ejemplo, los genes seleccionables utilizados comúnmente con células eucariotas incluyen los genes para aminoglucósido fosfotransferasa (APH), higromicina fosfotransferasa (HYG), dihidrofolato reductasa (DHFR), timidina cinasa (TK), glutamina sintetasa, asparagina



sintetasa y genes que codifican para resistencia a neomicina (G418), puromicina, histidinol D, bleomicina y fleomicina.

5 **[0032]** La selección también se puede realizar por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés) utilizando, por ejemplo, un marcador de superficie celular, una  $\beta$ -galactosidasa bacteriana o proteínas fluorescentes (p. ej., proteínas fluorescentes verdes (GFP, por sus siglas en inglés) y sus variantes de *Aequorea victoria* y *Renilla reniformis* u otras especies; proteínas fluorescentes rojas, proteínas fluorescentes y sus variantes a partir de especies no bioluminiscentes (p. ej., los géneros *Discosoma*, *Anemonia*, *Clavularia* y *Zoanthus*) para seleccionar para células recombinantes.

10 **[0033]** El término «agente de selección» se refiere a un sustrato que interfiere con el crecimiento o supervivencia de una célula anfitriona que es deficiente en un gen seleccionable particular. Por ejemplo, para seleccionar para la presencia de un gen de resistencia a antibióticos como APH (aminoglucósido fosfotransferasa) en una célula transfectada se utiliza el antibiótico Geneticina (G418).

15 **[0034]** La integrasa (habitualmente y designada en este documento «Int») del bacteriófago K pertenece, al igual que Cre y Fip, a la familia integrasa de la secuencia específica conservadora de las ADN recombinasas. En su función natural, Int cataliza la recombinación integrante entre dos secuencias de recombinación diferentes, específicamente *attB* y *attP*. La secuencia *attB* comprende 21 nucleótidos y originalmente fue aislada del genoma de *E. coli*; Mizuuchi, M. y Mizuuchi, K. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, pp. 3220. Por otra parte, *attP* tiene 243 nucleótidos y es mucho más larga y se encuentra en la naturaleza en el genoma del bacteriófago lambda; Landy, A. y Ross, W. (1977) Science, 197, pp. La recombinasa Int tiene siete sitios de unión en *attP* y dos en *attB*. La función biológica de Int es la integración específica de secuencia del genoma del fago circular en el locus *attB* en el cromosoma de *E. coli*. La integrasa Int necesita un cofactor proteínico, el denominado factor de anfitrión de integración (normalmente denominado en este documento como «IHF») para la recombinación integrante; Kikuchi, Y. Und Nash, H. (1978) J. Biol. Chem., 253, 7149. El factor IHF es necesario para el ensamblado de un complejo de recombinación funcional con *attP*. Un segundo cofactor para la reacción de integración es el ADN negativo superenrollado de *attP*. Finalmente, la recombinación entre *attB* y *attP* lleva a la formación de dos secuencias de recombinación nuevas, específicamente, *attL* y *attR*, las cuales sirven como sustrato y secuencia de reconocimiento para una reacción de recombinación adicional, la reacción de escisión. Un resumen amplio de la integración del bacteriófago lambda se proporciona, p. ej., en Landy, A. (1989) Annu. Rev. Biochem., 58, pp. 913.

25 **[0035]** La escisión del genoma del fago extrayéndolo del genoma bacteriano también está catalizada por la Int recombinasa. Para esto, es necesario un cofactor adicional además de Int e IHF, el cual está codificado por el bacteriófago lambda. Este es la escisionasa (normalmente denominada en este documento como «XIS») que tiene dos sitios de unión en *attR*; Gottesman, M. y Weisberg, R. (1971) The Bacteriophage Lambda, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 113. En contraste con la recombinación integrante, el ADN negativo superenrollado de la secuencia de recombinación no es necesario para recombinación escisional. No obstante, el ADN negativo superenrollado incrementa la eficacia de la reacción de recombinación. Se puede obtener una mejora adicional de la eficacia de la reacción de escisión con un segundo cofactor, específicamente FIS (factor para la estimulación de inversión), el cual actúa junto con XIS; Landy, A. (1989) Annu. Rev. Biochem., 58, pp.913. La escisión es genéticamente la reacción inversa exacta de la integración, es decir, *attB* and *attP* se generan nuevamente. Un resumen amplio de la escisión del bacteriófago lambda se proporciona, p. ej., en Landy, A. (1989) Annu. Rev. Biochem., 58, pp. 913

45 **[0036]** La presente invención se refiere a un procedimiento según se define en la reivindicación 1,

**[0037]** El procedimiento de la presente invención está basado en un procedimiento de recombinación de ADN específica de secuencia en una célula eucariota. Dicho procedimiento de recombinación específica de secuencia puede comprender los pasos siguientes:

- 50 a) introducir una primera secuencia *attB*, *attP*, *attL* o *attR* o un derivado de la misma en una célula,
- b) introducir una segunda secuencia *attB*, *attP*, *attL* o *attR* o un derivado de la misma, o en el que si dicha primera secuencia de ADN comprende una secuencia *attB* o un derivado de la misma, dicha segunda secuencia comprende una secuencia *attB*, *attL* o *attR* o un derivado de la misma, o en el que si dicha primera secuencia de ADN comprende una secuencia *attP*, *attL* o *attR* o un derivado de la misma, o en el que si dicha primera secuencia de ADN comprende una secuencia *attL* o un derivado de la misma, dicha segunda secuencia comprende una secuencia *attB*, *attP* o *attL* o un derivado de la misma, o en el que si dicha primera secuencia de ADN comprende una secuencia *attR* o un derivado

de la misma, dicha segunda secuencia comprende una secuencia *attB*, *attP* o *attR* o un derivado de la misma,

c) realizar la recombinación específica de secuencia por una integrasa Int de bacteriófago lambda.

5 **[0038]** Se prefiere el procedimiento el procedimiento en el que en la etapa c) la recombinación específica de secuencia se realice por Int o por Int y XIS, FIS o IHF. Se prefiere adicionalmente el procedimiento en el que en la etapa c) la recombinación específica de secuencia se realice por Int o por Int y un factor XIS, o por Int e IHF, o por Int y XIS e IHF. Se prefiere adicionalmente un procedimiento en el que en la etapa c) la recombinación específica de secuencia se realice por una Int modificada, preferentemente Int-h o Int-h/218. En este contexto, también está dentro  
10 del significado de la presente invención el uso de Int modificada junto con XIS, FIS y/o IHF.

**[0039]** En una realización más preferente de este procedimiento, la recombinación específica de secuencia de ADN en células eucariotas se realizará en sitios de recombinación idénticos o casi idénticos. Por lo tanto, la presente invención se relaciona con un procedimiento de recombinación específica de secuencia como se describió  
15 anteriormente, en donde la primera secuencia de ADN comprende una secuencia de *attB* o un derivado de la misma, la segunda secuencia comprende también una secuencia de *attB* o un derivado de la misma, o en donde la primera secuencia de ADN comprende una secuencia de *attP* o un derivado de la misma, la segunda secuencia comprende una secuencia de *attP* o un derivado de la misma, o en donde la primera secuencia de ADN comprende una secuencia de *attL* o un derivado de la misma, la segunda secuencia comprende una secuencia de *attL* o un derivado de la misma, o en donde la primera secuencia de ADN comprende una secuencia de *attR* o un derivado de la misma, la segunda secuencia comprende una secuencia de *attR* o un derivado de la misma.  
20

**[0040]** El procedimiento de la presente invención se puede llevar a cabo no solo con las secuencias que se presentan de manera natural de *attB*, *attP*, *attL* y/o *attR* sino también con secuencias modificadas, por ejemplo  
25 sustituidas, de *attB*, *attP*, *attL*, y/o *attR*. Por ejemplo se ha observado una recombinación integrante del bacteriófago lambda y *E. coli* entre secuencias homólogas de *attP* y *attB* (mutantes de las secuencias naturales) las cuales tienen una o más sustituciones en *attB* (Nash, H. (1981) Annu. Rev. Genet., 15, pp. 143; Nussinov, R. y Weisberg, R. (1986) J. Biomol. Struct. Dynamics, 3, pp 1134) y/o en *attP* (Nash, H. (1981) Annu. Rev. Genet., 15, pp.143).

30 **[0041]** Así pues, la presente invención se relaciona con un procedimiento en donde las secuencias utilizadas de *attB*, *attP*, *attL* y/o *attR* tienen una o más sustituciones en comparación con las secuencias que se encuentran en la naturaleza de *attB*, *attP*, *attL*, y/o *attR*. Las sustituciones pueden aparecer tanto en la región de superposición como en la región de núcleo. La región de superposición completa comprende siete nucleótidos y también puede estar sustituida. Se prefiere de manera adicional un procedimiento en el que las sustituciones se introducen dentro de las  
35 secuencias de *attB*, *attP*, *attL*, y/o *attR*, ya sea en la región del núcleo o en la región de superposición. Se prefiere la introducción de una sustitución en la región de superposición y la introducción simultánea de una o dos sustituciones en la región de núcleo. La presente invención también se refiere a un procedimiento en el que las secuencias utilizadas de *attB*, *attP*, *attL* y/o *attR* son derivados, que incluyen fragmentos funcionales de los mismos de los sitios de recombinación en comparación con las secuencias que se presentan en la naturaleza de *attB*, *attP*, *attL* y/o *attR*.  
40

**[0042]** Se selecciona una modificación en forma de una o más sustituciones en las secuencias de recombinación de manera tal que la recombinación se puede llevar a cabo a pesar de una o varias modificaciones. Los ejemplos de tales sustituciones se incluyen, p. ej., en las publicaciones de Nash, H. (1981) más arriba y Nussinov, R y Weisberg, R. (1986), más arriba y no se consideran como limitantes. Se pueden introducir fácilmente modificaciones  
45 adicionales, p. ej., mediante procedimientos de mutagénesis (muchos de estos se describen en Ausubel, F.M. y cols. et al. (actualizada en 1994) más arriba) y también se puede evaluar su uso mediante recombinaciones de prueba como se describe, p. ej., en los ejemplos de la presente invención (Ejemplos 1 y 2, Resultados 5.1).

**[0043]** Además, la presente invención se refiere a un procedimiento en el que las secuencias utilizadas de *attB*,  
50 *attP*, *attL* y/o *attR* comprenden únicamente uno de los sitios de unión Int a núcleo respectivos; no obstante, también se prefieren más de dos sitios de unión Int a núcleo. En una realización preferente, la presente invención se refiere a un procedimiento en el que las secuencias utilizadas de *attB*, *attP*, *attL* y/o *attR* consisten únicamente de uno de los sitios de unión Int a núcleo respectivos. En una realización adicional, las secuencias utilizadas de *attB*, *attP*, *attL* y/o *attR* consisten en dos o más sitios de unión Int a núcleo.  
55

**[0044]** La presente invención se refiere adicionalmente a un procedimiento en el que las secuencias utilizadas de *attP*, *attL* y/o *attR* comprenden, además del sitio de unión Int a núcleo, una o más, preferiblemente dos, tres, cuatro, cinco o más de cinco copias del sitio unión a brazo para Int. El sitio de unión comprende un motivo de consenso que tiene la secuencia 5'-C/AAGTCACTAT-3' (IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N.º 1) o una secuencia modificada del

mismo que tiene sustituciones nucleotídicas y que es funcional con respecto a la unión de Int. El(los) sitio(s) de unión a brazo para Int se puede(n) colocar a diversas distancias aguas arriba o aguas arriba del(de los) sitio(s) de unión Int a núcleo.

5 **[0045]** Para realizar el procedimiento de la presente invención, la primera secuencia de recombinación puede comprender secuencias adicionales de ADN las cuales permiten la integración en el locus diana deseado, p. ej., en el genoma de la célula eucariota o un minicromosoma artificial. Esta recombinación se produce, p. ej., por medio de la recombinación homóloga la cual es mediada por mecanismos de recombinación celular interna. Para dicha recombinación, las secuencias adicionales de ADN deben ser homólogas al ADN del locus diana y se deben  
10 localizar tanto en 3' como en 5' de las secuencias *attB*, *attL*, *attP* o *attR* o derivados de las mismas, respectivamente. Una persona experta en la materia sabe cómo de grande debe ser el grado de homología y cómo de largas deben ser las secuencias 3' y 5' respectivas de manera tal que se produzca la recombinación homóloga con una probabilidad suficiente; véase la revisión de Capecchi, M. (1989) *Science*, 244, pp. 1288.

