

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 700**

51 Int. Cl.:

C12N 5/073 (2010.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2010 E 10721938 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 2393919**

54 Título: **Nueva línea de células humanas permanente**

30 Prioridad:

05.02.2009 DE 102009003439

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

08.10.2015

73 Titular/es:

**CEVEC PHARMACEUTICALS GMBH (100.0%)
Gottfried-Hagen Strasse 62
51105 Köln, DE**

72 Inventor/es:

**SCHIEDNER, GUDRUN y
VOLPERS, CHRISTOPH**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 547 700 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

Nueva línea de células humanas permanente

La presente invención se refiere a un método para la producción de una línea de células humanas permanente, que comprende transfectar células amniocíticas humanas primarias con moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica los productos génicos adenovirales E1A y E1B y transfectar subsiguientemente con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el antígeno T grande de SV40 o el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1).

Además de bacterias, levaduras, y células vegetales, se usan células animales en particular para la producción de polipéptidos y proteínas recombinantes. En la actualidad, aproximadamente del 60 al 70% de todas las proteínas terapéuticas son producidas en células de mamíferos (Wurm, Nat. Biotechnology 22, 1393 - 1398, 2004). La producción de polipéptidos o proteínas recombinantes en cultivo celular, es decir in vitro, con fines terapéuticos, de diagnóstico o técnicos, puede efectuarse generalmente de dos diferentes maneras. En líneas de células establecidas estables, duraderas o permanentes, el ácido nucleico que codifica el polipéptido o la proteína deseada se integra en el ADN cromosómico de la célula con al menos una copia y se pasa junto con el juego de cromosomas celulares a las células hijas en la división de la célula (la llamada expresión estable en líneas de células de producción). Para la producción de estas líneas de células de producción estables es necesario que al menos uno de los ácidos nucleicos introducido en la célula mediante transfección lleve una función génica que proporcione una ventaja en términos de selección en cultivo de células durante el crecimiento. El ácido nucleico que tiene tal función génica no está necesariamente en la misma molécula que la casete de expresión para el polipéptido o proteína deseados. Dicha función génica es o bien un gen de resistencia a antibiótico o un gen de resistencia frente a agentes quimioterapéuticos en el medio (por ejemplo, usado frecuentemente para células de mamífero; Wurm, Nat. Biotechnology 22, 1393 - 1398, 2004), un gen que tiene un producto génico que complementa una ruta metabólica deficiente (por ejemplo, usado en células de levadura), o una función génica de transformación (que se muestra para células amniocíticas humanas; Schiedner et al., BMC Biotechnology 8, 13, 2008). De esta forma se asegura que tales células que tienen una integración estable del ácido nucleico transfectado en el ADN cromosómico de la célula y que producen dicho producto génico sobrecrecen otras células sin tal integración y pueden ser seleccionadas. En la preparación de células de producción por transfección en la llamada línea de células hospedadoras por una parte el ácido nucleico que codifica el polipéptido recombinante (el denominado transgén) se transfiere junto con los elementos de regulación transcripcional necesarios, y por otra parte se transfiere una segunda casete de expresión que tiene un gen que codifica un marcador de selección cuyo producto génico proporciona una cierta ventaja en términos de selección. Unos pocos días después de la transferencia de genes durante los cuales se cultivan las células, por ejemplo en un medio de cultivo sin reactivo de selección, se añade al medio un reactivo de selección adecuado. En presencia de dicho reactivo de selección solamente sobreviven y crecen aquellas células que tienen integrados los ácidos nucleicos usados para la transfección y expresión del marcador de selección. Son marcadores de selección usados comúnmente el gen de resistencia a la neomicina, el gen de resistencia a la higromicina y la dihidrofolato reductasa (DHFR) (Wurm, Nat. Biotechnology 22, 1393 - 1398, 2004; Wurm y Jordan, 309 - 333 en: Makrides (Hrsg), Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells, Elsevier, Amsterdam, 2003). En consecuencia, la selección se lleva a cabo en medio de cultivo con reactivos de selección tales como los antibióticos neomicina o higromicina y el glucocorticoide sintético metotrexato, respectivamente. Generalmente, las células que tienen el marcador de selección y el transgén, que sobreviven al proceso de selección y proliferación (los llamados transformantes) son subsiguientemente singularizados (clonados) para asegurar que todas las células en el cultivo son genéticamente idénticas y separar las líneas de células de producción deseadas que tienen la mejor tasa de producción, de las líneas de células con menos capacidad productora.

En cambio, para la llamada expresión transitoria el ácido nucleico introducido en la célula por transfección y que codifica el polipéptido o proteína deseados no está integrado en el ADN cromosómico de la célula y no se selecciona para este resultado, respectivamente. Así pues, el ácido nucleico introducido se diluye generalmente y se pierde en el curso de la división celular durante el crecimiento en cultivo. Esto presupone la naturaleza temporal transitoria de este método de expresión. La selección de las líneas de células de producción estables con una buena eficiencia de expresión lleva varios meses y produce unos costes considerables. En cambio, la cantidad de miligramos de polipéptido o proteína deseados se puede producir en unos pocos días por expresión transitoria. Velocidad y costes son factores esenciales para el desarrollo industrial de los productos biofarmacéuticos y de diagnóstico. La expresión transitoria de proteínas en pequeñas cantidades o de diferentes variantes de proteínas se lleva a cabo por tanto junto a la investigación fundamental para el desarrollo temprano explorativo y preclínico, por ejemplo para la identificación de dianas, el desarrollo del ensayo, la caracterización bioquímica de los productos génicos, para la toxicología y para la farmacocinética, así como para investigaciones farmacodinámicas (Baldi et al., Biotechnol. Lett. 29, 677 - 684, 2007; Pham et al., Molecular Biotechnology 34, 225 - 237, 2006). En cambio, la producción industrial de proteínas en escala de gramos hasta kilogramos para la realización de estudios clínicos más grandes y el suministro al mercado, se realiza mediante líneas de células de producción estables.

Por ejemplo, en el documento EP 1948789 se describe un método para la producción de una línea de células amniocíticas humanas permanente por transfección de un factor de transformación de la célula sin usar un marcador de selección.

Hasta ahora se pudieron producir proteínas secretadas, unidas a la membrana e intracelulares por expresión génica transitoria. Actualmente, las células de mamíferos son los sistemas de expresión más comúnmente usados para muchas proteínas complejas, en particular si dichas proteínas deben usarse con fines terapéuticos, ya que los sistemas de células procariotas y eucariotas simples (por ejemplo, las levaduras) están en clara desventaja en lo que se refiere a modificaciones postraduccionales. Hasta ahora se han utilizado básicamente cuatro líneas de células de mamíferos para la expresión transitoria de proteínas: células COS-1 y COS-7, respectivamente, que derivan de la línea celular CV-1 derivada de células de riñón del mono verde africano; células BHK derivadas de células de riñón de la cría del hámster; células CHO derivadas del ovario del hámster chino; y células HEK293, una línea de células de riñón embrionario humano que tiene características neuronales (Pham et al, Molecular Biotechnology 34, 225 - 237, 2006; Wurm y Bernard, Current Opinion in Biotechnology 10, 156 - 159, 1999). La expresión transitoria en líneas de células de mamífero se basa generalmente en la transfección de un vector de plásmido que incorpora la casete de expresión con la secuencia que codifica el producto génico deseado. También se pueden utilizar vectores de expresión virales, tales como virus Semliki Forest o adenovirus pero son poco comunes ya que son eficientes pero precisan tiempo y están relacionados con altos requisitos de seguridad. Se ha desarrollado una diversidad de métodos físicos y químicos para la transferencia de ADN en células de mamífero cultivadas. Los métodos físicos para la transferencia de genes comprenden electroporación, nucleofección y microinyección. Para el uso de métodos de transfección químicas se utilizan sustancias inorgánicas (por ejemplo coprecipitación de fosfato cálcico/ADN), polímeros catiónicos (p. ej. polietilenimina, el método de DEAE-dextrano) o lípidos catiónicos (la llamada lipofección). El fosfato de calcio y la polietilenimina son los reactivos más comúnmente usados para la transfección para la transferencia de ácidos nucleicos en escalas mayores (de hasta varios litros) (Baldi et al., Biotechnol. Lett. 29, 677-684, 2007).

Los métodos descritos para la expresión transitoria de polipéptidos y proteínas basados en líneas de células que se conocen desde hace mucho tiempo tienen inconvenientes por varias razones. Las bajas eficiencias de expresión son un problema en relación con los métodos transitorios. Para mejorar los rendimientos de la expresión celular se han utilizado diferentes sistemas genéticos para aumentar el número de copias de genes por célula mediante la replicación episomal del ácido nucleico introducido. Las células COS expresan el antígeno T grande del virus de simio 40 (SV40), un factor de replicación que realiza una replicación episomal de un número elevado de copias de plásmidos que llevan un origen de replicación de SV40 (SV40 ori). El evento inicial de dicha replicación es la unión del antígeno T con el origen de replicación SV40 (SV40 ori) con lo cual son reclutados factores de replicación celular para el complejo ADN/antígeno T y es inducida una replicación por la ADN polimerasa celular. Se han descrito dos variantes genéticas de la línea celular HEK293 que se genera por transformación de células renales embrionarias humanas con ADN tipo 5 de adenovirus cortado hace aproximadamente 30 años y que es bien transfectable. Dichas variantes expresan también dicho antígeno T grande de SV40 (HEK293T) y dicho antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1) (HEK293E o 293EBNA-1), respectivamente. Dichas líneas de células deben proporcionar una replicación episomal o amplificación de plásmidos que tienen un SV40-ori y un EBV-oriP, respectivamente. El factor de replicación EBNA-1 interactúa en el último caso con el origen de replicación oriP de EBV. Al menos para las células HEK293E, se ha detectado un aumento de los rendimientos de la expresión usando plásmidos de expresión que contienen oriP. Al contrario que con el uso de EBNA-1 en combinación con el origen de replicación oriP, algunos estudios indican que no tiene lugar una fuerte replicación de plásmidos que tienen SV40-ori en las células HEK293T (Durocher et al., Nucleic Acid Research 30, e9, 2002). Se ha generado una variante estable de células CHO, que expresa el antígeno T grande (LT: Large T-antigen) de poliomavirus (Epi-CHO) y que puede ser utilizado en combinación con un plásmido que lleva el origen de replicación del poliomavirus (PyOri) (Kunaparaju et al., Biotechnology and Bioengineering 91, 670 - 677, 2005). Rendimientos promediados de aproximadamente 10 - 20 mg/litro son producidos por dicha expresión transitoria de proteínas recombinantes por el uso de tales sistemas de células de mamíferos (Baldi et al., Biotechnol. Lett. 29, 677 - 684, 2007). En cambio, rendimientos en el intervalo de varios gramos por litro son normales usando líneas de células de producción estables permanentes, como se mencionó anteriormente, sin embargo con unas necesidades de tiempo y dinero considerablemente mayores.

Otra desventaja más de los sistemas de células utilizados para la expresión de la proteína recombinante hasta ahora es que algunas líneas de células son realmente adecuadas para la expresión transitoria debido a su capacidad para ser transfectadas fácilmente y para permitir la amplificación del plásmido episomal (por ejemplo células HEK293T o HEK293E), pero otras líneas de células se usan preferiblemente para la producción de líneas de células estables debido a sus propiedades en el cultivo y sus rendimientos (por ejemplo, las células CHO). Sin embargo, dado que los sistemas celulares difieren entre ellos en varios aspectos de la modificación postraducciona, los datos de la estructura y función de dichos productos génicos obtenidos para un sistema de células específico después de la expresión transitoria (en su mayor parte en una fase temprana del desarrollo de productos proteínicos terapéuticos) sólo pueden ser transferidos de una forma muy limitada a la estructura y función de dichos productos génicos después de la expresión en líneas de células estables de un sistema de células distinto (en su mayor parte en la fase tardía de desarrollo, para estudios clínicos y suministro comercial). Las modificaciones postraduccionales, como la glicosilación, fosforilación, carboxilación, palmitoilación o segmentaciones específicas, son de gran importancia para las diferentes propiedades de los productos de expresión para muchos candidatos de productos terapéuticos. Pueden tener una influencia sobre la actividad, la solubilidad, la vida media, la estabilidad o la inmunogenicidad. Así pues, los sistemas de células humanas desempeñan un papel cada vez mayor para la producción de proteínas terapéuticas; sólo las células humanas como instalaciones de producción proporcionan una modificación humana auténtica de los productos de expresión y reducen por tanto el riesgo de que se vea afectada la calidad del producto

o de efectos secundarios no deseados. Por ejemplo, se sabe para la eritropoyetina recombinante que se aplica terapéuticamente en los seres humanos, que la proteína producida en células CHO (Epoetina alfa) muestra en sus cadenas laterales de carbohidrato restos de ácido N-glicolilneuramínico, mientras que la proteína producida en células humanas (epoetina delta) - al igual que la eritropoyetina humana natural - no contiene tales restos de azúcar. Dado el hecho de que el ser humano forma de una manera demostrable anticuerpos contra dichas estructuras de azúcar "extrañas", parece ser favorable el uso de un sistema de expresión humana (Varki, Am. J. Phys. Anthropol. 33, 54 - 69, 2001). Actualmente, no hay ningún sistema de células humanas disponible que sea comparativamente bien adecuado para la expresión transitoria y la producción de líneas de células de producción estables y que proporcione así un perfil de producto reproducible sobre todo el desarrollo de una terapia basada en proteína. Las células humanas son particularmente bien adecuadas para la producción de productos bioterapéuticos humanos ya que expresan polipéptidos complejos - al contrario que otras células de mamíferos o células animales - con patrón de modificación postraduccional auténtico. El patrón de glicosilación de proteínas recombinantes complejas, y así la estructura y la disposición de restos de azúcar en la molécula, reproducirán el patrón del polipéptido humano auténtico sustancialmente mejor en la producción en células humanas que en la producción en los sistemas de producción no humanos. Dicho patrón de glicosilación es con frecuencia de una importancia crucial para propiedades importantes del polipéptido, tales como la actividad biológica, la estabilidad, la solubilidad y la inmunogenicidad.

Así pues, el objeto de la invención es proporcionar un método para la producción de una línea de células amniocíticas humanas permanente que es comparativamente bien adecuada para la expresión transitoria de polipéptidos y la producción de líneas de células de producción estables.

Dicho objeto se resuelve por la materia que se define en las reivindicaciones. Las figuras que siguen ilustran la invención.

La Fig. 1 muestra esquemáticamente el ensamblaje de plásmidos para la expresión permanente de antígeno T. En pGS158 (Fig. 1a) el antígeno T se expresa bajo el control del promotor CAG humano (un promotor híbrido del potenciador inmediato-precoc del citomegalovirus humano y un promotor de β -actina de pollo modificado con el primer intrón) (Niwa et al, Gene 108: 193 - 199, 1991), en pGS159 (Fig. 1b) bajo el control del promotor de RSV (virus del sarcoma de Rous) (Makrides, 9 - 26 en: Makrides (Hrsg), Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells, Elsevier, Amsterdam, 2003) y en pGS161 (Fig. 1c) bajo el control del promotor de CMV (citomegalovirus) (Makrides, 9 - 26 en: Makrides (Hrsg), Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells, Elsevier, Amsterdam, 2003).

La Fig. 2 muestra esquemáticamente el ensamblaje de plásmidos para la expresión transitoria de la alfa 1-antitripsina humana (hAAT) y la eritropoyetina humana (Epo), respectivamente, cada uno bajo el control del promotor de CMV humano. El plásmido pGS116 (Fig. 2a) y pGS151 (Fig. 2b) contiene casetes de expresión idénticas para hAAT, pGS151 contiene adicionalmente el origen de la replicación de ADN del virus de simio 40 (SV40 ori). El pGS177 contiene también el ori SV40 además de la casete de expresión de Epo.

La Fig. 3 muestra esquemáticamente la cantidad de hAAT en el sobrenadante del cultivo expresado transitoriamente en diferentes líneas de células amniocíticas que expresan el antígeno T (CAP-T Z582, Z583 y Z597) en comparación con la de células amniocíticas parentales (CAP) sin expresión de antígeno T. En Z582 el antígeno T se expresa bajo el control del promotor CAG (Niwa et al, Gene 108: 193 - 199, 1991), en Z583 bajo el control del promotor de RSV (virus del sarcoma de Rous) (Makrides, 9-26 en: Makrides (Hrsg.), Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells, Elsevier, Amsterdam, 2003) y en Z597 bajo el control del promotor de CMV (citomegalo) (Makrides, 9 - 26 en: Makrides (Hrsg), Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells, Elsevier, Amsterdam, 2003).

La Fig. 4 muestra esquemáticamente la cantidad de hAAT (barras) expresada transitoriamente en el sobrenadante de cultivo y el número de células vivas (líneas) en diferentes momentos después de la transfección de un plásmido sin ori SV40 (hAAT/número de células - ori, plásmido pGS116) y con ori SV40 (hAAT/número de células + ori, pGS151), respectivamente.

La Fig. 5 muestra esquemáticamente la cantidad de hAAT (barras) expresada transitoriamente en el sobrenadante de cultivo y el número de células vivas (líneas) en diferentes momentos después de la transfección de pGS151 (con ori SV40) en células CAP-T y HEK293T.

La Fig. 6 muestra esquemáticamente el número de copias intracelulares de plásmidos pGS116 (sin SV40 ori) y pGS151 (con SV40 ori), respectivamente, en diferentes momentos después de la transfección en células HEK293-T y CAP.

La Fig. 7 muestra esquemáticamente la cantidad de hAAT expresada transitoriamente (barras) en el sobrenadante de cultivo y el número de células vivas (líneas) en diferentes momentos después de la transfección de pGS151 (con SV40 ori) en CAP-T con polietilenimina (PEI) como reactivo de transfección.

