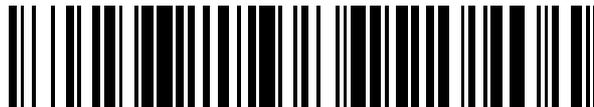


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 610**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**C12P 21/00** (2006.01)

**C12N 15/67** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2014 PCT/EP2014/066352**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015 WO15018703**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2014 E 14744580 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 3030656**

54 Título: **Medios y métodos para la generación de células productoras de mamífero para la producción de proteínas recombinantes**

30 Prioridad:

**06.08.2013 EP 13179342**

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

**05.02.2019**

73 Titular/es:

**LONZA BIOLOGICS PLC. (100.0%)  
228-230 Bath Road  
Slough SL1 4DX, GB**

72 Inventor/es:

**FEARY, MARC;  
RANCE, JAMES;  
YOUNG, ROBERT;  
SAYER, ELIZABETH C. y  
SMALES, CHRISTOPHER MARK**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 698 610 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

Medios y métodos para la generación de células productoras de mamífero para la producción de proteínas recombinantes

5 La presente invención se refiere a la generación de células de mamífero capaces de producir proteínas a una escala industrial y a medios y métodos para obtener y utilizar dichas células, en particular para la producción de proteínas.

La generación y síntesis de proteínas recombinantes para diversas aplicaciones y procedimientos son bien conocidas por el experto en la materia. Se utiliza una amplia diversidad de diferentes medios y métodos que aplican diversos mecanismos para proporcionar una fabricación a gran escala segura y eficiente de dichas proteínas. Estos mecanismos celulares pueden ejercer efectos en diferentes estadios del procedimiento de producción de proteínas, 10 por ejemplo en el nivel transcripcional, traduccional o post-traduccional. Un mecanismo identificado hace relativamente poco tiempo por el que se controla la traducción, y por lo tanto la expresión génica, es la expresión de ARNm (abreviatura para microARN, en lo sucesivo también denominado miR). Son ARN no codificantes monocatenarios endógenos de aproximadamente 22 nucleótidos (nt) de longitud que generalmente actúan como reguladores negativos de la expresión génica mediante interacciones ARN:ARN entre el miR y la UTR 3' de los ARNm diana. Se ha demostrado que los miR desempeñan importantes funciones reguladoras en la traducción del ARNm y que participan 15 en el control del desarrollo celular, diferenciación, apoptosis, defensa antiviral y en la mayoría de procesos celulares fundamentales. En efecto se ha sugerido que los miR podrían regular la expresión de aproximadamente 30% del genoma humano: los miR influyen y regulan las tasas de traducción del ARNm mediante la interacción con ARNm celulares diana específicos, principalmente en el UTR 3'. Además, un miR puede presentar como diana e interactuar con múltiples ARNm diana y, por lo tanto, determinar los motivos y dianas de localización de miR actualmente resulta difícil. 20

Hasta la fecha, la mayoría de investigaciones sobre la expresión de miR y su control de la expresión génica se han llevado a cabo en el campo de la oncología, aunque gran parte de este conocimiento es relevante para el campo de la biotecnología industrial en el aspecto de cómo estos miR constituyen la base del fenotipo celular. Por ejemplo, 25 estudios en el campo del cáncer que demuestran la relación entre el crecimiento celular y los miR podrían ser aplicables al campo biotecnológico. El amplio abanico de dianas potenciales que pueden regular los miR ofrece el potencial de desarrollar líneas celulares con nuevos fenotipos manipulando la expresión génica mediante ingeniería de los miR. De esta manera, se ha observado que la manipulación de un único miR podría regular múltiples genes que juntos desempeñan un papel en la determinación del fenotipo celular.

30 Parte de la ruta de biogénesis de los miR es compartida con la ruta de silenciamiento de los ARN interfirientes pequeños (ARNip), que incluyen Dicer y complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés) (Bartel et al. Cell 116:281-297, 2004). Se ha informado de que el 70% de los genes de miR se encuentra dentro de intrones o exones de genes, mientras que el 30% restante se localiza dentro de regiones intergénicas. Inicialmente, el miR primario (pri-miR) es cortado por la endonucleasa ARNasa II Drosha y Pasha formando una estructura de tallo- 35 bucle denominada pre-ARNmi (pre-miR). Este pre-miR presenta una longitud de aproximadamente 60 a 70 nucleótidos, un fosfato 5' y un extremo protuberante de 2 nucleótidos en 3'. Junto con el cofactor de transporte Ran-GTP, la horquilla pre-miR es transportada activamente desde el núcleo mediante el receptor exportina-5. En el citoplasma, se cree que una endonucleasa ARNasa III denominada Dicer interactúa con el pre-miR mediante el reconocimiento de la parte bicatenaria y corta en una posición aproximadamente a dos giros de hélice de la base del tallo-bucle, dejando un dúplex miR:miR\* (el brazo opuesto del pre-miR se indica mediante un asterisco después del nombre miR). Este dúplex miR:miR\* entra en RISC y se desprende el componente miR\* del dúplex miR:miR\* y es degradado mediante la ayuda de una helicasa. El extremo 5' del miR maduro se encuentra en el extremo de una 40 cadena del dúplex miR-miR\* con la energía termodinámica más baja (Bartel et al., Cell 116:281-297, 2004).

Los primeros uno a siete nucleótidos en el extremo 5' del miR se unen a la diana mediante apareamiento de bases y se denominan región semilla. En las células de mamífero, los miR habitualmente reconocen genes diana mediante un apareamiento de bases imperfecto con el ARNm, en donde sólo la región semilla del miR muestra una correspondencia perfecta con la diana. También se ha informado de que los sitios de unión de miR existen en localizaciones diferentes al extremo 3' del ARN, tales como la región 5' no traducida (UTR, por sus siglas en inglés) del ARNm de proteína ribosómica (Ør-om et al., Molecular Cell 30:460-471, 2008) o incluso secuencias reguladoras genómicas, tales como 50 promotores (p.ej., Tan et al., BMC Molecular Biology 10:12, 2009). También existen informes de que los miR pueden interactuar con los ARNm en la secuencia codificante (Rigoutsos et al., Cancer Research 69:3245-3248, 2009). Sin embargo, existe menos información sobre las interacciones que no implican UTR 3' y la mayoría de dianas miR se encuentran situadas en regiones 3' no traducidas del ARNm (UTR 3'). Generalmente, si el apareamiento de bases entre el miR y el ARNm diana es incompleto, se produce una inhibición de la traducción, mientras que donde se produce un apareamiento de bases completo con el ARN diana, se produce degradación. 55

A pesar de la utilización potencial de los miR para regular la expresión génica y, por lo tanto, rutas y procesos celulares que influyen sobre una productividad elevada de proteína recombinante, hasta la fecha no se ha conseguido totalmente la manipulación de miR para mejorar la producción de proteínas recombinantes a partir de células de mamífero en cultivo. La concentración de proteína recombinante secretada al medio de cultivo es una función de la tasa de 60 producción específica celular (qP) y la integral respecto al tiempo de concentración de células viables (CCV) (Porter

et al., *Biotechnology Progress* 26:1446-1455, 2010). Por lo tanto, los miR pudieron aplicarse a rutas para incrementar qP (p.ej., mediante la manipulación de rutas secretorias) o CCV (p.ej., mediante la manipulación de rutas proliferativas o apoptóticas). La mayoría de estudios sobre la expresión y manipulación de miR en el campo del bioprocesamiento/biotecnología se han centrado en diferentes linajes de células de ovario de hámster chino (CHO). Sin embargo, un estudio que ha perfilado los miR en células embrionarias de riñón humano 293 (HEK293) (con frecuencia utilizados para la producción transitoria de proteína recombinante), ha seguido cómo cambia el perfil de expresión de miR durante diferentes etapas de crecimiento en cultivo por lotes (Koh et al., *Journal of Biotechnology* 140:149-155, 2009). Estos autores han informado de que 14 miR cambiaron significativamente en su expresión entre las etapas de crecimiento exponencial y estacionaria, en donde 13 se encontraban reguladas positivamente en la etapa estacionaria. Entre aquellos miR que se había observado que cambiaban entre la etapa exponencial y la etapa estacionaria se encontraban miR-15a y miR-16 (Koh et al., *Journal of Biotechnology* 140:149-155, 2009).

Recientemente, la expresión de miR de células CHO y la manipulación de los miR en las células CHO ha despertado mucho interés, aunque tales estudios se encuentran todavía en sus inicios. Un estudio reciente ha utilizado un enfoque de secuenciación profunda para perfilar miR conservados y su expresión en diferentes líneas celulares recombinantes (Hammond et al., *Biotechnology and Bioengineering* 109:1371-1375, 2012). Este estudio ha investigado un anfitrión CHO-K1, líneas celulares derivadas de CHO-K1 con fosfatasa alcalina secretada (SEAP) y expresantes de proteína activadora del plasminógeno tisular (tPA) y ha encontrado 173 miR conservados de los que 136 se expresaban diferencialmente en la línea celular recombinante SEAP o tPa y 75 en ambas en comparación con el anfitrión. De aquellos identificados como expresados diferencialmente se incluyen miR-15a, miR-15b y miR-34c (Hammond et al., *Biotechnology and Bioengineering* 109:1371-1375, 2012). Otro estudio informa de que la expresión de mmu-miR-446h influye sobre la apoptosis en células CHO (Druz et al., *Biotechnology and Bioengineering* 108:1651-1661, 2011). Un estudio en CHO informado por Johnson et al. (2011) identificó 350 miR mediante alineación con miR conocidos de la base de datos miRBase (Johnson et al., *Biotechnology and Bioengineering* 108:475-480, 2011). Este estudio demostró (i) que prácticamente la totalidad de los miR maduros en las líneas celulares CHO investigadas eran altamente homólogos respecto a sus contrapartidas humanas o de ratón, y (ii) que la expresión de muchos de los miR cambiaba en respuesta a pequeñas perturbaciones ambientales. Este estudio también informaba de que el miR de hámster cgr-let-7f es el miR más abundante en las células CHO y que sus niveles son comparables bajo todas las condiciones investigadas.

Se informó de un enfoque de secuenciación similar en Hackl et al. (Hackl et al., *Journal of Biotechnology* 153:62-75, 2011) para identificar y anotar miR tanto conservados como nuevos en células CHO. En el momento del estudio, los autores no disponían de acceso a un genoma de CHO anotado. Por el contrario, los patrones de alineación de las lecturas y las proporciones de recuento de lecturas de los miR maduros 5' y 3' se obtuvieron y se utilizaron para una clasificación independiente de las parejas miR/miR\* y miR 5p/3p y la discriminación de miR respecto de otros ARN no codificantes, dando como resultado la anotación de 387 miR de CHO maduras. El estudio incluía una comparación entre las condiciones con suero vs sin suero y líneas celulares recombinantes anfitrionas vs derivadas. En la comparación entre líneas celulares anfitrionas vs derivadas recombinantes informaron de una expresión diferente de miR-16b (Hackl et al., *Journal of Biotechnology* 153:62-75, 2011). El mismo grupo informó además de la expresión de miR en cultivos de células CHO-K1 en suspensión en diferentes etapas del cultivo discontinuo e informan de que más de 100 miR se regulaban de manera diferente en el cultivo discontinuo (Hernández-Bort et al., *Biotechnology Journal* 7:500-515, 2012). En otro estudio, Lin et al. (2011) investigaron los niveles de miR en las células CHO anfitrionas DG44 y en una línea celular derivada productora de IgG, e informaron de que miR-221 y miR-22 se encontraban regulados negativamente en las líneas celulares recombinantes productoras de IgG. Sin embargo, no existía relación entre la concentración de IgG secretada al medio de cultivo y la expresión de estos miR. En la línea celular DG44 parental, la expresión de miR-15b también era significativamente más baja que en una línea celular derivada productora de una proteína recombinante (Lin et al., *Biotechnology Progress* 27:1163-1171, 2011).

Uno de los primeros informes sobre la expresión de miR en las células CHO fue el de Gammell et al. (Gammell et al., *Journal of Biotechnology* 130:213-218, 2007). El enfoque adoptado por los autores fue utilizar una micromatriz no de hámster e investigar la expresión de miR al variar la temperatura. Los datos resultantes demostraron que miR-21 y miR-24 se encontraban regulados positivamente en las líneas celulares CHO-K1 con inhibición del crecimiento, inducido por una variación de la temperatura o durante el cultivo discontinuo normal (documento n° US 2010/0190258 A1). Posteriormente, este grupo informó de que la reducción de la temperatura de 37°C a 28-33°C conducía a niveles incrementados de miR-219, miR-518d, miR-126, miR-30e, miR-489 y miR-345, medidos tras 24 h, mientras que miR-7, miR-320, miR-101 y miR-199 resultaban regulados negativamente (Barron et al., *Journal of Biotechnology* 151:204-211, 2011). La sobreexpresión exógena con éxito de miR-7 dio como resultado un bloqueo de la proliferación celular y una producción incrementada de proteína recombinante normalizada (por célula) a 37°C, aunque el rendimiento todavía era más bajo que el de las células a temperatura reducida.

El impacto de la manipulación de miR con frecuencia se investiga utilizando genes informadores y vectores esponja (Ebert et al., *Nature Methods* 4:721-726, 2007). Para demostrar la influencia de los miR sobre fenotipos industrialmente relevantes resulta necesario validarlos mediante la reducción o el incremento de la expresión del miR en cuestión. Jadhav et al. (Jadhav et al. *Biotechnology and Bioengineering* 109:1376-1385, 2012) recientemente han informado de que el análisis funcional de los miR en las células CHO puede demostrarse con éxito utilizando una línea celular CHO productora de EPO-FC recombinante y una transfección transitoria durante un periodo de cuatro días.

La producción comercial de proteína recombinante con frecuencia requiere procedimientos de fabricación a gran escala. A pesar de los recientes avances en procedimientos industriales, la producción de proteína recombinante sigue siendo una tarea complicada. Por lo tanto, todavía existe la necesidad de proporcionar medios y métodos mejorados adicionales para la producción de proteínas de un modo más eficiente y optimizado.

