

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 506**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/67 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/16 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2014** **PCT/US2014/024512**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014** **WO14159633**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2014** **E 14776495 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019** **EP 2971035**

54 Título: **Producción de polipéptidos recombinantes**

30 Prioridad:

14.03.2013 US 201361782180 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2020

73 Titular/es:

MEDIMMUNE, LLC (100.0%)
One MedImmune Way
Gaithersburg, MD 20878, US

72 Inventor/es:

STREICHER, KATIE;
JACOBS, JONATHAN;
GEORGANTAS III, ROBERT, W.;
GREENLEES, LYDIA;
RANADE, KOUSTUBH y
BOWEN, MICHAEL

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 743 506 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

Producción de polipéptidos recombinantes

1. Campo de la invención.

5 La invención se refiere a la producción de polipéptidos recombinantes. Más específicamente, la invención se refiere a la regulación de miARN para aumentar la productividad de líneas celulares productoras de polipéptidos recombinantes, por ejemplo, haciendo aumentar o disminuir los niveles de uno o más miARN.

2. Antecedentes

10 Se usan con frecuencia células de mamífero cultivadas para la producción de polipéptidos recombinantes. El cultivo de células de mamífero ofrece muchas ventajas sobre los sistemas no mamíferos, que incluyen, por ejemplo, el plegamiento de proteínas, el ensamblaje y la modificación postraducción adecuados. Sin embargo, todavía existen desafíos para mejorar la productividad de los cultivos de mamíferos a gran escala, incluidos, por ejemplo, desafíos relacionados con el nivel de crecimiento, el estrés celular y la tasa de traducción. En muchos procesos industriales de cultivo celular, las células se cultivan a alta densidad en un biorreactor a gran escala en forma de suspensión y, con frecuencia, las células proliferan más allá de sus condiciones óptimas de crecimiento. En estas condiciones, se puede desencadenar la apoptosis y, como resultado, la viabilidad celular y la productividad pueden disminuir. En consecuencia, muchas estrategias de optimización de la producción dependen de la prevención de la apoptosis y la alteración del metabolismo celular al mejorar las formulaciones de los medios y las condiciones de crecimiento. Investigaciones recientes sugieren que la productividad celular puede aumentarse alterando los patrones globales de expresión génica de moléculas clave, como los factores de transcripción, que regulan múltiples vías celulares críticas.

20 Los microARN (miARN) son pequeñas moléculas de ARN no codificantes de aproximadamente 22 nucleótidos que se encuentran en plantas y animales y son reguladores transcripcionales y postranscripcionales clave de la expresión génica. Los miARN funcionan mediante el emparejamiento de bases con secuencias complementarias dentro de las moléculas de ARNm, lo que con frecuencia resulta en silenciamiento génico y están involucrados en diversas vías biológicas en animales y plantas, incluidas las funciones reguladoras relacionadas con el crecimiento, desarrollo y diferenciación celular. Los miARN desempeñan un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis celular y la regulación de importantes vías celulares, como el crecimiento y la apoptosis. La expresión inadecuada de miARN se ha asociado con una serie de enfermedades, incluido el cáncer, donde pueden contribuir a la patogénesis al alterar numerosas proteínas y rutas simultáneamente.

30 La capacidad de un cambio en un solo miARN para afectar múltiples procesos fisiológicos indica que modificar la expresión de miARN en el cultivo celular de producción puede extender la fase productiva de crecimiento celular, generar títulos de anticuerpos más altos y aumentar la productividad (Sampson et al. (2007) "MicroRNA Let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt Lymphoma cells". Cancer Res 67(20): 9762-9770; Muller et al. (2008) "MicroRNAs as targets for engineering of CHO cell factories". Trends in Biotechnology 26(7): 359-365 y Barron et al. (2011) "Engineering CHO cell growth and recombinant polypeptide productivity by over expression of miR-7". Journal of Biotechnology 151(2): 204-11). En consecuencia, los investigadores han comenzado a examinar el papel de los microARN en cultivos de células de mamíferos, principalmente a través del análisis de las alteraciones en los miARN endógenos que se producen a lo largo del cultivo de producción (Muller et al. (2008) "MicroRNAs as targets for engineering of CHO cell factories". Trends in Biotechnology 26(7): 359-365; Barron et al. (2011) "Engineering CHO cell growth and recombinant polypeptide productivity by over expression of miR-7". Journal of Biotechnology 151(2): 204-11; Gammell et al. (2007) "Initial identification of low temperature and culture stage induction of MiARN expression in suspension CHO-K1 cells". Journal of Biotechnology 130: 213-218; y Hackl et al. (2010) "Next-generation sequencing of the Chinese hamster ovary microRNA transcriptome: Identification, annotation and profiling of microRNAs as targets for cellular engineering". Journal of Biotechnology 153(1-2): 62-75). Un pequeño número de estudios también ha explorado el efecto de los miR o anti-miR expresados ectópicamente en las células CHO (Barron et al., 2011; Meleady et al., 2011; Druz et al., 2011). Sin embargo, es necesaria una caracterización más cuidadosa de los efectos de MiARN alterado en las células CHO antes de que esta tecnología pueda implementarse rutinariamente para aumentar la producción de productos biológicos terapéuticos.

3. Resumen

50 En el presente documento se describe un método para producir un polipéptido recombinante en un cultivo de células de ovario de hámster chino (CHO) en donde las células CHO han reducido la actividad de miARN-let-7a. En una realización, la actividad de miARN-let-7a se reduce mediante un inhibidor de microARN. En una realización, el inhibidor de microARN incluye un inhibidor de oligonucleótido antisentido de miARN-let-7a. En otra realización, el cultivo de células CHO incluye células CHO que se transfectan con un inhibidor de oligonucleótido antisentido sintético de miARN-let-7a. En una realización, el inhibidor de oligonucleótidos se modifica químicamente para mejorar la resistencia a la nucleasa, para aumentar la resistencia a la escisión dirigida por miARN por RISC y/o para aumentar la afinidad de unión. En una realización, el cultivo de células CHO incluye células CHO que se transfectan con un vector de expresión que codifica el inhibidor de oligonucleótido antisentido de miARN-let-7a. El cultivo de células CHO

puede transfectarse de manera estable o transitoria con el inhibidor de oligonucleótido antisentido de miARN-let-7a. En otra realización, las células CHO incluyen genes genéticos miARN-let-7a.

Se usan células de ovario de hámster chino (CHO) en el método de la invención.

Los polipéptidos recombinantes adecuados incluyen anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos y proteínas que no son anticuerpos. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo se selecciona de anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos completamente humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos camelizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados con CDR, Fvs de cadena sencilla (scFv), Fvs unidos por disulfuro (sdFv), fragmentos Fab, fragmentos F(ab') y anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id). En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo incluye un isotipo seleccionado de IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY. En otra realización, el anticuerpo incluye un isotipo seleccionado de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

En otra realización, el polipéptido recombinante incluye una proteína no anticuerpo. En una realización, el polipéptido recombinante incluye una proteína de fusión. En otra realización, el polipéptido recombinante incluye un receptor. En una realización, el polipéptido recombinante incluye un ligando de una proteína de la superficie celular. En otra realización, la proteína de la superficie celular es un receptor. En otra realización, el polipéptido recombinante incluye una proteína secretada. En otra realización, el polipéptido recombinante incluye una enzima. En otra realización, el polipéptido recombinante incluye un mimético de armazón.

El cultivo celular tiene una productividad específica que aumenta al menos aproximadamente un 25% en comparación con un cultivo celular de control que no tiene actividad reducida de miARN-let-7a. En una realización, el cultivo celular tiene una productividad máxima determinada a una densidad celular viable máxima (VCD) que aumenta al menos aproximadamente un 25% en comparación con un cultivo celular de control que no tiene actividad reducida de miARN-let-7a. En una realización, el cultivo celular ha aumentado la productividad específica, donde el título de anticuerpo por célula viable aumenta en el cultivo celular en comparación con un cultivo celular de control que no tiene actividad reducida de miARN-let-7a.

En una realización, la expresión de al menos un mediador de la apoptosis, la traducción de proteínas o el metabolismo celular aumenta en el cultivo de células CHO cuando se compara con un cultivo de células de control que no tiene actividad reducida de miARN-let-7a. En una realización, la expresión de al menos un miARN-let-7a diana seleccionado de HMGA2, MYC, NF2, NIF, RAB40C y eIF4a aumenta en el cultivo celular en comparación con un cultivo celular de control que no tiene miARN- reducido actividad let-7a.

En una realización, las células de ovario de hámster chino (CHO) tienen una mayor actividad de un segundo microARN seleccionado de miR-10a, miR-21 y combinaciones de los mismos en comparación con un cultivo celular de control. En una realización, las células CHO se transfectan con un vector de expresión capaz de expresar miR-10a, miR-21 o una combinación de los mismos. En una realización, las células CHO tienen una actividad disminuida de un segundo microARN seleccionado de miR-16, miR-101, miR-145 y combinaciones de los mismos. En una realización, la actividad del segundo microARN se reduce por un segundo inhibidor de microARN. En una realización, el segundo inhibidor de microARN incluye un inhibidor de oligonucleótidos antisentido. En una realización, el cultivo de células CHO incluye células CHO que se transfectan con el segundo inhibidor de oligonucleótidos antisentido. En una realización, el segundo inhibidor de oligonucleótidos se modifica químicamente para mejorar la resistencia a la nucleasa, para aumentar la resistencia a la escisión dirigida por miARN por RISC y/o para aumentar la afinidad de unión. En una realización, el cultivo de células CHO incluye células que se transfectan con un vector de expresión que codifica el segundo inhibidor de oligonucleótidos antisentido.