El término "amniocitos", como se usa en el presente texto, se refiere en el más amplio sentido a todas las células que están presentes en el líquido amniótico y pueden obtenerse por amniocentesis. Se originan ya sea del amnios o bien del tejido fetal que está en contacto con el líquido amniótico. Se han descrito tres clases principales de

amniocitos que pueden distinguirse basándose en criterios morfológicos: células como los fibroblastos (células F), células epiteloides (células E) y células del líquido amniótico (células del líquido amniótico, células AF) (Hohn et al, *Pediat . Res.* 8: 746 - 754, 1974). Las células AF son el tipo de células predominante.

5 El término "casete de expresión" se refiere en particular a una molécula de ácido nucleico y una región de una molécula de ácido nucleico, respectivamente, que contiene un elemento regulador o promotor que está situado en frente de la región de codificación, una región de codificación y un marco de lectura abierto, respectivamente, así como un elemento de terminación transcripcional que está detrás de la región de codificación. El elemento regulador y el promotor, respectivamente, que residen en frente de la región de codificación, pueden ser un promotor constitutivo, es decir, un promotor que activa la transcripción permanentemente (por ejemplo, promotor CMV), o un promotor regulable, es decir, un promotor que puede ser conectado y/o desconectado (por ejemplo, un promotor regulable de tetraciclina). La región de codificación de la casete de expresión puede ser un marco de lectura abierto continuo como en el caso de un ADNc que tiene un codón de inicio en el extremo 5' y un codón de parada en el extremo 3'. La región de codificación puede consistir en una disposición genómica o una disposición recién combinada de exones de codificación e intrones no codificadores intercalados. Sin embargo, la región de codificación de la casete de expresión puede consistir en varios marcos de lectura abiertos, separadas por los llamados IRES (Internal Ribosome Entry Sites: sitios internos de entrada al ribosoma).

El término "líneas de células permanentes", como se usa en el presente texto, se refiere a células que se modifican genéticamente de una manera tal que pueden seguir creciendo permanentemente en un cultivo de células bajo condiciones de cultivo adecuadas. Tales células son también llamadas células inmortalizadas.

20 El término "polipéptido" o "polipéptido recombinante", como se usa en el presente texto, se refiere a péptidos que consisten en al menos 2 aminoácidos. El polipéptido puede ser modificado co- y/o post-traduccionalmente, por ejemplo por la unión de restos de azúcar o por modificación de residuos de aminoácidos. El polipéptido puede ser lineal, circular o ramificado. Además, el polipéptido puede consistir en más de una cadena de aminoácidos, en donde las cadenas pueden adoptar estructuras tridimensionales más o menos complejas mediante enlaces intra y/o intermoleculares (por ejemplo, estructura secundaria, terciaria, cuaternaria). Si el polipéptido consiste en una cadena de aminoácidos, puede adoptar estructuras tridimensionales más o menos complejas también mediante enlaces intramoleculares. Los polipéptidos pueden ser polipéptidos farmacológica o inmunológicamente activos o polipéptidos usados con fines de diagnóstico.

30 La expresión "células primarias", como se usa en el presente texto, se refiere a células que fueron obtenidas mediante la extracción directa de un organismo o un tejido y puestas en cultivo. Las células primarias muestran solamente una vida útil muy limitada.

El término "líneas de células de producción", como se usa en el presente texto, se refiere a líneas de células permanentes que fueron modificadas genéticamente de forma estable mediante la introducción de un transgén que codifica el polipéptido deseado que se quiere producir.

35 El término "CAP", como se usa en el presente texto, se refiere a una línea de células amniocíticas humanas permanente generada por inmortalización de amniocitos humanos primarios con las funciones génicas adenovirales E1A y E1B.

El término "CAP-T", como se usa en el presente texto, se refiere a células CAP que son además transfectadas establemente con una molécula de ácido nucleico que contiene la secuencia del antígeno T grande de SV40.

40 El término "transfección", como se usa en el presente texto, se refiere a cualquier método adecuado para la introducción en las células del ácido o los ácidos nucleicos mencionados. Como ejemplos cabe mencionar el método del fosfato de calcio, electroporación, sistemas liposómicos de cualquier tipo y combinaciones de estos métodos.

45 La expresión "expresión transitoria" como se usa en el presente texto, se refiere a cualquier método en el que el ácido o los ácidos nucleicos se introducen en la célula por transfección sin la selección de líneas de células estables por un método de selección adecuado, dichas líneas de células estables pueden ser cultivadas más adelante en cultivo de células permanentemente.

La expresión "expresión estable", como se usa en el presente texto, se refiere a la expresión de un transgén en líneas de células de producción.

50 El término "transgén", como se usa en el presente texto, se refiere a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido recombinante.

Un objeto de la presente invención se refiere a un método para producir una línea de células amniocíticas humanas permanente que comprende las etapas siguientes:

a) transfectar células amniocíticas humanas primarias con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica las funciones génicas adenovirales E1A y E1B, llamada transfección 1, y

b) subsiguientemente transfectar la línea permanente de células amniocíticas humanas con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el antígeno T grande de SV40, llamada transfección 2.

5 Preferiblemente, dicha molécula de ácido nucleico de la etapa b) del método para la producción de una línea de células amniocíticas humanas permanente de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una forma no secretada del antígeno T grande de SV40.

10 Durante la transfección en la etapa b) del método de acuerdo con la presente invención, la línea de células humanas permanente se transfecta alternativamente con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1), llamada transfección 2. Preferiblemente, dicha molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una forma no secretada del antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1).

Por las transfecciones realizadas en el método de acuerdo con la presente invención, dichas células amniocíticas humanas primarias son preferiblemente transfectadas establemente, es decir, el ADN transfectado se integra en el genoma de la célula.

15 Las células se immortalizan mediante la transfección de dichas células amniocíticas humanas primarias con la molécula de ácido nucleico que comprende las secuencias de ácidos nucleicos que codifican E1A y E1B. La molécula de ácido nucleico usado para la immortalización de dichas células amniocíticas humanas primarias comprende secuencias de ácido nucleico de E1A y E1B preferiblemente que derivan de adenovirus humanos, en particular de adenovirus humano de serotipo 5. En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico usado para la immortalización comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la función génica adenoviral pIX, además de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican E1A y E1B. El polipéptido pIX, una proteína estructural viral, actúa como un activador transcripcional en diferentes promotores virales y celulares, tales como la timidina quinasa y el promotor de beta-globina.

20 Una secuencia ejemplar puede encontrarse en GenBank nº de entrada X02996. En particular, las moléculas de ácido nucleico que comprenden los nucleótidos 1 a 4344 (SEC ID N°: 1 comprende secuencias de ácidos nucleicos que codifican E1A, E1B y pIX), de 505 a 3522 (SEC ID N°: 2 comprende secuencias de ácidos nucleicos que codifican E1A y E1B) o los nucleótidos 505 a 4079 (SEC ID N°: 3 comprende secuencias de ácidos nucleicos que codifican E1A, E1B y pIX) del adenovirus humano serotipo 5.

30 En particular, las células amniocíticas humanas se transfectan con las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la función génica deseada, que se ha de expresar, en forma de un casete de expresión. Dicho casete de expresión comprende una molécula de ácido nucleico que contiene un elemento regulador o promotor que está situado en frente de la región de codificación, una región de codificación y un marco de lectura abierto, respectivamente, así como un elemento de terminación de la transcripción que está detrás de la región de codificación.

35 En particular, en una realización el casete de expresión o la molécula de ácido nucleico contiene una secuencia de ácidos nucleicos para el antígeno T grande de SV40 (SEC ID N°: 4), la secuencia de ácidos nucleicos para un promotor seleccionado entre los grupos de promotor CMV (SEC ID N°: 5), el promotor CAG (Niwa et al, Gene 108: 193 - 199, 1991) y el promotor RSV (GenBank nº de entrada DQ075935), la secuencia de SV40 SD/SA (intrón) (SEC ID N°: 6) y la secuencia de ácidos nucleicos para poliA de SV40 (SEC ID N°: 7).

40 En una realización más, el casete de expresión o la molécula de ácido nucleico contiene, en particular, una secuencia de ácidos nucleicos para el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1) (SEC ID N°: 8), la secuencia de ácidos nucleicos para un promotor seleccionado entre el grupo de promotor de CMV (SEC ID N°: 5), el promotor CAG (Niwa et al, Gene 108: 193 - 199, 1991), y promotor RSV (GenBank nº de entrada DQ075935), la secuencia de ácidos nucleicos para SV40 SD/SA (intrón) (SEC ID N°: 6) y la secuencia de ácidos nucleicos para poliA de SV40 (SEC ID N°: 7).

45 Las células amniocíticas humanas primarias se obtienen por extracción directa a partir del organismo o un tejido extraído del organismo, y se ponen en cultivo.

50 El método de la presente invención se puede realizar también con líneas de células amniocíticas humanas immortalizadas ya existentes en lugar de la etapa a) que tienen las secuencias de ácido nucleico para las funciones génicas adenovirales E1A y E1B en su genoma. Preferiblemente, las líneas de células amniocíticas humanas immortalizadas comprenden las secuencias de ácidos nucleicos para las funciones génicas adenovirales E1A, E1B y pIX en su genoma. Las líneas de células amniocíticas humanas immortalizadas existentes se transfectan a demanda con la molécula de ácido nucleico mencionado anteriormente que contiene un casete de expresión que codifica el antígeno T grande de SV40 o el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1). Un profesional experto en la técnica reconoce que la transfección 2 es en lo que se refiere a su tiempo sólo dependiente de la transfección 1 de la célula humana primaria en que tiene que realizarse después de la transfección 1. No es necesario que la transfección 2 tenga lugar inmediatamente después de la transfección 1. Así pues, también las líneas de células amniocíticas humanas immortalizadas que son immortalizadas con E1A y/o E1B y que están

establecidas desde hace varios años, se pueden transfectar a demanda con la molécula de ácido nucleico anteriormente mencionado en una transfección 2.

La presente invención describe una línea de células amniocíticas humanas permanente producida por el método de la presente invención, que comprende una secuencia de ácidos nucleicos para las funciones génicas adenovirales E1A y E1B y una secuencia de ácidos nucleicos para el antígeno T grande de SV40 o el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1). Se describe además una línea de células amniocíticas humanas permanente que comprende la secuencia de ácidos nucleicos para las funciones génicas adenovirales E1A, E1B y pIX y la secuencia de ácidos nucleicos para antígeno T grande de SV40 o antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA 1).

La presente invención describe un método para la expresión transitoria de polipéptidos o proteínas recombinantes mediante el uso de la línea de células amniocíticas humanas permanente producida por el método de la presente invención, que comprende las etapas siguientes:

- a) transfectar dicha línea de células amniocíticas humanas permanente con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido o proteína recombinante deseado y un sitio de reconocimiento o de unión para el antígeno T grande de SV40 o el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1),
- b) cultivar la línea de células amniocíticas humanas permanente transfectada obtenida en la etapa a) en condiciones que permiten la expresión de dicho polipéptido o proteína recombinante deseada, y, subsiguientemente,
- c) aislar dicho polipéptido o proteína recombinante deseado de las células o del sobrenadante del cultivo.

Si la línea de células amniocíticas humanas permanente producida de acuerdo con la presente invención contiene una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el antígeno T grande de SV40, la línea de células es, p. ej., transfectada con un plásmido de expresión que contiene una casete de expresión o una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el transgén que se ha de expresar y el origen de replicación de SV40 (SV40 ori). El antígeno T grande de SV40 que se expresa de forma estable intracelularmente en la línea de células se une al origen de replicación de SV40 del plásmido de expresión que se ha de introducir por transfección en la línea de células y causa una replicación episomal del plásmido de expresión y con ello una amplificación del número de copias del transgén que se ha de expresar. El producto génico deseado codificado por el transgén puede obtenerse a partir de las células o del sobrenadante de cultivo después de que las células han sido cultivadas durante unos pocos días. Así pues, dicho transgén se expresa de forma transitoria.

Si la línea de células humanas permanente producida de acuerdo con la presente invención contiene una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1), la línea de células es p. ej. transfectada con un plásmido de expresión que comprende una casete de expresión o una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el transgén que se ha de expresar y el origen de replicación de EBV (EBV oriP) (Durocher et al., Nucleic Acids Research Vol. 30 N° 2 e9, 2002; Tuvesson et al. Cytotechnology 56: 123 - 136, 2008). El EBNA-1 de EBV que se expresa de forma estable intracelularmente en la línea de células se une al origen de replicación oriP del plásmido de expresión que se ha de introducir por transfección en la línea de células y causa una replicación episomal del plásmido de expresión y con ello una amplificación del número de copias del transgén que se ha de expresar. El producto génico deseado codificado por el transgén puede obtenerse a partir de las células o del sobrenadante de cultivo después de que las células han sido cultivadas durante unos pocos días. Así pues, dicho transgén se expresa de forma transitoria.

Las células producidas de acuerdo con la presente invención pueden ser cultivadas bajo condiciones usuales para el cultivo de células eucariotas a aproximadamente 37 °C, 95% de humedad y 8% de CO₂. Las células producidas de acuerdo con la presente invención pueden ser cultivadas en medio que contiene suero o medio libre de suero, en cultivo adherente o en cultivo en suspensión. El cultivo en suspensión puede tener lugar en diversos fermentadores, por ejemplo, en reactores de tanque agitado, reactores de onda, en vasos de sacudidora o vasos centrifugadores o en las llamadas botellas rodantes. Por tanto, las células son adecuadas para escalar un proceso a la escala industrial. La transfección de las células para la expresión transitoria puede tener lugar con los diversos métodos de transfección como se mencionaron anteriormente. La transfección y la expresión transitoria pueden también llevarse a cabo en el formato de alta producción y cribado, respectivamente, p. ej. en un formato de 96 o 384 pocillos.

El antígeno T del virus de simio 40 (SV40) es una fosfoproteína multifuncional que controla tanto la replicación viral como las funciones celulares después de la infección. El antígeno T es un agente de transformación e interfiere en el ciclo celular a través de la interacción con la proteína supresora de tumores p53. Durante la replicación del genoma viral el antígeno T está necesariamente como ADN helicasa para arrancar el genoma de doble cadena. El antígeno T es la única proteína viral que es necesaria para la replicación. Las otras funciones son cumplimentadas por las proteínas celulares. En la primera etapa de la replicación del ADN, 12 moléculas de antígeno T se unen al origen de la replicación del ADN (ori) en el genoma de SV40 en forma de hexámeros dobles. Subsiguientemente, las proteínas celulares necesarias, tales como ADN polimerasa se unen a dicho complejo de helicasa y arrancan y replican el

ADN. El llamado "ori mínimo" consiste en una secuencia núcleo que es de 63 pb de longitud. No tiene lugar ninguna integración en el genoma del huésped en una transfección transitoria de plásmidos circulares en la célula diana. Esto tiene como resultado que la concentración del plásmido disminuye constantemente después de la división celular y la expresión de un gen que está en el plásmido de codificación es sólo temporal. La introducción del fragmento ori de SV40 en el plásmido de expresión y la expresión del antígeno T de SV40 en la línea de células de producción tiene como resultado un aumento del número de copias del plásmido y por tanto un aumento de la eficacia de la expresión.

El método para la expresión transitoria de polipéptidos y proteínas de acuerdo con la presente invención tiene la ventaja de que es más eficaz desde el punto de vista de la cantidad y la calidad del producto génico recombinante y por tanto es también más rentable en la totalidad del proceso de desarrollo industrial de terapias basadas en proteínas que los métodos utilizados hasta ahora. En particular, es ventajoso que se proporciona un sistema de expresión transitoria altamente eficaz sobre la base de una línea celular humana, que en primer lugar modifica las proteínas humanas auténticamente postraduccionales en contraste con las células de mamíferos no humanos y células no de mamíferos, y que en segundo lugar sea comparativamente bien adecuado para el establecimiento de líneas de células de producción estables en el proceso de producción industrial. En esto puede asegurarse que en el curso del desarrollo de productos de diagnóstico y terapéuticos las características cualitativas del producto génico después de la expresión transitoria en la etapa temprana de desarrollo y después de la expresión estable en líneas de células de producción permanentes en la fase tardía y la producción industrial tienen la identidad mayor posible, en particular con respecto a diferencias en las características, que pueden ser causadas por la naturaleza de los sistemas de células.

Otra ventaja de la presente invención es que las líneas de células humanas permanentes producidas de acuerdo con la presente invención muestran un alto rendimiento de expresión por la expresión transitoria. Por tanto, se han encontrado rendimientos de producción sorprendentemente altos de hasta 60 mg/litro en el sobrenadante de cultivo en la expresión transitoria en líneas de células amniocíticas que producen antígeno T de SV40 después de la transfección con un vector de plásmido que tiene además de la secuencia que codifica el producto génico deseado un origen de replicación de SV40 (SV40 ori). Dichos rendimientos de producción han sido por encima de 70 veces más altos que en la expresión transitoria en una línea de células amniocíticas que no expresan antígeno T.

Una ventaja más de dicha línea de células humanas permanente producida de acuerdo con la presente invención es que se proporciona un sistema de células humanas basado en amniocitos humanos inmortalizados, que es adecuado tanto para la expresión transitoria de proteínas como para la expresión estable de proteínas en líneas de células de producción permanentes (Schiedner et al., BMC Biotechnology 8, 13, 2008). En comparación con el uso de diferentes sistemas de células para la expresión transitoria (por ejemplo, las variantes HEK293 o HEK293) y la expresión estable (por ejemplo, CHO), se reduce al mínimo el riesgo de que las propiedades estructurales y funcionales de los productos de expresión de la producción transitoria y estable difieran entre sí, si dichas propiedades estructurales y funcionales se basan en la naturaleza del sistema de expresión. Con ello se mejora la planificación del proceso de desarrollo y el proceso de desarrollo exige menos tiempo y es más económico.