5 La presente invención se basa, entre otros factores, en el problema técnico de proporcionar medios y métodos mejorados o adicionales para la producción a escala industrial de proteínas.

La presente invención resuelve su problema técnico mediante la provisión de las enseñanzas contenidas en las reivindicaciones independientes.

10 En particular, la presente invención resuelve su problema técnico mediante la provisión de un método para la producción de una proteína de interés en una célula productora de mamífero, que comprende las etapas de procedimiento siguientes:

a) proporcionar una célula productora de mamífero,

15 b) incrementar la concentración de al menos un miR seleccionado del grupo que consiste en miR-15, miR-16 y miR-34 en la célula productora de mamífero proporcionada en la etapa a) de manera que se obtiene una célula productora de mamífero modificada genéticamente para la producción de proteína,

c) cultivar la célula productora de mamífero modificada genéticamente para la producción de proteína, bajo condiciones adecuadas para la producción de la proteína de interés, y

d) recuperar la proteína de interés producida en la etapa c).

20 De esta manera, la presente invención incrementa la concentración, es decir, eleva la cantidad, en particular la cantidad intracelular, de los miR identificados en una célula productora de mamífero, para proporcionar una producción incrementada de la proteína de interés.

En el contexto de la presente invención, el término concentración se entiende que también significa 'nivel'.

25 En el contexto de la presente invención, una concentración incrementada de un miR es una concentración más elevada de dicho miR en comparación con la concentración de dicho miR en la célula productora de mamífero proporcionada en la etapa a). La concentración de miR puede determinarse mediante métodos convencionales a fin de determinar las cantidades de miR en una célula, por ejemplo mediante análisis de qRT-PCR. Las mediciones de control apropiadas y la fijación de estándares apropiados son conocidos por el experto en la materia.

30 En el contexto de la presente invención, una producción incrementada de la proteína de interés pretende referirse a una tasa de producción específica (qP) más alta de la proteína de interés, en particular de la proteína recombinante de interés en la célula y/o a una integral respecto al tiempo más alta de la concentración de células viables (CCV). La producción o productividad de proteína recombinante, definida como la concentración de dicha proteína en el medio de cultivo, es una función de estos dos parámetros (qP y CCV), calculados según Porter et al. (Porter et al. *Biotechnology Progress* 26:1446-1455, 2010).

35 Los métodos de medición de una producción incrementada de proteína son bien conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, puede determinarse un incremento en la producción de proteína recombinante a escala pequeña mediante la medición del título en medio de cultivo de tejidos mediante ELISA (Smales et al., *Biotechnology Bioengineering* 88:474-488, 2004). También puede determinarse cuantitativamente mediante el instrumento ForteBio Octet, por ejemplo para la determinación de alto rendimiento de la concentración de anticuerpo monoclonal (mAb) recombinante en el medio (Mason et al., *Biotechnology Progress* 28:846-855, 2012) o a una escala más grande mediante HPLC de proteína A (Stansfield et al., *Biotechnology Bioengineering* 97:410-424, 2007). Métodos para el recuento de células incluyen, aunque sin limitarse a ellos, un método de exclusión de azul tripán seguido del recuento utilizando un hemocitómetro o Vi-CELLI (Beckman-Coulter).

45 Dicha producción incrementada de la proteína de interés puede deberse, en una realización, a una tasa de producción de proteína (qP) específica incrementada de las células como resultado de una mayor concentración intracelular de al menos un miR obtenido en la etapa b) del presente procedimiento. En una realización, dicha producción de proteína incrementada puede deberse, alternativa o adicionalmente, a un crecimiento celular incrementado, en particular una CCV más alta como resultado de la mayor concentración de al menos un miR obtenido en la etapa b) del presente procedimiento. De esta manera, la presente invención resulta particularmente útil para el crecimiento y la utilización de células productoras de mamífero, en particular líneas celulares, las cuales se utilizan en la generación de proteínas, en particular proteínas recombinantes.

50 Según la presente invención, la etapa a) del presente método requiere la provisión de una célula productora de mamífero, es decir, una célula que es capaz de producir una proteína de interés, en particular una proteína recombinante de interés, y que es capaz de someterse a las etapas b) y c) del presente método.

En una realización preferente de la presente invención, la proteína de interés es una proteína endógena de la línea de

células productoras.

5 En una realización preferente adicional, la proteína de interés es exógena a la célula productora. Ello significa que la proteína de interés no se encuentra presente normalmente en la célula productora. De esta manera, una secuencia de nucleótidos codificante de la proteína de interés debe introducirse, en particular transfectarse, en la célula productora mediante métodos conocidos por el experto en la materia, preferentemente tal como se menciona posteriormente.

10 En una realización particularmente preferente de la presente invención, una secuencia de nucleótidos codificante de la proteína de interés se transfecta antes de la etapa a) del presente método. Ello significa que la proteína exógena de interés ya se encuentre presente en la célula productora proporcionada. Preferentemente, la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína de interés se encuentra presente en un vector o se encuentra establemente integrada en el genoma de la célula productora.

15 Según la presente invención, la etapa b) del presente método requiere el incremento de la concentración de al menos uno de dichos miR en comparación con el nivel de dicho miR presente en la célula productora de mamífero antes de llevar a cabo la etapa b), de manera que se obtiene una célula productora de mamífero manipulada (construida), en lo sucesivo también denominada "célula productora de mamífero modificada genéticamente para la producción de proteína". Dicha célula productora de mamífero modificada genéticamente para la producción de proteína seguidamente se cultiva en la etapa c) bajo condiciones adecuadas para la producción de la proteína de interés, en la que durante dicho cultivo se produce dicha proteína de interés y puede recuperarse, en particular puede separarse del medio de cultivo y de la célula.

20 En una realización particularmente preferente adicional, una secuencia de nucleótidos codificante de la proteína de interés se transfecta en la célula productora simultáneamente con al menos un miR durante la etapa b) del presente procedimiento. De esta manera, en esta realización, no sólo se encuentra incrementada la concentración de al menos un miR sino también la concentración de la proteína de interés. También en esta realización, la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína de interés puede encontrarse en un vector separado o encontrarse integrada establemente en el genoma de la célula productora de mamífero modificada genéticamente para la producción de proteína obtenida.

25 En una realización particularmente preferente todavía adicional, una secuencia de nucleótidos codificante de la proteína de interés se transfecta en la célula productora de mamífero modificada genéticamente para la producción de proteína, es decir, después de la etapa b), aunque antes de la etapa c) del presente procedimiento.

30 En una realización particularmente preferente, el cultivo celular se lleva a cabo como cultivo discontinuo, cultivo alimentado por lotes o cultivo continuo. Resulta adicionalmente preferente llevar a cabo el cultivo celular como cultivo en suspensión. Preferiblemente, un medio de cultivo celular convencional se utiliza en la etapa b).

35 En una realización preferente, la etapa b) de la presente invención se lleva a cabo en un medio de cultivo celular convencional, preferentemente un medio de cultivo celular tal como el utilizado en la etapa c). En otra realización de la presente invención, la etapa b) se lleva a cabo en un medio de transfección, en particular un medio adecuado para transfectar miR o vectores que comprenden secuencias de nucleótidos codificantes de miR, y posiblemente la proteína de interés, en la célula productora de mamífero.

Los métodos adecuados de cultivo y recuperación son conocidos por el experto en la materia y pueden depender de la proteína de interés y de la célula productora de mamífero utilizada.

40 La presente descripción se refiere a proporcionar un método para la preparación de una célula productora de mamífero modificada genéticamente para la producción de proteína capaz de expresar una proteína de interés, que comprende las etapas de procedimiento siguientes:

x) proporcionar una célula productora de mamífero,

45 y) incrementar la concentración de al menos un miR seleccionado del grupo que consiste en miR-15, miR-16 y miR-34 en la célula productora de mamífero proporcionada en la etapa x) de manera que se obtiene una célula productora de mamífero modificada genéticamente para la producción de proteína,

z) recuperar la célula productora de mamífero modificada genéticamente para la producción de proteína producida en la etapa y).

50 El presente método para la preparación de una célula productora de mamífero modificada genéticamente para la producción de proteína, de esta manera, permite la producción de una célula productora de mamífero manipulada que preferiblemente es capaz de una tasa específica incrementada de producción de proteína y/o que es capaz de un crecimiento celular mejorado, en particular incrementado, es decir, una integral respecto al tiempo más elevada de concentración de células viables (CCV).

miR-15b y miR-16 son ambos miR inductores de apoptosis, con diana en ARNm codificante de proteínas

- antiapoptóticas tales como Bcl2. Algunos otros genes también se ha encontrado que son dianas para estos miR. Por ejemplo, también se ha informado de que miR-16 regula la ciclina-D1, la ciclina-D3, la ciclina-E1 y CDK6, provocando la parada de las células en la etapa G0/G1 del ciclo celular. miR-21 es otro miR inductor de apoptosis que bloquea la proliferación celular e induce la muerte celular. miR-21, al igual que miR-15 y miR-16, con diana en ARNm de Bcl2.
- 5 miR-34c participa en la proliferación celular, principalmente en la apoptosis mediada por p53, convirtiéndolo en una diana clave en el diagnóstico y terapia del cáncer. miR-34 es un supresor tumoral, que realiza su acción utilizando como diana Notch, HMGA2, el regulador de información silencioso 1 (SIRT1), así como Bcl-2 y otros genes asociados a la formación y/o desarrollo tumoral.
- De esta manera, la presente invención proporciona de una manera ventajosa medios y métodos para potenciar la producción de proteína, en particular para permitir la producción a gran escala de una proteína de interés en una célula productora de mamífero. La exposición se refiere además a células productoras de mamífero mejoradas, es decir, células productoras de mamífero manipuladas, las cuales se manipulan de manera que permitan una producción de proteína mejorada, en particular incrementada, y/o un crecimiento celular mejorado, en particular incrementado.
- 10 En el contexto de la presente invención, la expresión "proteína de interés" pretende referirse a un oligopéptido o polipéptido en forma glucosilada, parcialmente glucosilada o no glucosilada.
- La expresión "proteína de interés" tal como se utiliza en la presente memoria en forma singular también se refiere en una realización a al menos una proteína de interés, en particular polipéptidos de interés, es decir, entre otros, dos, tres o más proteínas de interés diferentes. En una realización de la presente invención, la expresión "proteína de interés" se refiere a una proteína específica la producción de la cual está incrementada, preferiblemente que está incrementada específicamente, en particular meramente la producción de esta proteína específica está incrementada. En una realización particular y preferente, dicha proteína de interés, en particular la secuencia de nucleótidos codificante de la misma, puede ser una proteína endógena o exógena con respecto a la célula productora de mamífero, es decir, la célula anfitriona de mamífero. En el caso de que la línea celular productora comprenda una proteína de interés exógena, se denomina transgénica.
- 20 En el contexto de la presente invención, el término proteína "endógena" se refiere a una proteína que ya está presente o está codificada en el genoma de la línea celular productora de mamífero y, por lo tanto, que no se origina en el exterior de dicha línea celular.
- En el contexto de la presente invención, el término proteína "exógena" se refiere a una proteína que está presente en dicha célula productora de mamífero debido a métodos de tecnología de recombinación genética, por ejemplo métodos convencionales de ingeniería genética, preferentemente mediante transformación, electroporación o transfección de una secuencia de nucleótidos codificante de dicha proteína exógena, en la que dicha secuencia de nucleótidos exógena no se encontraba presente, previamente a dicha etapa de ingeniería genética, en dicha célula productora de mamífero.
- 30 La proteína de interés puede ser una proteína de ingeniería genética, en particular una proteína recombinante. En particular, la proteína puede ser un biofarmacéutico.
- En particular, la proteína puede ser una proteína de mamífero, bacteriana, vírica o vegetal. Preferiblemente, la proteína es una proteína humana o humanizada.
- En el contexto de la presente invención, la expresión "célula productora de mamífero" pretende referirse a una célula de mamífero, en particular a una célula anfitriona de mamífero, capaz de producir una proteína de interés, en particular a una célula anfitriona de mamífero capaz de producir una proteína de interés y capaz de someterse a las etapas de procedimiento b) y c) de los presentes métodos.
- 40 En el contexto de la presente invención, la expresión "una célula productora de mamífero modificada genéticamente para la producción de proteína" pretende referirse a una célula productora de mamífero manipulada que es el resultado de haber incrementado la concentración de al menos un miR seleccionado del grupo que consiste en miR-15, miR-16, miR-34 en la célula productora de mamífero proporcionada y que, por lo tanto, se caracteriza por una concentración incrementada de dicho al menos un miR, en particular dos de dichos miR, preferiblemente tres de dichos miR en comparación con la célula productora de mamífero proporcionada en la etapa a). La presente "célula productora de mamífero modificada genéticamente para la producción de proteína" se caracteriza en una realización preferente por una producción de proteína incrementada, en una realización por una qP o CCV incrementada y en una realización, por ambas características.
- 45 En una realización preferente de la presente invención, la "célula productora de mamífero modificada genéticamente para la producción de proteína" es una célula que muestra una qP incrementada o una CCV incrementada o ambas.
- En una realización preferente, el miR-15 es miR-15a o miR-15b.
- En una realización preferente, el miR-16 es miR-16-1 o miR-16-2.
- 55 En una realización preferente, el miR-34 es miR-34a, miR-34b o miR-34c.

En una realización preferente, la concentración de al menos un miR se incrementa mediante transfección de la célula productora de mamífero en la etapa b) con al menos un miR seleccionado del grupo que consiste en miR-15, miR-16 y miR-34.

5 De esta manera, en una realización preferente, las células productoras de mamífero se transfectan con al menos un miR o pre-miR, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente tres miR o pre-miR tal como se identifican en la presente memoria, de manera que se obtiene una concentración incrementada de los mismos. En una realización preferente, las células productoras se transfectan transitoriamente con al menos un vector codificante de pre-miR, mientras que, en otra realización preferente, se construyen líneas celulares que expresan establemente al menos un pre-miR, es decir, las células productoras manipuladas de producción de proteína contienen la secuencia de  
10 nucleótidos de al menos un pre-miR integrado establemente en su genoma.

