

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 447**

51 Int. Cl.:

C12N 15/79 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2009 PCT/EP2009/065410**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2010 WO10060844**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2009 E 09756728 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.06.2018 EP 2356241**

54 Título: **Vector cromosómico artificial**

30 Prioridad:

28.11.2008 AT 18592008

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

25.10.2018

73 Titular/es:

**BAUER, ANTON (50.0%)
Getreidegasse 2
3470 Kirchberg/Wagram, AT y
CASANOVA HEVIA, EMILIO MANUEL (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BAUER, ANTON;
CASANOVA HEVIA, EMILIO MANUEL y
BLAAS, LEANDER**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 687 447 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

Vector cromosómico artificial

La invención se refiere a un método de producción de proteínas en líneas celulares hospedadoras mamíferas.

5 La producción de proteína recombinante en sistemas celulares de mamífero es un asunto importante en la biotecnología. Una de las etapas críticas en la producción de proteínas recombinantes es la generación de líneas celulares que expresen altos niveles de la proteína de interés y el aislamiento de sus clones celulares sencillos con expresión estable durante los ciclos de división celular y con el tiempo (Wurm, F.M. *Nature Biotechnology* 22, 1.393-1.398 (2004)). Hay una necesidad de métodos que generen líneas celulares que expresan de manera estable, segura y reproducible altas producciones de proteínas secretadas en el cultivo celular a escala industrial. Esta
10 necesidad esta creciendo particularmente con el crecimiento de la cantidad de compuestos biológicos desarrollados y producidos para terapia por la industria farmacéutica.

Comúnmente, esto se consigue mediante integración genómica aleatoria de un vector de expresión que contiene un promotor, un gen de interés y un marcador seleccionable dentro del ADN cromosómico de líneas celulares de producción establecidas.

15 Las líneas celulares de producción frecuentemente usadas están derivadas de células de mamífero o insecto. Una línea celular es un cultivo celular permanentemente establecido que proliferará indefinidamente en medio fresco y espacio apropiados dados. Las líneas celulares difieren de las cepas celulares en el sentido de que han escapado del límite de Hayflick (Hayflick L. (1965). "The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains." *Exp. cell Res.* 37 (3):614-636) y llegan a ser inmortalizadas. Ejemplos para las líneas celulares de producción establecidas son CHO, NS0, COS, o células Sf9, o líneas celulares humanas como PerC-6 y HEK293.
20

Para modificar por ingeniería genética las células así como líneas celulares mamíferas normalmente se usan plásmidos como vectores. Un plásmido es una molécula de ADN no cromosómico separada del ADN cromosómico, que es capaz de replicarse independientemente del ADN cromosómico en bacterias. En muchos casos, es circular y de doble cadena. En células mamíferas proliferativas, el plásmido se puede mantener indefinidamente en las células
25 hospedadoras después de la integración aleatoria dentro del genoma de la célula hospedadora, y puede dirigir la producción del gen/producto de interés, comúnmente una proteína, por su promotor.

Aunque este método de modificación por ingeniería genética es simple y directo, carece de reproducibilidad. La expresión de proteínas a partir de tales vectores está básicamente influenciada por la cromatina circundante al sitio de integración, lo cual tiende a silenciar la expresión con el tiempo (Wurm, F.M. *Nature Biotechnology* 22, 1.393-1.398 (2004)). Esto hace la selección de clones adecuados un procedimiento que requiere tiempo y tedioso.
30

Se han desarrollado varias estrategias para superar los efectos posicionales de la cromatina adyacente. Por ejemplo, se han usado elementos "antirepresores" que flanquean los vectores o se han integrado específicamente vectores dentro de los loci cromosómicos con cromatina abierta (Kwaks, T.H. et al. *Nature Biotechnology* 21, 553-558 (2003), Huang, Y. et al. *Journal of Immunological Methods* 322, 28-39 (2007)).

35 Se han usado cromosomas artificiales en la técnica para proporcionar hospedadores transgénicos, tales como animales o plantas.

El documento WO 2002/097059A2 describe cromosomas artificiales que se han modificado por ingeniería para contener sitios disponibles para la integración de ADN dirigida por recombinación, específica a sitio, particularmente útil para modificar por ingeniería animales transgénicos.

40 El documento US2008/0060093A1 describe métodos de generación de plantas transformadas con minicromosomas autónomos.

Moralli et al (*EMBO reports* 2006 Vol. 7(9) 911-918) describe vectores de cromosoma artificial humano (HAC, del inglés "Human Artificial Chromosome") para ser usados como un sistema de transferencia génica para estudios de expresión y complementación.

45 El desarrollo de vectores de expresión de proteína apropiados constituye una etapa crítica en la producción de proteína recombinante en líneas celulares eucariotas. Para la producción de proteína recombinante en cultivo celular, generalmente se busca un vector que manifieste las siguientes características:

- 1) la expresión debería ser independiente del sitio de integración en el genoma,
- 2) la expresión debería correlacionarse con el número de copias de transgen integradas,
- 50 3) la expresión debería mantenerse con el tiempo, y
- 4) el nivel de expresión debería ser alto.