También se describen líneas celulares de mamíferos configuradas para expresar un polipéptido recombinante, en donde la línea celular de mamíferos tiene actividad reducida de miARN-let-7a; sistemas de expresión que incluyen uno o más vectores que codifican un inhibidor de microARN antisentido de miARN-let-7a y una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína recombinante; medios de cultivo celular que incluyen un inhibidor antisentido de miARN-let-7a; y polipéptidos recombinantes producidos a partir de un cultivo celular de mamífero que incluye células de mamífero transfectadas con un inhibidor de microARN antisentido de miARN-let-7a.

4. Breve descripción de los dibujos.

La Figura 1 es un gráfico que muestra la productividad específica al final de la ejecución (Q_p) calculada como título/integral del VCD acumulativo e informada como mg/L/día célula acumulativo (CCD).

La Figura 2 es un gráfico que muestra la Q_p acumulativa en comparación con la Q_p máxima.

La Figura 3 es un gráfico que muestra el título de anticuerpos recombinantes (en relación con los niveles de referencia medidos en el día 2) de las líneas celulares CHO modificadas anti-miR-let-7a, anti-miR-143 y miR-10a medidas cada dos días.

La Figura 4 es un gráfico que muestra VCD (en relación con los niveles de referencia medidos en el día 0) medidos cada dos días en líneas celulares CHO modificadas anti-miR-let-7a, anti-miR-143 y miR-10a.

La Figura 5 es un gráfico que muestra el VCD relativo de dos líneas celulares productoras de anticuerpos medidas durante el ensayo por lotes alimentado de cultivos parentales transducidos con lentivectores anti-miR-let-7a o controles de vectores. Los resultados se muestran como niveles relativos de VCD en comparación con el valor inicial (día 0).

5 La Figura 6 es un gráfico que muestra títulos de anticuerpos recombinantes (en relación con la línea de base medida en el día 2) de cultivos y controles modificados con anti-miR-let-7a evaluados cada dos días.

La Figura 7 es una tabla que muestra el % de aumento en la Q_p acumulativa con respecto al control en dos líneas celulares que producen mAb recombinante.

10 La Figura 8 es un gráfico que muestra los cambios de pliegue en múltiples dianas de mRNA en células productoras de CHO evaluadas por PCR cuantitativa TaqMan en líneas celulares miR o anti-miR modificadas después de la inhibición de miR-let-7a en comparación con las líneas de control. Las barras representan la media $\pm$ DE.

Las Figuras 9 A y B. (A) muestran que se usaron mediciones densitométricas para calcular el cambio porcentual en la relación RAS/GAPDH después de la inhibición de miR-let-7a en comparación con el control. (B) es una transferencia Western que muestra los niveles de proteína de RAS y el control de carga GAPDH en líneas celulares parentales, de control y anti-miR-let-7a.

15 La Figura 10 es un diagrama de flujo que muestra los genes diana involucrados en múltiples vías celulares que incluyen proliferación/ciclo celular, apoptosis, resistencia al estrés, metabolismo y transcripción/traducción que se alteraron debido a la modulación de miR-let-7a en líneas celulares productoras de anticuerpos.

20 Figuras 11 A-C. (A) es una fotomicrografía representativa de células CHO transducidas con un lentivector que expresa un anti-miR y GFP que indica que las eficiencias de transducción se aproximan al 100%. (B) y (C) son histogramas representativos de FACS que muestran un cambio de 2 log en los valores de fluorescencia (RFP) en las células CHO transducidas con lentivirus en comparación con las células parentales.

25 Las Figuras 12 A y B son espectros de masas ESI desconvolucionados representativos de un anticuerpo monoclonal representativo de la línea parental, reduciendo la masa de HC y LC. LC 22895.9263 coincidente LC y HC (G0F) 50992.2014 coincidente G0F; 51154.2639 coincidente G1F; y 51316.1579 G2F correspondiente; y (B) anticuerpo de la línea modificada anti-miR-let-7a - reduciendo la masa de HC y LC. LC 22895.7493 coincidente LC y HC (G0F) 50992.7636 coincidente G0F y 51154.3954 coincidente G1F.

5. Descripción detallada

A. Revisión

30 Las realizaciones de la invención descrita en el presente documento se refieren a métodos para producir polipéptidos recombinantes en cultivo de células de ovario de hámster chino (CHO). Las líneas celulares CHO están diseñadas para reducir la actividad de miARN-let-7a para aumentar la productividad del polipéptido recombinante.

B. Definiciones

35 A menos que se defina lo contrario, los términos científicos y técnicos utilizados en el presente documento tendrán los significados que comúnmente entienden los expertos en la materia. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. En general, las nomenclaturas utilizadas en conexión con las técnicas de cultivo de células y tejidos, biología molecular y química e hibridación de proteínas y oligo- o polinucleótidos descritas en el presente documento son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica.

40 Se usan técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección, transducción viral). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se logra comúnmente en la técnica o como se describe aquí. Las técnicas y procedimientos se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. Ver, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)), que se incorpora aquí como referencia. Las nomenclaturas utilizadas en conexión con los procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica sintética y química farmacéutica y medicinal descritas en el presente documento son las bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Las técnicas estándar se utilizan para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración, por ejemplo, para el tratamiento de pacientes.

50 Como se usa de acuerdo con la presente divulgación, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se usa para modificar, por ejemplo, la cantidad de un ingrediente en una composición, concentración, volumen, temperatura del proceso, tiempo del proceso, rendimiento, rata de flujo, presión y rangos de los mismos, empleados en la descripción la invención. El término

"aproximadamente" se refiere a la variación en la cantidad numérica que puede ocurrir, por ejemplo, a través de procedimientos típicos de medición y manipulación utilizados para preparar compuestos, composiciones, concentrados o usar formulaciones; por error inadvertido en estos procedimientos; a través de diferencias en la fabricación, fuente o pureza de los materiales de partida o ingredientes utilizados para llevar a cabo los métodos, y otras consideraciones similares. El término "aproximadamente" también abarca cantidades que difieren debido al envejecimiento de una formulación con una concentración o mezcla inicial particular, y cantidades que difieren debido a mezclar o procesar una formulación con una concentración o mezcla inicial particular. Cuando se modifica por el término "aproximadamente", las reivindicaciones adjuntas a la misma incluyen dichos equivalentes.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido o grupo de polipéptidos que incluyen al menos un dominio de unión que se forma a partir del plegamiento de cadenas de polipéptidos que tienen espacios de unión tridimensionales con formas de superficie interna y distribuciones de carga complementarias a las características de un determinante antigénico de un antígeno. Un anticuerpo típicamente tiene una forma tetramérica, que comprende dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, cada par con una cadena "ligera" y una "pesada". Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman un sitio de unión de anticuerpos. Un anticuerpo puede ser oligoclonal, policlonal, monoclonal, quimérico, camelizado, injertado con CDR, multiespecífico, biespecífico, catalítico, humanizado, totalmente humano, antiidiotípico y anticuerpos que pueden marcarse en forma soluble o unida, así como fragmentos, incluidos fragmentos de unión a epítomos, variantes o derivados de los mismos, solos o en combinación con otras secuencias de aminoácidos. Un anticuerpo puede ser de cualquier especie. El término anticuerpo también incluye fragmentos de unión, que incluyen, entre otros, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ anticuerpo monocatenario (svFC), región variable dimérica (Diacuerpo) y región variable unida a disulfuro (dsFv). En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno. Los fragmentos de anticuerpos pueden fusionarse o no a otro dominio de inmunoglobulina que incluye, pero no se limita a, una región Fc o fragmento de la misma. El experto en la técnica apreciará además que se pueden generar otros productos de fusión que incluyen, pero no se limitan a, fusiones scFv-Fc, región variable (por ejemplo, VL y VH) - fusiones Fc y fusiones scFv-scFv-Fc. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

El término "secuencia de control", como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias de polinucleótidos que afectan o afectan la expresión y el procesamiento de secuencias de codificación a las que están conectadas. La naturaleza de tales secuencias de control puede diferir dependiendo del organismo huésped. En eucariotas, las secuencias de control pueden incluir promotores, potenciadores, intrones, secuencias de terminación de la transcripción, secuencias de señal de poliadenilación y regiones 5' y 3' no traducidas (UTR). El término "secuencias de control" como se usa en el presente documento incluye todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia no es necesaria, pero aún ventajosa, por ejemplo, secuencias líderes.

El término "gen" se usa ampliamente para referirse a cualquier ácido nucleico asociado con una función biológica. Por lo tanto, el término "gen" incluye secuencias de codificación y/o secuencias reguladoras requeridas para la expresión. El término "gen" también puede aplicarse a una secuencia genómica específica, así como a un ADNc o un ARNm codificado por esa secuencia genómica.