Las secuencias de ácidos nucleicos para la expresión de al menos un polipéptido recombinante están contenidas en al menos una casete de expresión. Dichas casetes de expresión contienen promotores y secuencias de terminación transcripcional. El promotor CMV (citomegalovirus) (Makrides, 9 - 26 en: Makrides (Hrsg), Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells Elsevier, Amsterdam, 2003), el promotor EF-1 α (Kim et al, Gene 91: 217 - 223, 1990), el promotor CAG (un promotor híbrido del potenciador inmediato-temprano del citomegalovirus humano y un promotor de β -actina de pollo modificado con primer intrón) (Niwa et al, Gene 108: 193 - 199, 1991), el promotor de pgk (fosfoglicerato quinasa) humano o murino (Adra et al., Gene 60: 65 - 74, 1987), el promotor RSV (virus del sarcoma de Rous) (Makrides, 9 - 26 en: Makrides (Hrsg.), Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells, Elsevier, Amsterdam, 2003) o el promotor SV40 (virus de simio 40) (Makrides, 9 - 26 en: Makrides (Hrsg.), Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells, Elsevier, Amsterdam, 2003) pueden servir, por ejemplo, como promotores. Las secuencias de poliadenilación del antígeno T grande de SV40 (GenBank n° de entrada J02400) o el gen del G-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos) humano (Mizushima und Nagata, Nucl. Acids Res. 18: 5322, 1990) pueden servir por ejemplo como sitios de poliadenilación.

La presente invención describe el polipéptido o proteína obtenidos mediante el uso del método de acuerdo con la presente invención.

El polipéptido recombinante del método de acuerdo con la presente invención puede ser una proteína terapéutica, tal como alfa 1-antitripsina o factores de crecimiento humano tales como eritropoyetina o interleucina-2. La antitripsina alfa 1 humana (hAAT) es un inhibidor de proteinasa que inhibe la elastasa y otras proteinasas y que es terapéuticamente activo en el caso de la deficiencia de hAAT heredada que conduce a graves daños de pulmón y de hígado. La eritropoyetina es un factor importante para el crecimiento para los eritrocitos (glóbulos rojos) que tiene una actividad de formación de sangre en el caso de anemia, así como en el caso de pacientes de un trasplante. La interleucina-2 (IL-2) es un mensajero celular del sistema inmunitario y es de importancia significativa en la activación de la respuesta inmunitaria celular, por ejemplo en el caso de enfermedades tumorales. Los factores de coagulación sanguínea, como el factor VIII y IX usados en el caso de pacientes con hemofilia que tienen trastornos de coagulación de la sangre, también pertenecen a los polipéptidos terapéuticamente activos. El polipéptido

recombinante del método de acuerdo con la presente invención puede ser una hormona. Se utilizan hormonas modificadas mediante biotecnología en la terapia de sustitución en pacientes que tienen trastornos hormonales. Son ejemplos la hormona insulina que reduce el azúcar en la sangre, sobre la que son dependientes muchos pacientes que tienen diabetes mellitus, somatotropina (hormona del crecimiento) para el tratamiento del enanismo, y factores gonadotropos tales como la hormona estimuladora del folículo (FSH) o la hormona luteinizante (LH) para el tratamiento de trastornos de la fertilidad. Además, el polipéptido recombinante puede ser una enzima modificadora después de la traducción de otros polipéptidos recombinantes que se expresa intracelularmente o en el sobrenadante de cultivo simultáneamente, por ejemplo una enzima implicada en la glicosilación. Los productos génicos E1A, E1B y pIX expresados en la línea de células humanas permanente de acuerdo con la presente invención, así como el antígeno T grande de SV40 y el antígeno nuclear 1 del virus Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1), no pertenecen al polipéptido deseado que se ha de producir.

El polipéptido recombinante del método de acuerdo con la presente invención puede ser un anticuerpo recombinante que puede ser usado con fines terapéuticos o de diagnóstico. Los anticuerpos contra el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) se usan en el caso de pacientes con artritis reumatoide, los anticuerpos contra el receptor celular del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se usan en el caso de pacientes de cáncer. Los anticuerpos usados con fines de diagnóstico pueden ser por ejemplo componentes de kits comerciales de diagnóstico basados en métodos tales como el ensayo de inmunoabsorbente ligado a una enzima (ELISA) o el ensayo de radioinmunoabsorbente (RIA). En estos ensayos de prueba, los anticuerpos sirven para la detección de los antígenos de agentes infecciosos tales como el virus de la hepatitis B humana.

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) consisten en una cadena pesada y una ligera consistente cada una de ellas en regiones o dominios variables y constantes. Las secuencias de ácidos nucleicos de las moléculas de ácido nucleico transfectadas para la expresión de un anticuerpo pueden contener dos casetes de expresión distintas, una de las cuales codifica la cadena ligera y la otra la cadena pesada de la molécula de inmunoglobulina. Al tener lugar la expresión de ambas cadenas en la célula de acuerdo con la presente invención, estas cadenas se ensamblan para formar la molécula de anticuerpo activa. Los casetes de expresión de las dos cadenas pueden estar presentes en distintas moléculas de ácido nucleico o en las mismas. Las secuencias de codificación para la cadena ligera y pesada pueden, sin embargo, estar presentes dentro de la misma casete de expresión y estar separados por una secuencia IRES (sitio interno de entrada al ribosoma) que proporciona una expresión tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera. Las secuencias de codificación para la cadena ligera y la pesada pueden también en principio estar presentes dentro de la misma casete de expresión y estar separadas por una secuencia que codifica un sitio de segmentación enzimática para una proteinasa (por ejemplo, trombina) que se expresa simultáneamente dentro de la célula y que segmenta el polipéptido precursor que consiste en la secuencia de la cadena ligera y pesada en la cadena ligera y pesada activa.

Los anticuerpos recombinantes codificados por la secuencia de ácidos nucleicos de la célula producida de acuerdo con la presente invención también pueden consistir en fragmentos de un anticuerpo en vez de la cadena ligera y pesada completa. Los denominados anticuerpos de cadena simple (scFv, fragmentos variables de cadena simple) consisten en los dominios variables de una cadena pesada y una ligera unidas por una secuencia de aminoácidos (lo que se denomina un enlazador) que proporcionan una libre movilidad de ambos dominios. Una estructura de unión con el antígeno se forma por el ensamblaje intramolecular de ambos dominios, cuya estructura corresponde a la región variable de una molécula de inmunoglobulina. Los anticuerpos de cadena simple biespecíficos (bis-scFv) constan de dos de tales conjuntos de cadena simple constituidos por los dominios variables de una cadena pesada y una ligera que a su vez están enlazados por una secuencia de conexión y son móviles uno frente al otro; tales moléculas pueden unirse simultáneamente a dos sitios de unión con el antígeno (epítopos) conectando así dos estructuras moleculares de una manera no covalente. Los anticuerpos biespecíficos consisten en dos cadenas individuales que se expresan por separado y cada una de las cuales consisten cada una en dominios variables de una cadena ligera y una pesada, separados sólo por un enlazador muy corto o son sin ningún enlazador en absoluto. El enlazador corto o ausente inhibe el ensamblaje intramolecular; por ensamblaje intramolecular de un dominio pesado y ligero variable se forma una vez más una molécula activa que tiene dos valencias de enlace.

El polipéptido recombinante codificado por la molécula de ácido nucleico transfectado en el presente método puede ser una proteína viral, bacteriana o parasitaria que se ha de producir para su uso como vacunas profilácticas o terapéuticas. De este modo, esta proteína puede ser tanto un polipéptido estructural como un polipéptido regulador o enzimáticamente activo de virus, bacterias o parásitos. Una proteína viral puede ser, por ejemplo, el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (antígeno de superficie de HBV) o la proteína estructural L1 de los virus del papiloma humano. Una proteína bacteriana que se considera para la producción de vacunas después de la expresión en líneas de células de producción es, por ejemplo, subunidades de enterotoxina de *Escherichia coli* enterotoxinógeno (ETEC) o proteínas de unión con transferrina (Tbp A y B) de *Neisseria gonorrhoeae*. Un polipéptido procedente de parásitos, que puede ser codificado por las moléculas de ácido nucleico transfectadas en el presente método es, por ejemplo, la proteína de superficie de merozoito (MSP) del agente causante de la malaria *Plasmodium falciparum* o glutatión S transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum*.

El polipéptido recombinante codificado por la molécula de ácido nucleico transfectada en el presente método puede también ser una proteína viral que permite una producción de vectores de transferencia génica virales recombinantes dentro de las líneas de células. Esta proteína viral, también llamada factor de complementación, se

expresa dentro de la línea celular y es el componente enzimático o estructural necesario para la producción de los vectores de transferencia génica, el cual componente no está codificado en la molécula de ácido nucleico del vector de transferencia de genes. En tales vectores de transferencia génica ciertas funciones génicas virales son usualmente borradas por razones de seguridad. Vectores de transferencia de genes, cuyos factores de complementación pueden ser codificados por el transgén introducido por el método descrito, son, por ejemplo, los vectores que están basados en adenovirus, virus asociado en adenovirus (AAV), retrovirus o lentivirus o virus herpes. El factor de complementación expresado dentro de la línea celular también puede complementar virus borrados o recombinantes durante su producción, los cuales virus no contienen un gen a transferir y de este modo no actúan como vector de transferencia génica, sino que se usan, por ejemplo, como vacuna.

El polipéptido que es expresado transitoriamente por el presente método también puede ser un polipéptido receptor que está localizado en particular en la superficie de la célula y que es responsable de la infección de la célula por un virus y la transducción de la célula por un vector de transferencia génica viral, respectivamente. Como receptor viral para la etapa inicial de la infección de las células con el adenovirus serotipo 2 o 5, del que se derivan la mayor parte de los vectores adenovirales convencionales, fue identificado el llamado receptor de Coxsackie y adenovirus, CAR (Bergelson et al., Science 275 : 1320 - 1323, 1997). La expresión suficiente de CAR en la superficie es un requisito previo de que una célula es adecuada para ser una célula de producción de vectores de transferencia génica adenovirales. En una realización preferida el polipéptido recombinante es el receptor de Coxsackie y adenovirus (CAR). La sobreexpresión del polipéptido receptor puede mejorar significativamente la infecciosidad y, por tanto la eficiencia de producción de estas células en relación con los vectores adenovirales. Además, la molécula de ácido nucleico puede codificar, además de CAR, los receptores secundarios o receptores de internalización tales como ciertas integrinas que median en la absorción del virus y del vector de transferencia de genes, respectivamente, en la célula y cuya expresión adicional es ventajosa en la producción de células de producción para los vectores adenovirales.

El método descrito puede usarse, entre otros fines, para la producción de polipéptidos terapéuticos, factores de coagulación de la sangre y de crecimiento, hormonas y anticuerpos, así como polipéptidos virales, bacterianos o parasitarios para su uso como vacuna. Además, las células producidas de acuerdo con la presente invención pueden ser usadas para la producción de proteínas de interés para diagnóstico, tales como antígenos virales, bacterianos o parasitarios o los correspondientes anticuerpos específicos. Además, las células producidas de acuerdo con la presente invención pueden ser usadas para la producción de proteínas de interés técnico o industrial, tales como enzimas para la catálisis de procesos técnicos de síntesis o para la degradación de sustancias nocivas. Las células producidas de acuerdo con la presente invención pueden expresar uno o también más polipéptidos recombinantes diferentes. El número de polipéptidos expresables depende de cómo muchas secuencias diferentes de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos recombinantes son transfectadas transitoriamente en las células con el método de acuerdo con la presente invención.

Además, la presente invención se refiere al uso de líneas de células amniocíticas humanas permanentes producidas de acuerdo con el método de la presente invención para la producción de un polipéptido o proteína.

Los ejemplos que siguen ilustran la invención y no han de ser considerados limitantes. A menos que se indique otra cosa, se utilizaron métodos moleculares estándar tal como se describe, por ejemplo, en Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

1. Procedimientos de clonación.

a. Plásmidos para la transformación de amniocitos primarios: pSTK146, pGS119, pGS122.

El plásmido pSTK146 fue descrito en detalle en el documento EP 1230354 B1 y comprende el promotor de la fosfoglicerato cinasa (PGK) murina, secuencias de nucleótidos (nt.) de serotipo 5 de adenovirus (Ad5) 505 a 3522 y la señal de corte y empalme y poliadenilación de SV40. Las secuencias adenovirales en pSTK146 comprenden la región que codifica E1A y E1B, en donde la expresión de E1A está regulada por el promotor de pgk.

El plásmido pGS119 fue descrito con detalle en el documento WO 2007/056994 y contiene el promotor de pgk murina, secuencias Ad5 de nt. 505 - 3522 (que comprenden la región E1A y E1B), la señal de corte y empalme y de poliadenilación de SV40, seguido por la región pIX de Ad5 nt. 3485 - 4079.

El plásmido pGS122 fue descrito en detalle en el documento WO 2007/056994 y contiene las secuencias adenovirales nt. 1 - 4344 que comprenden las regiones E1A, E1B y pIX incluyendo los correspondientes promotor regulador y secuencias de poliadenilación. Las secuencias adenovirales en pGS122 están flanqueadas por sitios de restricción PmeI.

b. Plásmidos de expresión para el antígeno T: pGS158, pGS159, pGS161.

Los plásmidos pGS158, pGS159 y pGS161 contienen todos ellos la casete de expresión para el antígeno T de SV40 (SEC ID N°: 4) flanqueada por un intrón de SV40 (SEC ID N°: 6) y un sitio de poliadenilación (SEC ID N°: 7). Adicionalmente, el pGS158 contiene el promotor CAG (promotor híbrido que consiste en un potenciador de CMV y el

el promotor de β -actina de pollo (Niwa et al, Gene 108: 193 - 199, 1991), pGS159 contiene el promotor de RSV (promotor del virus del sarcoma de Rous) (GenBank nº de entrada DQ075935) y pGS161 el promotor CMV (promotor temprano del citomegalovirus humano) (SEC ID N°: 5). Para la generación de líneas de células estables los plásmidos pGS158, pGS159 y pGS161 contienen un casete de expresión de blasticidina con el promotor de ubiquitina (pUB/Bsd, Invitrogen nº V512-20).

En una primera etapa un fragmento de 2,6 kb que contiene la secuencia que codifica el antígeno T fue introducido en el plásmido pGS140. El plásmido pGS140 contiene el promotor CMV humano (SEC ID N°: 5), una región de intrón de SV40 con sitio donador de corte y empalme/aceptor de corte y empalme (SEC ID N°: 6), un sitio de restricción NotI singular y una secuencia de poliA de SV40 (SEC ID N°: 7). Para introducir el fragmento de antígeno T el pGS140 fue linealizado con NotI, el saliente 5' se rellenó y se ligó con el fragmento aislado. El plásmido producido por este procedimiento fue llamado pGS149.

Para el plásmido pGS158 el pGS149 fue digerido con XbaI y se aisló un fragmento de aproximadamente 3 kb que contiene la secuencia de intrón, el antígeno T y la secuencia de poliA. Este fragmento fue introducido en el sitio de restricción NotI (saliente 5' rellenado) de pGS152. El pGS152 fue producido por inserción de un fragmento del promotor de CAG que tiene un tamaño de 1,1 kb (Niwa et al, Gene 108: 193 - 199, 1991) en el sitio de restricción EcoRV de pUB/Bsd.

Para el plásmido pGS159, un fragmento XbaI que tiene un tamaño de 3 kb y contiene el antígeno T de pGS149 fue introducido en el sitio de restricción NotI rellenado, de pGS153. El pGS153 contiene un fragmento de promotor de RSV que tiene un tamaño de aproximadamente 0,6 kb introducido en el sitio de restricción EcoRV de pUB/Bsd.

Para el plásmido pGS161, el pGS149 fue digerido con SphI, los salientes 3' fueron rellenados y el fragmento de 3,6 kb que contiene el promotor CMV, el intrón SV40, la secuencia de antígeno T y el poliA se aislaron y se introdujeron en el sitio de restricción EcoRV de pUB/BSD.

c. Plásmidos de expresión para hAAT: pGS116, pGS151.

El plásmido pGS116 fue descrito con detalle en el documento EP1948789 y contiene el promotor de CMV humano seguido de un sitio donante de corte y empalme/aceptor de corte y empalme de SV40, el hAAT-cDNA (SEC ID N°: 12) y el sitio de poliadenilación de SV40.

El plásmido pGS151 (Fig. 2b) contiene dicho casete de expresión de hAAT y el origen de replicación del ADN (ori) de SV40. Por medio del DNA de SV40 y el cebador ori 1 (CCGGAATTCTTTGCAAAGCCTAGGCCTC) (SEC ID N°: 9) y ori 2 (CCGGAATTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCT) (SEC ID N°: 10) las secuencias de SV40 fueron amplificadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), digeridas con EcoRI (cada sitio de restricción EcoRI se encuentra en los cebadores) e introducidas en el sitio de restricción EcoRI de pGS116.

d. Plásmidos de expresión para Epo: pGS177.

El plásmido pGS127 se describe con detalle en el documento EP 1948789 y contiene el promotor de CMV humano seguido por un sitio donante de corte y empalme/aceptor de corte y empalme de SV40, el ADNc para la eritropoyetina humana (Epo) y el sitio de poliadenilación de SV40.

Para el plásmido pGS177 el fragmento ori de SV40 fue amplificado como se describió anteriormente con los cebadores ori 1 y ori 2 e introducido en pGS127.

2. Comprobación de las construcciones.

a. Análisis de secuencia.

La integridad de todos los plásmidos descritos anteriormente fue ensayada mediante digestión de restricción. Además, la secuencia y orientación correctas de los fragmentos SV40 ori en pGS151 y pGS177 se confirmaron por análisis de secuencia. Las secuencias adenovirales en pSTK146, pGS119 y pGS122 fueron determinadas por análisis de secuencia y coincidieron completamente con la secuencia de tipo silvestre de Ad5.

b. Pruebas para la expresión transitoria.

Los plásmidos pSTK146, pGS119 y pGS122 fueron transfectados en células HeLa y la expresión de las proteínas E1A y E1B se analizó mediante transferencia Western usando anticuerpos monoclonales (Merck Bioscience). Los plásmidos pGS158, pGS159, pGS161 fueron transfectados en células HEK293 y la expresión del antígeno T se detectó utilizando transferencia Western y un anticuerpo monoclonal (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Los plásmidos pGS116 y pGS151 fueron transfectados en células CAP y se detectó la expresión y secreción de alfa 1-antitripsina humana (hAAT) en el sobrenadante de cultivo usando ELISA (véase 6.).