15 **[0046]** No obstante, también es posible integrar la primera secuencia de recombinación por cualquier otro mecanismo dentro del genoma de la célula eucariota o cualquier minicromosoma artificial, p. ej., por medio de la integración aleatoria que también está mediada por sucesos de recombinación celular interna. La integración del primer sitio de recombinación por medio de la recombinación específica de secuencia utilizando sitios diferentes a aquellos integrados, p. ej. utilizando las secuencias *loxP/FRT*, también resulta concebible.

20 **[0047]** La segunda secuencia de recombinación también puede comprender secuencias de ADN que son necesarias para una integración dentro del locus diana deseado por medio de recombinación homóloga. Para el procedimiento de la presente invención tanto la primera como la segunda secuencias de recombinación pueden comprender secuencias adicionales de ADN. Se prefiere un procedimiento en donde ambas secuencias de ADN  
25 comprendan secuencias adicionales de ADN.

**[0048]** La introducción de la primera y segunda secuencias de recombinación con o sin secuencias adicionales de ADN se puede llevar a cabo de manera consecutiva y en una transformación conjunta, en donde las secuencias de recombinación están presentes en dos moléculas diferentes de ADN. Se prefiere un procedimiento en el que están  
30 presentes la primera y segunda secuencias de recombinación, con o sin secuencias adicionales de ADN, y se introducen dentro de células eucariotas sobre una molécula sencilla de ADN. Además, la primera secuencia de recombinación se puede introducir en una célula y la segunda secuencia de recombinación se puede introducir en otra célula y posteriormente fusionar las células. El término fusión se refiere a un cruce de organismos, así como a la fusión celular en su sentido más amplio.

35 **[0049]** El procedimiento de la presente invención se puede utilizar, p. ej., para invertir un segmento de ADN que se encuentra entre secuencias de recombinación orientadas indirectamente en una recombinación intramolecular. Además, el procedimiento de la presente invención se puede utilizar para suprimir un segmento de ADN que se encuentra entre secuencias de recombinación orientadas directamente en una recombinación intramolecular. Si las  
40 secuencias de recombinación se incorporan cada una en la orientación 5'-3' o 3'-5', están presentes en una orientación directa. Las secuencias de recombinación están en orientación indirecta, si, p. ej., la secuencia de *attB* se integra en 5'-3' y la secuencia de *attP* se integra en orientación 3'-5'. Si las secuencias de recombinación se incorporan cada una, p. ej., por medio de la recombinación homóloga dentro de secuencias de intrón 5' y 3' de un exón y la recombinación se realiza por una integrasa, el exón se habrá invertido en el caso de secuencias de  
45 recombinación orientadas indirectamente y habrá sido suprimido en el caso de secuencias de recombinación orientadas directamente, de manera respectiva. Con este procedimiento, el polipéptido codificado para el gen respectivo puede perder su actividad o función, o la transcripción se puede detener por la inversión o supresión de manera que no se genere un transcrito (completo). De esta manera se puede investigar, p. ej., la función biológica del polipéptido codificado. Además, se pueden utilizar reacciones de inversión o supresión para activar la expresión  
50 de un gen que codifica para un polipéptido deseado, p. ej., mediante enlace funcional de la fase de lectura abierta del polipéptido codificado con elementos reguladores los cuales permiten la transcripción o traducción del polipéptido codificado. Los elementos reguladores incluyen, entre otros, elementos promotores o promotores/mejoradores, los cuales son bien conocidos en la técnica para diversos sistemas de expresión eucariótica.

55 **[0050]** No obstante, la primera y/o segunda secuencias de recombinación pueden comprender secuencias adicionales de ácidos nucleicos que codifican para uno o más polipéptidos/productos de interés. Por ejemplo, se puede introducir una proteína estructural, una proteína enzimática o reguladora por medio de la las secuencias de recombinación en el genoma que se expresa de manera transitoria o estable después de una recombinación intramolecular. El polipéptido/producto introducido puede ser endógeno o exógeno. Además, se puede introducir una

proteína marcadora o polipéptidos terapéuticos biofarmacéuticamente relevantes. Una persona experta en la materia sabe que esta lista de aplicaciones del procedimiento de acuerdo con la presente invención tiene efectos meramente ilustrativos y no es limitante. Los ejemplos de aplicaciones de acuerdo con la presente invención realizados con las recombinasas Cre y Flp utilizadas hasta ahora se pueden encontrar, p. ej., en la revisión de Kilby, N. y cols., (1993), Trends Genet., 9, pp. 413.

**[0051]** Además, el procedimiento de la presente invención se puede utilizar para suprimir o invertir segmentos de ADN en vectores por una recombinación intramolecular sobre sustratos episómicos. Se puede utilizar una reacción de supresión para suprimir, p. ej., secuencias de empaquetado de los denominados virus cooperadores (*helper*). Este procedimiento tiene una aplicación amplia en la producción industrial de vectores virales para aplicaciones de genoterapia; Hardy, S. y cols., (1997), J. Virol., 71, pp. 1842.

**[0052]** La recombinación intermolecular lleva a la fusión de dos moléculas de ADN, cada una de las cuales tiene una copia de *attB*, *attP*, *attL*, o *attR* o diversas combinaciones de secuencias de *att* o de sus derivados. Por ejemplo, *attB* o un derivado del mismo se puede introducir en primer lugar por medio de recombinación homóloga en un locus genómico conocido y bien caracterizado de una célula o de un minicromosoma artificial. Posteriormente, un vector o un segmento de ADN que transporta *attB*, *attP*, *attL*, o *attR* se puede integrar en la secuencia genómica de *attB* por medio de recombinación intermolecular. En este procedimiento se prefiere la expresión conjunta de la integrasa mutante, p. ej., Int-h o Int-h/218 dentro de la célula eucariota, en donde se produce la recombinación. Se prefiere adicionalmente la expresión conjunta de la integrasa mutante Int-h/218. Los genes que codifican para cualquiera de estas integrasas mutantes se pueden localizar sobre un segundo vector de ADN que está transfectado, preferentemente cotransfectado, o sobre el vector o segmento de ADN que presenta la secuencia *attP*, *attL*, *attR* o también una secuencia *attB* o un derivado de la misma. Las secuencias adicionales se pueden localizar en el vector o el segmento de ADN que transporta *attB*, *attP*, *attL*, o *attR*, por ejemplo un gen para una proteína marcadora particular flanqueada por las secuencias loxP/FRT. Con esta solución se puede hacer que, p. ej., en el análisis de expresión comparativo de diferentes genes en un tipo de célula, los genes no sean alterados por influencias positivas o negativas del locus de integración genómico respectivo. Además, el procedimiento de la presente invención se puede utilizar para fusionar segmentos de ADN sobre vectores por una recombinación intermolecular sobre sustratos episómicos. Se puede utilizar una reacción de fusión, p. ej., para expresar proteínas recombinantes o dominios relevantes con el fin de cribar en búsqueda de genotipos. Este procedimiento se puede utilizar en el análisis de alto rendimiento de funciones de proteínas en células eucariotas y, por lo tanto, es de considerable interés.

**[0053]** Como se mencionó anteriormente, la recombinación intermolecular se puede utilizar para introducir uno o más genes de interés que codifican para uno o más de los polipéptidos/productos deseados en, p. ej., sustratos episómicos, cromosomas artificiales/minicromosomas o diversos genomas de células anfitrionas que contienen una primera secuencia de recombinación. En este contexto un segundo ADN comprende, además de al menos una secuencia de recombinación, p. ej. *attP*, *attB*, *attL*, *attR* o cualquier derivado de la misma, uno o más casetes de expresión para la expresión de una o más proteínas/productos deseados. Dicho casete de expresión se puede introducir en un locus diana deseado mediante las secuencias de recombinación que permiten una recombinación específica de secuencia entre el ADN que comprende la segunda secuencia de recombinación y el casete de expresión, introduciéndose antes la primera secuencia de recombinación dentro del sustrato episómico, el minicromosoma artificial o el genoma de la célula anfitriona. Esta realización puede ser de gran interés para establecer estirpes celulares de alta expresión que resultan adecuadas para la producción de productos biofarmacéuticos.

**[0054]** En este contexto, se debe introducir un primer ADN que comprende al menos una secuencia de recombinación, p. ej. mediante integración aleatoria, dentro del genoma de la célula anfitriona, cromosomas artificiales/minicromosomas o sustratos episómicos contenidos dentro de la célula anfitriona. Alternativamente, una célula anfitriona se puede transformar con un minicromosoma artificial o un sustrato episómico que comprende al menos uno o varios sitios de recombinación correspondientes. Otra manera de integrar una o varias secuencias de recombinación en un locus diana deseado, reconocido por la integrasa Int de bacteriófago lambda, es utilizar técnicas de recombinación homóloga, como se ha mencionado antes.

**[0055]** Para facilitar la selección por transfectantes estables los cuales hayan introducido una o varias secuencias de recombinación en el locus diana deseado, se introduce de manera conjunta un gen marcador de selección dentro del mismo locus diana, al mismo tiempo. Esto se puede llevar a cabo, p. ej., si una o varias de las secuencias de recombinación y un gen marcador de selección se localizan de manera conjunta sobre el mismo vector o segmento de ADN, el cual se introduce dentro del locus diana, p. ej., por cualquier procedimiento mencionado anteriormente

(recombinación homóloga, integración aleatoria, etc.). Dado que el nivel de expresión del gen marcador de selección se relaciona con la actividad de transcripción en el sitio de integración, se pueden identificar de manera muy eficaz las células que muestren un alto nivel de expresión en el sitio de integración, robustez celular y buenas características de crecimiento, p. ej., en un biorreactor. El nivel de expresión del gen marcador de selección se puede determinar por procedimientos bien conocidos en la técnica, p. ej., sobre la base de la cantidad de ARNm correspondiente que está presente en la célula o de la cantidad de polipéptido codificado por el gen. Por ejemplo, el ARNm transcrito de una secuencia genética introducida se puede cuantificar por hibridación de transferencia Northern, protección de ARN de ribonucleasa, hibridación in situ a ARN celular o por PCR (véase Sambrook y cols., 1989; Ausubel y cols., 1994, más arriba). Las proteínas codificadas por una secuencia seleccionada se pueden cuantificar por diversos procedimientos, p. ej., por ELISA, por transferencia Western, por radioinmunoensayos, por inmunoprecipitación, realizando ensayos para determinar la actividad biológica de la proteína, por inmunotinción de la proteína seguida por PCR y análisis FACS o midiendo las señales de fluorescencia de una proteína fluorescente (véase Sambrook y cols., 1989; Ausubel y cols., actualizada en 1994, más arriba). Mediante dicho procedimiento se pueden obtener excelentes candidatos de una estirpe celular de producción para elaborar sustancias biofarmacéuticas.

**[0056]** Una o varias secuencias de recombinación integradas (primera secuencia de recombinación) permiten la integración de una molécula adicional de ADN, p. ej. un vector o un segmento de ADN que transporta al menos una secuencia de recombinación adicional (segunda secuencia de recombinación) por medio de la recombinación específica de secuencia por una integrasa Int de bacteriófago lambda en un locus activo transcripcional. Preferentemente, dicha molécula adicional de ADN comprende al menos una segunda secuencia, de recombinación y comprende además un casete de expresión para la expresión de al menos un gen biofarmacéuticamente relevante de interés. Para esto, las células anfitrionas las cuales comprenden la primera secuencia de recombinación integrada, integrada preferentemente en el genoma de la célula anfitriona en un locus transcripcional activo, se transfectan con una molécula de ADN que comprende la segunda secuencia de recombinación para la integrasa Int de bacteriófago lambda, y se cultivan en condiciones que permiten recombinación específica de secuencia entre la primera y segunda secuencias de recombinación, preferentemente la integración de la molécula de ADN que comprende la segunda secuencia de recombinación dentro del genoma de la célula anfitriona que comprende la primera secuencia de recombinación. La primera y segunda secuencias de recombinación pueden ser *attP*, *attB*, *attL*, *attR*, o cualquier derivado de las mismas, las cuales permiten una recombinación específica de secuencia por una integrasa Int de bacteriófago lambda o cualquier mutante funcional del mismo. Por ejemplo, si la primera secuencia de recombinación comprende *attP* o un derivado de la misma, la segunda puede comprender *attP*, *attB*, *attL*, *attR* o cualquier derivado de la misma.