En una realización preferente, la concentración de al menos un miR se incrementa mediante transfección de la célula productora de mamífero en la etapa b) con al menos un vector que contiene una secuencia de nucleótidos codificante de al menos un miR bajo el control de al menos un elemento regulador que permite la sobreexpresión de al menos un miR, donde el al menos un miR se selecciona del grupo que consiste en miR-15, miR-16 y miR-34.

15 En una realización preferente, el vector que contiene la secuencia de nucleótidos codificante de al menos uno de los miR es un vector de expresión.

De esta manera, en una realización preferente, las células productoras de mamífero se transfectan con al menos uno de los presentes vectores, permitiendo en las células transfectadas la sobreexpresión de al menos un miR, preferiblemente al menos dos, lo más preferiblemente tres, miR tal como se identifican en la presente memoria, de  
20 manera que se obtiene una concentración incrementada de los mismos. En una realización preferente de la presente invención, se incrementa transitoriamente la concentración. En otra realización preferente de la presente invención, se incrementa establemente la concentración.

Un elemento regulador que permite la sobreexpresión de al menos un miR puede ser un promotor o cualquier otro elemento promotor de la expresión o potenciador de la expresión, tal como un intensificador. En una realización  
25 preferente, el elemento regulador que permite la sobreexpresión de al menos un miR es un promotor, preferiblemente un promotor de mamífero o vírico.

En una realización particularmente preferente, el promotor puede ser un promotor constitutivo o inducible, por ejemplo un promotor inducible por la temperatura.

30 En una realización preferente, el vector o vectores utilizados en la etapa b) se transfectan transitoria o establemente en la célula productora de mamífero.

En una realización preferente, se transfectan preferiblemente i) miR-15 y miR-16, o ii) miR-15 y miR-34, o iii) miR-16 y miR-34, preferiblemente los tres miR o secuencias de nucleótidos codificantes de al menos dos, preferiblemente tres, de los miR.

35 En una realización preferente, al menos dos secuencias de nucleótidos codificantes de miR pueden transfectarse en el mismo vector. En otra realización, la cotransfección de al menos dos secuencias de nucleótidos codificantes de miR se lleva a cabo con cada miR individual codificado en vectores separados. Además, en el caso de que la proteína de interés se transfecte junto con al menos un miR, puede estar codificada en el mismo vector o en un vector separado.

40 La transfección de la secuencia de nucleótidos codificante de al menos un miR o de al menos un miR puede conseguirse utilizando métodos convencionales bien conocidos por el experto en la materia. Dichos métodos pueden ser preferiblemente la transfección con lipofectamina, la electroporación, la transfección mediada por liposomas, la transfección mediada por fosfato de calcio, la transfección mediada por virus o la transferencia génica directa, p.ej. el bombardeo de partículas.

45 En una realización preferente de la presente invención, la secuencia de nucleótidos codificante de al menos un miR, preferiblemente de al menos un pre-miR bajo el control de al menos un elemento regulador que permite la sobreexpresión de al menos un miR, se encuentra transitoria o establemente contenida en la célula productora de mamífero.

En una realización preferente, el miR es un miR maduro, un miR precursor (pre-miR) o un miR primario (pri-miR). El miR maduro preferiblemente es sintetizado por la célula o es un oligonucleótido de síntesis química añadido exógenamente.

50 En una realización preferente, la célula productora de mamífero es preferiblemente una célula de roedor, una célula de hámster, una célula de ratón o una célula humana, una célula Y0, una célula COS, una célula sp2/0, una célula CHO, una célula CHO-K1 o una célula CHO-K1SV, una célula CHO DG44, una célula CHO DUXB11, una célula CHO GS con desactivación génica, una célula CHO FUT8 G2 con desactivación génica, una célula NS0, una célula PERC6, una célula HEK293, una célula HT1080 o una célula BHK. La célula productora de mamífero también puede ser una  
55 célula renal de hámster neonato (BHK, por sus siglas en inglés). La célula productora también puede ser una célula

no de mamífero, p.ej. una célula de insecto, etc., preferiblemente la célula productora es una célula no humana.

En una realización preferente, la célula productora de mamífero es una célula CHO, una célula NS0, una célula PERC6, una célula HT1080 o una célula renal de hámster neonato (BHK). En una realización preferente, la célula CHO se selecciona del grupo que consiste en una célula CHO-K1, una célula CHO-K1SV, una célula CHO DG44, una célula CHO DUXB11, una célula CHO GS con desactivación génica y una célula CHO FUT8 GS con desactivación génica.

La célula CHO GS con desactivación génica preferiblemente es una célula CHO-K1SV GS con desactivación génica, preferiblemente GS Xceed™ de Lonza. La célula CHO FUT8 con desactivación génica preferiblemente es la CHOK1SV Potelligent® de Lonza.

En el contexto de la presente invención, el término "célula" pretende referirse a una célula individual. El término "célula" también pretende referirse a una línea celular, preferiblemente una línea celular inmortalizada, que puede comprender un grupo de células.

La presente invención resuelve su problema técnico proporcionando además una "célula productora de mamífero modificada genéticamente para la producción de proteína" producida según cualquiera de los métodos de la presente invención.

La presente descripción se refiere en particular a una célula "productora de mamífero modificada genéticamente para la producción de proteína" que comprende al menos una secuencia de ácidos nucleicos transgénica codificante de al menos un miR, donde dicha secuencia de ácidos nucleicos transgénica se incorpora transitoria o establemente en el genoma de dicha célula, bajo el control de al menos un elemento regulador que permite la sobreexpresión de dicho al menos un miR, donde el al menos un miR se selecciona del grupo que consiste en miR-15, miR-16 y miR-34.

La presente descripción se refiere en particular a un kit para la producción de la proteína de interés en una célula productora de mamífero, que comprende al menos una célula productora de mamífero, al menos un vector que contiene una secuencia de nucleótidos codificante de al menos un miR bajo el control de al menos un elemento regulador que permite la sobreexpresión de al menos un miR, donde el miR se selecciona del grupo que consiste en miR-15, miR-16, miR-34 y medios para transfectar la célula o células con al menos un vector.

El kit comprende además un segundo vector que comprende una secuencia de nucleótidos codificante de una proteína de interés.

Otras realizaciones preferentes son la materia objeto de las sub-reivindicaciones.

A continuación, se explica en mayor detalle la presente invención mediante ejemplos no limitativos y las figuras adjuntas.

Las figuras muestran:

Figura 1. Curva de crecimiento discontinuo de dos líneas celulares GS-CHOK1SV recombinantes que expresan el mAb cB72.3 cultivado en medio CD-CHO (■ = línea celular CHO 42 productora 'elevada' con un título de mAb de  $550 \pm 4$  mg/l tras completarse el cultivo discontinuo en matraz de agitación,  $\Delta$  = línea celular CHO 114 productora 'baja', con un título de mAb de  $313 \pm 64$  mg/l tras completarse el cultivo discontinuo en matraz de agitación). Se extrajeron muestras durante todo el cultivo discontinuo en los tiempos señalados mediante flechas para la extracción del material de miR de los pellets celulares para el análisis de qRT-PCR.

Figura 2. Perfil de pre-miR-15b (A) y miR-15b maduro (B) durante todo el cultivo discontinuo de las líneas celulares GS-CHOK1SV de 'alta' producción CHO 42 (■) y de 'baja' producción CHO 114 (□) de anticuerpo cB72.3. Barras de error =  $\pm$  SD (n=3).

Figura 3. Perfil de (A) pre-miR-16-1, (B) pre-miR-16-2 y (C) miR-16 maduro durante la totalidad del cultivo discontinuo de líneas celulares GS-CHOK1SV productoras de mAb cB72.3 CHO 42 (■) y CHO 114 (□). Barras de error =  $\pm$  SD (n=3).

Figura 4. Perfil de (A) pre-miR-21 y (B) miR-21 maduro durante la totalidad del cultivo discontinuo de las líneas celulares GS-CHOK1SV de 'alta' producción CHO 42 (■) y de 'baja' producción CHO 114 (□) de anticuerpo cB72.3. Barras de error =  $\pm$  SD (n=3).

Figura 5. Perfil de (A) pre-miR-34c y (B) miR-34c maduro durante la totalidad del cultivo discontinuo de las líneas celulares GS-CHOK1SV de 'alta' producción CHO 42 (■) y de 'baja' producción CHO 114 (□) de anticuerpo cB72.3. Barras de error =  $\pm$  SD (n=3).

Figura 6. Efecto de la sobreexpresión transitoria de miR sobre CCV y qP determinado durante un periodo de 24 a 96 h posteriores a la transfección para las líneas celulares GS-CHOK1SV de 'alta' producción (■) y de 'baja' producción CHO 114 (□) de mAb cB72.3.

Figura 7. Efecto de la sobreexpresión transitoria de pre-miR sobre la concentración de mAb en medio 96 h después de la transfección en la línea celular GS-CHOK1SV CHO 42 de alta producción de mAb cB72.3. La concentración de mAb ha sido normalizada a la concentración de células viables del cultivo en cada punto temporal. \* = incremento estadísticamente significativo en la expresión de mAb ( $P < 0,05$ ) en comparación con el control de blanco de transfección. Barras de error =  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

Figura 8. Efecto de la sobreexpresión transitoria de pre-miR sobre la concentración de mAb en medio 96 h después de la transfección en la línea celular GS-CHOK1SV CHO 56 de producción 'moderada' de mAb cB72.3. \* = incremento estadísticamente significativo en la expresión de mAb ( $P < 0,05$ ) en comparación con el control de blanco de transfección. Barras de error =  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

Figura 9. Efecto de la sobreexpresión transitoria de miR sobre la concentración de mAb en medio en (A) 48 h y (B) 96 h después de la transfección en la línea celular GS-CHOK1SV CHO 114 de producción 'baja' de mAb cB72.3. \* = incremento estadísticamente significativo en la expresión de mAb ( $P < 0,05$ ) en comparación con el control de blanco de transfección. Barras de error =  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

Figura 10. Curvas de crecimiento de grupos de CHOK1SV creados mediante transfección con vectores codificantes de pre-miR individuales. A = grupo de miR-21 (vector JR03 codificante de pre-miR-21), B = grupo de miR-34c (vector JR04 codificante de pre-miR-34c), C = grupo de miR-15b (vector JR05 codificante de pre-miR-15b), D = grupo de miR-16 (vector JR06 codificante de pre-miR-16). Se muestran tres cultivos para cada grupo en paralelo al anfitrión CHOK1SV.

Figura 11. Expresión de miR maduro el día 5 (■) y el día 7 (□) del cultivo discontinuo de grupos derivados de CHOK1SV creados mediante transfección con vectores codificantes de pre-miR individuales. Línea de células anfitrionas CHOK1SV A = miR-21 (vector JR03 codificante de pre-miR), B = miR-34c (vector JR04 codificante de pre-miR-34c), C = miR-15b (vector JR05 codificante de pre-miR-15b), D = miR-16 (vector JR06 codificante de pre-miR-16), RY05 = grupo creado mediante transfección con vector de expresión de miR no codificante de miR. Barras de error =  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

Figura 12. Expresión de luciferasa 48 h después de la transfección transitoria en diversas líneas celulares de miR manipulado. (■) Los grupos se transfectaron con el vector informador de luciferasa con o sin la secuencia diana miR-34c (sin = 'vector de luciferasa', con = 'luciferasa con vector esponja que contiene secuencia diana para miR-34c) en la UTR 3' de la unidad de transcripción de luciferasa. (□) Los grupos se super-cotransfectaron con vector adicional codificante de miR-34c más el vector informador de luciferasa con la secuencia diana miR-34c en la UTR 3' de la unidad de transcripción de luciferasa o sin ella. Todos los datos se muestran respecto a la expresión de luciferasa en el grupo estable de miR-34c en ausencia de la secuencia diana para miR-34c.

La Tabla 1, posteriormente, identifica las secuencias de nucleótidos de cebadores de pre-miR (SEQ ID n° 1 a n° 12) utilizados en la presente invención.

### Ejemplos:

#### 35 Materiales y métodos:

##### Vectores para la sobreexpresión de miR y vectores esponja

Se generaron vectores para la sobreexpresión de miR para expresar la horquilla del miR humano generadora de un pre-miR. Se incluyó un marcador de selección de puromicina en el vector para la generación de líneas celulares estables. Se utilizó un vector esponja que consistía en luciferasa de *Renilla* con una secuencia diana de miR-34c complementaria o prácticamente complementaria en el UTR 3' para mostrar que la sobreexpresión de miR-34c da como resultado el silenciamiento génico.

##### Cultivos celulares

Se cultivaron células CHO-K1 adherentes (Colección Europea de Cultivos Celulares) en Gibco® DMEM (Life Technologies, Reino Unido) complementado con ácido L-glutámico 500  $\mu$ M y asparagina 500  $\mu$ M, L-glutamina 200 mM, nucleósidos (30  $\mu$ M de adenosina, citidina, uridina y guanosina con 10  $\mu$ M de timidina (todos de Sigma)), 1 suero de feto bovino inactivado por calor al 10% (v/v) (PAA Laboratories) y aminoácidos no esenciales al 1% (v/v) Gibco® (Life Technologies, Reino Unido). Se mantuvo CHO-K1 en matraces T (75 cm<sup>2</sup>, Sartorius) a 37°C en un incubador de aire humidificado con 5% de CO<sub>2</sub>. Tras alcanzar el matraz una confluencia de aproximadamente 80%, se dividieron las células. Se aspiró el medio actual y se lavó con 10 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (1 tableta por cada 100 ml de agua estéril (Oxide Limited)). Se aspiró el PBS y las células se incubaron en 3 ml de tripsina (Life Technologies, Reino Unido) durante 2 a 3 min a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> (v/v) en aire. A continuación, se añadieron 10 ml de medio para inhibir la tripsina y la suspensión celular se vertió en un tubo Falcon de 50 ml y se centrifugó durante 5 min a 1.000 rpm. Seguidamente se extrajo el sobrenadante y el pellet celular se resuspendieron en 10 ml de medio fresco para confirmar que la viabilidad celular era >95% (determinada utilizando un instrumento ViCell). A continuación, se sembró un nuevo matraz T75 que contenía 10 ml de medio fresco, mediante la adición de 0,25 ml de la suspensión celular al matraz T75.