De la misma forma los plásmidos pGS127 y pGS177 fueron transfectados en células CAP y la expresión de Epo humana se detectó mediante ELISA (véase 6.).

3. Cultivo de células.**a) Líneas de células.**

Se cultivaron células amniocíticas transformadas (CAP y CAP-T) en medio 293SFMI (Invitrogen nº 11686-029), 0,5% de antimicótico/antibiótico (Invitrogen nº 15240-062), L-glutamina 4 mM (Invitrogen nº 25030-024) a 37 °C, 95% de humedad, 8% de CO₂. El medio de cultivo de células CAP-T contenía adicionalmente 5 µg/ml de blasticidina (Invitrogen nº R210-01). Las células se inocularon normalmente con una densidad de comienzo de 2 - 4 x 10⁵ células/ml en un volumen de 12 ml en un matraz de agitación y se cultivaron en incubador sacudidor a 100 rpm durante 3 - 4 días. A una densidad de 1 - 2 x 10⁶ células/ml las células se recolectaron por centrifugación y se siguieron cultivando con la densidad de partida mencionada anteriormente en medio fresco. Las células HEK293, HEK293-T (ATCC nº CRL-11268) y HeLa se cultivaron adherentemente en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Advanced D-MEM, Invitrogen nº 12491-015) con 10% de suero de ternera fetal en placas de cultivo celular. Las células HEK293-T fueron adaptadas por etapas al crecimiento en suspensión libre de suero en medio 293-SFMI y se cultivaron en matraces de agitación a 100 rpm, 37 °C, 95% de humedad y 8% de CO₂.

b. Amniocitos primarios.

Se obtuvieron amniocitos primarios, siguiendo los correspondientes métodos de rutina, durante una amniocentesis. 1 - 2 ml de esta punción se cultivaron con 5 ml de medio F10 de Ham (Invitrogen nº 31550-023), 10% de suero de ternera fetal, 2% Ultrosor G (Cytogen GmbH), 1x de antibiótico/antimicótico (Invitrogen nº 15240-062) a 37 °C, 95% de humedad y 5% de CO₂ en placas de cultivo de células Primaria de 6 cm (Falcon). Al cabo de 4 - 6 días los amniocitos empezaron a hacerse adherentes y se añadieron 3 ml de medio fresco más aditivos (véase el conjunto precedente). Tan pronto como las células fueron completamente adherentes, el medio se retiró y se reemplazó por 5 ml de medio fresco más aditivos. Para los posteriores pasajes las células confluentes se lavaron con PBS, se despegaron con tripsina (TrypleSelect, Invitrogen nº 12563011) y se transfirieron a 10 y 25 ml, respectivamente, de medio fresco más aditivos en placas de 10 cm y 15 cm, respectivamente.

4. Transformación de amniocitos primarios.**a. Transfección.**

Los amniocitos primarios cultivados (véase 3b) fueron transformados cada uno de ellos mediante la transfección con plásmidos pSTK146, pGS119 o pGS122. De antemano, los plásmidos respectivos se linealizaron mediante digestión con enzimas de restricción adecuadas (pSTK146, pGS119: Scal; pGS122: PmeI). Antes de la transfección los amniocitos fueron adaptados por etapas al medio Opti-Pro (Invitrogen nº 12309-019) con 2% de Ultrosor. Para este propósito se añadió a las células medio F10 de Ham fresco (con aditivos véase 3b), más medio Opti-Pro (con 2% de Ultrosor) en una relación de 75:25%, 50:50%, 25:75% y 0:100% cada 2 a 3 días. Para la transfección, las células de una placa de 15 cm de aproximadamente 80% de confluencia se distribuyeron en placas de 6 cm que corresponden a un número de células de 5 a 7 x 10⁵ células por placa. Al día siguiente, las células en 5 placas fueron transfectadas cada una con 2 µg de pSTK146, pGS119 o pGS122 linealizados usando el reactivo de transfección Effectene (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Un disco no fue transfectado y se siguió cultivando. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS, se despegaron con TrypleSelect y se transfectaron a una placa de 15 cm. Las células se cultivaron durante 10 a 15 días más, en los que el medio se reemplazó por medio fresco cada 3 a 4 días. Durante este tiempo se redujo la adición de Ultrosor al 1%. Al cabo de aproximadamente 10 a 15 días las células eran confluentes y se transfirieron a placas de 15 cm, como se describió anteriormente.

b. Aislamiento de los clones de células transformadas.

Algunas semanas después de la transfección, se observaron en todas las transfecciones islas de células clonales que son significativamente distintas de los amniocitos no transformados en lo que se refiere a su morfología. Estas islas de células fueron recogidas y transferidas sobre placas de 24 pocillos (correspondientes al paso 1). Además, las células se propagaron y se transfirieron primeramente a placas de 6 cm y más tarde a placas de 15 cm. La expresión de las proteínas E1 en cada una de las líneas de células clonales se detectó en el análisis de transferencia de Western usando anticuerpos monoclonales (véase 2b).

La producción de líneas de células que expresan el antígeno T basadas en líneas de células amniocíticas transformadas se describe a continuación a modo de ejemplo para una línea celular obtenida por transfección con pGS119 (dicha línea celular se denomina línea celular de CAP en lo que sigue). Después del aislamiento y la expansión de las islas de células clonales se produjeron líneas de células uniformes genéticas a partir de los clones de células por clonación de células individuales a través del "método de dilución limitada". En resumen una célula del clon que se ha de clonar se sembró en una placa de 96 pocillos y la expansión real de solamente una célula se controló mediante microscopía en el curso de los siguientes días. Las líneas obtenidas a partir de células individuales fueron expandidas por etapas a placas de 15 cm. Por dilución en etapas del medio de cultivo Opti-Pro/1% Ultrosor con medio 293SFMI, se adaptaron las células al crecimiento en suspensión en medio libre de suero. Se analizaron las líneas de células individuales en relación con la expresión de proteína estable y transitoria y de alta densidad de crecimiento, se seleccionó un clon con las mejores propiedades y se continuó utilizando en lo que sigue.

5. Producción de grupos de células que expresan el antígeno T.

Cada 1×10^7 células CAP (obtenidas por transfección de amniocitos primarios con plásmido pGS119, adaptadas a crecimiento en suspensión en medio libre de suero) fueron transfectadas con cada 5 μg de ADN de plásmido pGS158-, pGS159- y pGS161 linealizado, y se cultivaron en el matraz de agitación bajo condiciones como las descritas anteriormente. Para la selección de células transfectadas estables se añadieron 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de blasticidina 48 h después de la transfección y las células se siguieron cultivando hasta que se obtuvieron grupos de células en crecimiento estable al cabo de aproximadamente 3 a 4 semanas. Dichos grupos de células se denominaron Z582 (transfección con pGS158, antígeno T expresado por el promotor CAG), Z583 (transfección con pGS159, antígeno T expresado por el promotor RSV) y Z597 (transfección con pGS161, antígeno T expresado por el promotor CMV). Dado que se desconoce si un aumento de la concentración de antígeno T es potencialmente tóxico para las células CAP, se intentó expresar el antígeno T por medio de promotores que tienen una fuerza diferente. Fue posible demostrar que la expresión de una proteína de referencia en las células CAP era la más alta por el uso del promotor CMV, un poco más baja con el promotor CAG y claramente más baja con el promotor RSV. Fue posible generar grupos de células de crecimiento estable con los tres promotores y los tres grupos de células expresaron el antígeno T intracelular.

6. Expresión transitoria de proteínas en células CAP y CAP-T.

El fragmento ori de 359 pb tal como se utiliza en la presente invención contiene en comparación con el ori mínimo que es de 63 pb de longitud, además de dicha secuencia nuclear, también las secuencias repetidas de 21 pb y 72 pb (SEC ID N°: 11). Estas dos secuencias repetidas son en realidad importantes principalmente para la función del promotor que superpone el ori pero hay indicios de que también aumentan la replicación del DNA de SV40 (Chandrasekharappa y Subramanian, J. Virol. 61, 2973 - 2980, 1987).

Para ensayar si la concentración de antígeno T en la célula tiene influencia en la expresión de una proteína de referencia, los tres grupos de células Z582, Z583 y Z597 que expresan el antígeno T bajo promotores de fuerzas diferentes han sido ensayados y comparados con la expresión transitoria en las células CAP que no expresan el antígeno T. Por tanto, 1×10^7 células de cada fueron transfectadas con medios de la tecnología nucleofector (Amaxa/Lonza, programa X-001, Puffer V) con el plásmido circular pGS151 y se cultivaron en un volumen inicial de 12 ml. El medio fue reemplazado tres y seis días después de la transfección, en donde en el día 6 también se aumentó el volumen a 15 ml. Cada alícuota fue tomada comenzando el tercer día hasta e incluyendo el séptimo día después de la transfección y en el noveno día después de la transfección, se determinó el número de células y la expresión de hAAT se determinó mediante el método ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a una enzima) utilizando anticuerpos policlonales anti-hAAT (desacoplados y acoplados a HRP; ICN Biomedicals). Se utilizó como control hAAT purificada a partir de plasma humano (ICN Biomedicals).

El resultado de este experimento se muestra gráficamente en la Fig. 3. En todos los grupos celulares de CAP-T se obtuvo una expresión transitoria más alta en comparación con las células CAP. La expresión transitoria en Z582 es 8 veces, en Z583 es 25 veces y en Z597 es 70 veces más alta que en las células CAP. También un segundo grupo de células CAP-T que expresan el antígeno T por el promotor CMV tiene como resultado una alta expresión comparable a la expresión obtenida con Z597.

Dichos datos demuestran que tanto la expresión permanente de antígeno T en células CAP como el nivel de expresión de antígeno T tienen influencia sobre el nivel de expresión transitoria.

En otro experimento se determinó el nivel de la expresión transitoria de hAAT en el grupo de células Z597 después de la transfección transitoria del plásmido pGS116 y pGS151, respectivamente. Ambos plásmidos difieren entre sí sólo por la presencia del fragmento de SV40-ori en pGS151. La transfección y el análisis cuantitativo de hAAT se realizaron como se describió anteriormente, en donde tanto el nivel de expresión de hAAT como el desarrollo del número de células vivas se determinaron a lo largo de un intervalo de tiempo de 9 días. El resultado de dicho ensayo se muestra gráficamente en la Fig. 4. La presencia del fragmento SV40-ori en el plásmido de expresión conduce a un aumento de la expresión transitoria que es 30 veces más alta. En total pudieron expresarse 2,5 mg de hAAT por transfección de 1×10^7 células CAP-T en un volumen de 40 ml dentro de los 9 días. Esto está en correspondencia con una eficiencia de expresión de alrededor de 60 mg/L y de hasta 40 pg/célula /día. El crecimiento celular se inicia aproximadamente 3 días después de la transfección, la vitalidad de las células sigue permaneciendo a lo largo de todo el margen de tiempo de la prueba por encima del 80%.

Para demostrar que dicha eficiencia de expresión transitoria no es específica para hAAT, otra proteína glicosilada eritropoyetina (Epo) fue expresada transitoriamente en células CAP-T. Como se describió para hAAT, 1×10^7 células CAP-T del grupo de células Z597 fueron transfectadas con plásmidos pGS177 (que contienen el casete de expresión para Epo y el fragmento SV40-ori) y Epo se cuantificó en el sobrenadante de las células por medio de ELISA (R & D Systems, Quantikine IVD, Human Epo Immunoassay, DEP00). Pudieron expresarse 0,73 mg de Epo con una eficacia de expresión de 32 mg/L en un intervalo de tiempo de ensayo de 7 días.

7. Comparación con la expresión transitoria en otros sistemas celulares.

Una línea de células humanas ya descrita con anterioridad, la llamada línea celular HEK293-T, expresa el antígeno T de SV40 de forma estable y está basada en la línea celular HEK293 humana transformada con adenovirus (DuBridghe et al., Mol. Cell. Biol. 7, 379 - 387, 1987). De forma comparable con Z597, 1×10^7 células HEK293-T (medio libre de suero, cultivo en suspensión) fueron transfectadas con $5 \mu\text{g}$ de plásmido circular pGS151 por medio de la tecnología nucleofector Amaxa según el protocolo del fabricante (programa X-001, Puffer V) y se cultivaron. El resultado de dicho experimento se muestra gráficamente en la Fig. 5. Aunque el número de células de 293-T fue claramente mayor que el de CAP-T en el día 9 la expresión transitoria en CAP-T es, en comparación con la de 293-T, aproximadamente 40 veces mayor.

8. Ensayo de replicación.

Debe demostrarse en un ensayo de replicación, si la expresión de antígeno T en células CAP-T produce un mayor número de copias del plásmido de expresión que contiene ori – lo que por tanto explicaría que la expresión transitoria de la proteína sea claramente superior. Por consiguiente, las células Z597- y HEK293-T, respectivamente, fueron transfectadas con los plásmidos pGS116 y pGS151, respectivamente, y cultivadas como se describió anteriormente. Después de 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas se tomaron 1×10^5 células, se centrifugaron, se recogieron en PBS y se lisaron mediante la adición del mismo volumen de NaOH 0,8 N. Los lisados celulares fueron transferidos en un aparato SlotBlot en una membrana de nilón cargada positivamente (GE Healthcare, Hybond-N+). Se añadieron cantidades crecientes de plásmidos pGS116 y pGS151 a 1×10^5 células Z597 como testigo, se lisaron y se transfirieron como se describió anteriormente. Dicho patrón corresponde a 1000, 2500, 5000, 10000 y 15000 copias por célula. El ADN se fijó mediante la incubación de la membrana a 120°C durante 30 minutos y se visualizó por medio de una sonda de PCR no radioactiva compuesta por hAAT-cDNA de acuerdo con el protocolo del fabricante (AlkPhos Direct Labeling and Detection System, GE Healthcare, RPN 3680 y 3682). El número de copias en las células transfectadas con pGS116 y pGS151 se cuantificó por medio de la concentración conocida del plásmido patrón. El resultado de dicho ensayo de replicación se muestra gráficamente en la Fig. 6. Como era de esperar, solamente pGS151 pero no pGS116 se replica en CAP-T Z597. El número de copias de pGS151 aumenta de aproximadamente 1500 copias/célula 6h después de la transfección a casi 7000 copias/célula 72 h después de la transfección, por lo cual el número de células se mantiene igual. En cambio, el número de copias de pGS151 permanece constante en HEK293-T durante más de 96 horas. Dado que el número de células 293-T se ha duplicado en dicho intervalo de tiempo, se puede suponer una baja replicación de pGS151 en dichas células, sin embargo, está claramente por debajo de la tasa de replicación de Z597.

La detección de la expresión del antígeno T en líneas de células amniocíticas y células HEK293-T se realizó mediante el análisis de transferencia Western. A partir de los tres grupos de células CAP-T y células HEK293-T se recogieron 1×10^6 células de cada uno en $50 \mu\text{l}$ de Tris/HCl 50 mM pH 8, NaCl 140 mM, 0,5% de NP40, EDTA 4 mM, EGTA 2 mM, PMSF 0,5 mM, 5% de glicerol, y se incubaron durante 30 min en hielo. La mezcla de proteínas se centrifugó durante 10 min a 13000 rpm y la concentración de proteína se determinó en el sobrenadante mediante un kit de detección de proteínas (Coomassie, Bradford, Thermo Life Science n° 23200). En un gel de poliacrilamida SDS 12% se separaron $10 \mu\text{g}$ de proteína, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech) y se visualizaron por medio de un anticuerpo específico del antígeno T (Abcam, antígeno T Anti- SV40 ab16879). Se pudo demostrar por este experimento que se expresa más antígeno T en Z597 que en los otros dos grupos y en las células HEK-293-T.

9. Transfección con polietilenimina.

Dado que el método de transfección descrito anteriormente es escalable solamente de una manera limitada, se ha ensayado otro reactivo de transfección, polietilenimina (PEI, Polysciences, n° 23966) que se describe en particular para transfecciones en gran escala. Se disolvió PEI linear (PM = 25.000) de acuerdo con el protocolo del fabricante con una concentración de 1 mg/ml y se usó en una relación de ADN: PEI = 1:3. Para la transfección se mezclaron $10 \mu\text{g}$ de pGS151 con $30 \mu\text{g}$ de PEI, se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente y se añadieron a 1×10^7 células CAP-T Z597 en 6 ml de medio FreeStyle (Invitrogen n° 12338-018). Se añadieron 6 ml de medio 293-SFMII al cabo de 5h y las células se incubaron durante 7 días. Tres días después de la transfección el medio fue reemplazado con 293-SFMII y en vista del fuerte crecimiento celular se aumentó el volumen hasta 30 ml. El resultado de dicho experimento se muestra en la Fig. 7. Por la transfección con PEI se logró una alta expresión transitoria de proteínas en CAP-T. Sin embargo, el rendimiento máximo de proteína fue de unas 2 veces por debajo de la expresión lograda con nucleofección. Es digno de señalar que las células crecen con una rapidez claramente mayor y con más fuerza después de la transfección con PEI y que logran un número de células que es aproximadamente 10 veces mayor en comparación con la nucleofección al cabo de 7 días.