**[0057]** Se prefiere el procedimiento en el que la recombinación específica de secuencia se realice por Int o por Int y XIS, FIS o IHF. Se prefiere adicionalmente el procedimiento en el que la recombinación específica de secuencia se realice por Int o por Int y un factor XIS, o por Int e IHF, o por Int y XIS e IHF. Se prefiere adicionalmente un procedimiento en el que la recombinación específica de secuencia se realice por una Int modificada, preferentemente Int-h o Int-h/218. En este contexto, también está dentro del significado de la presente invención el uso de Int modificada junto con XIS o IHF.

**[0058]** Mediante este planteamiento cualquier secuencia de ADN que comprenda una segunda secuencia de recombinación para la integrasa Int de bacteriófago lambda se integra dentro de un locus conocido, bien caracterizado y definido de la célula anfitriona. Para seleccionar las células en las que se ha producido la recombinación específica de secuencia se puede introducir, p. ej., un casete de expresión no funcional que comprende el gen marcador de selección, p. ej. sin un promotor o promotor/mejorador o únicamente parte de la región codificante del gen. Únicamente si se ha producido la recombinación específica de secuencia se generará un casete de expresión completo y funcional con expresión eficiente del gen marcador de selección, y de esta manera se permite la selección de células que tengan integrado el gen de interés por medio de la integración específica de secuencia.

**[0059]** Mediante el procedimiento de la presente invención es posible obtener estirpes celulares de producción que difieren de la célula anfitriona únicamente en la identidad de secuencias de ADN integrado en el sitio definido de integración, p. ej., dentro de un locus genómico. Debido a la menor variación genética entre los diferentes clones de células, se puede utilizar un procedimiento más genérico para el desarrollo de estirpes celulares de producción, y de esta manera se reduce el tiempo y la capacidad para selección de clon y el desarrollo de un procedimiento de producción optimizado. Las estirpes celulares de producción se pueden utilizar para la elaboración de los polipéptidos deseados.

**[0060]** Además, el procedimiento de la presente invención se basa en un procedimiento para expresar al menos un gen de interés que codifica para uno o más polipéptidos/productos deseados, en una célula eucariota, que comprende

- 5 a) introducir un primer ADN que comprende una secuencia *attB*, *attP*, *attL* o *attR* o un derivado de la misma en una célula,
- b) introducir un segundo ADN que comprende una secuencia *attB*, *attP*, *attL* o *attR* o un derivado de la misma, y al menos un gen de interés, en una célula,
- 10 c) poner en contacto dicha célula con una integrasa Int de bacteriófago lambda;
- d) realizar la recombinación específica de secuencia por una integrasa Int de bacteriófago lambda, en donde el segundo ADN se integra dentro del primer ADN; y
- 15 e) cultivar a la célula en condiciones en las que se expresen uno o varios de los genes de interés.

**[0061]** Es preferente el procedimiento en el que dicha primera secuencia de ADN comprende una secuencia *attB* o un derivado de la misma, dicha segunda secuencia comprende una secuencia *attB*, *attL* o *attR* o un derivado de la misma, o en el que si dicha primera secuencia de ADN comprende una secuencia *attP* o un derivado de la misma, dicha segunda secuencia comprende una secuencia *attP*, *attL* o *attR* o un derivado de la misma, o en el que si dicha primera secuencia de ADN comprende una secuencia *attL* o un derivado de la misma, dicha segunda secuencia comprende una secuencia *attB*, *attP* o *attL* o un derivado de la misma, o en el que si dicha primera secuencia de ADN comprende una secuencia *attR* o un derivado de la misma, dicha segunda secuencia comprende una secuencia *attB*, *attP* o *attR* o un derivado de la misma.

**[0062]** En una realización más preferente de dicho procedimiento, el primer ADN se ha integrado en el genoma, un minicromosoma artificial o un elemento episómico de una célula anfitriona, preferentemente en sitios que muestran alta actividad de transcripción, antes de que se introduzca dicho segundo ADN en dicha célula.

**[0063]** La presente invención también puede estar basada en un procedimiento para expresar al menos uno o más genes de interés en una célula anfitriona, en donde dicha célula anfitriona comprende una secuencia *attB*, *attP*, *attL* o *att*, o un derivado de la misma integrado en el genoma de la célula anfitriona, que comprende

- 35 a) introducir un ADN que comprende una secuencia *attB*, *attP*, *attL* o *attR* o un derivado de la misma, y al menos un gen de interés, en dicha célula,
- b) poner en contacto dicha célula con una integrasa Int de bacteriófago lambda; c) realizar la recombinación específica de secuencia por una integrasa Int de bacteriófago lambda, en donde el segundo ADN se integra dentro del primer ADN;
- 40 d) cultivar a la célula en condiciones en las que se expresen uno o varios de los genes de interés.

**[0064]** El procedimiento se puede llevar a cabo no solo con una secuencia *attB*, *attP*, *attL* o *attR* o un derivado del mismo que se integra en un genoma de una célula anfitriona por ingeniería genética de dicha célula, pero también con una secuencia de recombinación del genoma que se produce de manera natural, por ejemplo el sitio *att* descrito en WO 01/16345 (5'-GAAATTCTTTTTGATACTAACTTGTGT-3'; SEQ ID n.º 17) o cualquier otra secuencia de recombinación, lo cual permite la recombinación específica de secuencia mediada por un Int o cualquier mutante funcional del mismo.

**[0065]** Se prefieren aquellos procedimientos en donde la recombinación específica de secuencia se realice por Int o por Int y un factor XIS o por Int e IHF, o por Int, XIS e IHF. Se prefiere adicionalmente un procedimiento en el que la recombinación específica de secuencia se realice por una Int modificada, preferentemente Int-h o Int-h/218. En este contexto, también está dentro del significado de la presente invención el uso de Int modificada junto con XIS o IHF. Se pueden añadir Int-h o Int-h/218, XIS, FIS y/o IHF a la célula en forma purificada o se coexpresan por dicha célula anfitriona, en donde se realiza la recombinación específica de secuencia.

**[0066]** Una realización adicional de los procedimientos mencionados anteriormente se relaciona con un procedimiento en el que uno o varios polipéptidos/productos los cuales son codificados por uno o varios de los

genes de interés y que se expresan en la célula anfitriona se aíslan de las células o del sobrenadante de cultivo celular, si se secreta en el medio de cultivo.

**[0067]** Dichas células de producción se cultivan preferentemente en medios libres de suero y en cultivo en suspensión en condiciones que son favorables para la expresión de uno o varios de los genes deseados y aislando la proteína de interés de las células o del sobrenadante de cultivo celular. Preferentemente, la proteína de interés se recupera del medio de cultivo como un polipéptido secretado, o se puede recuperar de lisados de células anfitrionas si se expresa sin una señal secretora. Es necesario purificar la proteína de interés de otras proteínas recombinantes, proteínas de la célula anfitriona y contaminantes de una manera que se obtengan preparaciones sustancialmente homogéneas de la proteína de interés. Como una primera etapa con frecuencia las células o los residuos de células en partículas se separan del medio de cultivo o del lisado. Posteriormente, el producto de interés se purifica a partir de proteínas solubles contaminantes, polipéptidos y ácidos nucleicos, por ejemplo mediante fraccionamiento en columnas de inmunoadfinidad o de intercambio iónico, precipitación en etanol, CLAR en fase inversa, cromatografía en Sephadex sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico tal como DEAE. En general se conocen bien en la técnica los procedimientos descritos por una persona experta respecto a la manera de purificar una proteína heteróloga expresada en células anfitrionas. Tales procedimientos se describen, p. ej., en Harris y cols. (1995) *Protein Purification: A Practical Approach*, Pickwood and Hames, eds., IRL Press and Scopes, R. (1988) *Protein Purification*, Springer Verlag. Por lo tanto, el procedimiento mencionado antes de expresión de al menos un gen de interés se puede añadir mediante una etapa de purificación adicional, en donde el polipéptido deseado se purifica a partir de las células anfitrionas o de un cultivo de células si se secreta al medio de cultivo.

**[0068]** El procedimiento de la presente invención se puede llevar a cabo en todas las células eucariotas. Las células y estirpes celulares pueden estar presentes, p. ej., en un cultivo celular e incluyen, entre otros, células eucariotas tales como células de levadura, plantas, insectos o mamíferos. Por ejemplo, las células pueden ser ovocitos humanos, células madres embrionarias no humanas, células madre hematopoyéticas o cualquier tipo de células diferenciadas. Se prefiere un procedimiento en el que la célula eucariota es una célula de mamífero. Se prefieren de manera adicional un procedimiento en el que la célula de mamífero es una célula de humano, simio, ratón, rata, conejo, hámster, cabra, vaca, oveja o cerdo. Las estirpes celulares preferentes o las «células anfitrionas» para la producción de sustancias biofarmacéuticas son estirpes celulares de humano, ratón, rata mono, o roedor. Las más preferentes son las células de hámster, preferentemente las células BHK21, BHK TK-, CHO, CHO-K1, CHO-DUKX, CHO-DUKX BI y CHO-DG44 o los derivados/progenie de cualquiera de tales células. Se prefieren particularmente CHO-DG44, CHODUKX, CHO-K1 y BHK21, e incluso de manera más preferida las células CHO-DG44 y CHO-DUKX. Además, también se conocen como estirpes celulares de producción células de mieloma murino, preferentemente células NSO y Sp2/0 o derivados/progenie de dichas estirpes celulares.

**[0069]** Las células anfitrionas son las más preferentes, cuando se han establecido, adaptado y cultivado completamente en condiciones sin suero y opcionalmente en medio en el cual están libres de cualquier proteína/péptido de origen animal. Los medios disponibles comercialmente tales como Ham F12 (Sigma, Deisenhofen, Alemania), RPMI-1640 (Sigma), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Sigma), medio esencial mínimo (MEM; Sigma), medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM; Sigma), CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA), CHO-S-SFMII (Invitrogen), medio CHO sin suero (Sigma) y medio CHO sin proteínas (Sigma) son soluciones nutrientes apropiadas a título de ejemplo. Cualquiera de los medios se puede suplementar según se necesite con una diversidad de compuestos cuyos ejemplos son hormonas u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento similar a insulina), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio, fosfato), amortiguadores (tales como HEPES), nucleósidos (tales como adenosina, timidina), glutamina, glucosa u otras fuentes de energía equivalentes, antibióticos y elementos en trazas. Cualquier otro suplemento necesario también se puede incluir en concentraciones apropiadas que sean conocidas por los expertos en la materia. En la presente invención se prefiere el uso de medios sin suero, pero también se pueden utilizar para el cultivo de células anfitrionas medios suplementados con una cantidad adecuada de suero. Para el crecimiento y selección de células modificadas genéticamente que expresan un gen seleccionable se añade un agente de selección adecuado al medio de cultivo.

**[0070]** Las «proteínas/polipéptidos deseados» o las «proteínas/polipéptidos de interés» de la invención son, p. ej., entre otros, insulina, factor de crecimiento similar a insulina, hGH, tPA, citosinas tales como interleucinas (IL) por ejemplo IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL 5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, interferón (IFN) alfa, IFN beta, IFN gamma, IFN omega o IFN tau, factor de necrosis tumoral (TNF) tal como TNF alfa y TNF beta, TNF gamma, TRAIL; GCSF, GM-CSF, M-CSF, MCP-1 y VEGF. También se incluye la producción de eritropoyetina o de cualquier otro factor de crecimiento de hormonas o cualquier otro polipéptido que pueda servir como agonista o antagonista o que tenga uso terapéutico o de diagnóstico. El procedimiento de acuerdo con la

invención también se puede usar ventajosamente para la producción de anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales, policlonales, multiespecíficos y de cadena única, o fragmentos de los mismos, por ejemplo los fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fc y Fc', cadenas de inmunoglobulina pesada y ligera y su región constante, variable o hipervariable así como fragmentos Fv- y Fd- (Chamov, S. M. y cols. (1999) *Antibody Fusion Proteins*, Wiley-Liss Inc.)