Es el objetivo de la presente invención proporcionar un método y un vector que permitan la generación de clones celulares estables para mejorar la producción de proteína recombinante en líneas celulares de producción eucariota.

El objetivo se ha resuelto mediante la materia objeto de la presente invención.

Según la presente invención se ha proporcionado un método de producción de una proteína en una línea celular de producción eucariota, que comprende las etapas de

- a) proporcionar un cromosoma artificial bacteriano (BAC, del inglés "Bacterial Artificial Chromosome"),
- b) recombinar un promotor heterólogo y un ácido nucleico que codifica dicha proteína dentro de dicho BAC para generar un vector de expresión de BAC,
- c) integrar aleatoriamente dicho vector de expresión de BAC dentro del cromosoma de una línea celular hospedadora eucariota para obtener una línea celular de expresión eucariota,
- d) cultivar dicha línea celular de expresión, que comprende al menos 5 copias de BAC integradas en la célula hospedadora, para producir dicha proteína, y
- e) aislar dicha proteína.

Por tanto, la línea celular de expresión usada según la invención tiene un vector de expresión integrado basado en un cromosoma artificial.

La línea celular usada según la invención se entiende como un cultivo celular permanentemente establecido que proliferará indefinidamente en medio fresco y espacio apropiados dados, por tanto se ha inmortalizado. Más adelante en la presente memoria la línea celular usada según la invención también se denomina "línea celular hospedadora" o "célula hospedadora".

El método según la invención en particular se refiere a construcciones cromosómicas artificiales que contienen secuencias de ácidos nucleicos extrañas y métodos de uso de estas construcciones para la producción *ex vivo* de proteínas, como proteínas de secreción.

Se pueden usar cromosomas artificiales en las líneas celulares de producción para la producción a gran escala de proteínas recombinantes. Los cromosomas artificiales preferiblemente están derivados de bacterias, como un cromosoma artificial bacteriano, también denominado "BAC", que tiene por ejemplo elementos del plásmido F. Los cromosomas artificiales también pueden tener elementos de bacteriófagos, como en el caso de los "cósmidos". Estos cromosomas artificiales tienen en común, que contienen secuencias de origen de replicación necesarias para la replicación y la conservación durante las divisiones celulares en la respectiva célula usada para la amplificación de ADN. Los cósmidos, BAC y PAC (de sus siglas en inglés) tienen orígenes de replicación de bacterias, los YAC (de sus siglas en inglés) tienen orígenes de replicación de levadura, los MAC (de sus siglas en inglés) tienen orígenes de replicación de células mamíferas, y los HAC tienen orígenes de replicación de células humanas. Además, los cromosomas artificiales usados según la invención pueden tener marcadores de selección, normalmente resistencia a antibiótico, lo cual permite la selección de células que portan un cromosoma artificial.

Estos cromosomas artificiales son vectores que incluyen elementos derivados de cromosomas que son responsables de la replicación y el mantenimiento en el respectivo organismo, y son capaces de mantener de manera estable grandes fragmentos de ADN genómico. Estos grandes fragmentos de ADN genómico normalmente están en el intervalo de 30 a 50 kb para los cósmidos, 50 a 350 kb para los PAC y BAC, 100 a 3.000 kb para los YAC, y >1.000 kb para los MAC y HAC.

El cromosoma artificial usado según la invención se selecciona del grupo que consiste en BAC, los cuales también se denominan "cromosomas artificiales microbianos". Los cromosomas artificiales microbianos normalmente son pequeños cromosomas de 5.000 kpb como máximo. El tamaño de un cromosoma artificial usado según la invención preferiblemente es de 100 a 350 kpb, pero también puede ser mayor de 350 kpb.

Los esqueletos del cromosoma artificial preferido usados según la invención son de origen bacteriano, bacteriófago o de levadura. Estos se pueden considerar juntos como cromosomas artificiales microbianos con características de vector muy similares pero diferente capacidad para los loci de ADN insertados. Además, se pueden usar los cromosomas artificiales derivados de BAC, cósmido, PAC, YAC, igualmente, aquellos de mamíferos (MAC) o humanos (HAC). Como un esqueleto de BAC preferiblemente se usa la construcción Rosa26BAC según la invención. También se pueden usar otros loci considerados como cromatina abierta, tal como b-actina, Gapdh, Hprt, proteínas ribosómicas.

Elementos adicionales de un cromosoma artificial usado según la invención son elementos de los fragmentos grandes de ADN que contienen loci génicos. Estos loci génicos son preferidos y funcionales después de que se hayan introducido los cromosomas artificiales en las respectivas líneas celulares de producción eucariotas. Estos loci génicos contienen elementos reguladores de la estructura de la cromatina y accesibilidad a factores de

transcripción, y elementos que determinan los niveles de transcripción, como secuencias potenciadoras y promotoras, para la expresión de productos génicos de interés.