Se cultivaron células en suspensión GS-CHO 42, 56 y 114 (Lonza Biologics plc) en medio CD CHO (Life Technologies, Reino Unido). Se mantuvieron rutinariamente en matraces Erlenmeyer a 37°C en un incubador de agitación orbital en aire humidificado con 5% de CO<sub>2</sub> (v/v) a 100 rpm y se sembraron inicialmente con 2x10<sup>5</sup> células.ml<sup>-1</sup>.

Cultivos discontinuos de GS-CHO 42 y GS-CHO 114

- 5 Ambas líneas celulares se sembraron inicialmente con 3x10<sup>5</sup> células.ml<sup>-1</sup> en 100 ml de medio CD CHO en matraces Erlenmeyer grandes de 500 ml y se incubaron a 37°C en incubador de agitación orbital de aire humidificado con 5% de CO<sub>2</sub> (v/v) a 100 rpm. Se obtuvo una muestra diariamente para el recuento celular (1 ml). En los puntos temporales de 3, 5, 7 y 11 días de tiempo de cultivo, se extrajeron alícuotas de 1x10<sup>7</sup> células para el análisis de miR. Se recolectaron las células mediante centrifugación, se lavó el pellet una vez con PBS y se almacenó a -70°C. Se conservó el sobrenadante con el fin de determinar la concentración de mAb secretado.

Extracción del ARN

- 15 Se llevó a cabo la extracción del ARN utilizando el kit de extracción de ARN MirVANA (Life Technologies, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó un instrumento Nanodrop para medir la cantidad de ARN obtenida mediante la determinación de la absorbancia a una longitud de onda de A260 nm. Se preparó una dilución de 20 ng.ml<sup>-1</sup> del extracto de ARN para la utilización en la posterior qRT-PCR. Para el análisis de miR, se siguió el protocolo del fabricante para el enriquecimiento de ARN pequeños.

Análisis de qRT-PCR - TaqMan

- 20 Todos los materiales de qRT-PCR se obtuvieron de Applied Biosystems, a menos que se indique lo contrario. Para todos los experimentos, se utilizó el kit de ensayo de microARN TaqMan® de dos etapas con placas opacas de 48 y 96 pocillos y láminas adhesivas (ambas obtenidas de Bio-Rad). La primera etapa implica el kit de transcripción inversa de miR y la muestra recolectada. Se preparó cada pocillo siguiendo las instrucciones del fabricante para contener 7 µl de mezcla maestra, 3 µl del cebador apropiado (proporcionados en el kit, uno para cada miR) y 5 µl de muestra de ARN a una concentración de 10 ng.ml<sup>-1</sup>. Se llevó a cabo la RT-PCR en un termociclador autorizado Eppendorf utilizando el programa siguiente:

- 25
- 16°C durante 30 min
  - 42°C durante 30 min
  - 85°C durante 5 min

- 30 A continuación, se llevó a cabo la segunda etapa de RT-PCR. Cada pocillo consistía en 1 µl de ensayo de microARN TaqMan (20 X), 1,33 µl de producto de la primera etapa, 10 µl de mezcla de PCR universal Taqman y 7,67 µl de agua sin nucleasas. Los experimentos de qRT-PCR se llevaron a cabo en un instrumento Mastercycler® Eppendorf Realplex<sup>4</sup> utilizando los datos de ciclado de PCR siguientes:

1. 95°C durante 10 min
2. 95°C durante 15 segundos
3. 60°C durante 60 segundos

- 35 Las etapas 2 y 3 se repitieron durante 40 ciclos.

Los productos de la qRT-PCR se analizaron en un gel de agarosa al 2% en paralelo a una escala de 10 pb de ADN (Invitrogen).

- 40 Para determinar el número de copia de cada miR, se generó una curva estándar utilizando material de síntesis comercial de cada miR de concentración conocida. La curva estándar se generó utilizando el material sintético en el ensayo de microARN TaqMan® con números de copia conocidos y las posteriores concentraciones de miR no conocidas determinadas a partir de muestras utilizando la curva estándar.

Análisis de qRT-PCR utilizando verde SYBR para determinar las concentraciones relativas de pre-miR inmaduro entre puntos temporales y líneas celulares

- 45 Para todos los experimentos, se utilizó el kit de qRT-PCR en una etapa verde SYBR con placas opacas de 48 y 96 pocillos y láminas adhesivas. Se preparó cada pocillo para contener 12,5 µl de mezcla de verde SYBR, 1,5 µl de los cebadores apropiados, 0,5 µl de enzima de RT, 2 µl de ARN a una concentración de 2,5 ng/ml y 8,5 µl de ddH<sub>2</sub>O. Los cebadores utilizados durante dicho estudio se describen en la Tabla 1, posteriormente.

Los experimentos de qRT-PCR se llevaron a cabo en un instrumento Mastercycler® Eppendorf Realplex<sup>4</sup> utilizando los datos de ciclo de PCR siguientes:

- 50 1. 50°C durante 10 min

2. 95°C durante 5 min

3. 95°C durante 10 segundos

4. 58°C durante 30 segundos

Etapas 3 y 4 repetidas durante 40 ciclos

5 • Curva de fusión (medida con un cambio de temperatura de 0,5°C)

Los productos de la qRT-PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1% en paralelo a una escala de 100 pb de ARN (Invitrogen, Life Technologies, Reino Unido).

Tabla 1. Cebadores diseñados para el experimento de qRT-PCR de pre-miR

Gen	Cebador directo	Cebador inverso
Pre-miR-15b	AGTACTGTAGCAGCACATCATGG (SEQ ID nº 1)	TTTCCTT AAATTT CTAGAGCAGCA (SEQ ID nº 2)
Pre-miR-16-1	AGCAGTGCCTTAGCAGCAC (SEQ ID nº 3)	CAACCTTACTTCAGCAGCACA (SEQ ID nº 4)
Pre-miR-16-2	TTCCACTCTAGCAGCAGTAAA (SEQ ID nº 5)	GTCACACTAAAGCAGCACAATAA (SEQ ID nº 6)
Pre-miR-21	GTACCACCTTGTCGGGTAGC (SEQ ID nº 7)	CAAAATGTCAGACAGCCCATC (SEQ ID nº 8)
Pre-miR-34c	GGCAGTGTAGTTAGCTGATTGCT (SEQ ID nº 9)	TCTTTTTACCTGGCTGTGTGG (SEQ ID nº 10)
B-actina*	AGCTGAGAGGGAAATTGTGCG (SEQ ID nº 11)	GCAACGGAACCGCTCATT (SEQ ID nº 12)

\*Cebadores de B-actina de la Universidad de Kent.

10 Transfección con lipofectamina

Para los experimentos de transfección transitoria en placas de 6 pocillos, se sembraron las líneas celulares en la etapa de crecimiento exponencial a razón de  $3 \times 10^5$  células. $\text{ml}^{-1}$  en placas de 6 pocillos (Greiner, Reino Unido) que contenía medio apropiado y se cultivaron a 37°C en un incubador humidificado de aire con 5% de CO<sub>2</sub> (v/v). En 2 tubos diferentes se preparó lo siguiente: (a) 4 µg de ADN y 250 µl de medio OptiMEM Gibco® (Life Technologies, Reino Unido), (b) 12 µl de lipofectamina (Invitrogen, Life Technologies, Reino Unido) con 250 µl de medio OptiMEM Gibco® (Life Technologies, Reino Unido). A continuación, estos se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min y se mezclaron los dos tubos y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min. Al final de este periodo se añadieron 500 µl del complejo de ADN a los pocillos apropiados. Las células se cultivaron durante periodos de tiempo diferentes antes del recuento de las células y la recolección de una parte del medio para la determinación del título de mAb mediante ELISA.

Para los experimentos de transfección transitoria utilizando diversas líneas celulares CHO-K1SV en placas de 96 pocillos profundos, el protocolo para los experimentos de transfección transitoria en placas de 6 pocillos se ajustó para considerar el número más elevado de células. Las células se sembraron en la etapa de crecimiento exponencial a razón de  $0,4 \times 10^6$  células en cada pocillo en placas de 96 pocillos profundos (Nunc) a 37°C en un incubador de agitación orbital en aire humidificado con 5% de CO<sub>2</sub> (v/v) a 375 rpm. Se utilizaron 0,4 µg de ADN, 50 µl de medio OptiMEM Gibco® (Life Technologies, Reino Unido) y 1,2 µl de lipofectamina (Invitrogen, Life Technologies, Reino Unido) en cada pocillo y se prepararon tal como anteriormente. Las células transfectadas se dejaron durante diferentes periodos de tiempo antes del recuento de las células y la recolección del medio con el fin de determinar el título de mAb en el medio mediante ELISA.

30 ELISA

Para determinar la concentración de mAb, se analizaron 100 µl de medio sobrenadante de transfecciones transitorias utilizando un método basado en ELISA estándar (Smales et al., Biotechnology Bioengineering 88:474-488, 2004).

Análisis estadístico

Para determinar si había diferencias estadísticamente significativas en CCV, qP o concentración de mAb en el medio

sobrenadante entre condiciones experimentales y controles, se llevó a cabo una prueba t de Student. Los cambios se consideraron significativos en caso de obtener un valor de  $p < 0,05$  (nivel de confianza del 95%).

Ejemplo 1:

Identificación inicial de dianas de miR utilizando la micromatriz de ANB miRCURY

5 El trabajo inicial para identificar los miR la expresión de los cuales puede estar asociada a qP o CCV se llevó a cabo mediante la utilización de un enfoque de micromatriz de ANB miRCURY disponible comercialmente (Exiqon, Dinamarca). Se adoptaron dos enfoques:

10 A) el primer enfoque era comparar las respuestas de miR en una línea celular GS-CHOK1SV (que expresa un mAb quimérico recombinante modelo, cB72.3) cultivado en biorreactores de agitación por aire de 10 l en modo discontinuo y alimentado por lotes. El modo alimentado por lotes utilizó un régimen de alimentación genérico de Lonza (procedimiento genérico - versión 6). Se compararon tres biorreactores de modo discontinuo (n=3) con tres reactores de modo de alimentación por lotes (n=3) para la línea celular GS-CHOK1SV 42 (productora del mAb quimérico cB72.3).  
 15 Se seleccionaron cinco puntos de cada curva de crecimiento para el muestreo (Tabla 2). Para los puntos 1 a 3, se prepararon muestras de ARN de la totalidad de seis biorreactores (1=inmediatamente antes de la aplicación de la alimentación-1, 2=48 h después de la alimentación 1 y 3 =concentración máxima de células viables). Después del máximo, los biorreactores no alimentados (modo discontinuo) empezaron a declinar y no se realizó un muestreo posterior de este conjunto de biorreactores. Se obtuvieron dos puntos temporales adicionales de los tres biorreactores que recibían las alimentaciones (reactores de modo de alimentación por lotes, F17, F18 y F19) 48 h después de la aplicación de la segunda alimentación (4=48 h después de la alimentación 2) y en el momento de la recolección (5=recolección). De esta manera, en total se obtuvieron 24 muestras y se preparó el ARN a partir de ellas utilizando el kit miRNeasy (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se preparó una 25ª muestra de referencia que consistía en una mezcla de 5 µg de ARN de cada una de las 24 preparaciones de ARN.

25 Tabla 2. Crecimiento de la línea celular '42' en cultivo en biorreactor de alimentación por aire. Los biorreactores se hicieron funcionar en modo discontinuo o en modo de alimentación por lotes. Observación: para los cultivos discontinuos, no se produjo muestreo adicional después del día 9 y para los cultivos alimentados por lotes, f1 y f2 indican la aplicación de la primera y segunda alimentaciones, respectivamente.

		Biorreactores que funcionan en modo discontinuo			Biorreactores que funcionan en modo alimentado por lotes		
		F13	F14	F16	F17	F18	F19
Tiempo transcurrido (día)	Punto de muestreo	Concentración de células viables ( $10^6$ células.m $l^{-1}$ )					
0		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-
1		0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
2		0,7	0,6	0,7	0,5	0,6	0,4
3		0,6	0,5	0,7	0,5	0,6	0,6
4		1,7	1,7	1,9	1,7	1,7	1,8
5(f1)	1 (pre-alimentación 1)	1,9	3,0	3,0	3,1	3,0	2,7
6		2,3	3,8	3,3	4,0	3,9	4,1
7	2	2,3	4,4	4,3	4,7	4,4	5,0
8		2,5	4,8	4,8	6,0	5,8	6,3
9	3	2,5	5,6	5,4	6,8	6,5	7,3
10(f2)		2,3	5,5	4,9	6,8	6,7	7,2
11		2,0	5,2	4,7	6,8	6,5	7,5
12	4	1,6	4,3	4,1	6,6	6,5	7,5
13		1,5	3,8	3,0	7,4	6,6	7,7
14	5	1,3	2,7	2,1	7,3	6,5	7,4

5 Las muestras se marcaron con Hy3 y la referencia, con Hy5, y cada muestra se hibridó frente a la referencia en 24 micromatrices de ANB (ácido nucleico bloqueado) miRCURY. Los datos representados en la presente memoria son valores normalizados de logaritmos de las proporciones de medianas ( $\ln(\text{Hy3}/\text{Hy5})$ ) para miR de la comparación de grupos de reactores mediante ANOVA. Sólo se introdujeron aquellos con  $p < 0,05$  (Tabla 3) en el algoritmo de agrupamiento jerárquico a dos vías. A partir de este análisis se identificaron varios grupos de miR interesantes (que contenían mmu-miR-21, -34b, -34c, -29a, -130a y -193) que mostraban diferencias de expresión entre estadios de crecimiento o entre procedimientos de alimentación. Los miR identificados en el estudio de matrices podrían participar en el control del ciclo celular y de la apoptosis. Se observaron grandes cambios en la cantidad de mmu-miR-34b y -34c. Los miR mmu-miR-34a, -34b y -34c están todos estrechamente relacionados y es conocido que miR-34a es una diana para p53 que conduce a apoptosis y a la parada en G1.