Listado de secuencias

<110> CEVEC Pharmaceuticals GmbH

<120> Nueva línea de células humanas permanente

<130> CEV-014 PCT

5 <150> DE 10 2009 003 439.0
<151> 2009-02-05

<160> 12

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

10 <211> 4344

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 1-4344 Ad5

15 <400> 1

```

catcatcaat aatatacctt attttggatt gaagccaata tgataatgag ggggtggagt      60
ttgtgacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcggtgacg tagtagtgtg gcggaagtgt      120
gatgttgcaa gtgtgcgga acacatgtaa gcgacggatg tggcaaaagt gacgtttttg      180
gtgtgcgccg gtgtacacag gaagtgacaa ttttcgcgcg gttttaggcg gatgtttag      240
taaatttggg cgtaaccgag taagatttgg ccattttcgc gggaaaactg aataagagga      300
agtgaaatct gaataatfff gtgttactca tagcgcgtaa tatttgtcta gggccgcggg      360
gactttgacc gtttacgtgg agactcgccc aggtgttttt ctcaggtggt ttccgcgttc      420
cgggtcaaag ttgcggtttt attattatag tcagetgacg tgtagtgtat ttatacccg      480
tgagttcctc aagaggccac tcttgagtgc cagcgagtag agttttctcc tccgagccgc      540
tccgacaccg ggactgaaaa tgagacatat tatctgccac ggaggtggtta ttaccgaaga      600
aatggccgcc agtcttttgg accagctgat cgaagaggta ctggctgata atcttcacc      660
tcctagccat tttgaaccac ctacccttca cgaactgtat gatttagacg tgacggcccc      720
cgaagatccc aacgaggagg cggtttcgca gatttttccc gactctgtaa tgttggcgg      780
gcaggaaggg attgacttac tcacttttcc gccggcgccc ggttctccgg agccgcctca      840
cctttcccg      cagcccgagc agccggagca gagagccttg ggcccggtt      ctatgcaaaa      900
ccttgtaaccg gaggtgatcg atcttacctg ccacgaggct ggctttccac ccagtgacga      960
cgaggatgaa gaggtgagg agtttgtgtt agattatgtg gagcaccocg ggcacggttg      1020
caggtcttgt cattatcacc ggaggaatac gggggaccca gatattatgt gttcgtttg      1080
    
```

ES 2 547 700 T3

ctatatgagg acctgtggca tgtttgtcta cagtaagtga aaattatggg cagtgggtga 1140
tagagtgggtg ggtttgggtg ggtaattttt tttttaattt ttacagtttt gtggtttaaa 1200
gaatthtga ttgtgatttt tttaaaaggt cctgtgtotg aacctgagcc tgagcccag 1260
ccagaaccgg agcctgcaag acctaccgc cgtcctaaaa tggcgccctgc tatcctgaga 1320
cgcccgacat cacctgtgtc tagagaatgc aatagtagta cggatagctg tgactccggt 1380
ccttctaaca cacctcctga gatacaccgc gtgggtccgc tgtgcccctat taaaccagtt 1440
gocgtgagag ttgggtgggcg tccgccaggt gtggaatgta tccaggactt gcttaacgag 1500
cctgggcaac ctttgaactt gagctgtaaa cgcgccaggc cataaggtgt aaacctgtga 1560
ttgcctgtgt ggtaacgcc tttgtttgct gaatgagttg atgtaagttt aataaagggt 1620
gagataatgt ttaacttgca tggcgtgta aatggggcgg ggcttaagg gtatataatg 1680
cgccgtgggc taactctggt tacatctgac ctcattggagg cttgggagtg tttggaagat 1740
tttctgctg tgcgtaactt gctggaacag agctctaaca gtacctcttg gttttggagg 1800
tttctgtggg gctcatccca ggcaaagtta gtctgcagaa ttaaggagga ttacaagtgg 1860
gaatttgaag agcttttgaa atcctgtggt gagctgtttg attctttgaa tctgggtcac 1920
caggcgcttt tccaagagaa ggtcatcaag actttggatt tttccacacc ggggcgcgct 1980
gcggtgctg ttgctttttt gagttttata aaggataaat ggagcgaaga aacctatctg 2040
agcggggggg acctgctgga ttttctggcc atgcatctgt ggagagcggg tgtgagacac 2100
aagaatgcc tgcactggtt gtcttcgctc cgcggggcga taataccgac ggaggagcag 2160
cagcagcagc aggaggaagc caggcggcgg cggcaggagc agagcccatg gaacccgaga 2220
gccggcctgg acctcggga atgaatggtg tacagggtggc tgaactgtat ccagaactga 2280
gacgcatttt gacaattaca gaggatgggc aggggctaaa gggggtaaag agggagcggg 2340
gggcttgtga ggctacagag gaggctagga atctagcttt tagcttaatg accagacacc 2400
gtcctgagtg tattactttt caacagatca aggataattg cgctaatgag cttgatctgc 2460
tggcgcagaa gtattccata gagcagctga ccacttactg gctgcagcca ggggatgatt 2520
ttgaggaggc tattagggtg tatgcaaagg tggcacttag gccagattgc aagtacaaga 2580
tcagcaaaact tgtaaatatc aggaattggt gctacatttc tgggaacggg gccgaggtgg 2640
agatagatac ggaggatagg gtggccttta gatgtagcat gataaatatg tggccggggg 2700
tgcttggcat ggacggggtg gttattatga atgtaagggt tactggcccc aatthtagcg 2760
gtacggtttt cctggccaat accaacctta tctacacggg tgtaagcttc tatgggttta 2820
acaatacctg tgtggaagcc tggaccgatg taagggttcg gggctgtgcc ttttactgct 2880

ES 2 547 700 T3

gctggaagg ggtaggtgtg ccccccaaaa gcagggttc aattaagaaa tgcctctttg 2940
aaaggtgtac cttgggtatc ctgtctgagg gtaactccag ggtgcgccac aatgtggcct 3000
ccgactgtgg ttgcttcatg ctagtgaaaa gcgtggctgt gattaagcat aacatggtat 3060
gtggcaactg cgaggacagg gcctctcaga tgctgacctg ctcgacaggc aactgtcacc 3120
tgctgaagac cattcacgta gccagccact ctgcgaaggc ctggccagtg tttgagcata 3180
acatactgac ccgctgttcc ttgcatttgg gtaacaggag gggggtgttc ctacctacc 3240
aatgcaattt gagtcacact aagatattgc ttgagcccga gagcatgtcc aaggtgaacc 3300
tgaacggggt gtttgacatg accatgaaga tctggaagg gctgaggtag gatgagacc 3360
gcaccagggt cagaccctgc gagtggggc gtaaacatat taggaaccag cctgtgatgc 3420
tggatgtgac cgaggagctg aggcccgatc acttgggtgt ggcctgcacc cgcgctgagt 3480
ttggctctag cgatgaagat acagattgag gtaactgaaat gtgtgggctg ggcttaaggg 3540
tgggaaagaa tatataagg gggggtctta tgtagttttg tatctgtttt gcagcagccg 3600
ccgcgcgat gagcaccac tcgtttgatg gaagcattgt gagctcatat ttgacaacgc 3660
gcctgcccc atgggcccgg gtgcgtcaga atgtgatggg ctccagcatt gatggtcgcc 3720
ccgtcctgcc cgcacaactct actacctga cctacgagac cgtgtctgga acgccgttgg 3780
agactgcagc ctccgcgcc gctcagccg ctgcagccac cgcgcgggg attgtgactg 3840
actttgcttt cctgagcccc ctgcaagca gtgcagcttc ccgttcctcc gcccgcgatg 3900
acaagttgac ggctcttttg gcacaattgg attctttgac ccgggaactt aatgtcgttt 3960
ctcagcagct gttggatctg cgcagcagg tttctgcct gaaggcttc tccctccca 4020
atgcggttta aaacataaat aaaaaaccag actctgtttg gatttggatc aagcaagtgt 4080
cttgcgtctt ttatttaggg gttttgcgcg cgcggtaggc ccgggaccag cgtctcggg 4140
cgttgagggt cctgtgtatt tttccagga cgtggtaaag gtgactctgg atgttcagat 4200
acatgggcat aagcccgctc ctggggtgga ggtagacca ctgcagagct tcatgctgag 4260
gggtggtgtt gtagatgatc cagtcgtagc aggagcgtg ggcgtggtgc ctaaaaatgt 4320
ctttcagtag caagctgatt gcca 4344

<210> 2
<211> 3018
<212> DNA
<213> Artificial

5

<220>
<223> 505-3522 Ad5

ES 2 547 700 T3

<400> 2

gagtgccagc gagtagagtt ttctcctccg agccgctccg acaccgggac tgaaaatgag 60
 acatattatc tgccacggag gtgttattac cgaagaaatg gccgccagtc ttttggacca 120
 gctgatcgaa gaggtactgg ctgataatct tccacctcct agccattttg aaccacctac 180
 ccttcacgaa ctgtatgatt tagacgtgac ggcccccgaa gatcccaacg aggaggcggg 240
 ttcgcagatt tttcccgact ctgtaatggt ggcggtgcag gaagggattg acttactcac 300
 ttttccgccg gcgcccgggt ctccggagcc gcctcacctt tcccggcagc ccgagcagcc 360
 ggagcagaga gccttgggtc cggtttctat gccaaacctt gtaccggagg tgatogatct 420
 tacctgccac gaggtcggct ttccaccagc tgacgacgag gatgaagagg gtgaggagtt 480
 tgtgttagat tatgtggagc accccgggca cggttgcagg tcttgtcatt atcaccggag 540
 gaatacgggg gaccagata ttatgtgttc gctttgctat atgaggacct gtggcatggt 600
 tgtctacagt aagtgaaaat tatgggcagt gggatgata gtgggtgggt ttggtgtggt 660
 atttttttt taatttttac agttttgtgg tttaaagaat tttgtattgt gattttttta 720
 aaaggtcctg tgtctgaacc tgagcctgag cccgagccag aaccggagcc tgcaagacct 780
 acccgccgtc ctaaaatggc gcctgctatc ctgagacgcc cgacatcacc tgtgtctaga 840
 gaatgcaata gtagtacgga tagctgtgac tccggtcctt ctaacacacc tcctgagata 900
 caccgggtgg tcccgtgtg ccccatataa ccagttgccg tgagagttgg tgggcgtcgc 960
 caggctgtgg aatgtatcga ggacttgctt aacgagcctg ggcaacctt ggacttgagc 1020
 tgtaaacgcc ccaggccata aggtgtaaac ctgtgattgc gtgtgtgggt aacgccttg 1080
 tttgctgaat gagttgatgt aagttaata aagggtgaga taatgtttaa cttgcatggc 1140
 gtgttaaatg gggcggggct taaaggtat ataatgcgcc gtgggctaata cttggttaca 1200
 tctgacctca tggaggcttg ggagtgttg gaagatttt ctgctgtgcg taacttgctg 1260
 gaacagagct ctaacagtac ctcttggtt tggaggtttc tgtggggctc atcccaggca 1320
 aagttagtct gcagaattaa ggaggattac aagtgggaat ttgaagagct tttgaaatcc 1380
 tgtggtgagc tgtttgatc tttgaatctg ggtcaccagg cgcttttcca agagaaggtc 1440
 atcaagactt tggatttttc cacaccgggg cgcgctgcgg ctgctgttgc ttttttgagt 1500
 tttataaagg ataaatggag cgaagaaacc catctgagcg gggggtacct gctggatttt 1560
 ctggccatgc atctgtggag agcggttgtg agacacaaga atcgctgct actgttgtct 1620
 tccgtccgcc cggcgataat accgacggag gagcagcagc agcagcagga ggaagccagg 1680
 cggcggcggc aggagcagag cccatggaac ccgagagccg gcctggacct tcgggaatga 1740
 atgtgttaca ggtggtgaa ctgtatccag aactgagacg cattttgaca attacagagg 1800

ES 2 547 700 T3

atgggcaggg gctaaagggg gtaaagaggg agcggggggc ttgtgaggct acagaggagg 1860
ctaggaatct agcttttagc ttaatgacca gacaccgtcc tgagtgtatt acttttcaac 1920
agatcaagga taattgcgct aatgagcttg atctgctggc gcagaagtat tccatagagc 1980
agctgaccac ttaactggetg cagccagggg atgattttga ggaggctatt agggatatatg 2040
caaagtgggc acttagggcca gattgcaagt acaagatcag caaacttgta aatatcagga 2100
attgttgcta catttctggg aacggggccg aggtggagat agatacggag gatagggtgg 2160
ccttttagatg tagcatgata aatatgtggc cgggggtgct tggcatggac ggggtggtta 2220
ttatgaatgt aaggtttact ggccccaatt ttagcggtac ggttttcctg gccaatacca 2280
accttatoct acacgggtgta agcttctatg ggtttaacaa tacctgtgtg gaagcctgga 2340
ccgatgtaag ggttcggggc tgtgcctttt actgctgctg gaaggggggtg gtgtgtcgcc 2400
ccaaaagcag ggcttcaatt aagaaatgco tctttgaaag gtgtaccttg ggtatcctgt 2460
ctgagggtaa ctccagggtg cgcacaatg tggctccga ctgtggttgc tcatgctag 2520
tgaaaagcgt ggctgtgatt aagcataaca tggatgtgg caactgagag gacagggcct 2580
ctcagatgct gacctgctcg gacggcaact gtcacctgct gaagaccatt cacgtagcca 2640
gccactctcg caaggcctgg ccagtgttg agcataacat actgaccocg tgttccttgc 2700
atltgggtaa caggaggggg gtgttcctac cttaccaatg caatttgagt cacactaaga 2760
tattgcttga gcccagagagc atgtccaagg tgaacctgaa cgggggtgtt gacatgacca 2820
tgaagatctg gaaggtgctg aggtacgatg agaccgcac caggtgcaga ccctgcgagt 2880
gtggcggtaa acatattagg aaccagcctg tgatgctgga tgtgaccgag gagctgaggc 2940
ccgatcaact ggtgctggcc tgcaccccg ctagtattgg ctctagcgat gaagatacag 3000
attgaggtagc tgaaatgt 3018

<210> 3
<211> 3575
5 <212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> 505-4079 Ad5

<400> 3
gagtgccagc gagtagagtt ttctcctccg agccgctccg acaccgggac tgaaaatgag 60
acatattatc tgccacggag gtgttattac cgaagaaatg gccgccagtc ttttggacca 120
gctgatcgaa gaggtactgg ctgataatct tccacctcct agccattttg aaccacctac 180
10 ccttcacgaa ctgtatgatt tagacgtgac ggcccccgaa gatcccaacg aggaggcgt 240

ES 2 547 700 T3

ttgcagatt	ttfcccgact	ctgtaatggt	ggcgggtgcag	gaagggattg	acttactcac	300
ttttccgccg	gcccgggtt	ctccggagcc	gcctcacctt	tcccggcagc	ccgagcagcc	360
ggagcagaga	gccttgggtc	cggtttctat	gccaaacctt	gtaccggagg	tgatcgatct	420
tacctgccac	gaggctggct	ttccaccag	tgacgacgag	gatgaagagg	gtgaggagtt	480
tgtgttagat	tatgtggagc	accccgggca	cggttgcagg	tcttgtcatt	atcacccggag	540
gaatacgggg	gaccagata	ttatgtgttc	gctttgetat	atgaggacct	gtggcatggt	600
tgtctacagt	aagtgaaaat	tatgggcagt	gggtgataga	gtgggtgggtt	tggtgtggta	660
atTTTTTTTT	taatTTTTac	agTTTTgtgg	tttaaagaat	tttgtattgt	gattTTTTta	720
aaaggtcctg	tgtctgaacc	tgagcctgag	cccgagccag	aaccggagcc	tgcaagacct	780
acccgcgctc	ctaaaatggc	gcctgctatc	ctgagacgcc	cgacatcacc	tgtgtctaga	840
gaatgcaata	gtagtacgga	tagctgtgac	tccggtcctt	ctaacacacc	tctgagata	900
caccgggtgg	tcccgtgtg	ccccattaaa	ccagttgccg	tgagagttgg	tgggcgtcgc	960
caggctgtgg	aatgtatoga	ggacttgctt	aacgagcctg	ggcaaccttt	ggacttgagc	1020
tgtaaacgcc	ccaggccata	aggtgtaaac	ctgtgattgc	gtgtgtgggtt	aacgcctttg	1080
tttgcTgaat	gagttgatgt	aagtttaata	aagggtgaga	taatgtttaa	cttgcagggc	1140
gtgttaaatg	gggcggggct	taaagggat	ataatgcgcc	gtgggctaata	cttggttaca	1200
tctgacctca	tggaggcttg	ggagtgtttg	gaagatTTTT	ctgctgtgcg	taacttgctg	1260
gaacagagct	ctaacagtac	ctcttggttt	tggagggttc	tgtggggctc	atcccaggca	1320
aagttagtct	gcagaattaa	ggaggattac	aagtgggaat	ttgaagagct	tttgaaatcc	1380
tgtggTgagc	tgtttgattc	tttgaatctg	ggtcaccagg	cgcttttcca	agagaaggtc	1440
atcaagactt	tggatTTTTc	cacaccgggg	cgcgctgcgg	ctgctgttgc	TTTTTTgagt	1500
tttataaagg	ataaatggag	cgaagaaacc	catctgagcg	gggggtacct	gctggatttt	1560
ctggccatgc	atctgtggag	agcggttgtg	agacacaaga	atcgctgct	actgttTct	1620
tccgtccgcc	cggcgataat	accgacggag	gagcagcagc	agcagcagga	ggaagccagg	1680
cggcgccggc	aggagcagag	cccatggaac	ccgagagccg	gcctggacct	tccggaatga	1740
atgttgTaca	ggtggctgaa	ctgtatccag	aactgagacg	cattttgaca	attacagagg	1800
atgggcaggg	gctaaagggg	gtaaagaggg	agcggggggc	ttgtgaggct	acagaggagg	1860
ctaggaatct	agcttttagc	ttaatgacca	gacaccgtcc	tgagtgtatt	acttttcaac	1920
agatcaagga	taattgcgct	aatgagcttg	atctgctggc	gcagaagtat	tccatagagc	1980
agctgaccac	ttactggctg	cagccagggg	atgattttga	ggaggctatt	agggtatatg	2040