5 En un cromosoma artificial, algunos de estos elementos anteriormente mencionados solo se requieren para amplificación apropiada del ADN. Estos elementos son el origen de replicaciones y un gen marcador para la selección en, por ejemplo, bacterias y levadura, como resistencia antibiótica. Por tanto, la parte del cromosoma artificial que porta estos elementos se denomina el esqueleto.

10 Los cromosomas artificiales son grandes vectores basados en ADN que se han usado mucho en la construcción de genotecas de ADN para el mapeado y el análisis del genoma compuesto. Los BAC se han usado para secuenciar el genoma de los organismos en proyectos de secuenciación a gran escala, por ejemplo, el Proyecto del Genoma Humano. Un pedazo corto del ADN del organismo se amplifica como un inserto en BAC y, a continuación, se secuencian. Finalmente, las partes secuenciadas se reorganizan *in silico*, dando como resultado la secuencia genómica del organismo.

15 Los BAC también se han usado como grandes vectores para la generación de ratones transgénicos (Giraldo, P. & Montoliu, L. *Transgenic research* 10, 83-103 (2001)). En este ejemplo, las células primarias de los ratones expresan el gen de interés regulado por el respectivo locus en el BAC.

20 Resultó que los cromosomas artificiales se podían usar en la producción de líneas celulares de expresión eucariotas que habían mejorado las propiedades. Por ejemplo, sorprendentemente se ha demostrado que un vector basado en BAC según la presente invención se puede aplicar para someter a transfección líneas celulares eucariotas y para expresar proteínas recombinantes en las líneas celulares en cultivo celular de un modo altamente eficaz. Según una realización preferida de la invención, se usó un vector basado en BAC para producir un fragmento de la región constante del IgG1 humano. La comparación directa de cultivos de célula HEK 293 voluminosos generados con un vector convencional o con un vector basado en BAC mostró que el vector basado en BAC sorprendentemente mejoró la producción de proteína en un factor de 10. Además el análisis de los clones celulares estables que albergaban el vector basado en BAC mostró que la producción de proteína era directamente proporcional al número de copias de BAC integradas y que la producción de proteína era estable incluso después de 30 pases.

30 Según la invención es así posible mejorar la expresión de proteínas de secreción y polipéptidos en general, en particular con el fin de la producción industrial de proteínas recombinantes, lo cual normalmente implica la producción a gran escala, por ejemplo, usando al menos 1 litro de volumen de fermentación, más preferido al menos 5 litros, incluso más preferido la fermentación se lleva a cabo usando al menos 100 litros de caldo de fermentación. La fermentación preferiblemente se emplea usando técnicas de fermentación continuas o discontinuas.

35 Las proteínas de secreción son proteínas o polipéptidos que se producen y secretan a partir de una célula hospedadora eucariota a su ambiente extracelular. Normalmente esto se soporta por péptidos señal, los cuales se entiende como una secuencia peptídica corta, por ejemplo de 2 a 100 aminoácidos de largo, que dirige el transporte post-traducción de una proteína. Los péptidos señal generalmente se usan para producir proteínas secretadas a partir de las células de producción. Estos péptidos señal normalmente se separan por escisión para formar una proteína secretada madurada. Ejemplo para un péptido señal que conduce a una proteína secretada es "MELGLSWIFLLAILKGVQC" encontrado para la cadena ligera kappa humana (Felgenhauer, M., Kohl, J. y Ruker, F.; "Nucleotide sequences of the cDNAs encoding the V-regions of H- and L-chains of a human monoclonal antibody specific to HIV-1-gp41"; *Nucleic Acids Res.* 18(16), 4.927 (1990)). Los péptidos señal también se pueden denominar señales guiadas, secuencias señal, péptidos de tránsito o señales de localización.

40 Las secuencias de aminoácidos de los péptidos señal dirigen las proteínas (que se sintetizan en el citoplasma) a ciertos orgánulos tales como el núcleo, la matriz mitocondrial, el retículo endoplasmático, el cloroplasto, el apoplasto y el peroxisoma. Los péptidos señal usados en los vectores de expresión normalmente se escinden de la proteína por peptidasa señal después de que se transporten las proteínas.

45 Por tanto, el vector usado según la invención está basado en un cromosoma artificial que incluye un gen que puede codificar una proteína de secreción, preferiblemente empleando un péptido señal, por ejemplo, junto con la proteína de secreción. El péptido señal preferiblemente se escinde de la proteína de secreción tras la expresión y el transporte dentro del sobrenadante del cultivo celular.

50 El método según la invención preferiblemente se usa para proporcionar proteínas recombinantes seleccionadas del grupo que consiste en proteínas de suero, incluyendo inmunoglobulinas, fragmentos o derivados de inmunoglobulina, albúmina, factores sanguíneos, hormonas polipeptídicas, citoquinas, quimioquinas, enzimas y factores de crecimiento, y sus derivados.

Un derivado incluye cualquier fragmento, conjugado, fusión, ácido nucleico u homólogo de un polipéptido, el cual es originario de o es similar a la proteína de secreción.