**[0071]** Los fragmentos Fab (fragmento de unión a antígeno = Fab, por sus siglas en inglés) consisten en regiones variables de ambas cadenas las cuales se mantienen juntas por la región constante adyacente. Estas se pueden formar por digestión con proteasa, p. ej. con papaína, a partir de anticuerpos convencionales, pero también se pueden producir fragmentos Fab similares por ingeniería genética. Los fragmentos adicionales de anticuerpo incluyen fragmentos F(ab')<sub>2</sub> los cuales se pueden preparar por separación proteolítica con pepsina.

**[0072]** Mediante la utilización de procedimientos de ingeniería genética es posible producir fragmentos de anticuerpo acortados los cuales consisten únicamente de las regiones variables de la cadena pesada (VH) o de la cadena ligera (VL). Estos se denominan como fragmentos Fv (fragmento variable = fragmento de la parte variable). Dado que estos fragmentos Fv carecen de la unión covalente de las dos cadenas por la cisteínas de las cadenas constantes, los fragmentos Fv con frecuencia están estabilizados. Es ventajoso enlazar las regiones variables de las cadenas pesada y ligera por un fragmento peptídico corto, p. ej. de entre 10 y 30 aminoácidos, preferentemente de 15 aminoácidos. De esta manera se obtiene una cadena peptídica única que consiste en VH y VL, enlazada por un péptido enlazador. Una proteína de anticuerpo de esta clase se conoce como un Fv de cadena sencilla (scFv). Los ejemplos de proteínas de anticuerpo scFv de esta clase conocidos de la técnica anterior se describen en Huston C. y cols. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 16, pp. 5879.

**[0073]** En años recientes se han desarrollado diversas estrategias para preparar scFv como un derivado multimérico. Esto tiene como objetivo, en particular, elaborar anticuerpos recombinantes con propiedades mejoradas farmacocinéticas y de biodistribución, así como una mayor avidéz de unión. Para obtener la multimerización de scFv, se preparan scFv como proteínas de fusión con dominios de multimerización. Los dominios de multimerización pueden ser, p. ej. la región CH3 de una IgG o la estructura de rollo enrollado (*coiled coil*) (estructuras helicoidales) tales como los dominios de cremallera de leucina. No obstante, también existen estrategias en las cuales se utiliza la interacción entre las regiones VH/VL de los scFv para la multimerización (p. ej. di-, tri- y pentacuerpos). Por un diacuerpo, una persona experta en la materia entiende un derivado de scFv homodimérico bivalente. El acortamiento del enlazador en una molécula de scFv a 5-10 aminoácidos lleva a la formación de homodímeros en los cuales se lleva a cabo la superimposición VH/VL de entre la cadena. De manera adicional, los diacuerpos se pueden establecer por la incorporación de puentes disulfuro. Los ejemplos de proteínas diacuerpo-anticuerpo de la técnica anterior se pueden encontrar en Perisic, O. y cols. (1994) *Structure*, 2, pp. 1217.

**[0074]** Por un minicuerpo, una persona experta en la materia entiende un derivado de scFv homodimérico bivalente. Consiste en una proteína de fusión la cual contiene de la región CH3 de una inmunoglobulina, preferentemente IgG, y de manera más preferente IgG1, como la región de dimerización la cual se conecta a scFv por medio de región de bisagra (p. ej. también de IgG1) y una región enlazadora. Los ejemplos de proteínas de minicuerpo-anticuerpo de la técnica anterior se pueden encontrar en Hu, S. y cols. (1996) *Cancer Res.*, 56, pp. 3055.

**[0075]** Por un triacuerpo, una persona experta en la materia entiende un derivado de scFv homotrimérico trivalente (Kortt A.A. y cols. (1997) *Protein Engineering*, 10, pp. 423). Los derivados de scFv en los que VH-VL se fusionan directamente sin una secuencia enlazador genera la formación de los trímeros.

**[0076]** Una persona experta también estará familiarizado con los denominados minianticuerpos, los cuales tienen una estructura bi-, tri- o tetravalente y se derivan de scFv. La multimerización se lleva a cabo por estructuras di-, tri- o tetraméricas de rollo enrollado (Pack, P. y cols. (1993) *Biotechnology*, 11, pp. 1271; Lovejoy, B. y cols. (1993) *Science*, 259, pp. 1288; Pack, P. y cols. (1995) *J. Mol. Biol.*, 246, pp. 28). En una realización preferente de la presente invención, el gen de interés es codificado por cualquiera de estos polipéptidos deseados mencionados anteriormente, preferentemente para un anticuerpo monoclonal, un derivado o un fragmento del mismo.

**[0077]** Con el fin de realizar cualquier realización de la presente invención, una integrasa debe actuar sobre las secuencias de recombinación. Las integrasa o el gen para integrasa o un cofactor o un gen para un cofactor, por ejemplo el factor XIS o el gen para el factor XIS o IHF o el gen para IHF pueden estar presentes en la célula eucariota de antemano, antes de introducir la primera y segunda secuencia de recombinación. También se pueden introducir entre la introducción de la primera y segunda secuencia de recombinación o después de la introducción de la primera y segunda secuencia de recombinación. La purificación de la recombinasa y las proteínas de factor del



- anfitrión se han descrito en la técnica (Nash, H. A. (1983) *Methods of Enzymology*, 100, pp. 210; Filutowicz, M. y cols. (1994) *Gene*, 147, pp.149). En los casos en los que no se conocen, se pueden utilizar extractos de células o las enzimas pueden ser purificadas parcialmente utilizando procedimientos descritos, p. ej., para recombinasa Int o Cre. Las proteínas purificadas se pueden introducir en una célula por técnicas estándar, p. ej., por medio de inyección o microinyección o por medio de una lipofección como se describe en el ejemplo 2 de la presente invención para IHF. Preferentemente, la integrasa utilizada para la recombinación específica de secuencia se expresa en la célula en la cual se lleva a cabo la reacción. Para este propósito se introduce en las células una tercera secuencia de ADN que comprende un gen para integrasa. Si la recombinación específica de secuencia se lleva a cabo, por ejemplo con *attL/attR*, se puede introducir en las células un gen para factor XIS (cuarta secuencia de ADN) de manera adicional.
- 10 La manera más preferente es un procedimiento en el que la tercera y cuarta secuencia de ADN se integran en el genoma eucariótico de la célula o un minicromosoma artificial por medio de recombinación homóloga o bien aleatoriamente. Se prefiere además un procedimiento en el que la tercera o cuarta secuencia de ADN comprendan secuencias reguladoras que resultan en una expresión espacial o temporal del gen para integrasa o del gen para el factor XIS.
- 15 **[0078]** En este caso, una expresión espacial significa que en la recombinasa Int el factor XIS o el factor IHF, respectivamente, se expresa únicamente en un tipo de célula particular mediante el uso de promotores específicos de tipo de célula y catalizan la recombinación únicamente en estas células, p. ej., en células de hígado, células de riñón, células nerviosas o células del sistema inmunológico. En la regulación de la expresión de integrasa/factor XIS/IHF se puede obtener una expresión temporal por medio de promotores que sean activos desde, o en particular en una etapa de desarrollo particular o en un punto en el tiempo particular en un organismo adulto. Además, la expresión temporal se puede obtener mediante el uso de promotores inducibles, p. ej., por promotores que dependen de interferón o tetraciclina; véase la revisión de Müller, U. (1999) *Mech. Develop.*, 82, pp. 3.
- 20 **[0079]** La integrasa utilizada en el procedimiento de la presente invención puede ser tanto natural como una integrasa modificada (mutada) del bacteriófago  $\lambda$ . Dado que la integrasa natural únicamente es capaz de realizar la reacción de recombinación con una eficacia elevada con un cofactor, específicamente IHF, se prefiere utilizar una integrasa modificada en el procedimiento de la presente invención. Si se utiliza integrasa natural en el procedimiento de la presente invención, se puede necesitar IHF además de obtener una estimulación de la reacción de recombinación. La integrasa modificada se modifica de manera tal que la integrasa pueda llevar a cabo la reacción de recombinación sin IHF u otros factores del anfitrión tales como XIS y FIS. Por ejemplo, se puede realizar una reacción de recombinación entre las secuencias *attL* and *attR* por una Int modificada sin la adición de un factor del anfitrión (véase los resultados 5.1 y la figura 2C y 2D).
- 25 **[0080]** La generación de polipéptidos modificados y el cribado (detección sistemática) para determinar la actividad deseada son elementos conocidos en la técnica y se pueden llevar a cabo fácilmente; Erlich, H. (1989) *PCR Technology*. Stockton Press. Por ejemplo, se diseña una secuencia de ácido nucleico que codifica para un integrasa modificada para incluir cualquier secuencia de ácido nucleico que se transcribirá y traducirá en una integrasa ya sea *in vivo* o ante la introducción de la secuencia codificante en bacterias o células eucariotas. Las secuencias codificantes para la proteína integrasa modificada pueden presentarse de manera natural (por mutación espontánea) o pueden ser mutantes y variantes generadas por ingeniería recombinante, versiones truncadas y fragmentos, equivalentes funcionales, derivados, homólogos y fusiones de las proteínas que se encuentran en la naturaleza o de tipo natural en la medida en que se mantenga la actividad funcional biológica, lo que significa la actividad de recombinasa, del polipéptido codificado. Se mantiene la actividad de recombinasa cuando la recombinasa modificada tiene al menos el 50 %, preferentemente al menos el 70 %, de manera más preferente al menos el 90 %, de manera mucho más preferente al menos el 100 % de la actividad de la integrasa Int natural, medida en un ensayo de cotransfección con sustratos vectores y vectores de expresión como se describe en los resultados 5.1 de la presente invención o en el ejemplo 3 de WO 01/16345. Ciertas sustituciones en la secuencia de aminoácidos se pueden realizar en una integrasa o en su secuencia codificante de ácido nucleico subyacente y se puede obtener una proteína con propiedades similares. Las sustituciones de aminoácidos que proporcionan polipéptido de integrasa funcionalmente equivalentes mediante el uso del índice hidropático de aminoácidos (Kyte, J. y cols. (1982) *J. Mol. Biol.*, 157, pp. 105) se pueden preparar realizando mutagénesis específica de sitio o mutagénesis mediada por reacción en cadena de polimerasa sobre sus secuencia de ácido nucleico subyacente. En la presente invención se prefieren integrasas mutantes o modificadas las cuales muestran, en comparación con la proteína de tipo natural que se encuentra en la naturaleza, actividad de recombinasa/eficacia de recombinación mejoradas o una actividad de recombinación independiente de uno o más factores del anfitrión. Se entiende por «proteína natural» un gen del polipéptido codificante que se encuentra en la naturaleza no modificado, no truncado y completo. Dos mutantes Int preferentes son las integrasas de bacteriófago  $\lambda$  designadas como Int-h e Int-h/218; Miller y cols. (1980) *Cell*, 20, pp. 721; Christ, N. y Dröge, P. (1999) *J. Mol. Biol.*, 288, pp. 825. Int-h incluye un residuo lisina en vez de un

residuo de glutamato en la posición 174, en comparación con Int natural. Int-h/218 incluye un residuo lisina adicional en vez de un residuo de glutamato en la posición 218 y se genera por mutagénesis PCR en el gen para Int-h. Tales mutantes pueden catalizar la recombinación entre *attB/attB*, *attP/attP*, *attL/attL* o *attR/attR* y todas las demás configuraciones posibles, p. ej. *attP/attR*, *attL/attP*, *attL/attB* o *attR/attB* o los derivados de las mismas sin los cofactores IHF, XIS o FIS y el superenrollado negativo en *E. coli*, en células eucariotas e *in vitro*, es decir, con sustratos purificados en un tubo de reacción. Se puede obtener una mejora de la eficacia de la recombinación con un cofactor, por ejemplo FIS. Se prefiere el mutante Int-h/218, debido a que este mutante cataliza la reacción de combinación con eficacia aumentada.