10 Tabla 3. Clasificación de los miR según el factor medio de cambio entre alimentación por lotes, día 12, y la referencia. El análisis de significancias se llevó a cabo mediante ANOVA y se muestran los valores de p asociados. Los miR indicados en negrita son de particular interés. Los logaritmos de las proporciones de medianas de expresión para cada miR se convirtieron a factores de cambio utilizando la fórmula de Microsoft Excel siguiente:  
15 "=POTENCIA(2,A1)", en la que A1 es la celda que contiene la media del log de la proporción de medianas de expresión normalizada ( $\ln(\text{Hy3}/\text{Hy5})$ ).

miR	Factor medio de cambio		Valor de p
	Lote día 9	Alimentación por lotes día 12	
mmu-miR-34b	2,28	4,09	1,41E-05
mmu-miR-21	3,03	4,06	5,73E-10
mmu-miR-34c	2,22	4,03	4,25E-05
mmu-miR-22	1,83	1,99	4,51E-03
mmu-miR-130a	1,73	1,94	1,33E-03
mmu-miR-29a	1,75	1,92	1,53E-06
mmu-miR-23a	2,13	1,76	2,41E-03
mmu-miR-26b	1,68	1,68	8,30E-05
mmu-miR-26a	1,90	1,63	8,55E-03
mmu-miR-30b	1,46	1,56	8,48E-06
mmu-miR-193	1,26	1,54	1,59E-04
mmu-miR-700	2,02	1,51	4,59E-04
mmu-miR-23b	1,50	1,43	6,90E-05
mmu-let-7c	1,18	1,36	2,45E-07
mmu-miR-30c	1,40	1,29	1,32E-04
mmu-let-7b	1,17	1,29	1,84E-05
mmu-miR-29b	1,20	1,26	5,03E-07
hsa-miR-3180-3p	1,16	1,22	1,24E-08
mmu-let-7d*	1,23	1,22	2,39E-03
mmu-miR-31	1,53	1,18	9,83E-03
mmu-miR-669c	0,97	1,13	6,97E-03
mmu-miR-669a	1,10	1,09	4,10E-06
hsa-miR-193a-5p	1,14	1,09	1,47E-03
mmu-miR-125a	0,90	1,06	1,15E-06

ES 2 698 610 T3

mmu-miR-185	1,08	1,05	2,85E-04
mmu-miR-10a	1,26	1,04	6,40E-03
mmu-miR-710	0,93	0,99	2,49E-03
hsa-miR483-5p	1,01	0,99	1,85E-06
hsa-miR-371a-5p	1,04	0,96	5,96E-04
mmu-miR-290	1,14	0,94	1,40E-04
hsa-miR-483-5p	0,92	0,93	2,76E-04
mmu-miR-705	0,99	0,93	8,34E-07
miRPlus_17836 (hsa-miR-30b-3p)	0,94	0,92	2,04E-03
hsa-miR-885-5p	0,94	0,89	4,22E-04
mmu-miR-129-5p	1,02	0,87	7,28E-04
mmu-miR-468	0,95	0,84	7,08E-08
mmu-miR-452	0,86	0,84	1,96E-03
mmu-miR-210	0,82	0,84	1,46E-04
mmu-miR-292-5p	0,99	0,83	2,67E-05
mmu-miR-671	0,92	0,83	5,75E-05
miRPlus_17861	0,94	0,78	8,09E-07
mmu-miR-298	0,84	0,74	7,77E-07
hsa-miR-491-3p	0,75	0,72	1,07E-03
hsa-miR-501-3p	0,74	0,72	2,53E-04
miRPlus_17832	0,76	0,71	5,52E-06
mmu-miR-467a	0,75	0,70	1,21E-05
mmu-miR-714	0,76	0,68	4,00E-03
mmu-miR-720	0,80	0,67	2,15E-04
mmu-miR-706	0,83	0,65	6,31E-09
mmu-miR-709	0,65	0,63	8,27E-04
mmu-miR-467b	0,67	0,56	3,97E-05
hsa/bta-miR-21-3p	0,68	0,54	4,69E-06
mmu-miR-691	0,62	0,50	4,47E-05
hsa-miR-665	0,62	0,48	2,63E-05
hsa-miR-185-3p	0,62	0,47	3,98E-08

B) El segundo enfoque fue perfilar los miR en un panel de 10 líneas celulares GS-CHOK1SV con diferentes productividades de mAb cB72.3. Esto se llevó a cabo mediante el análisis de muestras celulares obtenidas de cultivos de matraz de agitación de lotes por triplicado de 10 líneas celulares GS-CHO con un abanico de productividades de mAb cB72.3 en cultivo discontinuo en suspensión (Tabla 4).

5

Tabla 4. Concentración de mAb en el momento de la recolección de cultivos discontinuos en suspensión de las 10 líneas celulares GS-CHOK1SV recombinantes que expresaban el anticuerpo cB72.3. Los valores son de medias ( $\pm$ SD) de tres cultivos, con la excepción de la línea celular 56, que es la media de dos cultivos.

Línea celular	[mAb] en la recolección (mg/l)
153	11 $\pm$ 0
1	223 $\pm$ 5
142	254 $\pm$ 43
54	303 $\pm$ 5
114	313 $\pm$ 64
40	349 $\pm$ 2
56	414 $\pm$ 11
137	472 $\pm$ 14
149	524 $\pm$ 13
42	550 $\pm$ 4
47	644 $\pm$ 14

- 5 Se extrajo el ARN de los pellets celulares recogidos durante la etapa de crecimiento exponencial y se sometieron a análisis en la micromatriz de ANB miRCURY (Exiqon, Dinamarca). Se clasificaron las líneas celulares y se separaron en dos grupos de igual tamaño basándose en la concentración de cB72.3 de cultivos discontinuos en suspensión (Tabla 4: líneas celulares de 'baja' producción: 153,1,142, 54, 114; líneas celulares de 'alta' producción: 40, 137, 149, 42, 47). A continuación, se analizaron los logaritmos normalizados de proporciones de medianas de expresión ( $\ln(\text{Hy3}/\text{Hy5})$ ) de cada miR para identificar las relaciones con la productividad. El perfilado de miR ha identificado un subgrupo (15) del número total de miR analizados mediante la micromatriz miRCURY™ que se expresan diferencialmente en los grupos de alta y baja producción utilizando la anotación de ratón y 18 miR utilizando la anotación humana. Se prepararon diagramas de mapa térmico para las anotaciones humana y de ratón. Los valores de p de ANOVA de los resultados de anotación humana y de ratón se informan en las Tablas 5 y 6.
- 10
- 15 Tabla 5. Valores de p de ANOVA calculados entre miR regulados diferencialmente en grupos de 'alta' y 'baja' producción. Se llevó a cabo el análisis utilizando la micromatriz de ANB miRCURY entre grupos de 'alta' y 'baja' producción para anotaciones de ratón. Los miR de interés particular se señalan en negrita.

Juego de sondas	Valor de p
mmu-let-7b	3,51E-03
mmu-let-7d	7,68E-03
mmu-let-7f	5,80E-03
mmu-miR-137	1,71E-05
mmu-miR-146a	2,05E-03
<b>mmu-miR-15b</b>	<b>3,09E-04</b>
<b>mmu-miR-16</b>	<b>3,24E-04</b>
<b>mmu-miR-186</b>	<b>8,43E-03</b>
mmu-miR-18a	8,06E-03
mmu-miR-19a	1,89E-04
mmu-miR-19b	1,47E-03

mmu-miR-382	1,38E-04
mmu-miR-483	3,23E-03
mmu-miR-711	3,54E-03
mmu-miR-882	9,89E-08

Tabla 6. Valores de p de ANOVA calculados entre miR regulados diferencialmente en grupos de 'alta' y 'baja' producción. Se llevó a cabo el análisis utilizando la micromatriz de ANB miRCURY entre grupos de 'alta' y 'baja' producción para anotaciones humanas. Los miR de interés particular se señalan en negrita.

Juego de sondas	Valor de p
hsa-let-7b	3,51E-03
hsa-let-7d	7,68E-03
hsa-let-7f-1	5,80E-03
hsa-miR-137	1,71E-05
hsa-miR-146a	2,05E-03
<b>hsa-miR-15b</b>	<b>3,09E-04</b>
<b>hsa-miR-16</b>	<b>3,24E-04</b>
<b>hsa-miR-186</b>	<b>8,43E-03</b>
hsa-miR-18a	8,06E-03
hsa-miR-19a	1,89E-04
hsa-miR-19b	1,47E-03
hsa-miR-382	1,38E-04
hsa-miR-576-3p	1,96E-03
hsa-miR-583	9,44E-06
hsa-miR-605	4,33E-03
hsa-miR-617	6,49E-03
hsa-miR-620	4,17E-03
miRPlus_17891	5,12E-04

5

A partir de estos estudios iniciales en micromatrices, se identificaron cinco miR que mostraron una expresión incrementada relacionada con el crecimiento (miR-21 y miR-34c) o la productividad (miR-15b, miR-16 y miR-186).

Ejemplo 2

10 Validación de niveles de expresión endógenos de miR durante el cultivo discontinuo y en líneas celulares GS-CHOK1 SV de 'alta' y 'baja' producción de mAb recombinante

Tras la identificación de varios miR utilizando el sistema de micromatriz de ANB miRCURY, la expresión del cual podría estar asociada a CCV o qP tal como se indica en el Ejemplo 1, se analizaron adicionalmente cuatro miR diana: miR-15b, miR-16, miR-21 y miR-34c, con respecto a su influencia sobre la expresión de proteína recombinante en líneas celulares GS-CHOK1SV.

15 Antes de manipular los niveles de los miR mediante transfección transitoria (Ejemplos 3 a 5 utilizando un enfoque similar al descrito de manera general por Jadhav et al., Biotechnology and Bioengineering 109:1376-1385, 2012. En primer lugar, resultó necesario mostrar que los resultados de las micromatrices eran consistentes con las mediciones

de los miR diana en las líneas celulares GS-CHOK1SV recombinantes mediante qRT-PCR. Para ello, se seleccionaron tres líneas celulares (Ejemplo 1b) para análisis adicionales de diferente productividad (Tabla 4) y CCV (ver la figura 1). Se obtuvieron muestras (un número fijo de células en cada punto) durante todo el cultivo en los puntos señalados con flechas para el análisis de las cantidades de miR, etc.

- 5 Tras completar la extracción de miR utilizando el kit de extracción de ARN *MirVANA*, se determinaron las cantidades de miR utilizando el kit de ensayo de microARN TaqMan® en dos etapas disponible comercialmente (Applied Biosystems). Con el fin de determinar las concentraciones de miR maduros en cada muestra, se preparó una curva estándar para cada miR.

10 Utilizando este qRT-PCR, se determinaron las concentraciones de los cuatro miR diana en las líneas celulares GS-CHOK1SV en el cultivo discontinuo en las líneas celulares GS-CHOK1SV productoras de cB72.3 de Lonza: GS-CHO 42 (productor 'alto') y GS-CHO 114 (productor 'bajo'). Los datos obtenidos son compatibles con los datos de las micromatrices. Los datos en las figuras 2 a 5 muestran: (A) la cantidad de pre-miR inmaduro normalizado respecto a  $\beta$ -actina y respecto a las muestras recogidas el primer día, y (B) la concentración de miR maduro determinada a partir de las curvas estándares en los diversos puntos temporales.

15 La concentración de miR-15b en las dos líneas celulares de ensayo durante el cultivo discontinuo se informa en la figura 2. Aunque las cantidades de pre-miR en ambas líneas celulares mostraban perfiles similares durante todo el cultivo (figura 2A), la cantidad de pre-miR-15b en las muestras de 120 h y de 168 h era más elevada para la línea celular de 'alta' producción. Tal como puede observarse a partir de los datos, la tendencia en las cantidades del miR maduro es diferente entre las dos líneas celulares, cayendo durante el cultivo en el productor 'bajo' y apareciendo sólo al final del cultivo en el producto 'alto' (figura 2B). De esta manera, no había relación entre las cantidades de pre-miR-15b y de miR-15b maduro. Estos datos corroboran los de las micromatrices, en los que los niveles de miR-15b eran elevados en algunas líneas celulares de 'alta' producción el día 4 del cultivo discontinuo.

20 La cantidad relativa de pre-miR-16 y la concentración de miR-16 en las líneas celulares de 'alta' y 'baja' producción durante todo el cultivo discontinuo se informan en la figura 3. En el productor 'alto' se observó la presencia de 40-50% más pre-miR-16-1 que en el productor 'bajo' durante todo el cultivo (figura 3A). La cantidad relativa de pre-miR-16 en ambas líneas celulares alcanzó un máximo en 168 h (para pre-miR-16-1) y 120 h (para pre-miR-16-2) (figuras 3A y 3B, respectivamente) y sus perfiles eran similares a los observados para pre-miR-16b (figura 2A). Sin embargo, nuevamente el perfil de miR-16 maduro era diferente. La concentración de miR maduro se redujo durante el cultivo en ambas líneas celulares, aunque la concentración en todos los casos era más elevada en la línea celular de 'alta' producción (figura 3C). Esto es consistente con los datos de las micromatrices, que muestran un nivel elevado de miR-16 en algunas líneas celulares de 'alta' producción el día 4 de cultivo.