ES 2 547 700 T3

caaaggtggc acttaggcca gattgcaagt acaagatcag caaacttgta aatatcagga 2100
 attgttgcta catttctggg aacggggccg aggtggagat agatacggag gataggggtg 2160
 cctttagatg tagcatgata aatatgtggc cgggggtgct tggcatggac ggggtgggta 2220
 ttatgaatgt aaggtttact ggcccccaatt ttagcggtac ggttttcctg gccaatacca 2280
 accttatcct acacgggtgta agcttctatg ggtttaacaa tacctgtgtg gaagcctgga 2340
 ccgatgtaag ggttcggggc tgtgcctttt actgctgctg gaaggggggtg gtgtgtcgcc 2400
 ccaaaagcag ggcttcaatt aagaaatgcc tctttgaaag gtgtaccttg ggtatcctgt 2460
 ctgagggtaa ctccaggggtg cggcacaatg tggcctcoga ctgtggttgc ttcattgctag 2520
 tgaaaagcgt ggctgtgatt aagcataaca tggatgtggg caactgctgag gacagggcct 2580
 ctgagatgct gacctgctcg gacggcaact gtcacctgct gaagaccatt cacgtagcca 2640
 gccactctcg caaggcctgg ccagtgtttg agcataacat actgaccgcg tgttccttgc 2700
 atttgggtaa caggaggggg gtgttcctac cttaccaatg caatttgagt cacactaaga 2760
 tattgcttga gcccgagagc atgtccaagg tgaacctgaa cgggggtgtt gacatgacca 2820
 tgaagatctg gaaggtgctg aggtacgatg agaccgcac caggtgcaga ccctgcgagt 2880
 gtggcggtaa acatattagg aaccagcctg tgatgctgga tgtgaccgag gagctgaggc 2940
 ccgatcactt ggtgctggcc tgcaccgcg ctgagtttg ctctagcgt gaagatacag 3000
 attgaggtac tgaaatgtgt gggcgtggct taagggtggg aaagaatata taagggtggg 3060
 gtcttatgta gttttgtatc tgttttgcag cagccgcgcg cggcatgagc accaactcgt 3120
 ttgatggaag cattgtgagc tcatatttga caacgcgcat gccccatgg gccgggtg 3180
 gtcagaatgt gatgggctcc agcattgatg gtcgccccgt cctgccccga aactctacta 3240
 ccttgacctc cgagaccgtg tctggaacgc ogttggagac tgcagcctcc gccgccgctt 3300
 cagccgctgc agccaccgcc cgggggattg tgactgaact tgccttctctg agcccgttg 3360
 caagcagtgc agcttcccgt tcatccgcc gcgatgacaa gttgacggct cttttggcac 3420
 aattggattc tttgaccggg gaacttaatg tcgtttctca gcagctgttg gatctgcgcc 3480
 agcaggttcc tgccctgaag gcttctccc ctcccaatgc ggtttaaac ataaataaaa 3540
 aaccagactc tgtttggatt tggatcaagc aagtg 3575

<210> 4
 <211> 2499
 <212> DNA
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Antígeno T de SV40

ES 2 547 700 T3

<400> 4

atcatggata aagttttaa	cagagaggaa tctttgcagc	taatggacct tctaggtott	60
gaaaggagt cctgggggaa	tattcctctg atgagaaagg	catatttaa aaaatgcaag	120
gagtttcac ctgataaagg	aggagatgaa gaaaaaatga	agaaaatgaa tactctgtac	180
aagaaaatgg aagatggagt	aaaatatgct catcaacctg	actttggagg cttctgggat	240
gcaactgagg tatttgcttc	ttccttaaat cctgggtgtg	atgcaatgta ctgcaacaa	300
tggcctgagt gtgcaaagaa	aatgtctgct aactgcatat	gcttgctgtg cttactgagg	360
atgaagcatg aaaatagaaa	attatacagg aaagatccac	ttgtgtgggt tgattgctac	420
tgcttcgatt gctttagaat	gtggtttggg cttgatcttt	gtgaaggaac cttacttctg	480
tggtgtgaca taattggaca	aactacctac agagatttaa	agctctaagg taaatataaa	540
attttaagt gtataatgtg	ttaaactact gattctaatt	gtttgtgtat ttagattcc	600
aacctatgga actgatgaat	gggagcagtg gtggaatgcc	tttaatgagg aaaacctgtt	660
ttgctcagaa gaaatgccat	ctagtgatga tgaggctact	gctgactctc aacattctac	720
tcctccaaaa aagaagagaa	aggtagaaga ccccaaggac	tttccttcag aattgctaag	780
ttttttgagt catgctgtgt	ttagtaatag aactcttgct	tgctttgcta ttacaccac	840
aaaggaaaaa gctgcactgc	tatacaagaa aattatggaa	aatattctg taacctttat	900
aagtaggcat aacagttata	atcataacat actgtttttt	cttactccac acaggcatag	960
agtgtctgct attaataact	atgetcaaaa attgtgtacc	tttagctttt taatttgtaa	1020
aggggtaat aaggaatatt	tgatgtatag tgccttgact	agagatccat tttctgttat	1080
tgaggaaagt ttgccaggtg	ggttaaagga gcatgatttt	aatccagaag aagcagagga	1140
aactaaacaa gtgtcctgga	agcttgtaac agagtatgca	atggaaacaa aatgtgatga	1200
tgtgttgta ttgcttggga	tgtacttggg atttcagtac	agttttgaaa tgtgtttaa	1260
atgtattaaa aaagaacagc	ccagccacta taagtaccat	gaaaagcatt atgcaaatgc	1320
tgctatattt gctgacagca	aaaacccaaa aacctatgc	caacaggctg ttgatactgt	1380
tttagotaaa aagcgggttg	atagcctaca attaactaga	gaacaaatgt taacaaacag	1440
atthaatgat cttttggata	ggatggatat aatgtttgg	tctacaggct ctgctgacat	1500
agaagaatgg atggctggag	ttgcttggct aactgtttg	ttgcccaaaa tggattcagt	1560
ggtgtatgac tttttaa	aat gcatgggtga caacatcct	aaaaaagat actggctgtt	1620
taaaggacca attgatagtg	gtaaaactac attagcagct	gctttgcttg aattatgtgg	1680
ggggaaagct ttaaatgta	atgtgcctt ggacaggctg	aactttgagc taggagtagc	1740

ES 2 547 700 T3

tattgaccag tttttagtag tttttgagga tgtaaagggc actggagggg agtccagaga 1800
 tttgccttca ggtcagggaa ttaataacct ggacaattta agggattatt tggatggcag 1860
 tgttaaggta aacttagaaa agaaacacct aaataaaaga actcaaataat ttccccctgg 1920
 aatagtcacc atgaatgagt acagtgtgcc taaaacactg caggccagat ttgtaaaaca 1980
 aatagatfff aggccaaaag attatttaaa gcattgcctg gaacgcagtg agtttttgtt 2040
 agaaaagaga ataattcaaa gtggcattgc tttgcttctt atgttaattt ggtacagacc 2100
 tgtggctgag tttgctcaaa gtattcagag cagaattgtg gagtggaaag agagattgga 2160
 caaagagttt agtttgtcag tglatcaaaa aatgaagttt aatgtggcta tgggaattgg 2220
 agttttagat tggctaagaa acagtgatga tgatgatgaa gacagccagg aaaatgctga 2280
 taaaaatgaa gatggtgggg agaagaacat ggaagactca gggcatgaaa caggcattga 2340
 ttcacagtcc caaggctcat ttcaggcccc tcagtcctca cagtctgttc atgatcataa 2400
 tcagccatac cacatttgta gaggttttac ttgctttaa aaacctcca cacctcccc 2460
 tgaacctgaa acataaggat ccagcgatcc gcctgaatt 2499

<210> 5
 <211> 523
 <212> DNA
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Promotor de CMV

<400> 5
 gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggetgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg 60
 acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa 120
 tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac atcaagtgta tcatatgccca 180
 agtacgcccc ctattgacgt caatgacggg aatggcccgg cctggcatta tgcccagtac 240
 atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc 300
 atggtgatgo ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat agcggtttga ctcacgggga 360
 tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca aatcaacgg 420
 gactttccaa aatgtcgtaa caactcggcc ccattgaagc aaatgggagg taggcgtgta 480
 cgggtgggagg tctatataag cagagctcgt ttagtgaacc gtc 523

<210> 6
 <211> 97
 <212> DNA
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> SD/SA (intrón) de SV40

<400> 6
 taagtttagt ctttttgtct tttatttcag gtcccggatc cgggtgggtg gcaaatcaaa 60
 gaactgctcc tcagtggatg ttgcctttac ttctagg 97

20

<210> 7
 <211> 147
 <212> DNA
 <213> Artificial

ES 2 547 700 T3

<220>

<223> poliA (Antígeno T) de SV40

<400> 7

ggggatccag acatgataag atacattgat gagtttggac aaaccacaac tagaatgcag 60
 tgaaaaaaat gctttatttg tgaattttgt gatgctattg ctttatttgt aaccattata 120
 agctgcaata aacaagttaa caacaac 147

5

<210> 8

<211> 1926

<212> DNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> EBNA-1

<400> 8

atgtctgacg aggggccagg tacaggacct ggaaatggcc taggagagaa gggagacaca 60
 tctggaccag aaggctccgg cggcagtgga cctcaaagaa gagggggtga taaccatgga 120
 cgaggacggg gaagaggacg aggacgagga ggcgggaagac caggagcccc gggcggctca 180
 ggatcagggc caagacatag agatggtgtc cggagacccc aaaaacgtcc aagttgcatt 240
 ggctgcaaag ggaccacagg tggaacagga gcaggagcag gagcgggagg ggcaggagca 300
 ggaggggacg gagcaggagg aggggcagga gcaggaggag gggcaggagg ggcaggaggg 360
 gcaggagggg caggagcagg aggaggggca ggagcaggag gaggggacag aggggcagga 420
 ggggcaggag caggaggggg ggcaggagca ggagggggcag caggagggggc aggagcagga 480
 ggaggggacg gaggggacag aggggcagga gcaggaggag gggcaggagc aggagggagg 540
 gcaggagggg caggagcagg aggaggggca ggaggggacg gaggggacag agcaggagga 600
 ggggcaggag caggagggggc aggaggggca ggaggggacg gagcaggagg ggcaggagca 660
 ggagggaggg caggagggggc aggaggggca ggagcaggag gggcaggagc aggaggggca 720
 ggagcaggag gggcaggagc aggaggggca ggaggggacg gagcaggagg ggcaggaggg 780

ES 2 547 700 T3

gcaggagcag gaggggcagg aggggcagga gcaggaggag gggcaggagg ggcaggagca 840
ggaggagggg caggaggggc aggagcagga ggggcaggag gggcaggagc aggaggggca 900
ggaggggcag gagcaggagg ggcaggaggg gcaggagcag gaggaggggc aggagcagga 960
ggggcaggag caggaggtgg aggccggggt cgaggaggca gtggaggccg gggtcgagga 1020
ggtagtggag gccggggtcg aggaggtagt ggaggccgcc ggggtagagg acgtgaaaga 1080
gccagggggg gaagtogtga aagagccagg gggagaggtc gtggacgtgg agaaaagagg 1140
cccaggagtc ccagtagtca gtcacatca tccgggtctc caccgcgcag gccccctcca 1200
ggtagaaggc catttttcca ccctgtaggg gaagccgatt attttgaata ccaccaagaa 1260
ggtggcccag atggtgagcc tgacgtgcc cggggagcga tagagcaggg ccccgcagat 1320
gaccaggag aaggcccaag cactggacct cggggtcagg gtgatggagg caggcgcaaa 1380
aaaggagggg ggtttgaaa gcatcgtggt caaggaggtt ccaacccgaa atttgagaac 1440
attgcagaag gtttaagagc tctcctggct aggagtcacg tagaaaggac taccgacgaa 1500
ggaacttggg tgcgggtgt gttcgtatat ggaggtagta agacctccct ttacaacctt 1560
aggcgaggaa ctgcccttgc tattccacaa tgtcgtctta caccattgag tcgtctcccc 1620
tttggaatgg ccctggacc cggccacaa cctggccgc taagggagtc cattgtctgt 1680
tatttcattg tctttttaca aactcatata tttgtgagg ttttgaagga tgcgattaag 1740
gacctgtta tgacaaagcc cgtcctacc tgcaatatca gggtgactgt gtgcagcttt 1800
gacgatggag tagatttgc tccctggttt ccacctatgg tggagggggc tgccgcggag 1860
ggtgatgacg gagatgacgg agatgaagga ggtgatggag atgaggggtga ggaagggcag 1920
gagtga 1926

<210> 9
<211> 29
5 <212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

10 <400> 9
ccggaattct tgcaaaagc ctaggcctc 29

<210> 10
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

15 <220>
<223> Cebador

<400> 10
ccggaattct gaggcggaaa gaaccagct 29

20 <210> 11
<211> 359
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> SV40 ori

ES 2 547 700 T3

<400> 11
 ttgcaaaag cctaggcctc caaaaaagcc tcctcactac ttctggaata gctcagaggc 60
 cgaggcggcc tcggcctctg cataaataaa aaaaattagt cagccatggg gcgagaaatg 120
 ggcggaactg ggcggagtta gggcgggat gggcggagt agggcgggga ctatggttc 180
 tgactaattg agatgcatgc ttgcatact tctgcctgct ggggagcctg gggactttcc 240
 acacctggtt gctgactaat tgagatgcat gctttgcata cttctgcctg ctggggagcc 300
 tggggacttt ccacacccta actgacacac attccacagc tggttctttc cgcctcaca 359

<210> 12
 <211> 1378
 <212> DNA
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> hAAT

<400> 12
 attctgcagg gggggggggg ggctgggaca gtgaatcgac aatgccgtct tctgtctcgt 60
 ggggcacect cctgctggca ggcctgtgct gcctggctccc tgtctccctg gctgaggatc 120
 cccagggaga tgctgcccag aagacagata catcccacca tgatcaggat caccacaacct 180
 tcaacaagat ccccccaac ctggctgagt tcgccttcag cctataccgc cagctggcac 240
 accagtccaa cagcaccat atcttcttct ccccagtgag catcgtaca gcctttgcaa 300
 tgctctccct ggggaccaag gctgacactc acgatgaaat cctggagggc ctgaatttca 360
 acctcacgga gattccggag gctcagatcc atgaaggctt ccaggaactc ctccgtacct 420
 tcaaccagcc agacagccag ctccagctga ccaccggcaa tggcctgttc ctcagcgagg 480
 gcctgaagct agtggataag tttttggagg atgttaaaaa gttgtaccac tcagaagcct 540
 tcactgtcaa ctccggggac accgaagagg ccaagaaaca gatcaacgat tacgtggaga 600
 agggactca agggaaaatt gtggatttgg tcaaggagct tgacagagac acagtttttg 660
 ctctggtgaa ttacatcttc tttaaaggca aatgggagag accctttgaa gtcaaggaca 720
 ccgaggaaga ggactccac gtggaccagg tgaccaccgt gaaggtgcct atgatgaagc 780
 gtttaggcat gtttaacatc cagcactgta agaagctgtc cagctgggtg ctgctgatga 840
 aatacctggg caatgccacc gccatcttct tcctgcctga tgaggggaaa ctacagcacc 900
 tggaaaatga actcaccacc gatatcatca ccaagttcct ggaaaatgaa gacagaaggt 960
 ctgccagctt acatttacc aaactgtcca ttactggaac ctatgatctg aagagcgtcc 1020
 tgggtcaact gggcatcact aaggcttca gcaatggggc tgacctctcc ggggtcacag 1080
 aggagccacc cctgaagctc tccaaggccg tgcataaggc tgtgctgacc atcgacgaga 1140
 aagggactga agctgctggg gccatgttt tagaggccat acccatgtct atccccccg 1200
 aggtcaagtt caacaaacc tttgtcttct taatgattga acaaaatacc aagtctcccc 1260
 tcttcatggg aaaagtgggt aatcccacc aaaaataact gcctctcgt cctcaacccc 1320
 tcccctccat ccctggcccc ctcccctggat gacattaaag aagggttgag ctggattg 1378

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de una línea de células amniocíticas humanas permanente que comprende:
 - a) transfectar células amniocíticas humanas primarias con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica los productos génicos adenovirales E1A y E1B y
 - 5 b) subsiguientemente transfectar la línea de células amniocíticas humanas permanente obtenida en la etapa a) con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el antígeno T grande de SV40 o el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1).
2. El método según la reivindicación 1^a, en el que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica las funciones génicas adenovirales E1A y E1B se deriva de un adenovirus humano, en particular el adenovirus humano de serotipo 5.
10
3. El método según la reivindicación 2^a, en el que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica los productos génicos adenovirales E1A y E1B comprende los nucleótidos 1 a 4344, 505 a 3522, o los nucleótidos 505 a 4079 del adenovirus humano de serotipo 5.
4. El método según la reivindicación 1^a, en el que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el antígeno T grande de SV40 comprende además la secuencia de ácidos nucleicos para un promotor seleccionado entre el grupo de promotor de CMV, promotor de CAG y promotor de RSV, la secuencia de ácidos nucleicos para SD/SA de SV40 (intrón) y la secuencia de ácidos nucleicos para poliA de SV40, y la secuencia de ácidos nucleicos para el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (EBNA-1) comprende además la secuencia de ácidos nucleicos para un promotor seleccionado entre el grupo del promotor de CMV, promotor de CAG y promotor de RSV, la secuencia de ácidos nucleicos para SD/SA de SV40 (intrón) y la secuencia de ácidos nucleicos para poliA de SV40.
15
20
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que en vez de la etapa a) se usan las líneas de células amniocíticas humanas ya inmortalizadas con una molécula de ácido nucleico, que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica los productos génicos adenovirales E1A y E1B.