El término "gen heterólogo" se refiere a un gen que codifica un material biológico que no está en su entorno natural (es decir, ha sido alterado por la mano del hombre). Por ejemplo, un gen heterólogo puede incluir un gen de una especie introducida en otra especie. Un gen heterólogo también incluye un gen nativo de un organismo que ha sido alterado de alguna manera (por ejemplo, mutado, agregado en múltiples copias, vinculado a una secuencia promotora o potenciadora no nativa, etc.). Los genes heterólogos se distinguen de los genes endógenos en que las secuencias de genes heterólogos pueden unirse a elementos reguladores, como los promotores, que no se encuentran asociados naturalmente con el gen o con partes del cromosoma que no se encuentran en la naturaleza.

El término "célula huésped" significa una célula que puede o ha absorbido un ácido nucleico, tal como un vector, y soporta la replicación y/o expresión del ácido nucleico, y opcionalmente la producción de uno o más productos codificados. En una realización, el término "célula huésped" se refiere a una célula eucariota, tal como una célula de mamífero en un cultivo celular. En una realización más particular, las células huésped incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), riñón embrionario humano (HEK 293 y derivados tales como células 293T, 293H), células Vero, células de riñón de hámster bebé (BHK), células HeLa, células de riñón de mono CV1, células de riñón canino Madin-Darby (MDCK), células 3T3, líneas celulares de mieloma, células COS (por ejemplo, COS1 y COS7) PC12, células WI38. El término célula huésped también abarca combinaciones o mezclas de células que incluyen, por ejemplo, cultivos mixtos de diferentes tipos de células o líneas celulares.

El término "introducido" cuando se refiere a un ácido nucleico heterólogo o aislado se refiere a la incorporación de un ácido nucleico en una célula eucariota donde el ácido nucleico puede incorporarse al genoma de la célula (por ejemplo, cromosoma, plásmido, plastidio o ADN mitocondrial), convertido en un replicón autónomo, o expresado de forma transitoria (por ejemplo, ARNm transfectado). El término incluye métodos tales como "infección", "transfección", "transformación" y "transducción". Se conocen una variedad de métodos y pueden emplearse para introducir ácidos nucleicos en células de mamífero.

El término "aislado" cuando se usa en el presente documento en relación con un material biológico, tal como un ácido nucleico o una proteína, se refiere a un material biológico que se ha aislado de su entorno natural. El polinucleótido "aislado" puede referirse a genómico, ADNc o un polinucleótido sintético. Los polinucleótidos aislados pueden estar operativamente unidos a otro polinucleótido al que no está unido en la naturaleza. El término "aislado", cuando se usa en relación con una proteína, se refiere a una proteína que se ha aislado de su entorno natural. Las proteínas aisladas pueden derivarse de ADN genómico, ADNc, ADN recombinante, ARN recombinante u origen sintético o alguna combinación de los mismos.

El término "mAb" se refiere a un anticuerpo monoclonal.

El término "natural" se refiere a un material biológico que está presente en un organismo, por ejemplo, un polipéptido, polinucleótido o secuencia de microARN, en donde el material biológico no ha sido modificado intencionalmente por el hombre. El término "exógeno" se refiere a un material biológico que se origina desde el exterior de un organismo o que está presente en un organismo debido a una modificación intencional por parte del hombre, que incluye, por ejemplo, la modificación del organismo para expresar el material biológico.

Los términos "ácido nucleico", "oligonucleótido" y "polinucleótido" se refieren a polímeros de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos monocatenarios o bicatenarios, o quimeras o análogos de los mismos. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácidos nucleicos abarca secuencias complementarias, además de la secuencia indicada explícitamente. Los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos que generalmente tiene una longitud de hasta aproximadamente 200 bases, por ejemplo, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 bases.

El término "unido operativamente", como se usa en el presente documento, se refiere a posiciones de componentes que están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Por ejemplo, una secuencia de control "operativamente unida" a una secuencia de codificación está conectada de tal manera que la expresión de la secuencia de codificación se logra en condiciones compatibles con las secuencias de control.

Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en todas partes y se refieren a una molécula que comprende dos o más residuos de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" pueden referirse a proteínas con anticuerpos y sin anticuerpos. Las proteínas que no son anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, proteínas tales como enzimas, receptores, ligandos de una proteína de la superficie celular, proteínas secretadas y proteínas de fusión o fragmentos de las mismas. Las proteínas que no son anticuerpos tienden a tener un peso molecular más bajo que las proteínas de anticuerpos. El polipéptido puede o no estar glicosilado. La proteína puede o no fusionarse con otra proteína. Los péptidos, polipéptidos y proteínas también pueden incluir modificaciones tales como, pero sin limitación, glicosilación, unión de lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de residuos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP-ribosilación. Los polipéptidos pueden ser de interés científico o comercial, incluidos los medicamentos basados en proteínas. Los polipéptidos incluyen, entre otras cosas, anticuerpos y proteínas quiméricas o de fusión.

Un "promotor" o "secuencia promotora" es una región reguladora de ADN capaz de iniciar la transcripción de una secuencia de ácidos nucleicos a la que está operativamente unida, cuando las enzimas relacionadas con la transcripción apropiadas, por ejemplo, ARN polimerasa, están presentes en condiciones, por ejemplo, cultivo o condiciones fisiológicas, por lo que las enzimas son funcionales. Un promotor puede estar presente corriente arriba o corriente abajo de la secuencia de ácidos nucleicos cuya transcripción inicia. Un sitio de inicio de la transcripción se encuentra típicamente dentro o adyacente a la secuencia promotora, así como dominios de unión a proteínas (secuencias de consenso) que promueven, regulan, mejoran o son responsables de la unión de la ARN polimerasa.

El término "recombinante" se refiere a un material biológico, por ejemplo, un ácido nucleico o proteína, que ha sido alterado artificial o sintéticamente (es decir, de forma no natural) por intervención humana.

Como se usa en el presente documento, "sustancialmente puro" se refiere a un material biológico que es la especie predominante presente (por ejemplo, sobre una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición). En una realización, una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que el material biológico incluye al menos aproximadamente 50% (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Generalmente, una composición sustancialmente pura incluirá más de aproximadamente 80% de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, o más de aproximadamente 85%, más de aproximadamente 90%, más de aproximadamente 95% o más de aproximadamente 99%. En una realización, el material biológico se purifica a una homogeneidad esencial (las especies contaminantes no se pueden detectar en la composición mediante métodos de detección convencionales) y la composición incluye esencialmente una sola especie macromolecular.

El término "transfección" se refiere a la introducción de ADN extraño en las células. Los términos "transfectar" y "transformar" (y equivalentes gramaticales, como "transfectado" y "transformado") se usan indistintamente. El término "transfección estable" o "transfectado establemente" se refiere a la introducción e integración de ADN extraño en el genoma de la célula transfectada. El término "transfección transitoria" o "transfectado transitoriamente" se refiere a la introducción de ADN extraño en una célula donde el ADN extraño no se integra en el genoma de la célula transfectada. En la transfección transitoria, el ADN extraño puede persistir en el núcleo de la célula transfectada durante varios días,

durante los cuales el ADN extraño está sujeto a los controles reguladores que rigen la expresión de genes endógenos en los cromosomas.

El término "vector" se refiere a un ácido nucleico, por ejemplo, un plásmido, vector viral, ácido nucleico recombinante o ADNc que puede usarse para introducir secuencias de ácido nucleico heterólogo en una célula. Un "vector de expresión" es un vector, tal como un plásmido, que es capaz de promover la expresión, por ejemplo, la transcripción, de un ácido nucleico incorporado en el mismo. Típicamente, el ácido nucleico que se va a expresar está "operativamente unido" a un promotor y/o potenciador, y está sujeto al control regulador de la transcripción por parte del promotor y/o potenciador.

C. MicroARN

Los microARN (miR, miARN) son una clase de ARN pequeños no codificantes de origen natural de aproximadamente 17 y aproximadamente 27 nucleótidos de longitud, entre aproximadamente 19 y aproximadamente 25 nucleótidos de longitud, o entre aproximadamente 21 y aproximadamente 23 nucleótidos en longitud, con frecuencia 22 nucleótidos de longitud que se expresan en células de mamíferos. Los miARN pueden regular negativamente la expresión génica en mamíferos uniéndose a secuencias imperfectamente complementarias en la región 3' no traducida (UTR) del ARN mensajero diana (ARNm) e inhibiendo la traducción del ARNm, por ejemplo, evitando la unión al ribosoma, la represión de traducción, la desadenilación o induciendo o acelerando la degradación de ARNm (Ambros, V. (2001) microRNAs: tiny regulators with great potential. Cell 107(7): 823-6; Buckingham, S. (2003) The major world of microRNAs, Horizon Symposia: Understanding the RNAissance Nature Publishing Group, Nature, 1-3; He et al. (2009) Let-7a elevates p21WAF1 levels by targeting of NIFB and suppresses the growth of A549 lung cancer cells. FEBS Letters 583: 3501-3507). Los miARN regulan una amplia gama de procesos biológicos, incluidos el tiempo de desarrollo, la apoptosis, la diferenciación, la proliferación celular y el metabolismo, y tanto la regulación positiva como la regulación negativa de los miARN se han implicado en una variedad de afecciones patológicas. Los miARN con frecuencia forman familias de múltiples genes con dianas comunes de ARNm.