25 La cantidad relativa de pre-miR-21 y la concentración de miR-21 en las líneas celulares de 'alta' y 'baja' producción durante todo el cultivo discontinuo se informan en la figura 4. Entre las 72 y 120 h de tiempo de cultivo, pre-miR-21 mostró un gran incremento en la línea celular de 'baja' producción, mientras que la línea celular de 'alta' producción presentaba cantidades relativas más bajas de pre-miR-21, que sólo se incrementaron entre las 120 h y las 168 h de cultivo (figura 4A). La concentración de miR-21 en la línea celular de 'baja' producción se incrementó hasta las 168 h de tiempo de cultivo y después cayó entre las 168 h y las 264 h de tiempo de cultivo, mientras que en la línea celular de 'alta' producción, la concentración de miR-21 continuó incrementándose durante todo el cultivo (figura 4B).

30 La cantidad relativa de pre-miR-34c y la concentración de miR-34c en las líneas celulares de 'alta' y 'baja' producción durante todo el cultivo discontinuo se informan en la figura 5. Se observó una tendencia diferente en las líneas celulares de 'alta' y 'baja' producción con respecto a pre-miR34-c y miR-34c maduro (figura 5). Aunque la cantidad relativa de pre-miR-34c en ambas líneas celulares mostraba perfiles similares durante todo el cultivo (figura 5A), la cantidad relativa de pre-miR-34c en las muestras de 120 h y 168 h era más elevada para la línea celular de 'alta' producción. Para ambas líneas celulares se observó que el perfil de cantidades relativas de pre-miR-34c refleja el de la concentración de miR-34c maduro. En la línea celular de 'alta' producción, la cantidad de pre-miR-34c aparentemente se incrementó durante todo el cultivo; mucho menos en el caso de la línea celular de 'baja' producción (figura 5A). La concentración de miR-34c en la línea celular de 'alta' producción se incrementa entre las 72 h y 168 h de tiempo de cultivo, pero cae nuevamente a las 264 h (figura 5B). Sin embargo, en la línea celular de 'baja' producción, la concentración de miR-34c cae alcanzadas las 168 h de cultivo (figura 5B).

35 Por lo tanto, los datos de qRT-PCR para los miR maduros eran generalmente consistentes con los datos de micromatrices tal como se ha indicado anteriormente.

40 Los Ejemplos 3 a 5 muestran la sobreexpresión transitoria de los miR maduros y demuestra que la sobreexpresión puede modificar el fenotipo de las líneas celulares GS-CHOK1SV investigadas, p.ej. la tasa de producción específica, qP, o la integral de la concentración de células viables, CCV. En estos ejemplos, la sobreexpresión transitoria de tanto miR individuales como combinaciones de miR se analizó utilizando un enfoque basado en plásmidos, tal como se indica en las secciones a continuación.

### Ejemplo 3

Investigación del efecto de los niveles de sobreexpresión de miR exógeno sobre la productividad en líneas celulares

GS-CHOK1SV recombinantes que expresan un mAb modelo (cB72.3)

Para confirmar los efectos funcionales de los miR investigados, se llevaron a cabo estudios de expresión transitoria. Se generaron vectores que expresaban los tallo-bucles de pre-miR humanos flanqueados por la secuencia genómica de pre-miR apropiada y se utilizaron para la expresión transitoria. Se confirmó la secuencia esperada mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación. La expresión transitoria de miR en las células CHO se informó que era más elevada al utilizar los tallo-bucles derivados de CHO, aunque también pueden utilizarse otras especies para sobreexpresar los pre-miR. Sin embargo, un nivel de sobreexpresión más bajo podría resultar beneficioso ya que una elevación excesivamente elevada de la concentración de miR exógena podría resultar perjudicial.

Para confirmar la funcionalidad de estos plásmidos, se transfectaron transitoriamente células CHOK1SV con un vector de expresión codificante de pre-miR-21. Se analizaron mediante transferencia northern extractos de ARN de células de control (transfectadas con un plásmido blanco) y células transfectadas con pre-miR-21. La cantidad de miR-21 maduro se encontraba elevada en las células CHOK1SV transfectadas transitoriamente con el constructo de pre-miR-21 (datos no mostrados). Se observaron cantidades relativamente grandes de pre-miR en todas las muestras en comparación con los niveles maduros. Estos datos demuestran que los vectores son funcionales y pueden utilizarse en estudios de sobreexpresión o de 'desactivación génica'.

Ejemplo 4

Transfección transitoria y sobreexpresión de miR diana en placas de 6 pocillos

Se construyeron cuatro vectores que expresaban tallo-bucles de los pre-miR humanos miR-15b, -16, -21 y -34c. Se utilizaron estos vectores para investigar el efecto de los miR exógenos sobre qP y CCV en las líneas celulares de 'baja' y 'alta' producción utilizadas en la validación de los datos de micromatrices (Ejemplo 4). En el primer grupo de experimentos, las células se cultivaron y se transfectaron con los vectores de sobreexpresión en un formato de placa de 6 pocillos en incubadores en modo estático. El efecto de cada vector sobre qP y CCV determinados después de la transfección se presenta en la figura 6.

En este formato de cultivo celular, miR-15 fue el único miR expresado exógenamente que incrementó CCV en 50% (en comparación con el blanco de transfección) y sólo en la línea celular de 'alta producción (figura 6A). En términos de qP, sólo miR-34c expresado exógenamente produjo un incremento significativo (en comparación con el blanco de transfección) y ello ocurrió en las líneas celulares de producción 'baja' y 'alta' (figura 6B). Esto sugiere que miR-34c podría presentar como diana procesos implicados en la determinación de qP que son comunes a las líneas celulares de 'alta' y 'baja' producción.

El efecto de estos miR se analizó adicionalmente mediante la expresión transitoria de los vectores de sobreexpresión en las mismas líneas celulares GS-CHOK1SV productoras de mAb, en esta ocasión cultivadas en suspensión en placas de 96 pocillos profundos de agitación. Debido a que todas las líneas celulares GS-CHOK1SV descritas en la presente patente crecen en cultivo en suspensión, este modo de cultivo resulta más apropiado para estas líneas celulares y es más similar al procedimiento de fabricación.

Ejemplo 5

Transfección transitoria y sobreexpresión de miR diana en placas de 96 pocillos profundos bajo agitación

Con el fin de evaluar la influencia de la sobreexpresión de miR y de la sobreexpresión de combinaciones de miR en un entorno que puede aproximarse mejor al entorno observado en un biorreactor, se llevaron a cabo experimentos en placas de 96 pocillos profundos de agitación. Las líneas celulares GS-CHOK1SV productoras del mAb cB72.3 se transfectaron transitoriamente en suspensión separadamente con un único vector codificante de un miR o en cotransfecciones en las que se combinaron dos o tres vectores codificantes de miR. Para las transfecciones individuales, las células y medio de cultivo se muestrearon 48 h después de la transfección, mientras que las cotransfecciones se muestrearon 48 h o 96 h después de la transfección. Para cada transfección, se determinó el crecimiento (CCV) y el título de producto (determinado mediante ELISA). Se utilizaron tres líneas celulares GS-CHOK1SV productoras de cB72.3 diferentes para determinar si alguno de los efectos observados era específico de línea celular. Las líneas CHO 42 y CHO 114 de 'alta' y 'baja' producción, respectivamente, más CHO-56, que se consideró una línea celular de producción 'intermedia'.

(i) CHO 42 (producto 'elevado' de mAb)

Las células CHO 42 cotransfectadas transitoriamente con vectores separados codificantes de pre-miR-34c y pre-miR-15b y pre-miR-16 o pre-miR-16 y pre-miR-34c mostraron todos incrementos estadísticamente significativos (20,77%, 33,24% y 38,7%, respectivamente) de la concentración de mAb en el medio de cultivo 96 h después de la transfección (figura 7).

(ii) CHO 56 (productor 'intermedio' de mAb)

Las células CHO 56 cotransfectadas transitoriamente con vectores separados codificantes de pre-miR-15b y pre-miR-

16, pre-miR-16 y pre-miR-34c o pre-miR-15b con pre-miR-16 y pre-miR-34c mostraron incrementos estadísticamente significativos (58,7%, 57,8% y 71,1%, respectivamente) de concentración de mAb en el medio de cultivo 96 h después de la transfección (figura 8).

(iii) CHO 114 (productora 'baja' de mAb)

5 En el caso de la línea celular CHO 114, sólo aquellas transfectadas con el vector codificante de pre-miR-34 mostraron un incremento estadísticamente significativo de la concentración de mAb en el medio de cultivo 48 h después de la transfección (figura 9A). Sin embargo, alcanzadas las 96 h después de la transfección, todas las combinaciones de cotransfección mostraron incrementos estadísticamente significativos de la concentración de mAb secretado al medio de cultivo en diferentes grados (figura 9B).

10 Los datos combinados de los estudios de expresión transitoria en las diferentes líneas celulares muestran que la sobreexpresión individual de pre-miR-15b, pre-miR-16 o pre-miR-34c, o combinaciones de ellos, pueden influir sobre la expresión de mAb recombinante en una o más líneas celulares productoras del mismo mAb con diferentes productividades.

15 Con el fin de investigarlo adicionalmente, se generaron estos grupos de transfectantes a partir del anfitrión CHOK1SV manipulado para sobreexpresar establemente los pre-miR individuales.

Ejemplo 6

Generación de grupos de anfitriones CHOK1SV manipulados para sobreexpresar establemente miR individuales

20 Se crearon grupos de transfectantes que sobreexpresaban los pre-miR individuales en células anfitrionas CHOK1SV (Lonza Biologics). Para conseguirlo, se utilizaron los vectores anteriormente mencionados codificantes de diversos pre-miR, que contenían adicionalmente un marcador de selección de puromicina. Se transfectaron estos vectores mediante electroporación en la línea celular anfitriona CHOK1SV de Lonza, seguido de la selección en medio que contenía puromicina. Se analizaron los grupos resistentes a puromicina para el crecimiento (figura 10) y contenido de miR (figura 11) para confirmar que la cantidad de miR maduro específico (es decir, el codificado en forma pre-miR por el vector transfectado y procesado a la forma madura miR por la célula) se encontraba elevada en los grupos. Durante el cultivo discontinuo no se observó una diferencia significativa de las características de crecimiento de los grupos en comparación con el grupo de control (es decir, CHOK1SV transfectado separadamente con un vector idéntico que contenía un marcador de puromicina y no codificante de un pre-miR). Sin embargo, las concentraciones de miR específico (relacionado con el vector codificante de pre-miR utilizado para crear el grupo) en cada grupo se incrementaron en 2 a 3 veces en todos los grupos en comparación con el grupo de control y el anfitrión CHOK1SV original (figura 11).

35 Con el fin de someter a ensayo el rendimiento del grupo que expresaba miR-34c exógeno, se supertransfectó transitoriamente con un gen informador de luciferasa con o sin una secuencia esponja (es decir, una secuencia diana de miR complementaria o prácticamente complementaria; Ebert M.S. et al., Nature Methods 4:721-726, 2007) en la UTR 3' (figura 12). Debido a que los niveles de miR-34c aparentemente son elevados en el grupo, ello debería resultar en una actividad de informador más baja que en el control. El grupo estable también se supertransfectó transitoriamente con el mismo vector (utilizado para crear el grupo) codificante de miR-34c para determinar si ello presentaba algún efecto adicional sobre la actividad del gen informador. Tal como se muestra en la figura 12, al transfectar el informador de luciferasa en el grupo que expresaba miR-34c, la presencia de la secuencia de miR-34c dio como resultado una reducción de la expresión de luciferasa de aproximadamente 65%, consistente con el procesamiento del pre-miR-34c sobreexpresado en miR-34c maduro. Al transfectar vector codificante de pre-miR-34c adicional en el grupo, sólo se observó una reducción adicional en la expresión de informador de luciferasa en el caso de que estuviese presente la secuencia diana en el casete de transcripción del informador de luciferasa (figura 12). La actividad de informador sólo se encontraba elevada respecto a la línea celular de control en el grupo estable de pre-miR-34c. Esta observación concuerda con los resultados observados con la sobreexpresión transitoria de miR-34c en las líneas celulares productoras de mAb, en donde se observó un incremento de la concentración de mAb en el medio. Estos resultados muestran que la sobreexpresión de pre-miR-34c conduce a una expresión del transgén potenciada (mediante el procesamiento celular con éxito de pre-miR-34c exógeno a miR-34c maduro) y que las células CHOK1SV son competentes para procesar pre-miR-34c en miR-34c maduro funcional (según se determinó mediante un ensayo de qRT-PCR específico para miR maduro).

50

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para la producción de una proteína de interés en una célula productora de mamífero, que comprende las etapas de procedimiento siguientes:
  - a) proporcionar una célula productora de mamífero,
  - 5 b) incrementar la concentración de al menos un miR seleccionado del grupo que consiste en miR-15, miR-16 y miR-34 en la célula productora de mamífero proporcionada en la etapa a) mediante la transfección de la célula productora de mamífero con al menos un miR seleccionado del grupo que consiste en miR-15, miR-16 y miR-34 o con al menos un vector que contiene una secuencia de nucleótidos codificante de al menos un miR bajo el control de al menos un elemento regulador que permite la sobreexpresión de al menos un miR, en donde el al menos un miR se selecciona del grupo que consiste en miR-15, miR-16 y miR34 de manera que se obtiene una célula productora de mamífero modificada genéticamente para la producción de proteína,
  - c) cultivar la célula productora de mamífero modificada genéticamente para la producción de proteína, bajo condiciones adecuadas para la producción de la proteína de interés, y
  - 15 d) recuperar la proteína de interés producida en la etapa c),

donde la célula productora de mamífero es una célula de roedor, una célula de hámster, una célula de ratón o una célula humana, una célula Y0, una célula COS, una célula sp2/0, una célula CHO, una célula CHO-K1 o una célula CHO-K1SV, una célula CHO DG44, una célula CHO DUXB11, una célula CHO GS con desactivación génica, una célula CHO FUT8 G2 con desactivación génica, una célula NS0, una célula PERC6, una célula HEK293, una célula HT1080 o una célula BHK.
2. El método según la reivindicación 1, donde el miR-15 es miR-15a o miR-15b.
3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el miR-34 es miR-34a, miR-34b o miR-34c.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde se transfectan al menos dos de los miR o al menos dos de las secuencias de nucleótidos que codifican al menos dos de los miR.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el miR es un miR maduro, un miR precursor o un miR primario.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el al menos un vector que codifica el al menos un miR en la etapa b) se transfecta transitoria o establemente.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la célula productora de mamífero se transfecta con una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de interés antes de la etapa a) o durante la etapa b).
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la célula productora de mamífero modificada genéticamente para la producción de proteína obtenida tras la etapa b) se transfecta con una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de interés.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la célula productora de mamífero es una célula CHO, célula CHO-K1 o una célula CHO-K1SV.
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el elemento regulador que permite la sobreexpresión del al menos un miR es un promotor.
11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la célula productora de mamífero modificada genéticamente para la producción de proteína es una célula que muestra una tasa de producción específica incrementada o una integral respecto al tiempo incrementada de la concentración de células viables o ambas.