10 **[0081]** Si la primera reacción lleva a una escisión y las dos secuencias de recombinación utilizadas son idénticas, p. ej. *attP/P*, las secuencias de recombinación resultantes después de la recombinación serán idénticas a las del sustrato, p. ej. aquí, dos secuencias *attP*. No obstante, si las dos secuencias asociadas son diferentes, p. ej. *attP/R*, la reacción de recombinación generará secuencias de recombinación híbridas las cuales comprenden una mitad funcional de una secuencia (p. ej. *attP*) y una mitad de la otra (*attR*). Se puede definir un sitio de semirrecombinación  
15 funcional como la secuencia ya sea 5' o 3' desde la superposición, por lo que la superposición se considera, en cada caso, como parte de un sitio medio funcional. Si la región de superposición respectiva de las secuencias de recombinación utilizadas son idénticas, la reacción de escisión se puede llevar a cabo con cualquier secuencia de recombinación de acuerdo con la invención. Adicionalmente, la región de superposición designa la orientación de las secuencias de recombinación entre sí también, es decir, invertida o directa. La reacción se puede llevar a cabo con  
20 Int natural con baja eficacia únicamente; no obstante, la adición de IHF o en ausencia de IHF la presencia de uno o varios sitios de unión a brazo además del sitio de unión a núcleo estimula e incrementa la eficacia. La reacción se puede llevar a cabo sin cofactor alguno por una Int modificada.

**[0082]** Además, se prefiere un procedimiento en el que se introduce en las células una secuencia de ADN  
25 adicional que comprende un gen de factor XIS. El más preferente es un procedimiento en el que la secuencia de ADN adicional comprende, además, una secuencia de ADN reguladora lo que genera una expresión espacial o temporal del gen para el factor Xis.

**[0083]** Por ejemplo, después de recombinación intramolecular integrante (inversión) satisfactoria por medio de Int  
30 que se dirige a la activación/inactivación de un gen en un tipo de célula particular, dicho gen se puede inactivar o activar en un punto posterior del tiempo nuevamente por medio de una expresión espacial o temporal inducida de XIS con la expresión simultánea de Int.

**[0084]** Además, la invención se relaciona con el uso de cualquier secuencia de recombinación o un derivado de la  
35 misma, por ejemplo para el derivado de *attP* como se especifica en el IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N.º 2 en una recombinación específica de secuencia de ADN en células eucariotas. La célula eucariota puede estar presente en un agregado celular de un organismo, por ejemplo un mamífero, que no tiene integrasa o factor Xis en sus células. El organismo se puede utilizar para cruce o crianza con otros organismos que tengan en sus células la integrasa o el factor Xis de manera que se genere descendencia en donde la recombinación específica de secuencia  
40 se realiza en células de la descendencia. De esta manera, la invención se relaciona con el uso de una integrasa o un gen para integrasa y un factor Xis o un gen para el factor Xis y un factor IHF o un gen para el factor IHF en una recombinación específica de secuencia en células eucariotas. Además, en esta invención se describen células eucariotas y estirpes celulares en las cuales se realizó el procedimiento de la presente invención, en donde dichas células o estirpes celulares se obtienen después de realizar el procedimiento de la presente invención.

45 **[0085]** A menos que se indique lo contrario, la práctica de la presente invención utilizará técnicas convencionales de biología celular, biología molecular, cultivo celular, inmunología y similares, las cuales son conocidas por los expertos en la materia. Estas técnicas se describen completamente en la bibliografía actual. Véase, p. ej., Sambrook y cols., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Ausubel y cols., *Current Protocols in Molecular Biology* (1987, updated); Brown ed., *Essential Molecular Biology*, IRL Press (1991); Goeddel ed., *Gene Expression Technology*, Academic Press (1991); Bothwell y cols. eds., *Methods for Cloning and Analysis of Eukaryotic Genes*, Bartlett Publ. (1990); Wu y cols., eds., *Recombinant DNA Methodology*, Academic Press (1989); Krieglner, *Gene Transfer and Expression*, Stockton Press (1990); McPherson y cols., *PCR: A Practical Approach*, IRL Press at Oxford University Press (1991); Gait ed., *Oligonucleotide Synthesis* (1984); Miller & Calos eds., *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (1987); Butler ed., *Mammalian Cell Biotechnology* (1991); Pollard y cols., eds., *Animal Cell Culture*, Humana Press (1990); Freshney y cols., eds., *Culture of Animal Cells*, Alan R. Liss (1987); Studzinski, ed., *Cell Growth and Apoptosis, A Practical Approach*, IRL Press at Oxford University Press (1995); Melamed y cols., eds., *Flow Cytometry and Sorting*, Wiley-Liss (1990); *Current Protocols in Cytometry*, John Wiley & Sons, Inc. (updated); Wirth & Hauser, *Genetic Engineering of Animals*

Cells, en: Biotechnology Vol. 2, Pühler ed., VCH, Weinheim 663-744; the series Methods of Enzymology (Academic Press, Inc.), y Harlow y cols., eds., Antibodies: A Laboratory Manual (1987).

**[0086]** Todas las publicaciones y solicitudes de patentes mencionadas en esta memoria descriptiva son indicativas del nivel de habilidad de los expertos en la materia a la cual pertenece la invención. Todas las publicaciones y solicitudes de patentes mencionadas aquí se incorporan en este documento como referencia en su totalidad con el fin de describir más completamente el estado de la técnica a la cual pertenece esta invención. La invención descrita de manera general anteriormente se comprenderá más fácilmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos, los cuales se incluyen en este documento únicamente con el propósito de ilustración de ciertas realizaciones de la presente invención y no se pretende que limiten la invención de manera alguna.

## Ejemplos

### Procedimientos

15

#### 1. Producción de vectores de expresión y sustrato

**[0087]** Se ha descrito la construcción de los vectores de expresión simulados e Int pCMV, pCMVSSInt, pCMVSSInt-h y pCMVSSInt-h/218; Lorbach, E. y cols. (2000) J. Mol. Biol, 296, pp.1175. La expresión de Int es activada por el promotor de citomegalovirus humano.

**[0088]** Los vectores de sustrato utilizados en ensayos de recombinación intramoleculares, que contienen como secuencias repetidas directas *attB/attP* (pλIR) o *attL/attR* (pλER), son derivados de pGEM@4Z (Promega). Se construyó pλIR insertando *attB* como un oligonucleótido de cadena doble en pPGKneo separado por ClaI/EcoRI. Este vector es un derivado de pPGKSSInt-h, en el cual el gen para Int-h se sustituyó por un gen de neomicina (neo) usando PstI/XbaI. El promotor de CMV más el intrón híbrido se generaron por PCR utilizando pCMVSSInt como plantilla y se clonó dentro de un vector pPGKneo que contenía *attB* separado por KpnI/ClaI. A continuación, se clonó esta secuencia CMV-*attB*neo-casete de expresión por PCR en pGEM@4Z separado por BamHI. El sitio *attP*, que contiene una sustitución A a C en el brazo P' que suprime una señal de parada de la traducción, se generó por PCR de ensamblado usando los cebadores

(*attP01*) 5'-GTCACATATCAGTCAAATACAATCA-3', (SEQ ID n.º 3).

(*attP02*) 5'-TGATTGTATTTTGACTGATAGTGAC-3', (SEQ ID n.º: 4)

35

(PFP-Nsil) 5'-CCAATGCATCCTCTGTTACAGGTCCTAATAC-3', (SEQ ID n.º: 5)

y (P'RP-EcoRV-NotI) 5'-ATAAGAATGCGGCCGCAGATATCAGG

40 GAGTGGGACAAAATTGAA-3' (SEQ ID n.º: 6).

**[0089]** Se usó pGFP*attB/attP* como plantilla (Lorbach, E. y cols. (2000), más arriba). El fragmento de PCR se separa con Nsil y NotI y se liga al extremo 3' del fragmento BamHI/PstI que contiene un casete de parada transcripcional, el cual se genera a partir de pBS302 (Gibco/BRL). El gen para GFP y la señal polyA se clonó por PCR utilizando pCMVSSGFP (un derivado de pCMVSSInt-h en el cual el gen Int-h es sustituido por eGFP utilizando PstI/XbaI). El fragmento de PCR que contiene GFP se separa con NotI y XbaI y después se une por ligación con el fragmento de parada transcripcional/*attP* separado por BamHI/NotI en el vector separado por BamHI/XbaI que ya contiene el promotor de CMV, *attB* y el cassette de expresión neo. Se construyó pλER como pλIR, con la excepción de que se generó *attL* por PCR usando pGFP*attL/attR* (Lorbach, E. y cols. (2000), más arriba) como plantilla y se clonó en el pPGKneo separado por ClaI/EcoRI. El sitio *attR* se genera por PCR utilizando como plantilla pGFP*attL/attR* y el producto se separa con Nsil y NotI.

**[0090]** Los vectores de sustrato para los ensayos de recombinación intramoleculares los cuales contienen el promotor de CMV frente a sitios de unión diferentes: pCMV*attP* contienen tres sustituciones G a C en el brazo P. Estos cambios son necesarios para eliminar los codones de inicio ATG que podrían evitar la expresión de GFP después de la recombinación. La sustituciones están fuera de los sitios de unión de proteína en *attP* se introducen por PCR de ensamblado. En primer lugar, se generaron dos productos de PCR superpuestos, uno con el par de cebadores *attP*-ATC-1/*attP*-2 y uno con *attP*-ATC-3/*attP*-4. Se usó pGFP*attB/attP* como plantilla. Los productos de PCR se purificaron en gel y se utilizaron como plantillas para PCR con cebadores *attP*-PstI y *attP*-XbaI. El producto

resultante se digiere con PstI y XbaI y se clona en pCMVSSInt. Las secuencias de cebador para ensamblado por PCR son:

5 (*attP*-ATC-1) 5'-TTTGGATAAAAAACAGACTAGATAATACTGTAAAAACA  
CAAGATATGCAGTCACTA-3', (SEQ ID n.º 7)

(*attP*-2) 5'-TAACGCTTACAATTTACGCGT-3', (SEQ ID n.º 8)

10 (*attP*-ATC-3) 5'-CTGCATATCTTGTGTTTTACAGTATTATCTAGTCTG  
TTTTTTATCCAAAATCTAA-3', (SEQ ID n.º 9)

(*attP*-4) 5'CTGGACGTAGCCTTCGGGCATGGC-3', (SEQ ID n.º 10)

15 (*attP*-PstI) 5'-GACTGCTGCAGCTCTGTTACAGGTCAC-3', (SEQ ID n.º 11)

(*attP*-XbaI) 5'-GACTGTCTAGAGAAATCAAATAATGAT-3' (SEQ ID n.º 12).

20 **[0091]** Se generó pCMV*attB* insertando *attB* como un oligonucleótido de cadena doble dentro de pCMV*attP*mut separado por PstI/XbaI. Se genera pCMV*attL* por PCR utilizando pLER como plantilla para *attL*, el cual se introdujo en pCMV*attP*mut separado por PstI/XbaI.

**[0092]** Se construyeron vectores que contienen una señal de parada transcripcional y un sitio *att* colocado frente al gen GFP sin promotor como sigue: se generó pWS*att*BGFP suprimiendo en primer lugar una parte del gen para higromicina de pTKHyg (Clontech) utilizando Aval y NdeI. La estructura principal del vector se ligó después de que los extremos adhesivos se volvieran romos por medio de polimerasa Klenow. Se clonó un fragmento de *attB*-GFP, generado por PCR, en los sitios MfeI y HindIII y de esta manera se genera un sitio nuevo NheI 5' de *attB*. Finalmente, se insertó la secuencia de parada transcripcional a través de restricción con EcoRI y NheI. Se generó pWS*att*RGFP aislando el fragmento de parada transcripcional -*attR* por BamHI/NotI a partir de pLER, el cual se inserta dentro de pWS*att*BGFP separado con las mismas enzimas. Se generó por PCR pWS*att*PGFP del sitio *attP* usando como plantilla pGFP *attP/attB*, el cual se insertó dentro de pWS *att*BGFP separada con EcoRI/NotI, sustituyendo esta manera a *attB*. Se aislaron plásmidos de la cepa XL1-Blue de *E. coli* utilizando cromatografía de afinidad (Qiagen). Se verifica la composición nucleotídica de los elementos genéticos relevantes por secuenciación de ADN utilizando el sistema 373A basado en fluorescencia (Applied Biosystems).