Fig. 1a

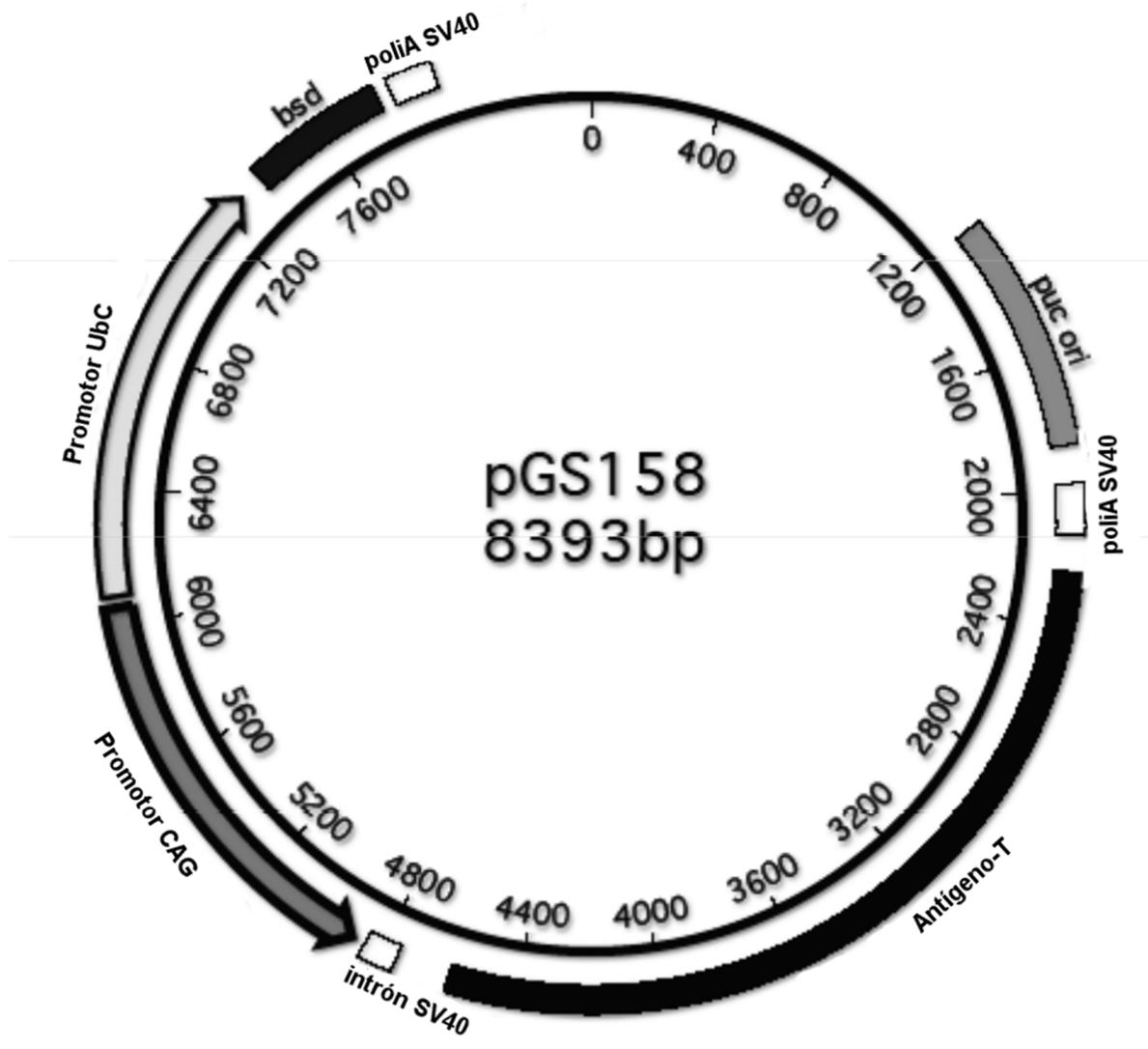


Fig 1b

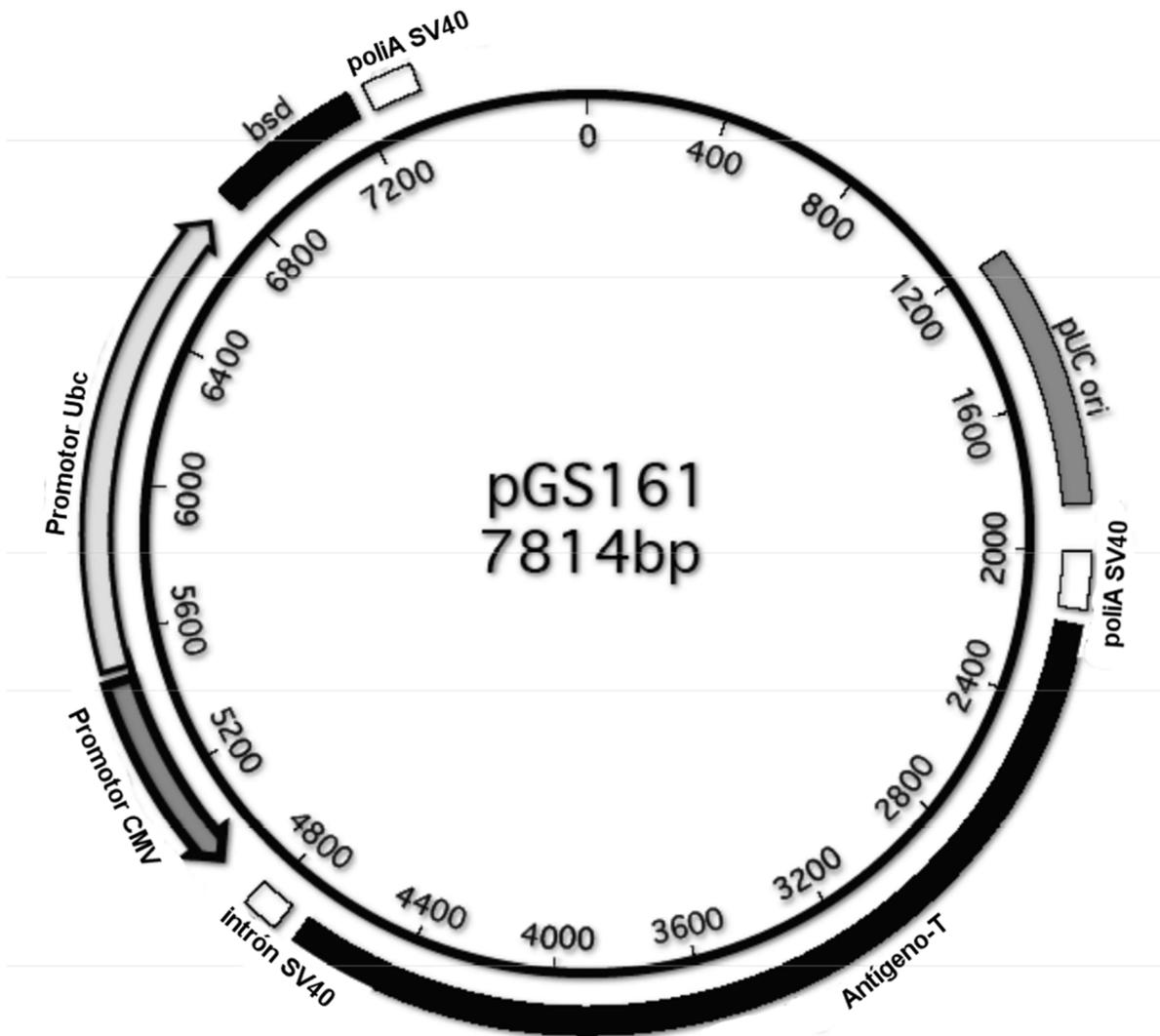


Fig. 1c

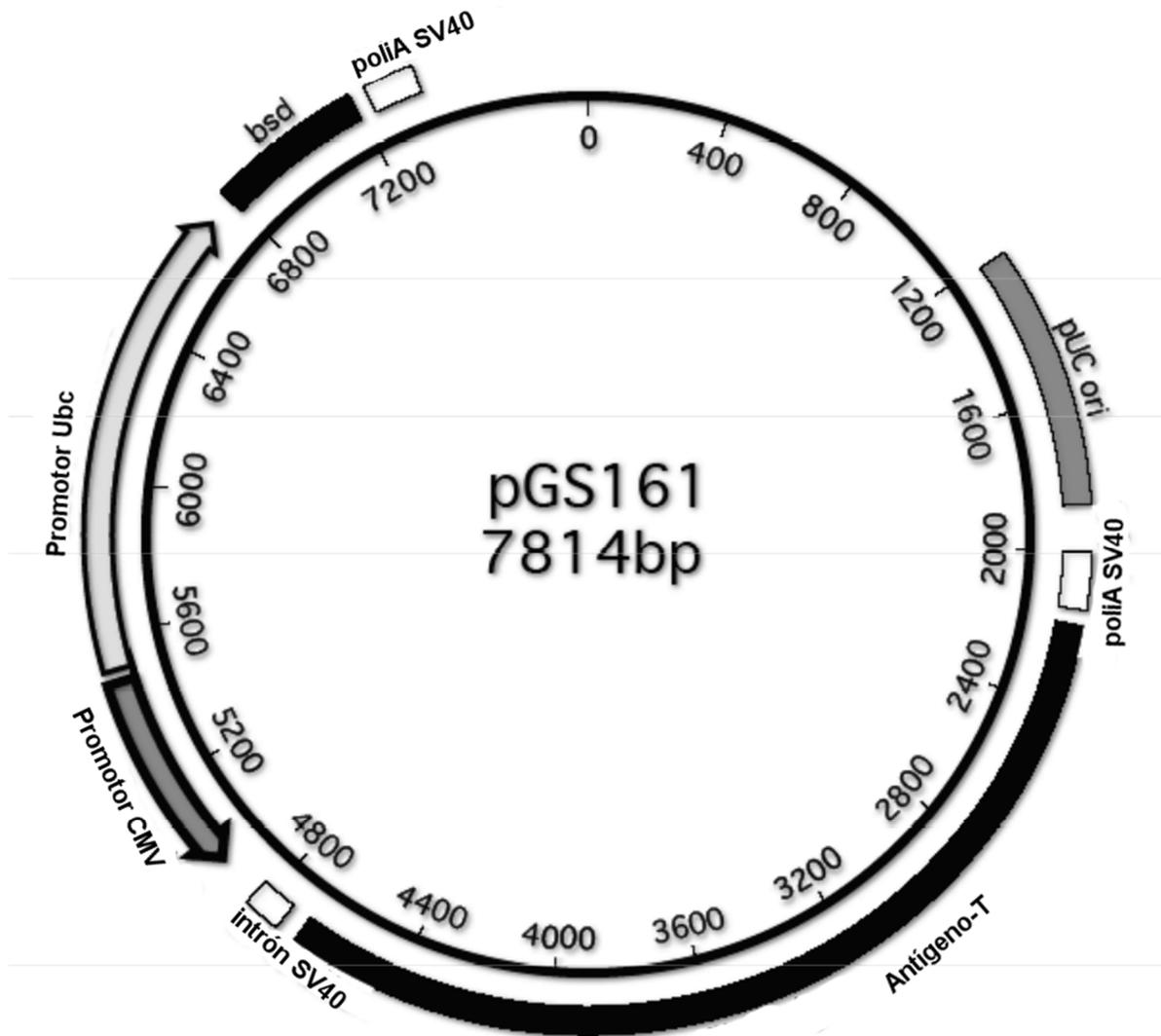


Fig. 2a

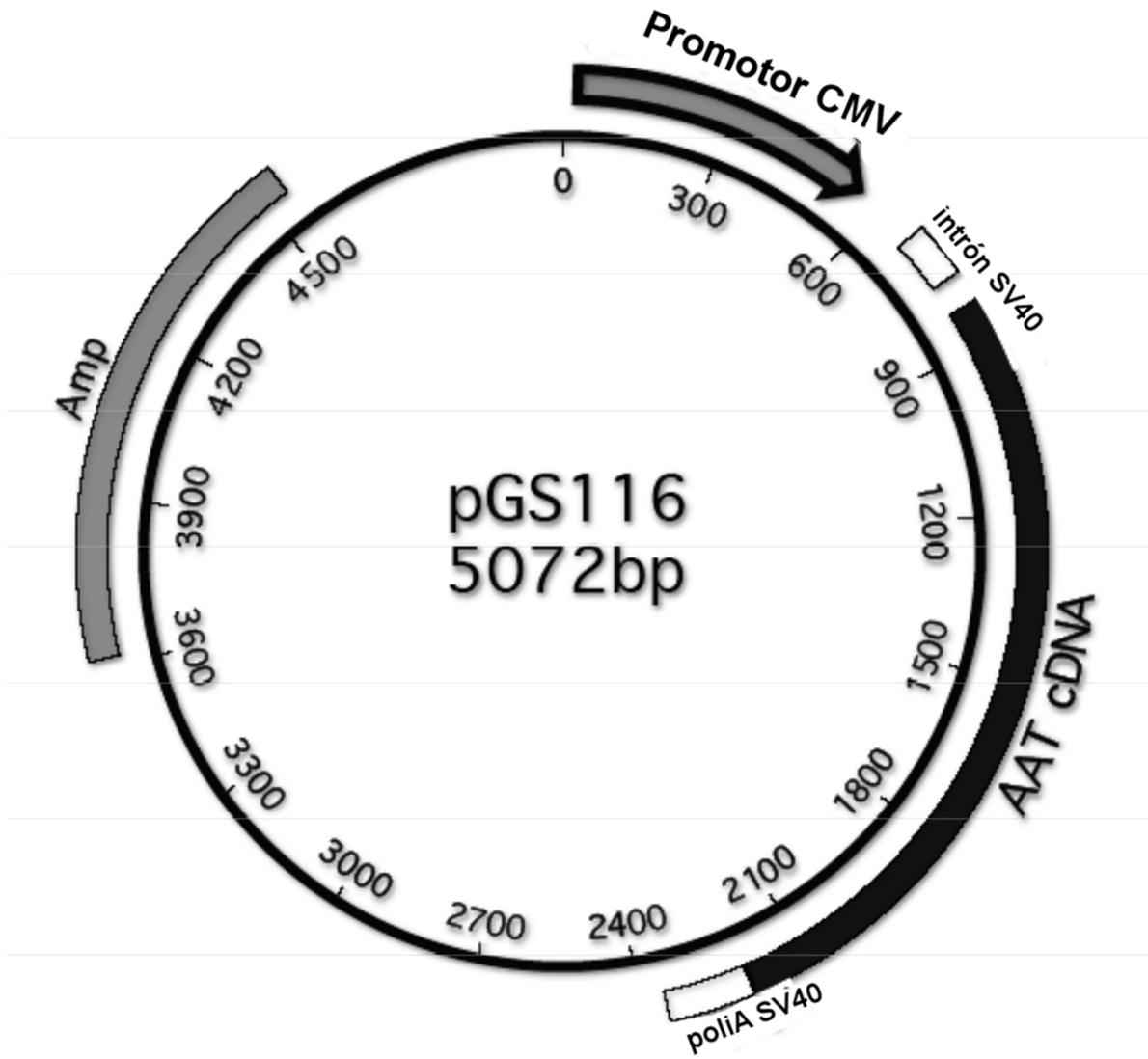


Fig. 2b

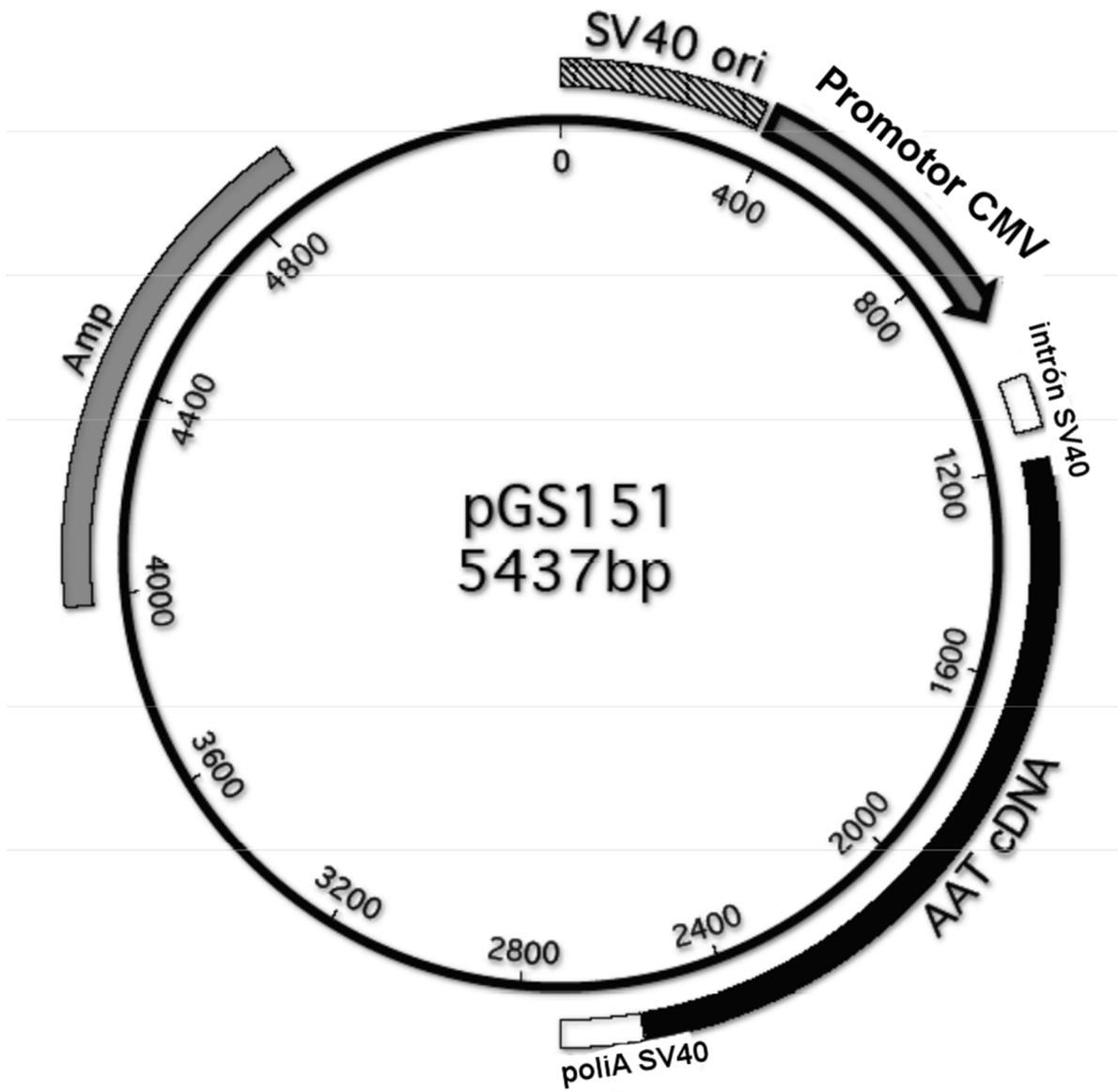