55 Para producir la proteína según la invención, la línea celular de expresión se cultiva para producir la proteína, y se aísla la proteína. Por lo tanto, se pueden emplear los métodos de aislamiento o separación usados en la técnica, tales como los métodos de separación cromatográfica para aislar cuantitativamente el producto.

Como célula hospedadora eucariota se usa cualquier célula hospedadora que pueda proporcionar glicosilación de proteína eucariota, si es necesario. Preferiblemente se usan célula sencilla de mamífero o insecto o línea celular de humano, primates, ratón, células de hámster. Ejemplos preferidos son las células HEK, tales como HEK293, CHO, COS, NS0, células de linfoblasto de ratón, células PerC6 o Sf9.

- 5 El ácido nucleico que codifica dichas proteínas recombinantes preferiblemente se recombinan con el gen del esqueleto del cromosoma artificial mediante técnicas de recombinación, tales como la recombinación homóloga o el intercambio de casete, tal como mediado por integrasa, como el intercambio de casete mediado por ϕ C31 integrasa.

- 10 El vector usado según la invención está preferiblemente integrado de manera estable dentro del cromosoma de la célula hospedadora, preferiblemente un cromosoma de mamífero o insecto, más preferiblemente un cromosoma de origen humano, murino o hámster, para proporcionar un hospedador transgénico.

- 15 La línea celular transgénica usada según la invención se proporciona o bien como una célula sencilla, clon de célula sencilla estable, como una línea celular o similares. Sin embargo, la invención excluye explícitamente seres humanos transgénicos. Preferiblemente la célula hospedadora transgénica está albergando el vector dentro del mapa genético de su cromosoma, normalmente junto con o directamente ligado en un locus de un gen abundantemente expresado o proteína, también denominada proteína abundante.

- 20 Una proteína abundante como se entiende en la presente memoria es una proteína que está altamente expresada en el nivel de ARNm y polipéptido por la célula hospedadora, por ejemplo, proteínas ribosómicas, proteínas de citoesqueleto y proteínas para la síntesis de ADN, como la ADN polimerasa. Tal proteína abundante normalmente es una proteína nativa que es altamente expresada por la célula hospedadora. Usando el locus de una proteína abundante normalmente se facilita la expresión estable de la proteína de secreción codificada por el cromosoma artificial a una alto índice. De nuevo se prefiere que el locus sea de origen mamífero o de insecto.

- 25 El locus seleccionado preferiblemente contiene elementos reguladores para la formación de cromatina abierta o la expresión de proteína en general. En particular se prefiere que se emplee un potenciador anticondensación, o bien a través de un elemento que está contenido en el locus como un potenciador nativo, o a través de un elemento regulador exógeno, heterólogo o sintético que proporciona la expresión de la estructura de cromatina. De ese modo el locus es accesible para los factores de transcripción.

- 30 La región "cromatina abierta" o "cromatina activa" o "eucromatina" puede estar sujeta a cambios estructurales, dando como resultado estructuras menos condensadas y altamente transcritas. La formación de eucromatina se cree que representa el mecanismo subyacente de la regulación génica mediada por cromatina, conservando los genes en un estado activo, lo cual es preferible para obtener un vector basado en un cromosoma artificial, el cual está diseñado para la expresión de proteína.

- 35 En los campos de la genética y la computación evolutiva, un locus se entiende como una posición fijada sobre un cromosoma que puede estar ocupada por uno o más genes. Un locus de una proteína se entiende como una posición del gen que está dedicada para expresar al menos parte de dicha proteína. Una variante de la secuencia de ADN en un locus dado se denomina cromosoma transgénico. La lista ordenada de loci conocidos para un genoma particular se denomina mapa genético.

- 40 Preferiblemente el locus usado según la invención se deriva de las secuencias de la línea celular de producción. Por ejemplo, para un hospedador mamífero, se usa un locus de proteínas de mamífero, también denominado locus de mamífero. Para una célula de insecto, se usa preferiblemente un locus de una proteína de insecto, también denominado locus de insecto. Preferiblemente se emplean loci humanos o murinos según la invención. Loci ejemplares son Rosa 26 o loci de genes abundantemente expresados y esenciales, como beta-actina y otras proteínas del citoesqueleto así como proteínas ribosómicas.

- 45 Incluso más preferido es emplear loci del mismo tipo o especie que la célula hospedadora, que proporciona un locus alogénico. Por ejemplo, un locus de mamífero está integrado dentro del vector para la producción de célula hospedadora mamífera, por ejemplo, un locus humano integrado dentro de un vector según la invención se introduce dentro de una línea celular humana. Este sistema alogénico se usa preferiblemente para la producción de proteínas humanas. Además se prefiere que un vector con un locus de ratón esté preferiblemente integrado dentro de una línea celular hospedadora murina, y un vector con un locus de hámster esté preferiblemente integrado en una línea celular hospedadora de hámster y un vector con un locus de insecto esté integrado en una línea celular de insecto.