Los nombres de microARN se asignan usando el prefijo "mir" o "miR" y seguidos de un guion y un número. El prefijo "mir" sin mayúscula generalmente se refiere al pre-miARN, mientras que el prefijo "miR" con mayúscula generalmente se refiere a la forma madura. Los miARN con secuencias casi idénticas, excepto uno o dos nucleótidos, generalmente se anotan con una letra minúscula adicional.

Los miARN se transcriben en el núcleo como grandes precursores de la horquilla de ARN llamados pri-miARN. Los pri-miARN se procesan en el núcleo mediante un complejo microprocesador para generar intermedios bicatenarios denominados pre-miARN, que tienen aproximadamente 70 nucleótidos de longitud. Los pre-miARN se exportan luego al citoplasma, donde se ensamblan en complejos de proteína-ARN citoplasmáticos denominados complejos silenciadores inducidos por ARN (RISC). El miARN monocatenario unido al complejo se une al ARNm diana con secuencias que son al menos parcialmente complementarias al miARN. Un determinante clave de especificidad para el reconocimiento de miARN diana se basa en el emparejamiento de Watson-Crick de la región "semilla" en el miARN maduro (por ejemplo, dentro de los nucleótidos 2-7 o 2-8 del miARN maduro) al "sitio de coincidencia de semillas" en la diana 3'UTR del ARNm, dentro de la diana 5'UTR, o dentro de una porción de la región de codificación, que nuclea la interacción miARN: ARNm diana. De esta manera, cada miARN puede regular de cientos a miles de especies de ARNm. Además, muchos miARN son miembros de familias altamente relacionadas que contienen semillas idénticas.

En el presente documento se describen miARN que se usan en relación con la producción de polipéptidos recombinantes en un cultivo de células de mamífero. En un ejemplo, se produce un polipéptido recombinante usando células de mamífero que tienen actividad modificada para miARN que están involucradas en la apoptosis, la traducción de proteínas, el metabolismo celular, la proliferación celular y/o la respuesta al estrés. En un ejemplo, las células de mamífero o el cultivo celular tienen una mayor actividad o expresión de un miARN particular implicado en la apoptosis, la traducción de proteínas, el metabolismo celular, la proliferación celular y/o la respuesta al estrés. En otro ejemplo, las células de mamífero o el cultivo celular tienen una actividad o expresión disminuida de un miARN particular implicado en la apoptosis, la traducción de proteínas, el metabolismo celular, la proliferación celular y/o la respuesta al estrés.

En un ejemplo de la divulgación, las células de mamíferos están diseñadas para aumentar o disminuir la actividad de miARN. Como se usa en el presente documento, "actividad de miARN" se refiere a la capacidad de miARN para regular procesos biológicos, tales como el tiempo de desarrollo, apoptosis, diferenciación, proliferación celular y metabolismo mediante la unión al ARN mensajero diana. La actividad de miARN de un miARN particular puede aumentarse, por ejemplo, aumentando la cantidad de ese miARN particular presente en la célula o cultivo celular. Por ejemplo, se conocen métodos para aumentar la expresión de miARN en una célula, que incluyen, pero no se limitan a, la transfección precursora de miARN, que incluye la transfección de pri-miARN o pre-miARN, la transfección de oligonucleótidos de miARN y la sobreexpresión de miARN basada en vectores. de vectores virales y la generación de animales transgénicos. Por ejemplo, la actividad de miARN de un miARN particular puede aumentarse transfectando una célula o cultivo celular con un oligonucleótido de miARN monocatenario o con un vector de expresión que codifica el oligonucleótido de miARN o precursor del mismo. En un ejemplo, la célula se transfecta con un oligonucleótido de miARN sintético. En algunos casos, el oligonucleótido de miARN sintético incluye una o más modificaciones químicas,

por ejemplo, para mejorar la resistencia a la nucleasa, para aumentar la resistencia a la escisión dirigida por miARN por RISC y/o para aumentar la afinidad de unión. En algunos ejemplos, el oligonucleótido de miARN puede conjugarse con un agente de direccionamiento para facilitar la absorción del oligonucleótido por las células. En una realización, las células CHO que tienen actividad de miARN-let-7a reducida se modifican para aumentar la actividad de uno o más miARN seleccionados de miR-10a [SEQ ID NO: 1 (uaccugugaucggaauuugug)], miR-21 [SEQ ID NO: 2 - uagcuuacagacugauguuga] y sus combinaciones. En otra alternativa, las células se modifican para sobreexpresar uno o más miARN seleccionados entre miR-10a, miR-21 y combinaciones de los mismos. En una realización, las células CHO que tienen actividad de miARN-let-7a reducida se modifican para sobreexpresar uno o más miARN seleccionados de miR-10a, miR-21 y combinaciones de los mismos al menos aproximadamente 10 veces, 25 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces, 1000 veces y hasta aproximadamente 1100 veces, 1200 veces, 1300 veces, 1400 veces, 1500 veces o más en comparación con una línea celular que no se ha modificado para sobreexpresar uno o más de estos miARN. En una realización más particular, las células se transfectan, de forma estable o transitoria, con un vector capaz de expresar miR-10a y/o miR-21.

Como alternativa, la actividad de miARN de un miARN particular puede inhibirse o disminuirse, por ejemplo, disminuyendo la cantidad de ese miARN particular presente en la célula o cultivo celular. Los métodos para disminuir la cantidad de un miARN particular presente en una célula o cultivo celular incluyen inactivaciones genéticas o el uso de inhibidores de miARN. En un ejemplo, la actividad de un miARN particular disminuye al cultivar una o más células genéticamente modificadas en las que el gen endógeno que codifica el miARN particular ha sido eliminado (es decir, el gen que codifica el miARN ha sido reemplazado o alterado). Se conocen métodos para generar bloqueos genéticos. En otra alternativa, la actividad de un miARN particular en una célula o cultivo celular disminuye al cultivar la célula o cultivo celular en presencia de inhibidor de miARN. Como se usa en el presente documento, el término "inhibidor de miARN" se refiere a una molécula que puede suprimir la regulación de miARN de la expresión del gen diana, por ejemplo, una molécula que puede suprimir la actividad de miARN nativa o endógena. En un ejemplo, las células de mamífero se transfectan, de forma estable o transitoria, con un vector de expresión que codifica un inhibidor de miARN o precursor del mismo. En otro ejemplo, una célula de mamífero o cultivo celular puede transfectarse con un oligonucleótido inhibidor de miARN antisentido monocatenario. En una alternativa, el oligonucleótido es un oligonucleótido sintético. En algunos ejemplos, el oligonucleótido sintético incluye una o más modificaciones químicas, por ejemplo, para mejorar la resistencia a la nucleasa, para aumentar la resistencia a la escisión dirigida por miARN por RISC y/o para aumentar la afinidad de unión. En un ejemplo, el oligonucleótido de miARN puede conjugarse con un agente de direccionamiento para facilitar la absorción del oligonucleótido por las células.

En un ejemplo, el inhibidor de miARN incluye un oligonucleótido antisentido anti-miARN (anti-miR) que es capaz de unirse estrechamente y de ese modo secuestrar el miARN en competencia con los ARNm diana celulares, lo que conduce a la inhibición funcional del miARN. Debido a que muchos miARN son miembros de familias altamente relacionadas que contienen semillas idénticas, un solo anti-miR puede bloquear la función de más de un miARN en una familia. El anti-miR puede incluir una sola unidad antisentido. Alternativamente, el anti-miR incluye múltiples unidades antisentido diseñadas en un solo oligonucleótido que puede silenciar simultáneamente múltiples miARN diana. En otra alternativa más, se puede cotransfectar más de un anti-miR para atacar varias isoformas o miembros de la familia. En otra alternativa más, se puede cotransfectar más de un anti-miR para apuntar a más de un microARN. Se conocen modificaciones químicas para mejorar la resistencia a la nucleasa, para aumentar la resistencia a la escisión dirigida por miARN por RISC y/o para aumentar la afinidad de unión del oligonucleótido antisentido al miARN, e incluyen, por ejemplo, modificaciones enlaces azúcar, base o internucleótido. Un ejemplo de un anti-miR modificado químicamente es un inhibidor monocatenario que contiene azúcares 2'-O-metil ribosa. Los oligonucleótidos de 2'-O-metilo son resistentes a la escisión por RISC y otras nucleasas y forman dúplex de ARN: ARN más termodinámicamente estables en comparación con los oligonucleótidos antisentido no modificados. En otro ejemplo, el inhibidor puede incluir un oligorribonucleótido modificado con 2'-O-metilo monocatenario que tiene múltiples unidades antisentido manipuladas en un solo fragmento que puede silenciar simultáneamente múltiples miARN diana. Otras modificaciones químicas incluyen modificaciones 2'-O-metoxietilo y 2'-fluoro en la posición 2' del resto azúcar. En otro ejemplo, el anti-miR puede incluir la modificación del anillo de furanosa en la cadena principal de fosfato de azúcar (a veces denominado "ácido nucleico bloqueado"). La resistencia a la nucleasa también se puede mejorar mediante la modificación del esqueleto del enlace del fosfodiéster original en enlaces de fosforotiato (PS) en los que un átomo de azufre reemplaza a uno de los átomos de oxígeno no puente en el grupo fosfato o mediante el uso de oligómeros de morfolino en los que un anillo de morfolina de seis miembros anillo reemplaza el resto de azúcar.