Fig. 2c

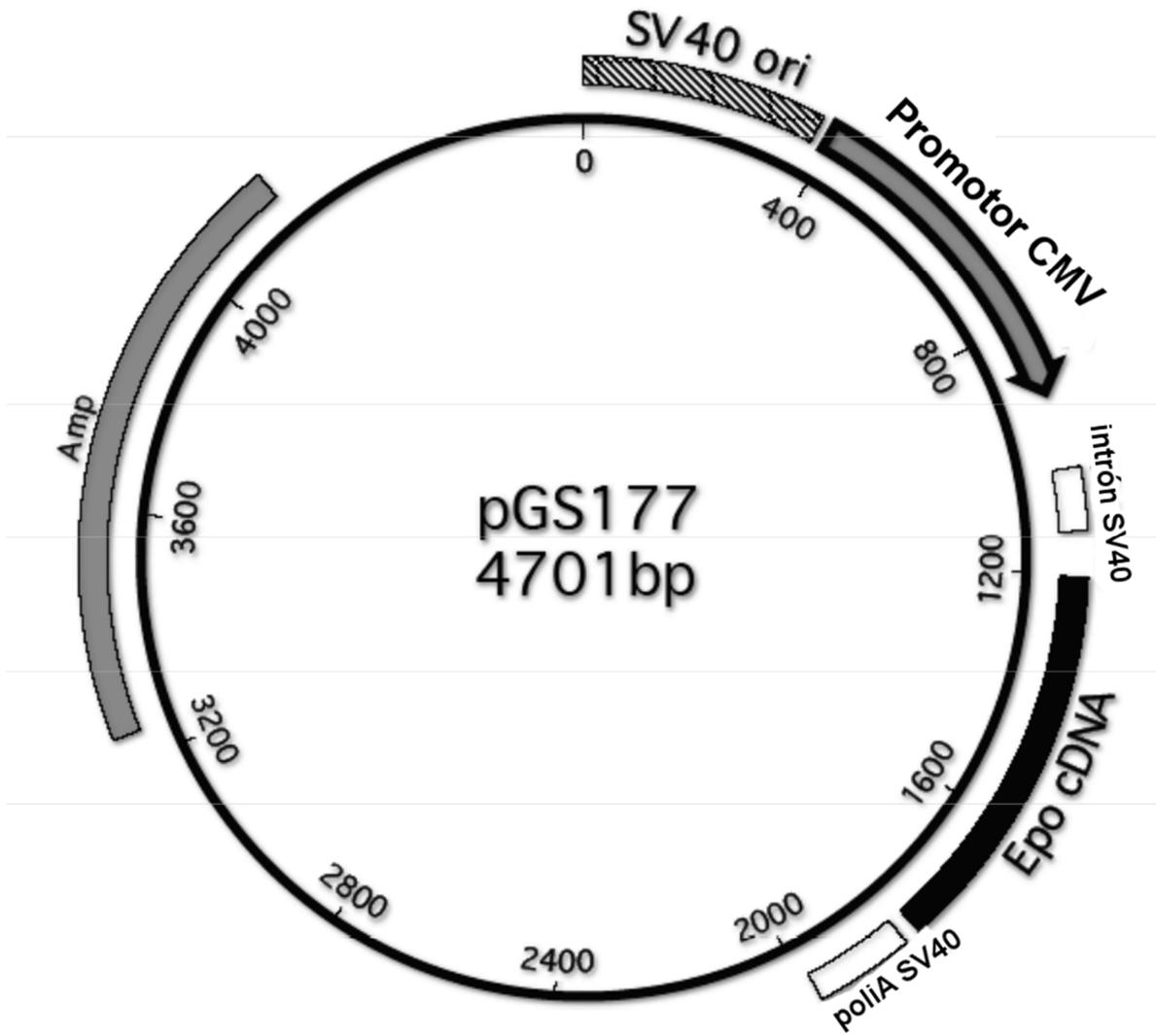


Fig.3

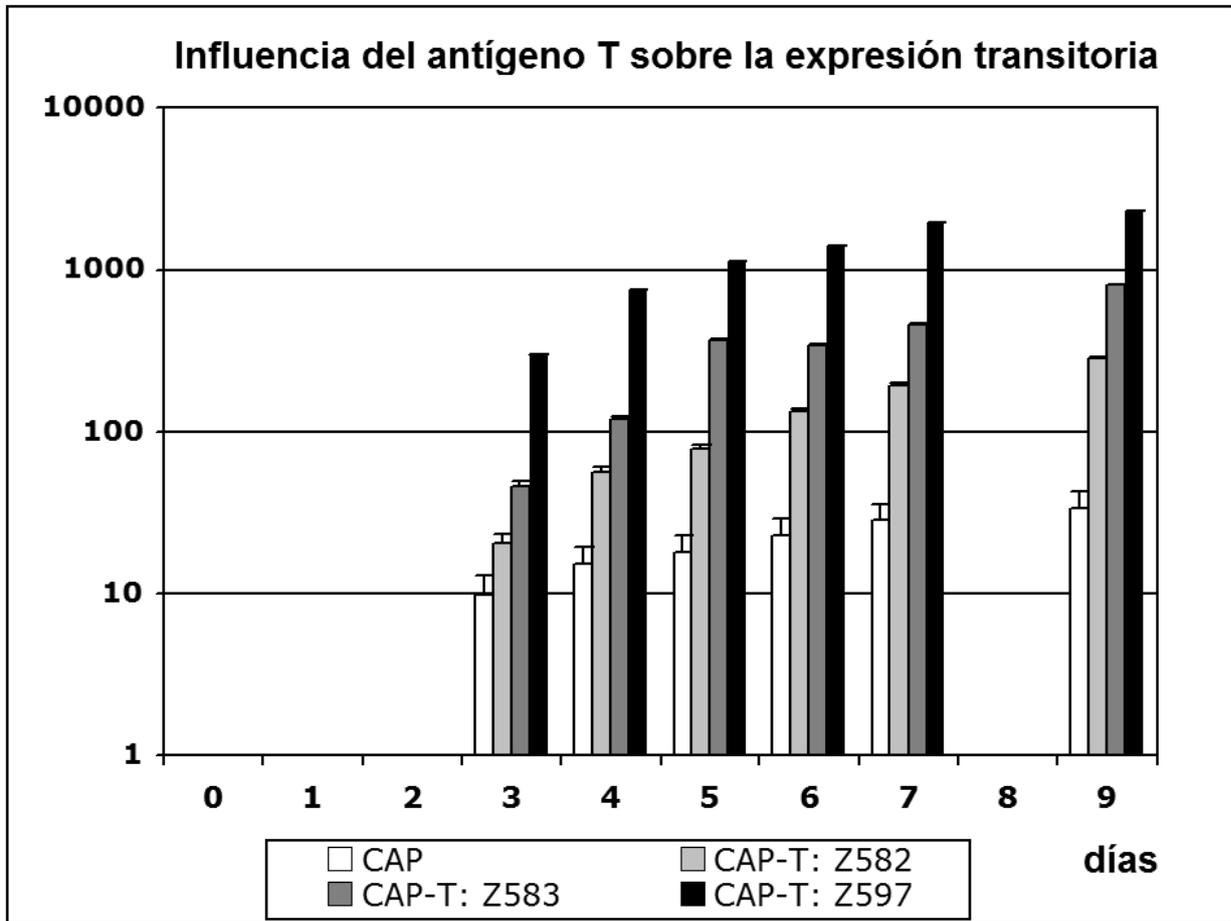


Fig. 4

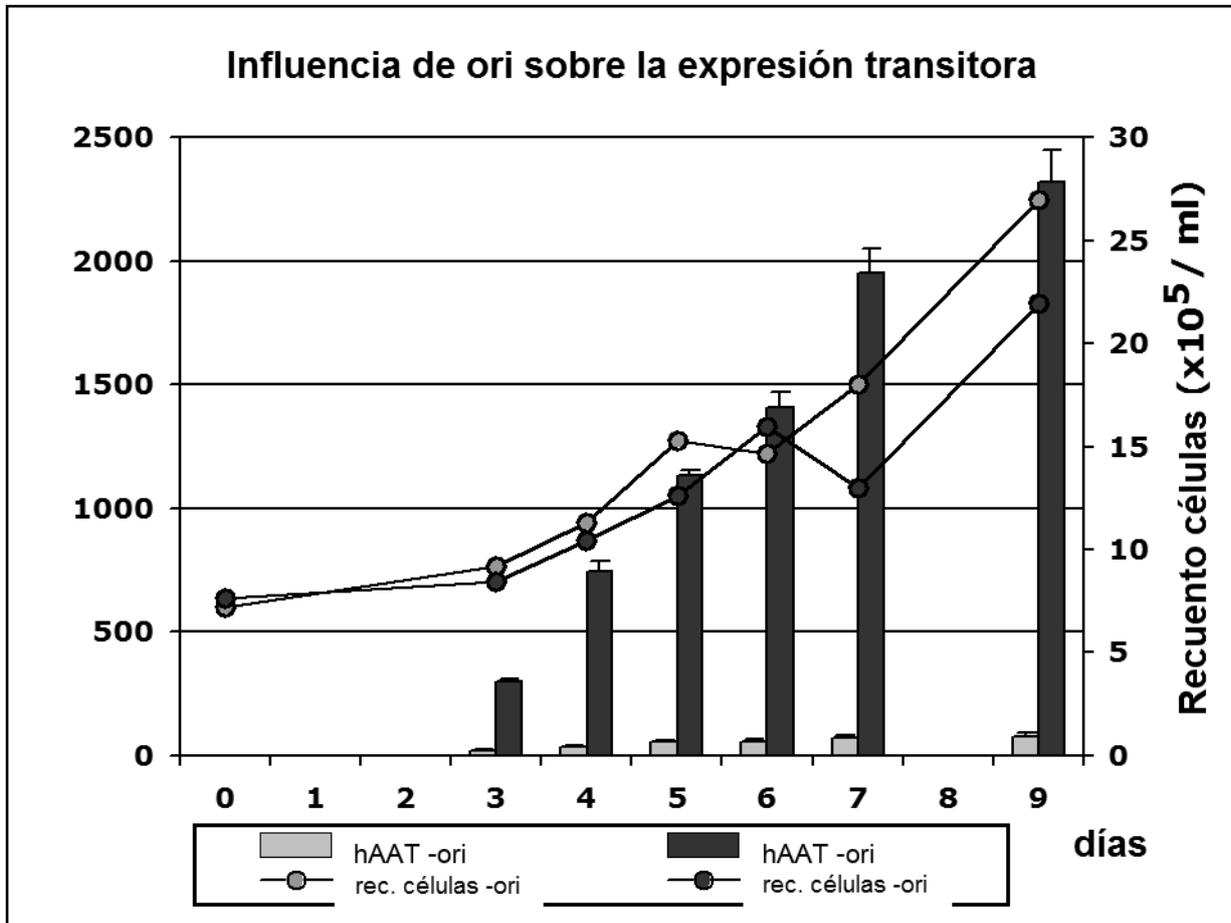


Fig. 5

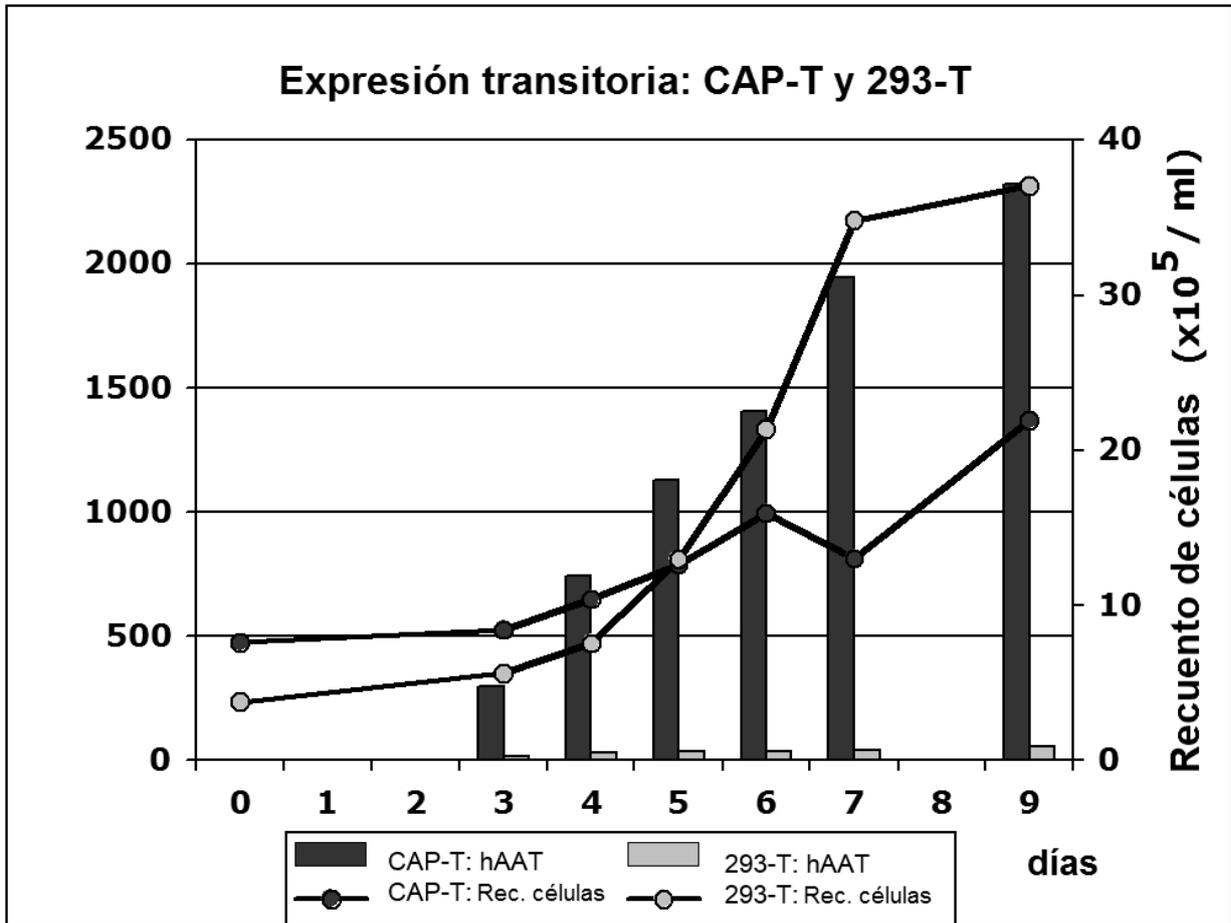


Fig. 6

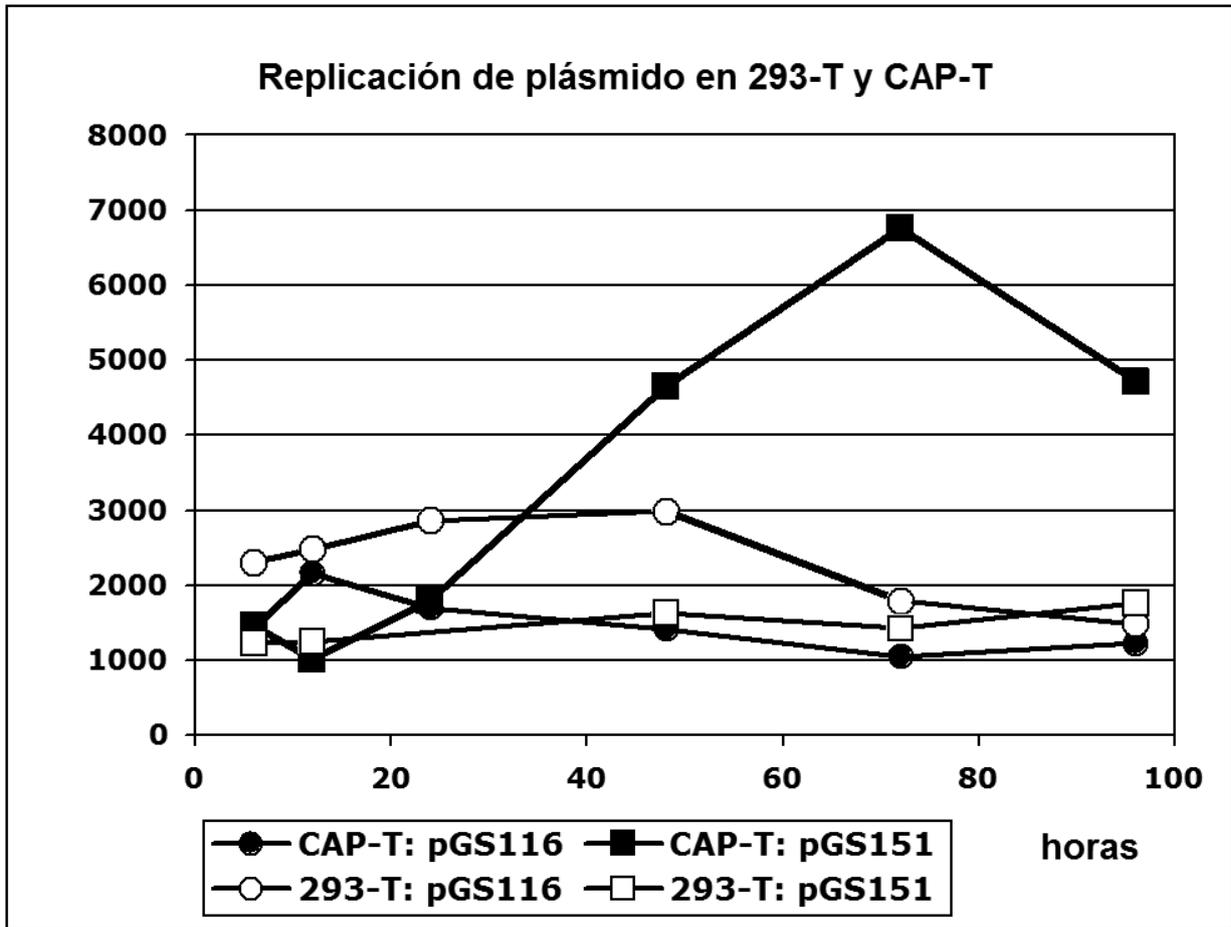


Fig. 7