- 50 Elementos reguladores usados según la invención incluyen preferiblemente un promotor, o bien un promotor nativo, que está contenido en el locus nativo, o como un elemento heterólogo, tal como promotores eucariotas y/o procariotas, o incluso se pueden usar promotores duales. Promotores como ejemplos son unos genéricos, preferiblemente CMV, Caggs, Tk (timidina quinasa), ubiquitina C o EF2, los cuales se usan comúnmente para transfección. Además de los promotores artificiales también se pueden usar promotores naturales como beta actina
- 55 o proteínas ribosómicas. Preferiblemente se selecciona un promotor fuerte.

Se ha probado que es preferido introducir más de una copia del cromosoma artificial en la célula hospedadora para mejorar la producción, al menos 5 a 10 copias, hasta 50 copias se pueden integrar dentro de la célula hospedadora.

Sin embargo puede ser ventajoso emplear incluso un número mayor de cromosomas artificiales, hasta 500 copias, en particular cuando más de un locus es empleado para expresar la proteína. El número incrementado de copias integradas del cromosoma artificial en el genoma se correlaciona directamente con la expresión incrementada del gen de interés y así la producción incrementada de la respectiva proteína codificada. Esto es una clara mejora en comparación con el uso de estrategias de inserción ("knock-in"), en donde el gen de interés se inserta dentro de una o dos copias de un locus cromosómico de una línea celular hospedadora sin el uso de cromosomas artificiales.

Por tanto, el uso de cromosoma artificial según la invención soporta una alta producción de expresión de proteína. El método de producción según la invención preferiblemente proporciona producciones de al menos 1 pg/célula/día, preferiblemente al menos 3, 5, 10, 30, 50 hasta 100 pg/célula/día. Las producciones se pueden mejorar incrementando la densidad de dichas células hospedadoras mediante amplificación apropiada.

Resulta que el clon usado según la invención está produciendo de manera estable la proteína, incluso después de pase múltiple. Sorprendentemente se ha mostrado que la producción no se reduce significativamente, es decir, en no más del 30 %, incluso después del pase 10, 20 o 30, demostrando así un sistema de expresión estable.

El vector usado según la invención se puede proporcionar como un instrumento de expresión para facilitar la producción de proteína recombinante combinada con unidades de expresión convencionales, o preferiblemente como una unidad de expresión completa por sí misma. Por tanto, es preferido que el vector usado según la invención albergue elementos reguladores de un gen para permitir la integración aleatoria del cromosoma artificial en líneas celulares estables, sin afecto por la cromatina circundante.

En una realización específica, el vector usado según la invención se proporciona como unidad de expresión completa que contiene todos los elementos reguladores para proporcionar expresión de proteína estable. Por tanto, el vector usado según la invención se puede introducir dentro de la célula hospedadora independiente de la integración cromosómica.

Resulta que, por ejemplo, un vector basado en BAC usado según la invención ofrece una ventaja clara en comparación con un vector convencional. Proporciona mayores niveles de expresión, por ejemplo, al menos 10 veces, y está menos afectado por efectos indeseables de la cromatina, simplificando así el aislamiento de clones celulares sencillos que expresan altos niveles de la proteína de interés. Además, los vectores basados en los cromosomas artificiales pueden hacer uso de elementos reguladores endógenos, evitando así el silenciamiento de la expresión en cultivos a largo plazo.

El uso de vectores basados en los cromosomas artificiales según la invención, en particular los cromosomas artificiales pequeños, como cromosomas artificiales microbianos, por ejemplo, BAC, ofrece todas las ventajas de las estrategias de inserción. Además, esos vectores pueden estar integrados en el genoma hospedador con un alto número de copia, mientras que los vectores de inserción están integrados como 1 o dos copias como mucho. La expresión de los vectores es proporcional al número de copias integradas, por tanto un vector basado en cromosomas artificiales ofrece mayores niveles de expresión que una estrategia de inserción. Además, la generación de líneas celulares estables según la invención, en particular usando vectores basados en BAC, es un proceso simple y requiere menos tiempo que las estrategias de inserción. Como se mencionó anteriormente, la expresión del gen de interés que usa vectores convencionales está altamente sometida a efectos de cromatina indeseables. Para superar este problema, los vectores convencionales están flanqueados por secuencias de ADN cortas denominadas aisladores de cromatina. Hay una larga lista de elementos de ADN considerados aisladores de cromatina, por ejemplo, regiones control de locus, elementos de uniones a matriz, elementos antirepresores, elementos de cromatina ubicua, elementos límite, etc. (Wurm, F.M. *Nature Biotechnology* 22, 1.393-1.398 (2004)). Todos estos elementos se han usado en vectores convencionales con índices con éxito variables. Estos aisladores de cromatina son secuencias de ADN cortas usadas fuera de su contexto genómico real, proporcionando así un ambiente de cromatina verdadero.

Por otro lado, los vectores basados en cromosomas artificiales usados según la invención que contienen un locus particular (vg Rosa 26) son por definición una unidad de cromatina. Pueden contener la mayoría, si no todos los elementos reguladores de cromatina de un locus definido en el contexto genómico endógeno real. Por tanto, los vectores usados según la invención proporcionan una regulación de cromatina o ambiente mucho mejor que los vectores convencionales flanqueados solamente con aisladores de cromatina. Según una realización preferida, el método según la invención no hace uso de aisladores de cromatina.