## 2. Cultivo celular, ensayos de recombinación y citometría de flujo

40 **[0093]** Se cultivan células HeLa en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10 %, estreptomycin [0,1 mg/ml] y penicilina [100 U/ml]. Las células se someten a dos pases antes de la transfección.

45 **[0094]** Los ensayos de recombinación típicos se realizaron según se describe a continuación. Se cosecharon las células, se lavaron con PBS y se resuspendieron en RPMI 1640 sin L-glutamina y rojo de fenol (Life Technologies). Después se introdujeron un total de 60 µg de vectores de expresión y de sustrato en una proporción molar de 1:1 en aproximadamente  $1 \times 10^7$  células a 300 V y 960 µF utilizando un pulsador Gene (Bio-Rad). Tras la electroporación, las células se sembraron en placa a una dilución apropiada, sobre recipientes de 10 cm. Se preparó una suspensión de una sola célula a las 24, 48 y 72 h después de la transfección. Se excluyeron del análisis las células muestras por tinción con 7-amino-actinomicina D (Sigma) y las células se analizan con un equipo FACScalibur (Becton Dickinson).  
50 Los datos de FACS se analizan con el software CeliQuest™. Las eficacias de transfección para los ensayos de recombinación intermolecular se determinaron para cada experimento por cotransfección de 40 µg de pCMV con 20 µg de pEGFP-C1 (Clontech); las correspondientes a la recombinación intramolecular se determinan con 30 µg de pCMV y 30 µg de pEGFP-C1.

55 **[0095]** Se realizaron experimentos con IHF purificadas introduciendo en primer lugar 30 µg de los vectores de expresión Int a aproximadamente  $6 \times 10^6$  células por medio de electroporación, como se describió anteriormente. Después entre 3 y 4 horas, se transfectaron aproximadamente  $1 \times 10^5$  células con 2 µg de vectores de sustrato para recombinación intramolecular, o con un total de 2 µg de vectores de sustrato en una proporción molar de 1:1 para recombinación intermolecular. Los sustratos se preincubaron a temperatura ambiente con 2 µg de IHF purificada

(Lange-Gustafson BJ, Nash HA., Purification and properties of Int-h, a variant protein involved in site-specific recombination of bacteriophage lambda., J Biol Chem. 1984 Oct 25;259(20):12724-32) en un tampón salino bajo (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) durante al menos 30 minutos. La transfección de los complejos de IHF-ADN se llevó a cabo con FuGene (Boehringer Mannheim) y las eficacias siempre estuvieron en el intervalo del 80 %. Las células se analizaron por citometría de flujo después de 48 h adicionales como se describió anteriormente.

**[0096]** Se incubaron células CHO-DG44/dhfr<sup>-/-</sup> (Urlaub, G. y cols., (1983), Cell, 33, pp. 405), cultivadas permanentemente en suspensión en medio libre de suero CHO-S-SFMII (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con hipoxantina y timidina (Invitrogen, Carlsbad, CA), en matraces de cultivo celular a 37 °C en una atmósfera humidificada con un contenido del 5 % de CO<sub>2</sub>. Las células se sembraron a una concentración de 1-3x10<sup>5</sup> células/ml en medio fresco cada dos a tres días.

**[0097]** Las transfecciones estables de células CHO-DG44 se llevan a cabo utilizando el reactivo Lipofectamine Plus (Invitrogen, Carlsbad, CA). Por transfección, se sembraron 6x10<sup>5</sup> células en crecimiento exponencial en 0,8 ml de medio CHO-S-SFMII suplementado con hipoxantina-timidina (HT) en un pocillo de una cámara de 6 pocillos. Se utilizó para cada transfección un total de 1 µg de ADN plasmídico, 4 µl de Lipofectamine y 6 µl de reactivo Plus en un volumen de 200 µl y se añadió a las células, siguiendo el protocolo del fabricante. Después de incubación durante 3 horas se añadieron 2 ml de medio CHO-S-SFMII suplementado con HT. En el caso de la selección basada en neomicina fosfotransferasa, el medio se sustituyó dos días después de la transfección con medio CHO-S-SFMII suplementado con HT y 400 µg/ml de G418 (Invitrogen) y las poblaciones de células mezcladas se seleccionaron durante dos a tres semanas con cambios de medio cada 3 a 4 días. Para la selección basada en DHFR de las células CHO-DG44 transfectadas de manera estable, se utilizó medio CHO-S-SFMII sin hipoxantina/timidina. La amplificación del gen basada en DHFR se obtiene al añadir metotrexato 5 - 2000 nM (Sigma, Deisenhofen, Alemania) como agente de selección de amplificación para el medio. 3. ELISA de MCP-1 y sICAM

**[0098]** Los títulos de sICAM en sobrenadantes de células CHO-DG44 transfectadas de manera estable se cuantificaron por ELISA con protocolos estándar (Ausubel, F.M. y cols., (1994, actualizado) Current protocols in molecular biology. New York: Greene Publishing Associated and Wiley-Interscience) utilizando dos anticuerpos monoclonales específicos para sICAM desarrollados en el laboratorio (como se describe, por ejemplo en las patentes de EE .UU. n.º 5,284,931 y 5,475,091), por lo que uno de los anticuerpos es un anticuerpo conjugado a HRPO. Se utiliza como patrón proteína sICAM purificada. Las muestras se analizaron utilizando un lector Spectra Fluor Plus (TECAN, Crailsheim, Alemania).

**[0099]** Los títulos de MCP-1 en los sobrenadantes de células CHO-DG44 transfectadas de manera estable se cuantificaron por ELISA utilizando el equipo MCP-1 humano de OptEIA, de acuerdo con el protocolo del fabricante (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Alemania).

### Ejemplo 1: Cinética de las reacciones de recombinación intramoleculares e intermoleculares

**[0100]** Hemos demostrado en estudios anteriores que las reacciones de recombinación integrantes y escisionales intramoleculares catalizadas por Int mutante en ausencia de factores accesorios naturales en *E. coli* y en células humanas (Christ, N. y cols. (1999), más arriba; Lorbach, E. y cols. (2000), más arriba). No obstante, una cuestión interesante con respecto a las interacciones de ADN episómico dentro de células de mamífero se relaciona con la capacidad de Int mutante para realizar recombinación intermolecular, es decir, cuando se localizan dos sitios de recombinación en moléculas de ADN diferentes en relación trans. Por lo tanto, comparamos las reacciones de combinación integrante intramoleculares e intermoleculares en primer lugar.

**[0101]** La recombinación intramolecular se analizó con un sustrato que contiene *attB* y *attP* como secuencias repetidas directas que flanquean una señal de parada transcripcional. A su vez, este casete de recombinación está flanqueada por un promotor de CMV y la región codificante para GFP. La recombinación entre *attB* y *attP* genera sitios híbridos *attL* y *attR*, y lleva a la escisión de la señal de parada. La expresión subsecuente del gen GFP de esta manera sirve como un indicador de recombinación (figura 2A, parte superior).

**[0102]** Los vectores de expresión ya sea para Int, Int-h o Int-h/218 se cotransfectan con el vector de sustrato en células HeLa. Se utiliza la estructura principal del vector de expresión (simulado) como un control negativo. Las eficacias de transfección determinadas independientemente para cada experimento se encuentran en el intervalo de entre el 95 y el 98 % (datos no mostrados). El análisis FACS de 3 experimentos muestra que ambos mutantes Int catalizaron eficazmente la recombinación, lo que llevó en ciertos experimentos a células que expresan

aproximadamente el 30 % de GFP (figura 2A, parte inferior). La secuencia nucleotídica de los productos de recombinación, determinada indirectamente por secuenciación de ADN o de fragmentos de PCR, confirma que las reacciones de transferencia estándar catalizadas por Int mutante generaron los sitios *att* híbridos esperados (datos no mostrados).

5

**[0103]** Es evidente que el mutante doble Int-h/218 es más activo que Int-h, mientras que Int natural es casi inactiva. La fracción de células que expresa GFP se incrementa durante 48 h después de la transfección y permanece estable durante las siguientes 24 h. El curso en el tiempo de las reacciones también indica que la mayor parte de los sucesos de recombinación deben haber sucedido en las primeras 24 h. Esto concuerda con el curso en el tiempo de la expresión de Int-h/218 en células HeLa (datos no mostrados). Aunque no se puede excluir la posibilidad de que una fracción de células que expresan GFP resultase de recombinación integrante intermolecular en vez de intramolecular, los datos generados se pueden utilizar como una referencia para nuestro análisis de recombinación intermolecular.

10

**[0104]** Analizamos la recombinación integrante intermolecular colocando *attB* y *attP* en plásmidos separados. La recombinación desplaza al promotor de CMV a una posición hacia el extremo 5' del gen para GFP (figura 2B, parte superior). Por lo tanto, únicamente la recombinación intermolecular entre *attB* y *attP* generará células que expresan GFP. El análisis por FACS después de cotransfección de los dos vectores de sustrato con los vectores de expresión Int generó resultados que son comparables con los generados con sustratos para recombinación intramolecular (figura 2B, parte inferior). Nuevamente, la mayor parte de los sucesos de recombinación deben haberse producido dentro de las primeras 24 horas después de la transfección e Int-h/218 fue más activo que Int-h. La Int natural generó únicamente una fracción muy pequeña de células que expresan GFP. Estos resultados demuestran que durante un tiempo de 24 a 72 h, la recombinación integrante intermolecular por el mutante Int es al menos tan eficiente como la reacción intramolecular correspondiente.

25

**[0105]** Se utiliza la misma estrategia experimental para comparar las vías de recombinación escisionales intramoleculares e intermoleculares (*attL* x *attR*). Los resultados muestran nuevamente que la recombinación intermolecular por Int mutante es tan eficiente como la recombinación intramolecular (figura 2C y D). No obstante, la eficacia de las reacciones de recombinación escisionales se redujo ligeramente en comparación con la recombinación integrante. La recombinación por Int natural nuevamente es escasamente detectable.

30

### **Ejemplo 2: Los sitios de unión a brazo de ADN en *att* no se requieren, pero estimulan la recombinación.**

**[0106]** Los resultados hasta ahora muestran que la Int mutante catalizó la recombinación integrante y escisional sobre sustratos episómicos en un número significativo de células transfectadas. Por el contrario, las actividades de recombinación de Int natural es escasamente detectable en comparación con el fondo. Dado que la recombinación escisional por Int natural depende de la presencia de cofactores proteínicos IHF y XIS pero no requiere de superenrollado de ADN negativo, este resultado demuestra que las partes eucarióticas de estos cofactores no se encuentran en células humanas. Además, se sabe que los sustratos episómicos se relajan topológicamente poco después de la transfección (Schwikardi y cols. (2000) FEBS Letters, 471, pp. 147). Por lo tanto, parece que Int mutante realiza la recombinación sin la formación de complejos nucleoproteínicos definidos, tales como el intasoma ensamblado en *attP*. Esto hace surgir la cuestión del papel funcional de los sitios de unión a brazo de ADN en la recombinación. Se encuentran presentes en al menos uno de los sitios *att* asociados utilizados hasta ahora.