En otro ejemplo, el inhibidor de miARN puede incluir tecnología de "esponja" de miARN, que puede usarse para la inhibición transitoria y/o estable de miARN en células cultivadas, incluidas familias de semillas de miARN completas. Una esponja de miARN es un vector de expresión que puede usarse para transfectar células de mamífero y expresar secuencias antisentido de miARN que incluyen múltiples (es decir, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 10 o entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20) sitios de unión de miARN que son complementarios a uno o más MiARN diana. Cuando un vector que codifica una esponja de miARN se transfecta en células cultivadas, el ARN expresado por la esponja compite con el ARNm endógeno para unirse al microARN particular, por lo que puede desreprimir los ARNm diana de microARN. En un ejemplo, se puede usar una esponja única para bloquear una familia completa de semillas de microARN.

En otro ejemplo, el inhibidor de miARN incluye un oligonucleótido antisentido de enmascaramiento de miARN (máscara de miR). El oligonucleótido antisentido de enmascaramiento de miARN puede incluir un oligonucleótido monocatenario (por ejemplo, un oligorribonucleótido modificado con 2'-O-metilo modificado químicamente) que, en lugar de interactuar directamente con el miARN diana, es completamente complementario y se une a un sitio de unión del miARN particular en el 3' UTR del ARNm diana. De esta manera, la máscara miR bloquea el acceso del miARN diana al sitio de unión para desreprimir el gen diana. En otro ejemplo, el inhibidor puede incluir una combinación de las tecnologías mencionadas anteriormente. Por ejemplo, la tecnología de esponja/miR-mask combina el principio de acción de la esponja miARN y las tecnologías de miR-mask para apuntar a los miARN.

En una realización, las células CHO con actividad reducida de MiARN-let-7a tienen además actividad reducida de uno o más miARN seleccionados de seleccionados entre miR-16 [SEQ ID NO: 4 (uagcagcacguaaaauuggcg)], miR-101 [SEQ ID NO: 5 (uacaguacugugauaacugaa)], miR-145 [SEQ ID NO: 6 (guccaguuuucccaggaaucuccu)], miR-143 [SEQ ID NO: 7 (ugagaugaagcacuguagcuc)] y sus combinaciones. En una realización, las células subexpresan uno o más miARN seleccionados entre miR-let-7a, miR-16, miR-101, miR-145, miR-143 y combinaciones de los mismos. En una realización, las células incluyen bloqueos genéticos de uno o más miARN seleccionados entre miR-let-7a, miR-16, miR-101, miR-145, miR-143 y combinaciones de los mismos. En otra realización, las células se transfectan, de manera estable o transitoria, con un vector capaz de expresar uno o más inhibidores anti-miR seleccionados de anti-miR-let7a [SEQ ID NO: 8 (ACTATACAACCTACTACCTCA)], anti-miR-16 [SEQ ID NO: 9 (CGCCAATATTTACGTGCTGCTA)], anti-miR-101 [SEQ ID NO: 10 (TTCAGTTATCACAGTACTGTA)], anti-miR-145 [SEQ ID NO: 11 (AGGGATTCTGGGAAACTGGAC) guccaguuuucccaggaaucuccu] miR-143 [SEQ ID NO: 12 (GAGCTACAGTGCTTCATCTCA)] y sus combinaciones. La actividad de miARN se puede cuantificar mirando los ARNm diana a nivel de proteína y ARN. Por ejemplo, se pueden utilizar ensayos informadores para determinar la actividad de miARN, como GFP o Luciferasa con un sitio de miARN en la construcción 3'UTR. En un ejemplo, uno o más inhibidores anti-miR seleccionados de anti-miR-let7a, anti-miR-16, anti-miR-101, anti-miR-145, miR-143 o una combinación de los mismos se sobreexpresa al menos aproximadamente 10 veces, 25 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces, 1000 veces y hasta aproximadamente 1100 veces, 1200 veces, 1300 veces, 1400 veces, 1500 veces o más en comparación con una línea celular que no ha sido modificada para expresar el inhibidor.

En otra realización, la actividad de al menos un mediador de la apoptosis, la proteína y/o el metabolismo celular aumenta o disminuye en un cultivo de células CHO que tiene una actividad reducida de MiARN-let-7a. En una realización, la actividad de uno o más miARN seleccionados de miR-10a, miR-21 y combinaciones de los mismos se incrementa en un cultivo celular que tiene actividad reducida de miARN-let-7a y/o actividad de uno o más miARN seleccionados miR-16, miR-101, miR-145, miR-143 y sus combinaciones disminuyen en un cultivo celular que tiene una actividad reducida de miARN-let-7a. En una realización, la expresión de al menos un miARN-let-7a diana aumenta en el cultivo celular que tiene una actividad reducida de miARN-let-7a. En una realización, se selecciona al menos un miARN-let-7a diana entre HMGA2, MYC, NF2, NIFR, RAB40C y eIF4a. Los métodos para medir la expresión de ARNm son conocidos e incluyen, por ejemplo, PCR, protección de ARNasa, inmunotransferencia Southern e hibridación in situ.

En otra realización, la expresión de más de un miR puede ser alterada (aumentada o disminuida, independientemente), por ejemplo, la expresión de al menos 2, al menos 3, al menos 4 o hasta 5 miARN puede ser alterada dentro de una línea celular de mamífero para aumentar la productividad al abordar múltiples áreas a la vez. En una realización, la actividad de miR-let-7a puede disminuirse y la actividad de un segundo miR puede alterarse. En una realización, el segundo miR puede incluir miR-21, miR-10a y/o anti-miR-143.

D. Vectores

En una realización, se produce un polipéptido recombinante usando células CHO que tienen una actividad reducida de miARN-let-7a que se han transfectado, de forma estable o transitoria, con un vector capaz de expresar uno o más miARN o inhibidores de miARN que están implicados en apoptosis, traducción de proteínas, metabolismo celular, proliferación celular y/o respuesta al estrés. Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a la composición de la materia que se puede usar para administrar un ácido nucleico de interés al interior de una célula. Se conocen numerosos vectores que incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfífilos, plásmidos y virus. El término "vector" puede incluir un plásmido de replicación autónoma o un virus o un vector o plásmido que no se replica de forma autónoma. En una realización, el vector puede ser un polinucleótido de ARN desnudo, un polinucleótido de ADN desnudo, un ADN o ARN conjugado con poli-lisina, un ADN o ARN conjugado con péptidos, un ADN conjugado con liposomas, que no se replican de forma autónoma. En una realización, el vector es un oligonucleótido sintético. Se contempla que cualquier vector puede usarse para la transfección transitoria siempre que se exprese en el sistema apropiado y sea viable en el huésped. Para una transfección estable, el vector generalmente es replicable en el huésped. Se conocen grandes cantidades de vectores adecuados y están disponibles comercialmente.

En una realización, el vector incluye al menos un polinucleótido que codifica un miARN o un inhibidor de miARN, o un precursor del mismo, unido operativamente a un promotor. La frase "operativamente unido" significa que el promotor está en la ubicación y orientación correcta en relación con un polinucleótido para controlar el inicio de la transcripción por la ARN polimerasa y la expresión del polinucleótido. Como se usa en este documento, el término "secuencia

reguladora" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que controla algún aspecto de la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos que está operativamente unida a la secuencia reguladora. En algunos casos, la secuencia reguladora puede ser un promotor (es decir, un elemento regulador que facilita el inicio de la transcripción de una región de codificación operativamente unida) y en otros casos, la secuencia reguladora puede incluir una secuencia potenciadora y/u otro elemento regulador, como como sitios de unión a ribosomas, señales de empalme, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción y/o secuencias flanqueantes 5' no transcritas. Los promotores empleados en el vector pueden ser constitutivos o inducibles. Un promotor "constitutivo" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está operativamente unida a un polinucleótido que codifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula bajo la mayoría o todas las condiciones fisiológicas de la célula (es decir, un estímulo específico no es necesario). Un promotor "inducible" es un promotor que es capaz de dirigir un nivel de transcripción de una secuencia polinucleotídica operativamente unida en presencia de un estímulo (por ejemplo, choque térmico, productos químicos, luz, etc.) que es diferente del nivel de transcripción de la secuencia polinucleotídica operativamente unida en ausencia del estímulo. El elemento regulador puede ser "endógeno" o "exógeno" o "heterólogo". Un elemento regulador "endógeno" es uno que está naturalmente ligado a una secuencia particular de ácido nucleico. Un elemento regulador "exógeno" o "heterólogo" es uno que se coloca en yuxtaposición a una secuencia de ácidos nucleicos por medio de manipulación genética de modo que la transcripción de la secuencia de ácidos nucleicos se dirija por el elemento regulador unido.

Los ejemplos de promotores adecuados incluyen promotores conocidos por controlar la expresión de genes en células de mamíferos, que incluyen, pero no se limitan a, promotores virales tales como el promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV), el promotor de timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV-TK), promotor del virus simio 40 (SV40) o promotor LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV), pMC1, promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK), promotor U1 y promotor H6.