La Figura 1A muestra una representación esquemática de las construcciones usadas para la producción de proteína. CAGGS Fc es un vector de expresión convencional que contiene un promotor CAGGS, un péptido señal seguido de la región Fc del gen de IgG1, un elemento indicador IRES-eYFP-SV40 poliA y un casete de PGK neomicina. La construcción Rosa26^{BAC} CAGGS Fc se generó recombinando el vector CAGGS Fc dentro de un BAC que contenía el locus Rosa26. El vector CAGGS Fc se colocó dentro del exón 2 del transcrito antisentido del locus Rosa26 con la secuencia en dirección 5' y dirección 3' de 100 kb.

La Figura 1B muestra una comparación de la eficacia en la producción de proteína entre un vector convencional y un vector basado en BAC. Se analizó la producción de Fc en cultivos voluminosos de HEK 293 (conjuntos celulares)

generados con los vectores CAGGS Fc y *Rosa26*^{BAC CAGGS Fc}. El vector CAGGS Fc dio una producción de 0,5 pg/célula/día, mientras que el vector basado en BAC dio una producción de 5,7 pg/célula/día. Las medidas se realizaron por triplicado. Las barras de error indican la desviación típica.

5 La Figura 1C muestra una correlación entre la producción de proteína y las copias de transgen de BAC integradas. El análisis de 12 clones sencillos mostró un intervalo de número de copia de 1 a 55 para el vector *Rosa26*^{BAC CAGGS Fc} con una producción de Fc de 5,5 a 30 pg/célula/día. La producción de proteína era directamente proporcional al número de copia de transgen de BAC.

10 La Figura 1D muestra que la producción de proteína se mantiene de manera estable durante el pase del cultivo. La producción de la proteína Fc se midió en el pase 1 y el pase 30 en 6 subclones aislados de los cultivos de *Rosa26*^{BAC CAGGS Fc}. No se encontraron diferencias obvias. Las barras de error indican la desviación típica.

La invención se describe además por medio de los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Expresión de Fc humano

15 Para ensayar la eficacia de los BAC en la producción de proteínas recombinantes, hemos generado dos vectores de expresión: El vector CAGGS Fc, el cual consiste en un promotor de CAGGS (Niwa, H., Yamamura, K. & Miyazaki, J. *Gene* 108, 193-199 (1991)), un péptido señal seguido del fragmento Fc (es decir, bisagra, C_H2 y C_H3) de IgG1 humano como gen de interés (Fc), un indicador de IRES/eYFP y un casete de PGK-neomicina. El segundo vector, *Rosa26*^{BAC CAGGS Fc}, consiste en el vector CAGGS Fc que se ha recombinado dentro de un esqueleto de BAC que contiene el locus de *Rosa26* (Figura 1A).

20 Las células HEK 293 se sometieron a transfección con los vectores CAGGS Fc y *Rosa26*^{BAC CAGGS Fc}. Después de 14 días de selección de G418, se establecieron dos cultivos voluminosos (conjuntos celulares) para los CAGGS Fc y *Rosa26*^{BAC CAGGS Fc}. El análisis de la producción de proteína Fc en los sobrenadantes mostró una producción de 0,5 y 5,7 pg/célula/día en el CAGGS Fc y los cultivos voluminosos (conjuntos celulares) de *Rosa26*^{BAC CAGGS Fc}, respectivamente (Figura 1B), demostrando que el uso de un vector basado en BAC mejora la producción de proteína sustancialmente.

25 A continuación, analizamos la correlación entre el número de copias de transgen y la producción de la proteína Fc. Los 12 subclones se establecieron a partir del cultivo de *Rosa26*^{BAC CAGGS Fc} que albergaba 1 a 55 copias del transgen. La producción de proteína en los sobrenadantes de estos cultivos se correlacionaron con los números de copia de transgen y oscilaban de 5,5 a 30 pg/célula/día (Figura 1C). El coeficiente de correlación R² entre el número de copia del vector BAC y la producción de proteína era de 0,88. Esto sugiere que la producción de proteína es proporcional al número de copias de transgen integradas cuando se usa un vector de expresión basado en BAC.

30 Finalmente, investigamos la producción de proteína a largo plazo con el tiempo y los números de pase crecientes. Se cultivaron 6 subclones del cultivo de *Rosa26*^{BAC CAGGS Fc} durante 30 pases y se analizó la producción de proteína. La producción de la proteína Fc no era significativamente decreciente desde el pase 1 al pase 30 (Figura 1D) indicando que los vectores basados en BAC proporcionan producción estable de la proteína recombinante con el tiempo.