Figura 1

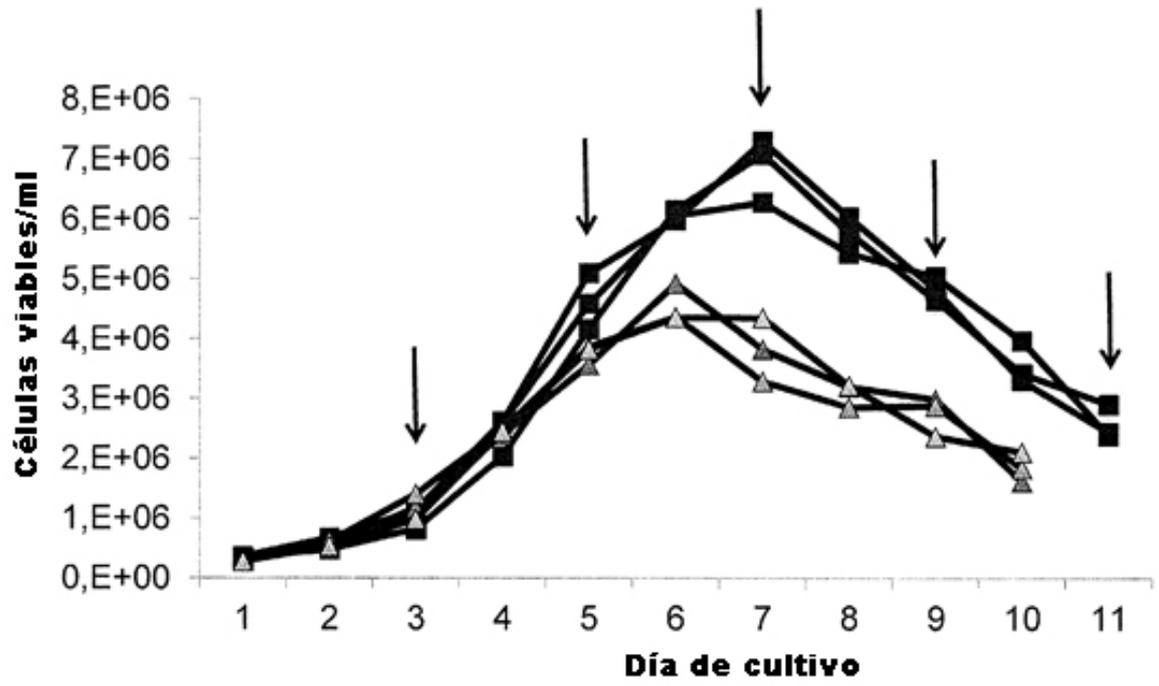
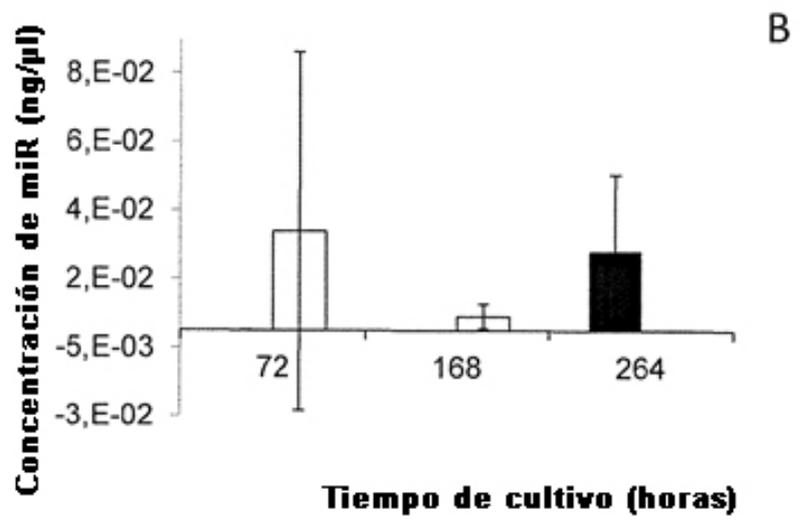
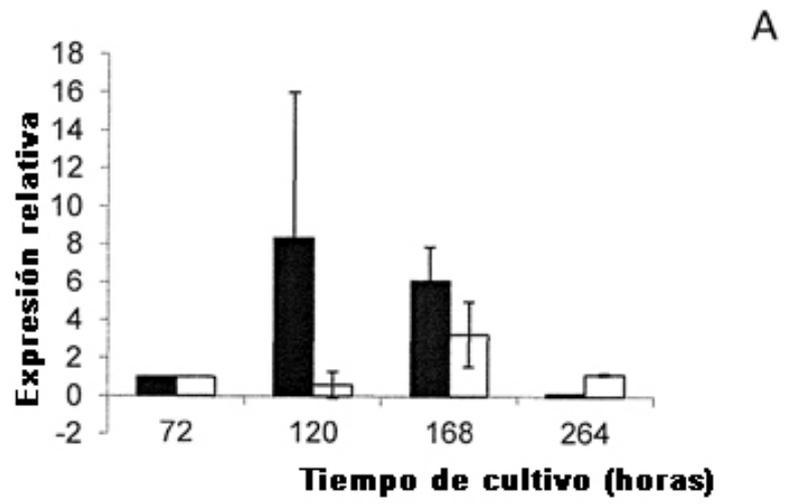
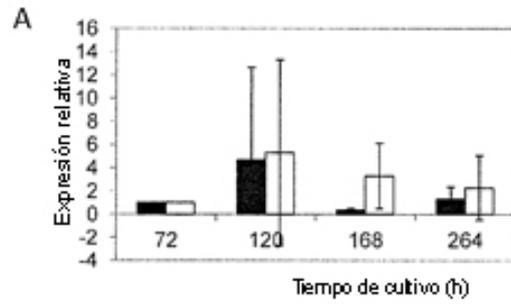
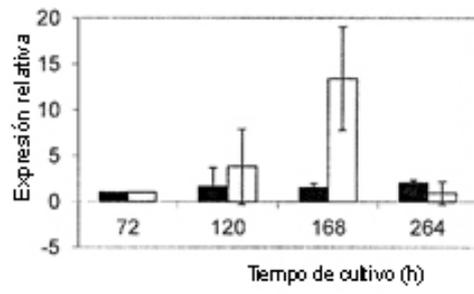


Figura 2





B

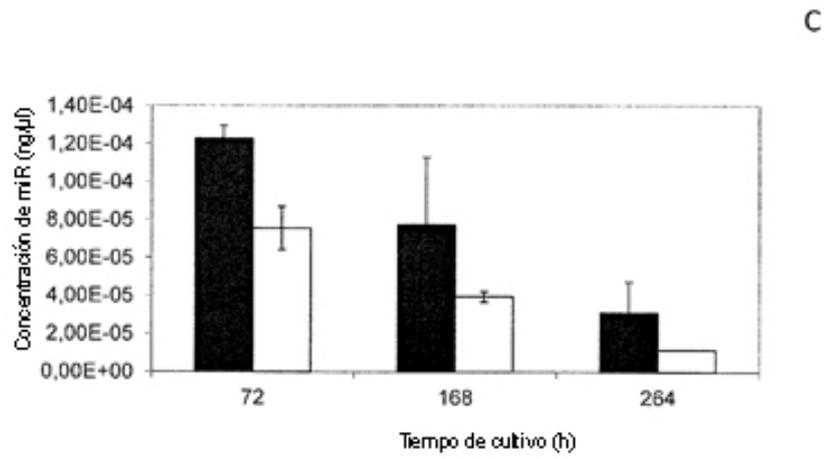


Figura 3

Figura 4

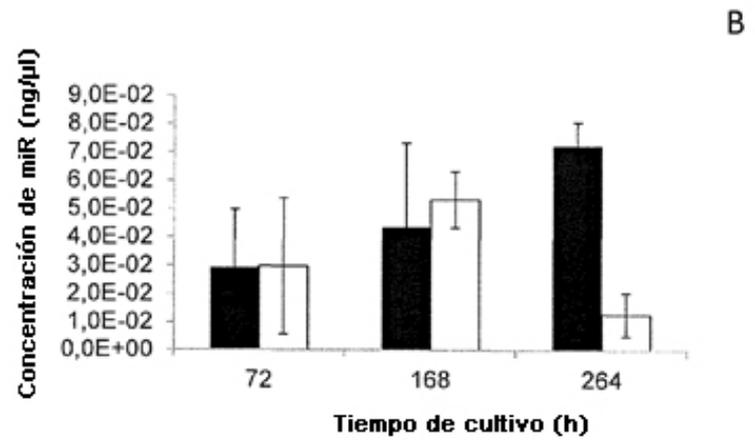
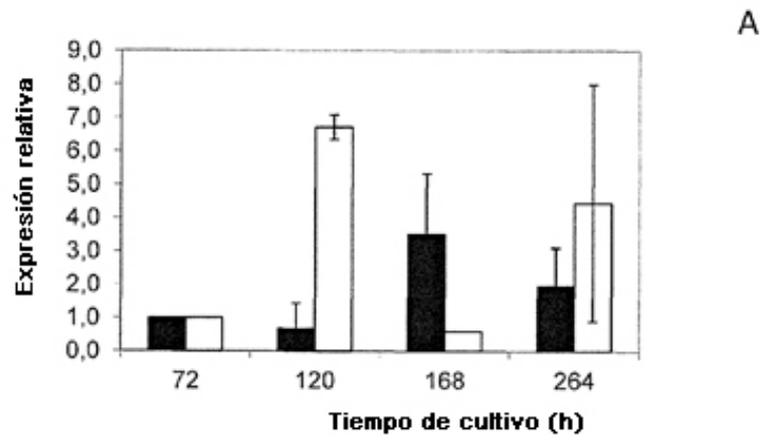