Además de codificar uno o más inhibidores de miARN o miARN, el vector también puede incluir genes marcadores seleccionables, genes informadores o genes que codifican un polipéptido recombinante de interés. Además, los vectores de expresión utilizados para la transfección estable pueden incluir uno o más sitios para la integración estable en un genoma de la célula huésped.

En una realización, el vector de expresión incluye uno o más marcadores seleccionables o genes informadores para evaluar la administración y la duración de la acción del vector in vitro. El término "marcador seleccionable" se refiere a un gen que codifica una enzima que tiene una actividad que confiere resistencia a un antibiótico u otro fármaco sobre la célula en la que se expresa el marcador seleccionable. Ejemplos de marcadores seleccionables incluyen, entre otros, adenosina desaminasa (ADA), aminoglucósidos fosfotransferasa, bleomicina, citosina desaminasa, dihidrofolato reductasa, histidinol deshidrogenasa, higromicina-B-fosfotransferasa, puromicina-N-acetil transferasa, timidina quinasa, xantina-guanina fosforibosiltransferasa, ampicilina, neomicina, kanamicina, zeocina y carbenicilina.

El término "gen indicador" se refiere a un gen que codifica una proteína cuya expresión se puede detectar fácilmente (por ejemplo, luminiscencia o fluorescencia). Ejemplos de genes informadores incluyen, pero no se limitan a, proteína fluorescente verde, luciferasa, cloranfenicol acetiltransferasa, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, RFP, YFP y BFP. En una realización, el vector de expresión es un vector viral, que incluye, pero no se limita a, vectores adenovirales, vectores de virus adenoasociados, vectores retrovirales, tales como vectores lentivirales o virus de la leucemia murina de Moloney, y vectores derivados del virus de la viruela, virus del herpes simple I. En otra realización, el vector de expresión es un vector no viral. Ejemplos de vectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, los siguientes vectores eucarióticos: pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, PXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia) y vectores pCS2 y sus derivados.

En una realización, se produce un polipéptido recombinante usando células CHO con células de actividad miARN-let-7a reducida que se han transfectado, de forma estable o transitoria, con uno o más vectores capaces de expresar uno o más miARN seleccionados de miR-10a, miR-21 y sus precursores o combinaciones de los mismos. En una realización más particular, se produce un polipéptido recombinante usando células CHO con actividad reducida de miARN-let-7a que se han transfectado, de manera estable o transitoria, con uno o más vectores capaces de expresar uno o más oligonucleótidos antisentido seleccionados de anti-miR-let7a, anti-miR-16, anti-miR-101, anti-miR-145, anti-miR-143 y sus precursores, o combinaciones de los mismos. En una realización, las células de mamífero se han transfectado, de manera estable o transitoria con uno o más vectores capaces de expresar al menos un miARN y al menos un inhibidor de miARN. En otra realización más, las células de mamífero se han transfectado con uno o más vectores capaces de expresar al menos un miARN y/o al menos un inhibidor de miARN en combinación con al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido recombinante de interés.

E. transfección

Los vectores descritos en este documento pueden introducirse en una célula huésped de mamífero usando métodos conocidos en la técnica. El término "transfección" se refiere a la introducción de material genético exógeno en las células para producir células genéticamente modificadas. Por ejemplo, un vector puede transferirse a una célula huésped por medios físicos, químicos o biológicos. Los métodos físicos para introducir un polinucleótido en una célula huésped incluyen, pero no se limitan a, precipitación con fosfato de calcio, lipofección (incluida la transfección mediada por liposomas cargados positivamente), bombardeo con partículas, microinyección, transfección mediada por DEAE-

dextrano y electroporación. Los métodos biológicos para introducir un vector en una célula huésped incluyen el uso de vectores de ADN y ARN, que incluyen, por ejemplo, vectores virales. Los medios químicos para introducir un polinucleótido en una célula huésped incluyen sistemas de dispersión coloidal, como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas.

En una realización, la célula huésped puede transfectarse de manera estable con el vector. El término "transfección estable" significa que la secuencia de nucleótidos en el vector puede integrarse en la secuencia de ADN completa de una célula de mamífero. Típicamente, para la transfección estable, una célula huésped se transfecta con un vector que incluye un marcador seleccionable. En una realización, el marcador seleccionable se coexpresa en el mismo vector que el miARN o el inhibidor de miARN o precursor del mismo. En otra realización, el marcador seleccionable se expresa en un vector cotransfectado separado. El crecimiento de las células transfectadas en presencia del agente de selección permite la subpoblación de células en las que el material genético exógeno se ha incorporado al genoma para que persista. Típicamente, la presión de selección se mantiene durante al menos aproximadamente 1 semana, al menos aproximadamente 2 semanas y hasta aproximadamente 3 semanas o hasta aproximadamente 1 mes. Al final del período de selección, las células que son viables en el medio selectivo habrán integrado el material genético exógeno del plásmido de expresión. La integración del material genético exógeno puede confirmarse por la presencia de un reportero y las células pueden expandirse para el cultivo a gran escala.

En otra realización, la célula huésped puede transfectarse transitoriamente con el vector. A diferencia de la transfección estable, el material genético transfectado transitoriamente solo se expresa en las células transfectadas durante un período de tiempo limitado y no se integra en el genoma de la célula huésped. En general, la transfección transitoria da como resultado la expresión del miARN, inhibidor anti-miR o precursor del mismo durante al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 48 horas, al menos aproximadamente 72 horas y hasta aproximadamente 96 horas.

F. Cultivo celular

El término "cultivo celular" se refiere al crecimiento y propagación de células fuera de un organismo o tejido multicelular. Las condiciones de cultivo celular tales como pH, temperatura, humedad, atmósfera y agitación se pueden variar para mejorar las características de crecimiento y/o productividad del cultivo celular. En general, los cultivos de células de mamífero se mantienen a un pH entre aproximadamente 6.5 y aproximadamente 7.5 a una temperatura de entre aproximadamente 36°C y aproximadamente 38°C, típicamente a aproximadamente 37°C y una humedad relativa de entre aproximadamente 80% y aproximadamente 95%. Los medios de cultivo de células de mamífero típicamente contienen sistemas de amortiguación que requieren una atmósfera de dióxido de carbono (CO₂) de entre aproximadamente 1% y aproximadamente 10%, típicamente entre aproximadamente 5% y aproximadamente 6%. Las células de mamífero pueden cultivarse en suspensión o mientras están unidas a un sustrato sólido. Las células de mamífero se pueden cultivar en cultivos a pequeña escala, por ejemplo, en un laboratorio en recipientes de 100 ml o en recipientes de 250 ml, que generalmente tienen un volumen dentro del recipiente que no excede el 40% del volumen total del recipiente, y generalmente alrededor del 25%. Alternativamente, los cultivos pueden ser a gran escala, por ejemplo, recipientes de 1000 ml, recipientes de 3000 ml, recipientes de 8000 ml y recipientes de 15000 ml, o en un biorreactor a gran escala, por ejemplo, en una instalación de fabricación, a volúmenes de hasta 1000 L, hasta 5000 L y hasta 10000 L. La producción a gran escala de polipéptidos recombinantes por células de mamífero puede incluir sistemas de cultivo continuo, discontinuo y alimentado. Las células de mamífero se pueden cultivar, por ejemplo, en biorreactores de lecho fluidizado, biorreactores de fibra hueca, botellas de rodillos, matraces de agitación o biorreactores de tanque agitado, con o sin microportadores, y se pueden operar en un lote, lote alimentado, continuo, semicontinuo o modo de perfusión. Los cultivos celulares a gran escala se mantienen típicamente durante días, o incluso semanas, mientras que las células producen los productos proteicos deseados.

Los métodos descritos en este documento pueden usarse para mejorar la producción de polipéptidos recombinantes tanto en procesos de cultivo de fase única como de fase múltiple. En una realización, el cultivo celular es un proceso de múltiples etapas en donde las células se cultivan primero en una fase de crecimiento, en condiciones ambientales que maximizan la proliferación y la viabilidad celular y luego se transfieren a una fase de producción, en condiciones que maximizan la producción de polipéptidos. Las fases de crecimiento y producción pueden estar precedidas o separadas por una o más fases de transición. En una realización, el cultivo celular es un proceso de múltiples etapas que tiene al menos una fase de crecimiento y al menos una fase de producción. En una realización, las células se incuban a una temperatura más alta durante la fase de crecimiento en comparación con la fase de producción. Por ejemplo, las células pueden cultivarse durante una fase de crecimiento a una primera temperatura entre aproximadamente 35°C y aproximadamente 38°C, y cultivarse durante una fase de producción a una segunda temperatura entre aproximadamente 29°C y aproximadamente 37°C, o entre aproximadamente 30°C a aproximadamente 36°C, o entre aproximadamente 30°C a aproximadamente 34°C. Además, durante la fase de producción se pueden agregar inductores químicos de la producción de proteínas, como por ejemplo cafeína, butirato y hexametilén bisacetamida (HMBA). En una realización, la actividad de un miARN o un inhibidor de miARN aumenta o disminuye durante la fase de producción. En una realización, la transcripción de un vector de expresión que codifica miARN o un inhibidor de miARN o precursor del mismo se induce durante la fase de producción. En otra realización, se agrega miARN o un vector u oligonucleótido de miARN, o inhibidor o precursor del mismo, a los medios de cultivo durante la fase de producción.