35 En este trabajo, hemos usado un BAC que contenía el locus de *Rosa26* para proteger una unidad de expresión (el CAGGS Fc). Con este planteamiento, hemos mostrado que un vector basado en BAC produce mejores resultados que los vectores convencionales para la producción de proteína recombinante. Mejoras adicionales de los vectores basados en BAC para la producción de proteína recombinante pueden incluir el uso de promotores endógenos/naturales que son altamente activos en la célula productora. Por ejemplo, un perfil transcripcional de células HEK 293 ha identificado fuertes niveles de expresión del gen *Rp/23a* que codifica una proteína ribosómica. Por lo tanto, el uso de un BAC que contiene el locus de *Rp/23a* en las células HEK 293 puede mejorar más la producción de proteína recombinante.

Materiales y métodos

45 Plásmidos y cultivo celular

El vector de expresión de CAGGS Fc se montó mediante métodos de clonación convencionales y están flanqueados por dos sitios attB (sitios de reconocimiento de phiC31 integrasa). El vector *Rosa26*^{BAC CAGGS Fc} BAC se generó como se describió previamente (Blaas, L. Musteanu, M., Zenz, R., Eferl, R. & Casanova, E. *BioTechniques* 43, 659-660, 662, 664 (2007)). En resumen, el vector CAGGS Fc se recombinó dentro de un BAC que contenía el locus de *Rosa26* usando el intercambio de casete mediado por phiC311 en el exón 2 del transcrito antisentido de *Rosa26*.

50 Para establecer los cultivos voluminosos, se sometieron a linealización 24 µg de los vectores CAGGS Fc y *Rosa26*^{BAC CAGGS Fc} BAC con NotI y se sometieron a transfección dentro de HEK 293 usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Dos días después de la transfección, se añadió G418 (800 µg/ml) al medio (DMEM alta glucosa, FCS al 10 %, complementado con glutamina, piruvato y aminoácidos no esenciales). La selección se llevó a cabo durante

14 días. Después de eso, los cultivos se cultivaron en ausencia de G418 y la producción de proteína Fc en los cultivos voluminosos se midió 1 semana después.

La proteína Fc se podría aislar usando métodos cromatográficos.

Determinación de proteína Fc

- 5 Se sembraron 5×10^5 células dentro de cada pocillo sencillo de una placa de 6 pocillos en 2 ml de medio. 72 horas después de la siembra, se midió la concentración de proteína Fc en los sobrenadantes usando un ensayo ELISA. Para el ELISA, se adsorbió anti-fragmento F(ab')₂ (Fc específico) de IgG humano de cabra (Sigma I-3391) a 1 µg/ml sobre los micropocillos de una placa Maxisorp durante la noche a 4 °C, seguido de bloqueo con BSA al 5 % en PBS durante 1 h a 25 °C. Después del lavado, se añadieron las muestras y el patrón, respectivamente, en series de dilución a los micropocillos bloqueados y se incubaron durante 1 h a 25 °C. La placa se lavó y el Fc unido se detectó por Proteína A – HRP (SIGMA P-8651) diluido 1:70.000 en PBS/BSA seguido de tinción con solución de sustrato TMB (Sigma T0446). El ELISA se midió a 450 nm con la longitud de onda de referencia de 630 nm.
- 10

Análisis del número de copia de *Rosa26*^{BAC CAGGS Fc}

- 15 Se establecieron subclones estables a partir del cultivo de *Rosa26*^{BAC CAGGS Fc} usando la clasificación FACS de eYFP. El número de copias de transgen en los clones de célula sencilla se cuantificó mediante PCR en tiempo real con ADN genómico como plantilla. El *Rosa26* BAC se amplificó con oligos RosaF 5' TCTTGTCTTTTACCTCCCTTGTA (SEQ ID NO: 1) RosaR 5' GAACATATTCAAAACACCAGGATTT (SEQ ID NO: 2). Estos oligos reconocen el BAC y el locus de *Rosa26* endógeno. El locus de beta-actina se amplificó con oligos, actinaF 5' TCATGTTTGAGACCTTCAACACC (SEQ ID NO: 3) y actinaR 5' GATCTTCATGAGGTAGTCAGTCAGGT (SEQ ID NO: 4) como control interno.
- 20

REIVINDICACIONES

1. Método de producción de una proteína en una línea celular de producción eucariota, que comprende las etapas de
- 5 a) proporcionar un cromosoma artificial bacteriano (BAC),
- b) recombinar un promotor heterólogo y un ácido nucleico codificador de dicha proteína dentro de dicho BAC para generar un vector de expresión de BAC,
- c) integrar aleatoriamente dicho vector de expresión de BAC dentro del cromosoma de una línea celular hospedadora eucariota para obtener una línea celular de expresión eucariota,
- 10 d) cultivar dicha línea celular de expresión, que comprende al menos 5 copias de BAC integradas en la célula hospedadora, para producir dicha proteína, y
- e) aislar dicha proteína.
2. Método según la reivindicación 1, en donde dicha recombinación según la etapa b) se realiza usando técnicas de recombinación seleccionadas de recombinación homóloga o intercambio de casete mediado por integrasa.
- 15 3. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde hasta 500 copias de dicho vector están integradas en dicho cromosoma.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde se produce una proteína de secreción.
5. Método según la reivindicación 4, en donde dicha proteína de secreción incluye un péptido señal.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, en donde dicha proteína de secreción se selecciona del grupo que consiste en proteínas de suero, incluyendo inmunoglobulinas, fragmentos de inmunoglobulina o derivados, albúmina, factores sanguíneos, hormonas polipeptídicas, citoquinas, quimioquinas, enzimas y factores de crecimiento, y sus derivados.
- 20 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho vector contiene un elemento regulador para la formación de cromatina abierta.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho vector contiene un locus de mamífero.
- 25