Figura 5

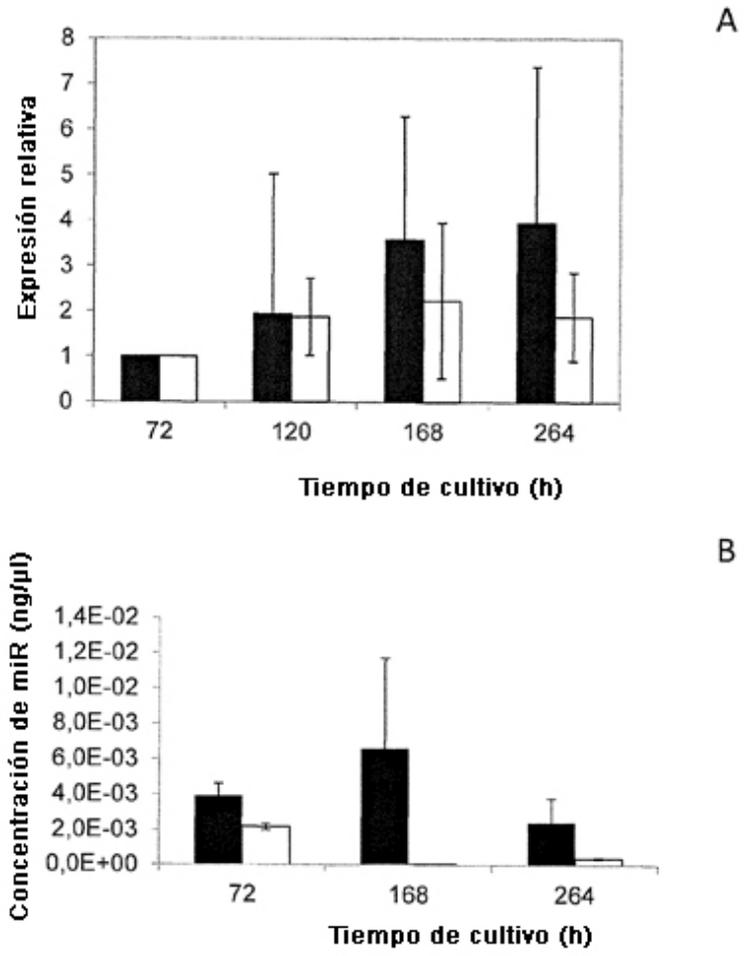


Figura 6

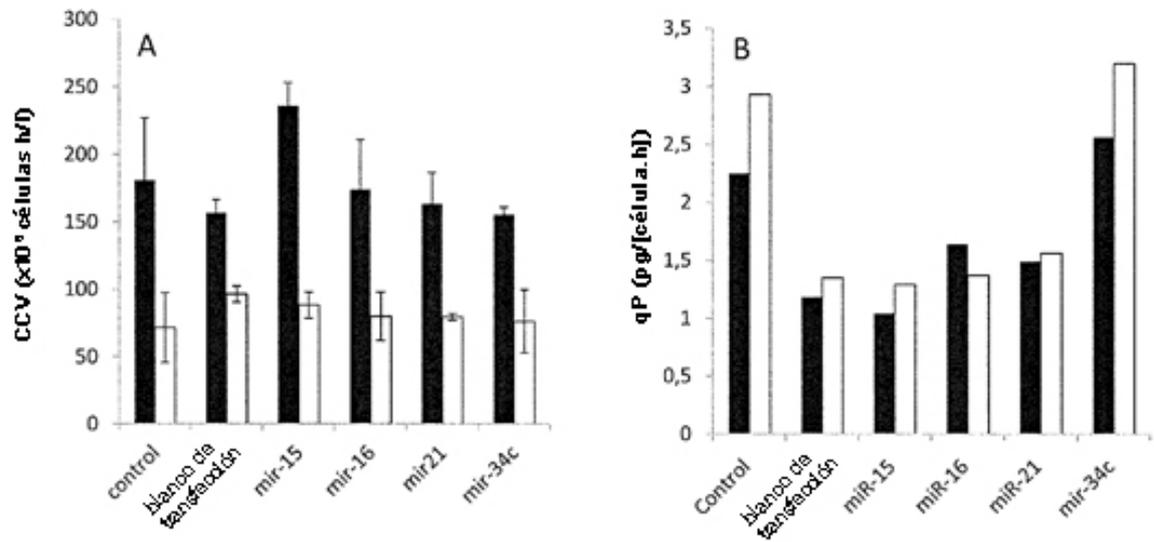


Figura 7

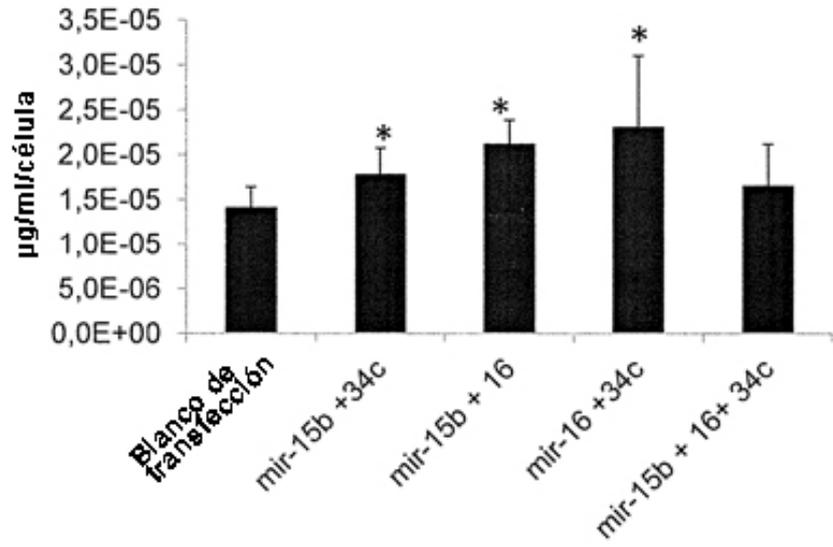


Figura 8

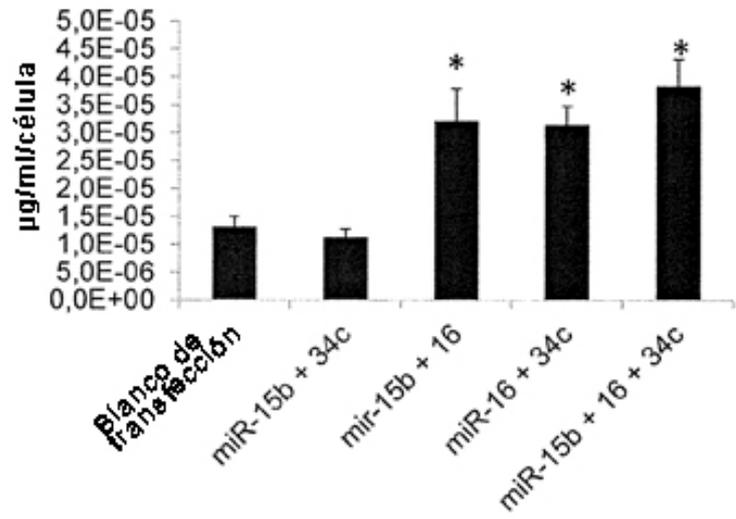
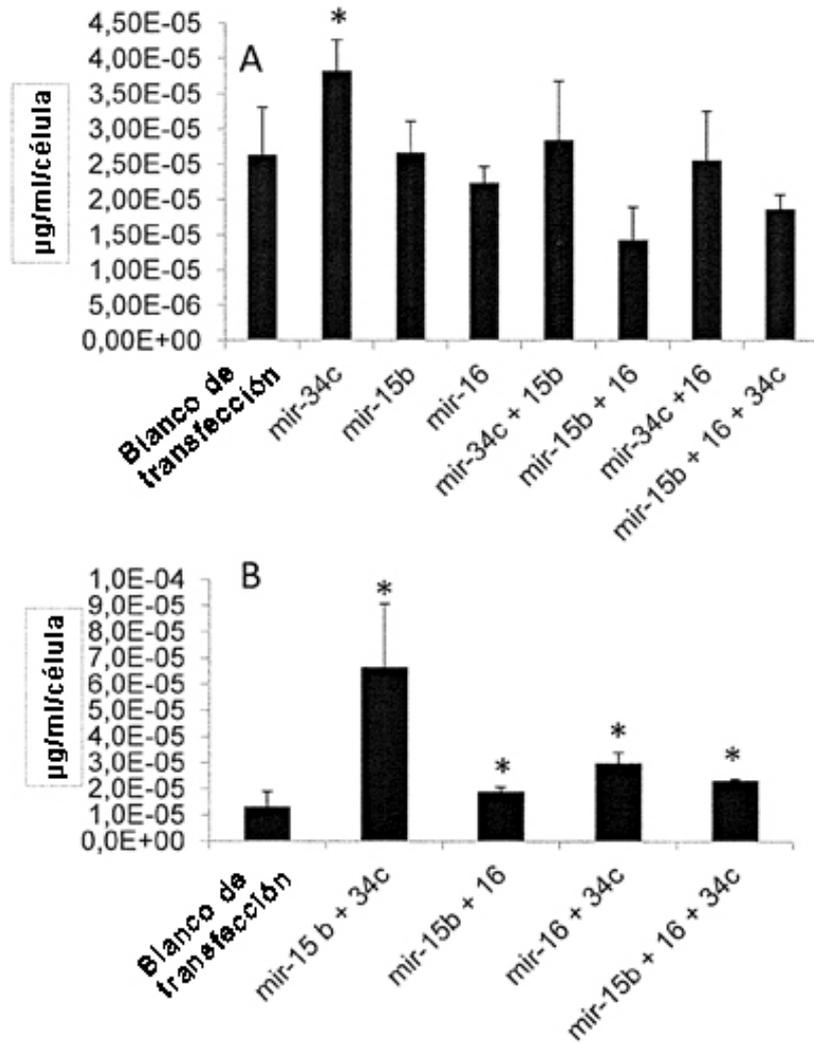


Figura 9



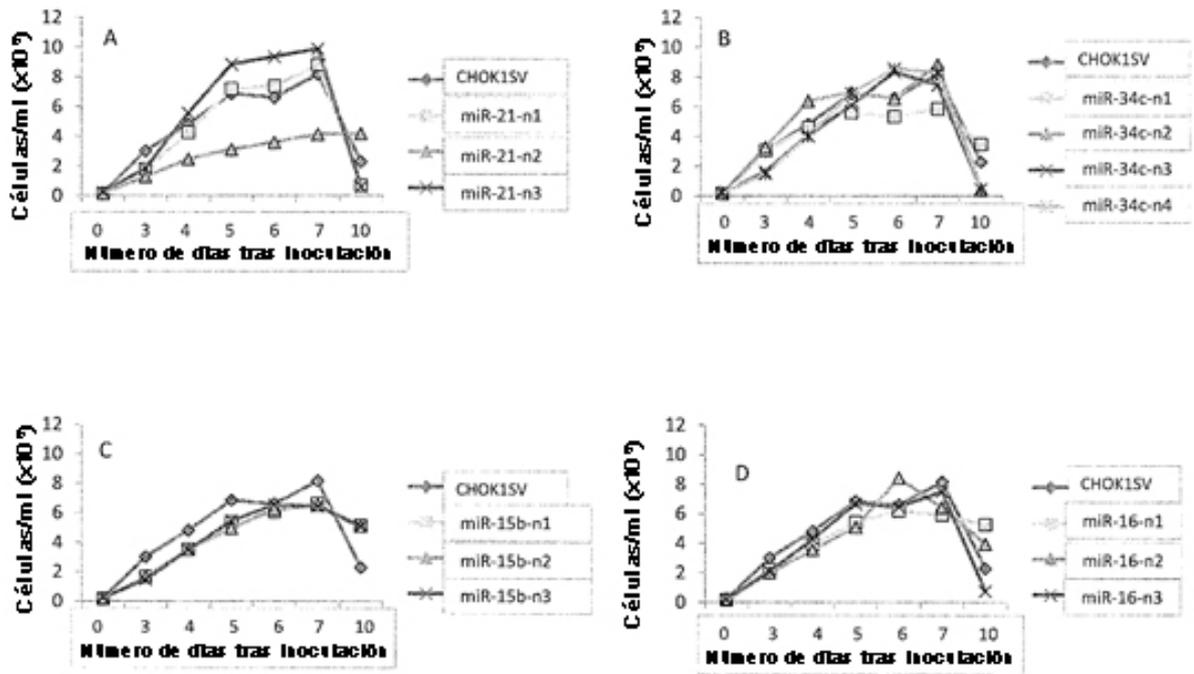


Figura 10

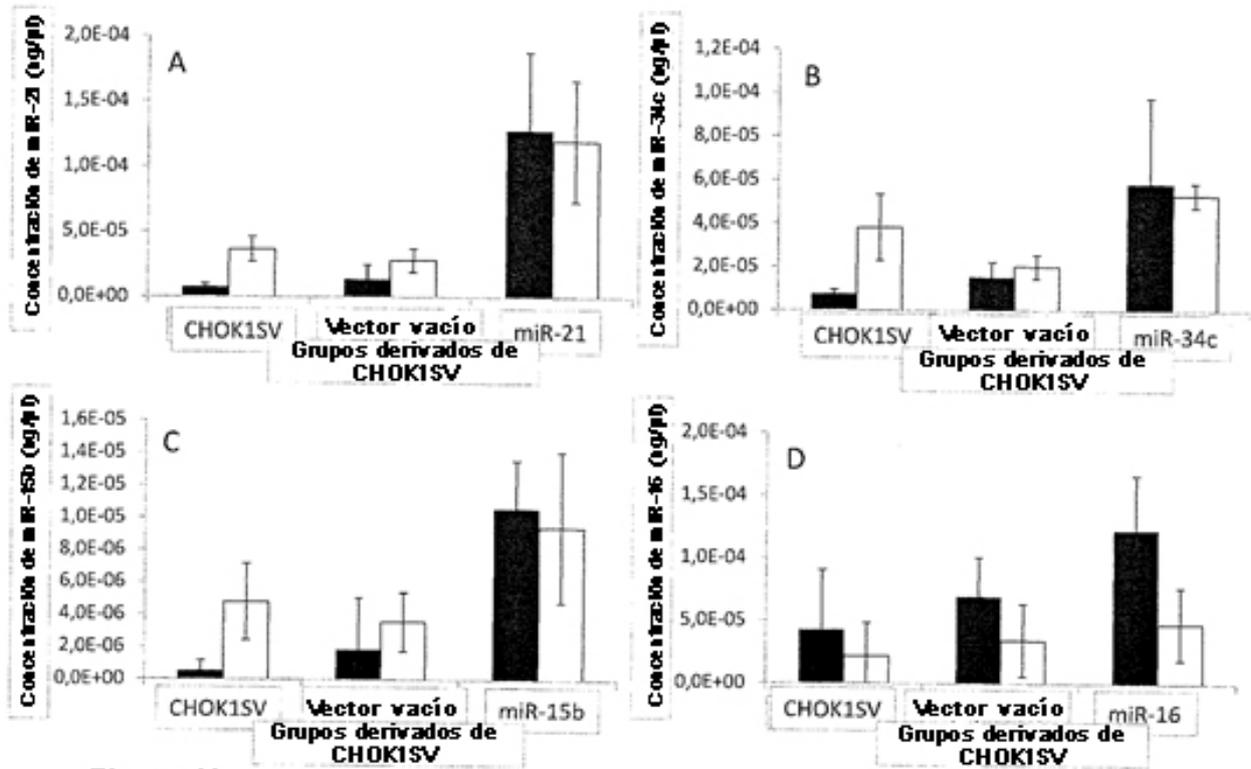


Figura 11

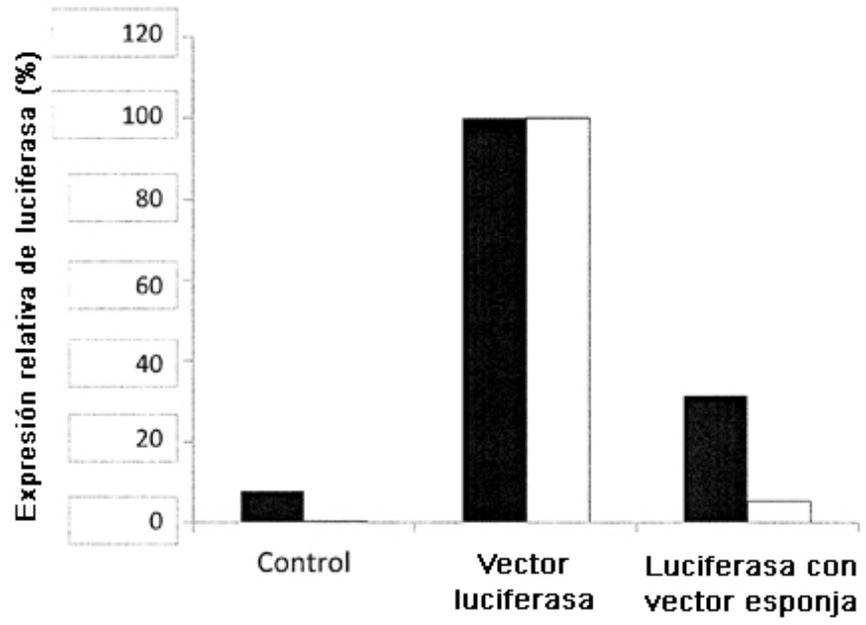


Figura 12