40

**[0107]** Para investigar esta cuestión se utilizó recombinación intermolecular con pares de sustratos vectores que contenían *attB* o *attP* en diversas combinaciones (figura 3A). La fracción de células que expresan GFP que resulta de la recombinación se determinó por FACS a las 48 h después de la cotransfección con los vectores de expresión Int. Las eficacias de transfección fueron siempre superiores al 90 % (datos no mostrados). Los resultados de tres experimentos muestran que la recombinación intermolecular entre pares de *attP* es tan eficiente como la recombinación entre *attB* y *attP* (figura 3B). No obstante, únicamente Int-h/218 utilizó pares de sitios *attB* como sustrato en un grado significativo. La eficacia de esta reacción es, en término medio, reducida aproximadamente cuatro veces en comparación con reacciones entre *attP* y *attP* o *attB* y *attP* (figura 3B). Por lo tanto, la fracción de células que expresan GFP que resulta de la recombinación entre dos sitios *attB* se redujo hasta un nivel comprendido entre el 4 y el 5 %. Estos resultados demuestran que la presencia de secuencias de tipo brazo en sitios *att* no se requiere para recombinación por Int-h/218, si bien estimula de manera significativa la reacción. Este efecto estimulador es incluso más pronunciado (aproximadamente ocho veces) cuando se utiliza Int-h. Además, la actividad de recombinación residual observada con Int natural parece altamente dependiente de la presencia de los sitios de unión a brazo.

55

**Ejemplo 3: La recombinación por Int natural es estimulada por proteína IHF transfectada**

[0108] La recombinación integrante eficiente catalizada por Int natural *in vitro* y en *E. coli* requiere el cofactor proteínico IHF y superenrollado de *attP*. Así pues, la aparente carencia de cualquiera de los cofactores en células de mamífero nos llevó a investigar si la actividad de recombinación residual de Int natural aumenta si se purifica IHF, se preincuba con un sustrato superenrollado y se cointroduce en células HeLa. Para analizar esta posibilidad introdujimos primero vectores de expresión ya sea para Int natural o Int-h. A las 3 a 4 h después de la electroporación los sustratos para recombinación intramolecular o intermolecular se incubaron, con o sin IHF purificado. Seguidamente, las mezclas de proteína-ADN, así como las muestras de control sin proteína, se transfectoron utilizando Fugene (figura 4A). Las fracciones de células que expresan GFP se compararon después de 48 h adicionales.

[0109] Los resultados de tres experimentos muestran que la recombinación intramolecular por Int natural fue estimulada, en promedio, hasta cinco veces debido a la presencia de IHF. La fracción de células GFP positivas se incrementó, por ejemplo, en un experimento de aproximadamente el 1 % en presencia de IHF al 6 % en su presencia. El efecto estimulador sobre la recombinación intermolecular también fue significativo, pero menos pronunciado (aproximadamente tres veces). 48 h después de la transfección, la estimulación fue específica para Int natural, dado que la actividad de Int-h no se ve alterada. De manera importante, los controles muestran que las eficacias de transfección tampoco se vieron afectadas por la presencia de proteína IHF (datos no mostrados).

**Ejemplo 4: Sistema de expresión de proteína mejorado basado en recombinación específica de secuencia del gen de interés**

[0110] Se transfectan de manera estable células CHO-DG44 con un primer ADN plasmídico linealizado que expresa la proteína fluorescente ZsGreen1 del género *Zoanthus sp.* (Clontch Laboratories Inc., Palo Alto, CA, EE. UU.) y el gen para resistencia a antibiótico neomicina fosfotransferasa (figura 5). Además, ya sea la secuencia de recombinación de *attB* o *attP* (secuencia natural o modificada o derivado de la misma) se coloca entre el gen para la proteína fluorescente y su promotor. El primer ADN plasmídico, linealizado mediante la utilización de una enzima de restricción con un sitio de restricción único fuera de las unidades de transcripción para ambos marcadores de selección, se introduce por integración aleatoria dentro del genoma de CHO-DG44. Las células con una integración aleatoria estable exitosa del primer ADN plasmídico se seleccionan positivamente por cultivo en presencia del antibiótico G418. Dentro del acumulado heterogéneo de células transfectantes estables con una alta actividad de transcripción en el sitio de integración del primer ADN plasmídico se pueden aislar simplemente por clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) basada en el nivel de expresión de la proteína fluorescente introducida ZsGreen1. Las células con la más alta fluorescencia de ZsGreen1 se clasifican y colocan como células solas dentro de los pocillos de una placa de 96 pocillos. Los subclones de células resultantes se expanden y se analizan mediante mapeado con endonucleasa de restricción por análisis de transferencia Southern para integración de una secuencia plasmídica única en un sitio cromosómico único. El ADN genómico de los subclones de células se digieren con enzimas de restricción con sitios de restricción nulos, uno o múltiples dentro del primer ADN plasmídico introducido, respectivamente, que se somete a electroforesis en gel de agarosa 0.8% y se transfiere a membrana de nailon cargada positivamente (Amersham Biosciences, Friburgo, Alemania). La hibridación se realizó durante la noche a 65 °C en un horno de hibridación con una sonda marcada con FITC-dUTP cebada aleatoria que consiste en el gen para ZsGreen1 de acuerdo con el protocolo de un módulo de marcado de cebado aleatorio de Gene Images (Amersham Biosciences). Los subclones candidatos con un inserto de una sola copia se analizan posteriormente en biorreactores a pequeña escala para determinar su funcionamiento en un proceso de alimentación por lotes que imita la producción. Además de altos niveles de expresión durante la fase de producción completa, monitorizados midiendo la fluorescencia de ZsGreen1, se tienen en cuenta otros parámetros importantes tales como alta viabilidad a alta densidad celular, metabolismo y un rendimiento reproducible. De esta manera se identifica una célula anfitriona adecuada con una primera secuencia de integración *att* integrada. Para generar una estirpe célula de producción que produce una sustancia biofarmacéutica por recombinación específica de secuencia, esta célula anfitriona es transfectada con un segundo ADN plasmídico (véase la figura 5) que contiene un gen para dihidrofolato reductasa sin promotor precedido ya sea por la secuencia de recombinación *attB* o un *attP* (una secuencia natural o modificada o un derivado de la misma) y una unidad de transcripción completa para la expresión del gen de interés, por ejemplo, sICAM terapéutico frío común (molécula 1 de adhesión intercelular soluble) o la proteína-1 quimioatrayente de monocitos humanos (MCP-1). Además se cotransfecta el vector pCMVSSInt-h/218 que expresa la integrasa del bacteriófago lambda mutada (modificada). Después de la transfección, la expresión transitoria de Int-h/218 es suficiente para realizar la recombinación intermolecular específica de secuencia entre el primer sitio de recombinación *att* (ya sea *attP* o *attB*) localizada en un locus activo transcripcional preferente dentro del genoma de la célula anfitriona y el segundo sitio de recombinación de *att* (ya sea *attP* o *attB*) en el segundo plásmido de ADN

introducido. Para seleccionar células en las que se ha producido recombinación específica de secuencia entre *attP* y *attP*, *attP* y *attB* o *attB* y *attB*, dependiendo de la selección de la secuencia de recombinación en el primer y el segundo plásmido de ADN, las células transfectadas se transfieren y cultivan en medio CHO-S-SFMII sin los suplementos de hipoxantina y timidina. Únicamente los resultados dirigidos correctamente en las células que sobreviven a la selección al colocar por medio de la recombinación el gen marcador dhfr sin promotor con un sitio de recombinación *att* hacia el extremo 5' en el segundo ADN plasmídico bajo el control de la secuencia promotora del gen ZsGreen1 con un sitio de recombinación *att* hacia el extremo 3' y de esta manera se permite la expresión eficaz del gen marcador de selección DHFR. Al mismo tiempo se interrumpe el casete de expresión funcional del gen ZsGreen1 dejando atrás al gen ZsGreen1 sin promotor. De esta manera las células dejan de expresar proteínas fluorescentes. Las células no fluorescentes se identifican y aíslan por FACS proporcionando un medio para detectar a las células productoras de la proteína de interés. Además, la integración específica de la secuencia se verifica por transferencia Southern y análisis PCR con cebadores que se localizan en las secuencias que flanquean a los sitios *att* antes y después de recombinación específica de sitio seguida por secuenciación subsecuente del ADN. La expresión de la proteína de interés, sICAM o MCP-1, se analizó por ELISA.

**[0111]** El uso de dhfr como gen marcador para la generación de producción de estirpes celulares ofrece no solo la ventaja de selección positiva sino también la posibilidad de incrementar aún más la productividad de la célula por amplificación de gen basada en dhfr, inducida por metotrexato. Esto se obtiene al suplementar el medio de cultivo sin hipoxantina/timidina CHO-S-SFMII al incrementar las cantidades de metotrexato.

LISTADO DE SECUENCIAS

**[0112]**

- <110> BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA GmbH & Co. KG Dröge, Peter
- <120> Recombinación de ADN específica de secuencia en células eucariotas
- <130> DRO-003 PCT
- <140> desconocido
- <141> 2003-11-28
- <150> CA 2,413,175
- <151> 28/11/2002
- <150> US 10/310,695
- <151> 05/12/2002
- <160> 17
- <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 10
- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia de consenso para el sitio de unión Int
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (1)..(1)
- <223> c o a
- <400> 1
- magtcactat 10
- <210> 2



ES 2 507 665 T3

<211> 243  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> attP derivative

<400> 2

```
tctgttacag gtcactaata ccactaagt agttgattca tagtgactgc atatcttgtg      60
ttttacagta ttatctagtc tgttttttat ccaaaatcta atttaataata ttgatattta    120
tatcatttta cgtttctcgt tcagcttttt tatactaagt tggcattata aaaaagcatt     180
gcttatcaat ttgttgcaac gaacagggtca ctatcagtca aaataaaatc attatttgat    240
ttc                                                                           243
```

10

<210> 3  
<211> 25  
<212> DNA  
15 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador

20 <400> 3

```
gtcactatca gtcaaaatac aatca      25
```

<210> 4  
25 <211> 25  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
30 <223> cebador

<400> 4

```
tgattgtatt ttgactgata gtgac    25
```

35

<210> 5  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

40

<220>  
<223> cebador

<400> 5

45

```
ccaatgcatc ctctgttaca ggtcactaat ac    32
```

<210> 6  
<211> 44  
50 <212> DNA  
<213> Secuencia artificial

ES 2 507 665 T3

<220>  
<223> cebador

<400> 6  
5 ataagaatgc ggccgcagat atcagggagt gggacaaaat tga 44

<210> 7  
<211> 55  
10 <212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador

<400> 7

ttggataaa aaacagacta gataatactg taaaacacaa gatatgcagt cacta 55  
20

<210> 8  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

25

<220>  
<223> cebador

<400> 8  
30 taacgcttac aattacgcg t 21

<210> 9  
<211> 55  
35 <212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador

40

<400> 9

ctgcatact tgtgtttac agtattatct agtctgttt ttatccaaaa tctaa 55

45 <210> 10  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> cebador

<400> 10

55 ctggacgtag cctcgggca tggc 24

<210> 11  
<211> 27  
<212> DNA

ES 2 507 665 T3

<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador

5 <400> 11

gactgctgca gctctgttac aggtcac 27

10 <210> 12  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> cebador

<400> 12

20 gactgtctag agaaatcaaa taatgat 27

<210> 13  
<211> 21  
<212> DNA

25 <213> Escherichia coli

<400> 13

ctgcttttt atactaact g 21

30 <210> 14  
<211> 243  
<212> DNA  
<213> Bacteriófago lambda

35 <400> 14

tctgttacag gtcactaata ccatctaagt agttgattca tagtgactgc atatgtttgtg 60

ttttacagta ttatgtagtc tgttttttat gcaaaatcta atttaataata ttgatattta 120

tatcatttta cgtttctcgt tcagcttttt tatactaagt tggcattata aaaaagcatt 180

gcttatcaat ttgttgcaac gaacaggtea ctatcagtea aaataaaatc attatttgat 240

ttc 243

40 <210> 15  
<211> 102  
<212> DNA  
<213> Escherichia coli

45 <400> 15

ctgctttttt atactaagtt ggcattataa aaaagcattg ottatcaatt tgttgcaacg 60

aacaggteac tateagtea aataaaatca ttatttgatt tc 102

<210> 16

50 <211> 162

ES 2 507 665 T3

<212> DNA  
<213> Escherichia coli

<400> 16

5

```
tctgttacag gtcactaata ccatctaagt agttgattca tagtgactgc atatggttg  
ttttacagta ttatgtagtc tgttttttat gcaaaatcta atttaataata ttgatattta  
tatcatttta cgtttctcgt tcagcttttt tatactaact tg
```