Fig. 1A

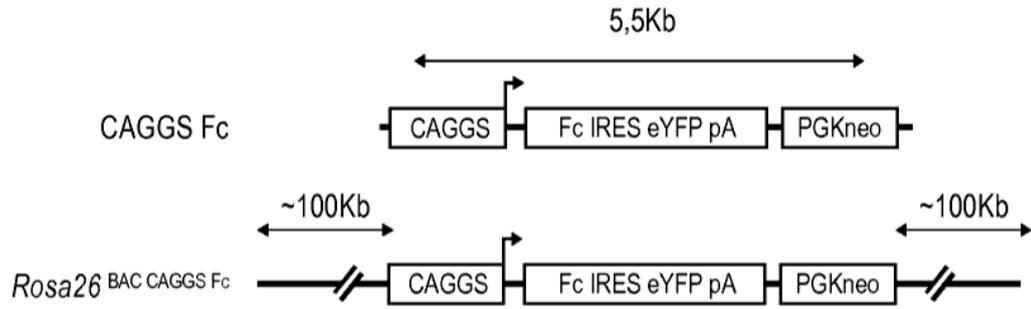


Fig. 1B

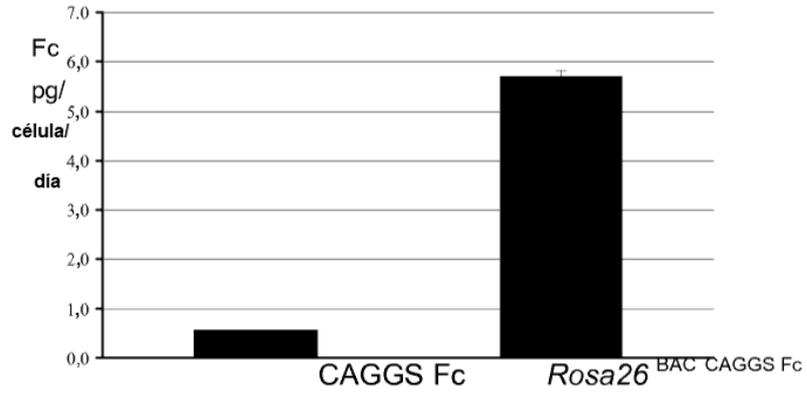


Fig. 1C

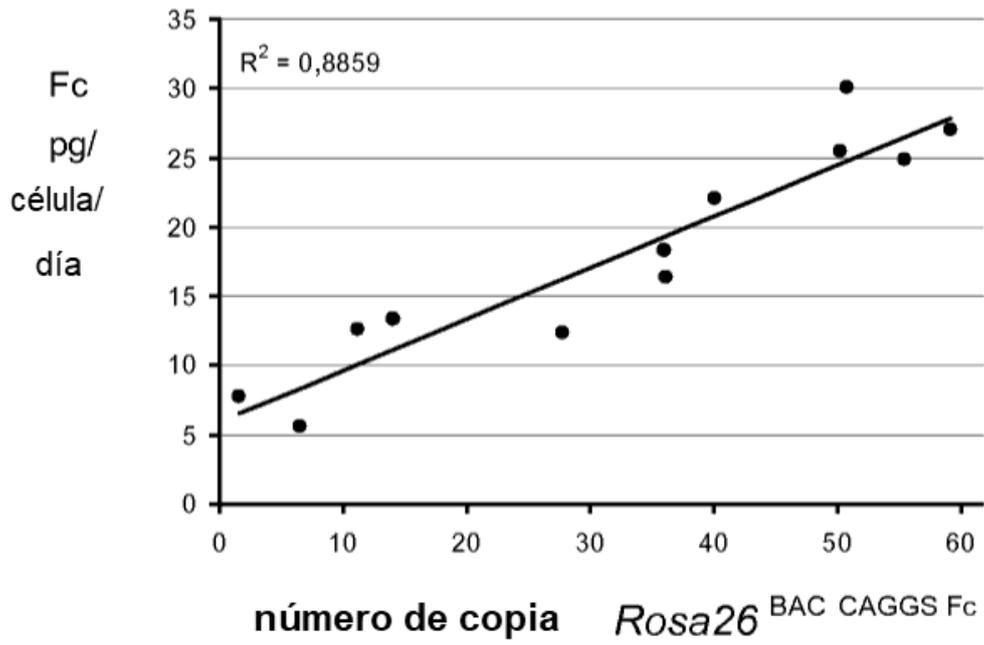


Fig. 1D