Las líneas celulares de mamífero (también denominadas "células huésped") pueden modificarse genéticamente para expresar un polipéptido recombinante, por ejemplo, un polipéptido de interés comercial o científico. La ingeniería genética de una línea celular generalmente implica transfectar, transformar o transducir las células con una molécula de polinucleótido recombinante, y/o alterarlo (por ejemplo, mediante recombinación homóloga y activación o fusión de genes de una célula recombinante con una célula no recombinante) para causar que la célula huésped exprese un polipéptido recombinante deseado. Se conocen métodos y vectores para la ingeniería genética de células y/o líneas celulares para expresar un polipéptido. Ejemplos de células de mamífero adecuadas para la producción de polipéptidos recombinantes incluyen, entre otras, células de ovario de hámster chino (CHO), mieloma de ratón (NS0), riñón embrionario humano (HEK 293), células de riñón de hámster bebé (BHK), células Vero, células HeLa, células Madin-Darby Canine Kidney (MDCK), células de riñón de mono CV1, células 3T3, líneas celulares de mieloma como NS0 y NS1, PC12, células WI38, células COS (incluidas COS-1 y COS-7), y C127. En una realización, la línea celular CHO con actividad reducida de miARN-let-7a expresa un nivel aumentado o disminuido de uno o más miARN. En una realización, las células de mamífero se transfectan, de manera estable o transitoria, con miARN heterólogo o un inhibidor anti-miARN como se describe con más detalle anteriormente. En una realización, las células CHO con actividad reducida de miARN-let-7a se transfectan con un inhibidor anti-miARN-let-7a.

Las células de mamífero se pueden mantener en una variedad de medios de cultivo celular. El término "medio de cultivo celular" se refiere a una solución nutritiva en la que crecen células, por ejemplo, células de mamífero. Las formulaciones de medios de cultivo celular son bien conocidas en la técnica. Típicamente, los medios de cultivo celular incluyen tampones, sales, carbohidratos, aminoácidos, vitaminas y oligoelementos esenciales. El medio de cultivo celular puede o no contener suero, peptona y/o proteínas. Los medios de cultivo celular pueden complementarse con concentraciones adicionales o aumentadas de componentes tales como aminoácidos, sales, azúcares, vitaminas, hormonas, factores de crecimiento, reguladores, antibióticos, lípidos, oligoelementos y similares, dependiendo de los requisitos de las células a ser cultivado y/o los parámetros de cultivo celular deseados. Varios medios de cultivo, que incluyen medios de cultivo sin suero y definidos, están disponibles comercialmente e incluyen, entre otros, Medio Mínimo Esencial (MEM, Sigma, St. Louis, MO); Medio F10 de Ham (Sigma); Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma); Medio esencial mínimo (MEM); Águila media basal (BME); RPMI-1640 Medio (Sigma); Medio de cultivo celular HyClone (HyClone, Logan, Utah); y medios definidos químicamente (CD), que están formulados para tipos de células particulares, por ejemplo, medio CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se pueden agregar componentes o ingredientes suplementarios, como los descritos anteriormente, a los medios disponibles comercialmente. En una realización, los medios de cultivo pueden incluir oligonucleótidos inhibidores de miARN o miARN o precursores de los mismos o vectores de expresión que codifican inhibidores de miARN o miARN o precursores de los mismos.

Los polipéptidos recombinantes expresados por el cultivo de células de mamífero pueden producirse intracelularmente o secretarse en el medio de cultivo del que pueden recuperarse y/o recogerse. Además, los polipéptidos recombinantes pueden purificarse, o parcialmente purificarse, del cultivo utilizando procesos y productos conocidos disponibles de vendedores comerciales. Los polipéptidos purificados pueden entonces "formularse", por ejemplo, intercambiarse con regulador, esterilizarse, envasarse a granel y/o envasarse para un usuario final.

Las características de producción de un cultivo celular se pueden determinar midiendo la densidad celular viable (VCD), el título de anticuerpos y la productividad, incluida la productividad específica (Qp), la productividad acumulativa y la productividad máxima evaluada en el VCD máximo.

El cultivo celular incluye células CHO que tienen actividad reducida de miARN-let-7a. En una realización, la actividad de miARN-let-7a se reduce mediante un inhibidor de microARN. En una realización, el inhibidor de microARN es un inhibidor de oligonucleótidos antisentido de miARN-let-7a. En una realización, las células CHO se transfectan con un vector de expresión replicable que codifica el inhibidor antisentido de miARN-let-7a. En otra realización, las células CHO se transfectan con un inhibidor oligonucleotídico de miARN-let-7a. En una realización, el inhibidor de oligonucleótidos se modifica químicamente, por ejemplo, para mejorar la resistencia a la nucleasa, para aumentar la resistencia a la escisión dirigida por miARN por RISC y/o para aumentar la afinidad de unión. En una realización, las células CHO que tienen miARN-let-7a reducido incluyen genes genéticos de miARN-let-7a.

El cultivo de células CHO tiene una productividad que aumenta al menos aproximadamente un 25% en comparación con un cultivo de células control que no tiene actividad reducida de miARN-let-7a. Como se usa en el presente documento, el término "productividad" se refiere a la concentración de polipéptido recombinante producido por un cultivo celular durante un período de tiempo definido. La productividad se puede evaluar en función de mediciones como el título, la densidad celular viable (VCD) y el % de viabilidad. Se conocen métodos para medir el título, el VCD y el % de viabilidad. En una realización, el cultivo celular tiene una productividad específica que aumenta al menos aproximadamente 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% y hasta aproximadamente el 100%; entre aproximadamente el 25% y aproximadamente el 100%; entre aproximadamente el 50% y aproximadamente el 75% en comparación con un cultivo celular de control que no tiene actividad reducida de miARN-let-7a.

En una realización, la productividad se refiere a una productividad específica (Yoon et al., (2006) Biphase culture strategy for enhancing volumetric erythropoietin productivity of Chinese hamster ovary cells. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 362-365; Baumann et al., (2008). Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins. *Biotechnology and Bioengineering* 100(1): 177-183; Brezinsky et al., (2003) A simple method for enriching populations of transfected CHO cells for cells of higher specific productivity.

Journal of Immunological Methods 277:141-155; Fox et al., (2003) Maximizing Interferon- γ production by Chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: experimental and modeling. Biotechnology and Bioengineering 85(2):177-184; Wurm, (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nature Biotechnology 22(11):1393-1398; Browne and Al-Rubeai, (2009) Selection methods for high-producing mammalian cell lines. In: Al-Rubeai M, editor. Cell Line Development, Series: Cell Engineering 6, Springer Science+Business Media B.V. p. 127-151). Como se usa en el presente documento, el término "productividad específica" se refiere a la proteína recombinante producida por célula viable en cultivo por día y puede calcularse como la pendiente de la concentración del producto (título) frente a la integral de la densidad celular viable acumulativa (mg/L/CCD). En una realización, el cultivo celular tiene una productividad específica que aumenta al menos aproximadamente 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% y hasta aproximadamente el 100%; entre aproximadamente el 25% y aproximadamente el 100%; entre aproximadamente el 50% y aproximadamente el 75% en comparación con un cultivo celular de control que no tiene actividad reducida de miARN-let-7a.

En una realización, la productividad se refiere a la "productividad máxima" determinada a la densidad celular viable máxima (VCD). Como se usa aquí, el término "productividad máxima" se refiere al nivel de productividad cuando el cultivo está en su VCD máximo y puede calcularse como el cambio en el título en el VCD máximo en comparación con el punto de tiempo anterior dividido por el cambio en el VCD entre el máximo y puntos de tiempo anteriores multiplicados por el número de días en cultivo desde el punto de tiempo 1 al punto de tiempo 2 dividido por el registro natural del VCD final sobre el VCD inicial. En una realización, la productividad máxima aumenta al menos aproximadamente un 25% en comparación con un cultivo celular de control que no tiene actividad reducida de miARN-let-7a. En una realización, el cultivo celular tiene una productividad máxima que es al menos aproximadamente 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175% o 200% o entre aproximadamente 25% y aproximadamente 200% en comparación con un cultivo celular de control que no ha reducido la actividad de miARN-let-7a.

En una realización, la productividad se refiere a la productividad acumulativa. Como se usa en el presente documento, el término "productividad acumulativa" se refiere a la productividad específica a lo largo de todo el ciclo de crecimiento y puede calcularse como la pendiente de la concentración del producto (título) versus la integral de la densidad celular viable acumulativa (mg/L/CCD) (Renard et al., (1988) Evidence that monoclonal antibody production kinetics is related to the integral of the viable cells curve in batch systems. Biotechnology Letters 10(2):91-96; Yoon et al., (2006) Biphasic culture strategy for enhancing volumetric erythropoietin productivity of Chinese hamster ovary cells. Enzyme and Microbial Technology 39:362-365; Li et al., (2010) Cell culture processes for monoclonal antibody production. mAbs 2(5):466-477; Breszinsky et al., (2003) A simple method for enriching populations of transfected CHO cells for cells of higher specific productivity. Journal of Immunological Methods 277:141-155; Fox et al., (2003) Maximizing Interferon- γ production by Chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: experimental and modeling. Biotechnology and Bioengineering 85(2):177-184). En una realización, el cultivo celular tiene una productividad acumulativa que aumenta al menos aproximadamente 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% y hasta aproximadamente el 100%; entre aproximadamente el 25% y aproximadamente el 100%; entre aproximadamente el 50% y aproximadamente el 75% en comparación con un cultivo celular de control que no tiene actividad reducida de miARN-let-7a.