<210> 17

<211> 27

10 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

15 gaaattcttt ttgatactaa cttgtgt 27.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento *in vitro* o *ex vivo* para expresar al menos un gen de interés que codifica para uno o más producto(s)/polipéptido(s) terapéutico(s) deseado(s) en una célula eucariota, en el que la célula eucariota no es un ovocito humano ni una célula madre embrionaria humana, que comprende
- 5 a) introducir de un primer ADN que comprende una secuencia *attB* de SEQ ID n.º: 13, una *attP* de SEQ ID n.º 14, una *attL* de SEQ ID n.º 15 o una *attR* de SEQ ID n.º 16 o un derivado de la misma en el interior de una célula;
- 10 b) seleccionar subclones candidatos en un biorreactor a pequeña escala que imita un proceso de producción de alimentación por lotes basado en parámetros tales como una alta viabilidad a alta densidad celular, el metabolismo y la capacidad de permitir una alta expresión y un rendimiento reproducible durante la producción,
- c) introducir un segundo ADN que comprende una secuencia *attB* de SEQ ID n.º: 13, *attP* de SEQ ID n.º: 14, *attL* de SEQ ID n.º: 15 o *attR* de SEQ ID n.º: 16 o un derivado de la misma, y al menos un gen de interés que codifica para una proteína terapéutica en la célula del paso b);
- 15 d) poner en contacto dicha célula con una integrasa Int de bacteriófago *lambda*;
- 20 e) realizar la recombinación específica de secuencia por una integrasa Int de bacteriófago *lambda*, en donde el segundo ADN se integra dentro del primer ADN;
- f) cultivar dicha célula en condiciones en las que se expresa(n) el(los) gen(es) de interés, en las que dicha célula se cultiva en medio libre de suero y en cultivo en suspensión; y
- 25 g) aislar dicho producto(s)/polipéptido(s) terapéutico(s) deseado(s) de la célula anfitriona o del medio de cultivo celular, en donde dicho derivado se define como una secuencia *attB*, *attP*, *attL* y *attR* que tiene una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete sustituciones en la región de superposición y/o en la región de núcleo, o al menos un sitio de unión Int a núcleo de *attB*, *attP*, *attL* o *attR*, o al menos un sitio de unión Int a núcleo de *attP*, *attL* o *attR* más una o más copias de los sitios de unión a brazo para Int, o al menos un sitio de unión Int a núcleo de *attP*, *attL* o *attR* más una o más copias de los sitios de unión de factor IHF, FIS o XIS, o combinaciones de los mismos.
- 30
2. Un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha primera secuencia de ADN comprende una secuencia *attB* o un derivado de la misma, dicha segunda secuencia comprende una secuencia *attB*, *attL* o *attR* o un derivado de la misma, o en el que si dicha primera secuencia de ADN comprende una secuencia *attP* o un derivado de la misma, dicha segunda secuencia comprende una secuencia *attP*, *attL* o *attR* o un derivado de la misma, o en el que si dicha primera secuencia de ADN comprende una secuencia *attL* o un derivado de la misma, dicha segunda secuencia comprende una secuencia *attB*, *attP* o *attL* o un derivado de la misma, o en el que si dicha primera secuencia de ADN comprende una secuencia *attR* o un derivado de la misma, dicha segunda secuencia comprende una secuencia *attB*, *attP* o *attR* o un derivado de la misma, y en el que dicho derivado se define como una secuencia *attB*, *attP*, *attL* y *attR* que tiene una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete sustituciones en la región de superposición y/o en la región de núcleo, o al menos un sitio de unión Int a núcleo de *attB*, *attP*, *attL* o *attR*, o al menos un sitio de unión Int a núcleo de *attP*, *attL* o *attR* más una o más copias de los sitios de unión a brazo para Int, o al menos un sitio de unión Int a núcleo de *attP*, *attL* o *attR* más una o más copias de los sitios de unión de factor IHF, FIS o XIS, o combinaciones de los mismos.
- 35
3. Un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el primer ADN se ha integrado en el genoma, un minicromosoma artificial o un elemento episómico de la célula anfitriona, antes de que se introduzca dicho segundo ADN en dicha célula.
- 40
4. Un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el primer ADN se ha integrado en el genoma de la célula anfitriona.
- 45
5. Un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha recombinación específica de secuencia se realiza por Int y uno o más cofactores seleccionados entre XIS, FIS y/o IHF.
- 50
6. Un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* e acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la recombinación específica de secuencia se realiza por una Int modificada, que tiene al menos el 90 % de la

actividad de la Int natural.

7. Un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la Int modificada es Int-h o Int-h/218.
- 5 8. Un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, en el que Int, Int-h o Int-h/218, XIS, FIS y/o IHF se añaden a la célula en forma purificada o se coexpresan por dicha célula anfitriona, en donde se realiza la recombinación específica de secuencia.
- 10 9. Un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que adicionalmente se introducen en la célula una tercera o una tercera y cuarta secuencias de ADN que comprenden un gen para Int, o un gen para Int y uno o más genes cofactores seleccionados entre el gen para XIS, el gen para FIS y/o el gen para IHF, respectivamente.
- 15 10. Un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que no se requiere XIS, FIS ni IHF cuando se realiza la recombinación específica de secuencia por una Int modificada, que tiene al menos el 90 % de la actividad de la Int natural.
- 20 11. Un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la Int modificada es Int-h o Int-h/218.
- 25 12. Un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la primera y/o la segunda secuencia de recombinación comprende además un ácido nucleico que codifica para un polipéptido terapéutico de interés.
- 30 13. Un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho polipéptido terapéutico de interés es un anticuerpo, hormona o factor de crecimiento.
14. Un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la célula anfitriona es una célula de mamífero.
- 35 15. Un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la célula de mamífero es una célula de roedor.
- 40 16. Un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la célula de mamífero es una célula de ratón o de hámster.
17. Un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la célula de hámster es una célula BHK o CHO y la célula de ratón es una célula de mieloma murino.
18. Un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* de acuerdo con la reivindicación 17, en el que la célula de mieloma murino es una célula NS0 o Sp2/0.

Fig. 1

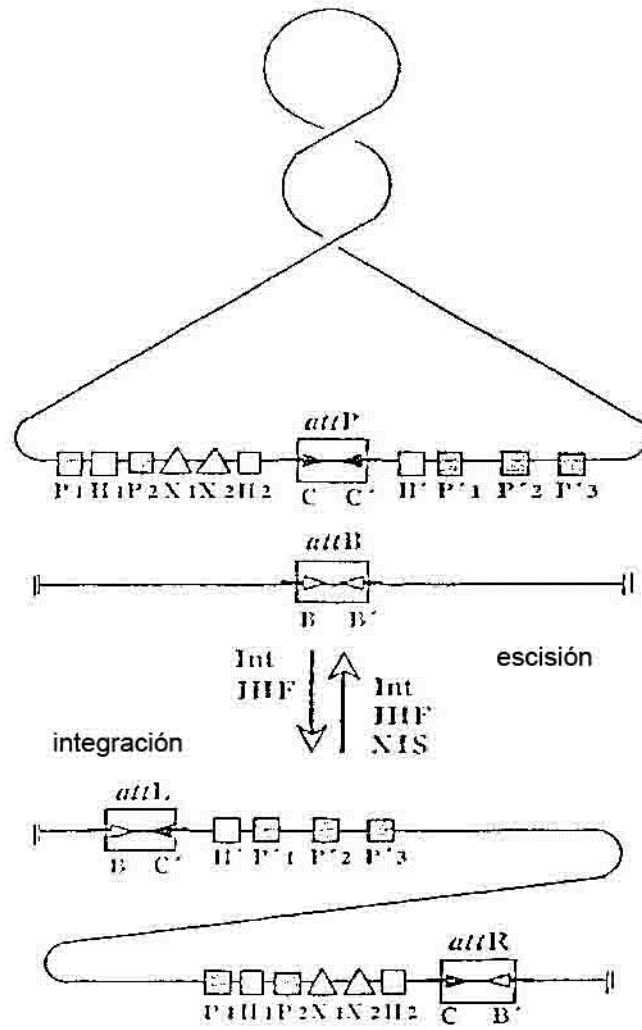






Fig. 3

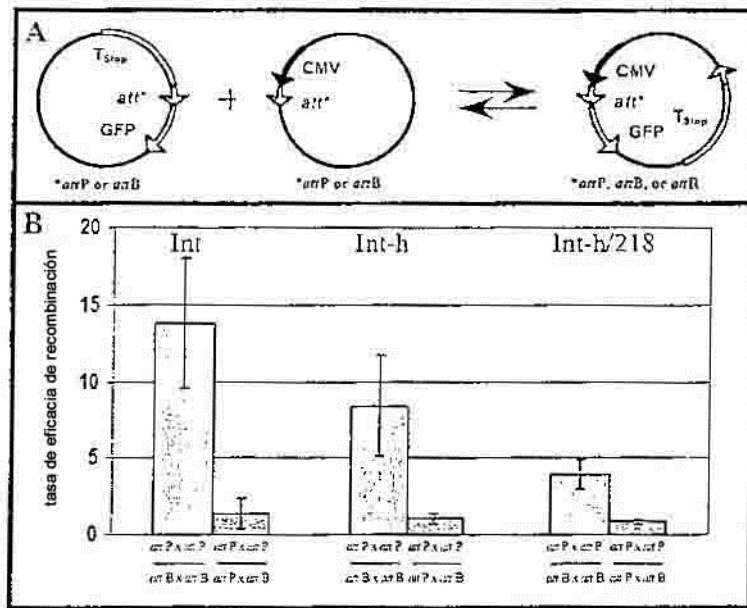


Fig. 4

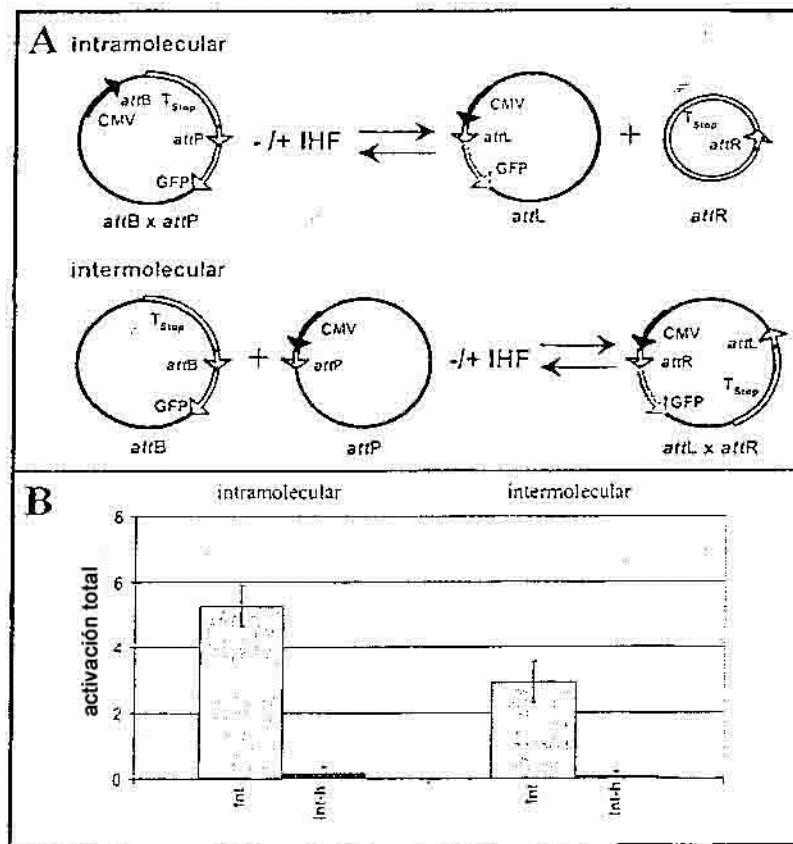


Fig. 5