En una realización, la productividad se refiere a la productividad específica del cultivo, es decir, el título del polipéptido recombinante por célula en un cultivo total en comparación con el título del polipéptido recombinante en un cultivo celular de control.

G. Polipéptidos recombinantes

El término "polipéptido recombinante", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido o proteína genéticamente modificado producido por una célula huésped cultivada. Como se usa en el presente documento, el término "heterólogo" se refiere a un polipéptido recombinante que es producido por una célula huésped que normalmente no expresa ese polipéptido. Sin embargo, un polipéptido heterólogo puede incluir polipéptidos que son nativos de un organismo, pero que se han alterado intencionalmente de alguna manera. Por ejemplo, un polipéptido heterólogo puede incluir un polipéptido que es expresado por una célula huésped que ha sido transfectada con un vector que expresa el polipéptido.

En una realización, el polipéptido es un anticuerpo o fragmento de unión del mismo. Un anticuerpo puede ser oligoclonal, policlonal, monoclonal, quimérico, camelizado, injertado con CDR, multispecifico, biespecifico, catalítico, humanizado, totalmente humano, antidiotípico y anticuerpos que pueden marcarse en forma soluble o unida, así como fragmentos, incluidos fragmentos de unión a epítopos, variantes o derivados de los mismos, solos o en combinación con otras secuencias de aminoácidos. Un anticuerpo puede ser de cualquier especie. El término anticuerpo también incluye fragmentos de unión, que incluyen, entre otros, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ anticuerpo monocatenario (svFC), región variable dimérica (Diabody) y región variable unida a disulfuro (dsFv). Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

En otra realización, el polipéptido recombinante es una proteína no anticuerpo. Ejemplos de proteínas sin anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión, receptores, ligandos de proteínas de la superficie celular, proteínas secretadas y enzimas.

H. Kits

- 5 Cualquiera de los oligonucleótidos de miARN o anti-miARN o vectores de expresión y componentes adicionales, tales como regulador, células y medio de cultivo pueden empaquetarse en forma de un kit. Típicamente, un kit también contiene materiales tales como instrucciones para realizar los métodos de la invención, material de embalaje y un contenedor. El kit puede incluir al menos un vector de expresión que codifica un producto génico de miARN o un inhibidor de miARN, como se describe con más detalle anteriormente. El vector de expresión puede usarse en sistemas de transcripción in vitro o de transcripción/traducción, o usarse para transfectar células, ya sea de forma transitoria o estable. En otro ejemplo, el kit incluye al menos dos vectores de expresión, uno de los cuales codifica un producto génico de miARN o un inhibidor de miARN y el otro codifica un marcador seleccionable, un gen indicador o un polipéptido recombinante.

I. Equivalentes

- 15 La especificación escrita anterior se considera suficiente para permitir que un experto en la materia practique la invención. La descripción y los ejemplos anteriores detallan ciertas realizaciones preferidas de la invención y describe el mejor modo contemplado por los inventores.

6. Ejemplo de trabajo

- 20 Para investigar la capacidad de la expresión alterada de microARN para mejorar la productividad de las células de mamífero, se transdujeron de manera estable dos líneas celulares CHO productoras de anticuerpos con vectores lentivirales que codifican nueve microARN diferentes o inhibidores de microARN antisentido en función de la posible implicación del microARN en las vías implicadas en la producción de polipéptidos recombinantes, como la proliferación celular, la respuesta al estrés, la apoptosis y la traducción de ARNm (Tabla 1).

A. Materiales y métodos.

- 25 Cultivo celular y transducción

- Las células de ovario de hámster chino (CHO) (línea celular en suspensión) que expresan diversos anticuerpos monoclonales se cultivaron en medio CD CHO (Life Technologies, Carlsbad, CA) suplementado con 50 μ M de L-metionina sulfoximina (MSX; Sigma Aldrich, St. Louis, MO) y 0.5X GS Supplement (SAFC Biosciences, Lenexa, KS). Los cultivos en matraces de agitación se mantuvieron a 120 rpm, 37°C, 6% de CO₂ y 80% de humedad. Doscientos cincuenta mil células fueron transducidas con vectores lentivirales que sobreexpresan miR-10a, miR-21 o un control vectorial (Open Biosystems, Huntsville, AL), o aquellos que expresan anti-miR-let7a, -16, -101 o -145 o un control vectorial (System Biosciences, Mountain View, CA) con un MOI de 2-20. Las células transducidas se expandieron y seleccionaron durante 2-3 semanas en 5 μ g/ml de Puomicina. Utilizando los componentes del vector de proteína fluorescente verde (GFP) o de proteína fluorescente roja (RFP) (de vectores anti-miR o miR, respectivamente), las células se recogieron mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y se expandieron para cultivo celular alimentado por lotes. La eficiencia de transducción se acercó al 100% (Figura 11A). La expresión del gen marcador se controló y confirmó durante el uso de estas líneas celulares modificadas, y la RT-PCR cuantitativa demostró un alto nivel de expresión tanto de miR como de anti-miR en las líneas celulares transducidas de manera estable resultante (Tabla 2).

- 40 Los ensayos por lotes alimentados se realizaron por triplicado en matraces de agitación de 125 ml. Las células se sembraron en 25 ml de medio CD CHO con suplementos descritos anteriormente. Después de la generación de líneas celulares CHO modificadas con miR estables, las células se monitorizaron cada dos días durante 14 días para determinar la densidad celular viable (VCD) (Tabla 3), el título de mAb (Tabla 4) y la Qp resultante de la expresión alterada de miARN (Figuras 1-4). La densidad de células viables (VCD), el % de viabilidad (% V) y el tamaño de las células se monitorearon usando un Analizador de Viabilidad Celular ViCELL (Beckman Coulter, Indianápolis, IN). El título de anticuerpos se midió usando el sistema Octet (forteBIO/Pall Life Sciences, Menlo Park, CA). La Qp acumulativa se calculó como la pendiente de la concentración del producto (título) versus la integral de la densidad celular viable acumulativa (mg/L/CCD) (Renard et al., (1988). Evidencia de que la cinética de producción de anticuerpos monoclonales está relacionada con la integral de la curva de células viables en sistemas discontinuos. Biotechnology Letters 10(2):91-96; Yoon et al., (2006) Biphasic culture strategy for enhancing volumetric erythropoietin productivity of Chinese hamster ovary cells. Enzyme and Microbial Technology 39:362-365; Li et al., (2010) Cell culture processes for monoclonal antibody production. mAbs 2(5)466-477; Breszinsky et al., (2003) A simple method for enriching populations of transfected CHO cells for cells of higher specific productivity. Journal of Immunological Methods 277:141-155; Fox et al., (2003) Maximizing Interferon- γ production by Chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: experimental and modeling. Biotechnology and Bioengineering 85(2):177-184). La Qp máxima se calculó como el cambio en el título en VCD máximo en comparación con el punto de tiempo anterior dividido por el cambio en VCD entre los puntos de tiempo máximo y anterior multiplicado por el número de días en cultivo

desde el punto de tiempo 1 al punto de tiempo 2 dividido por el registro natural del VCD final sobre el VCD inicial. El título, la Qp acumulativa y la Qp máxima se presentan como unidades relativas en comparación con la línea de base.

Extracción de ARN y análisis de PCR en tiempo real

Se extrajo el ARN total de $0.5\text{-}5 \times 10^6$ células usando un kit de aislamiento de miRVana miARN (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración se determinó mediante análisis Nanodrop y se evaluó la calidad del ARN en un bioanalizador Agilent 2100 usando el ARN 6000 Nano LabChip. Para el análisis TaqMan de miARN sobreexpresados, se aplicó transcripción reversa a 100-300 ng de ARN total a ADNc usando conjuntos de cebadores Multiscribe RT y Megaplex RT (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc resultante se preamplificó usando el conjunto de cebadores TaqMan PreAmp Master Mix y Megaplex preamp (Life Technologies) en una reacción que contenía 12.5 μL 2X de los cebadores TaqMan PreAmp Master Mix, 2.5 μL 10X Megaplex PreAmp, 7.5 μL H₂O y 2.5 μL de producto RT. Después del ciclo, las muestras amplificadas se diluyeron 1:4 en regulador de suspensión de ADN (TEKnova, Hollister, CA) y se mantuvieron a -20°C o se usaron inmediatamente para la PCR. La PCR en tiempo real sobre el material preamplificado se realizó utilizando ensayos TaqMan específicos para miR-10a y miR-21 (ABI/Life Technologies, Carlsbad, CA). La expresión de cada miARN se evaluó en relación con U6 snARN.

Para preparar las muestras para cargarlas en chips de matriz dinámica de 48x48 (Fluidigm, South San Francisco, CA), la mezcla de reacción contenía 2.5 μL 2X Universal Master Mix (ABI/Life Technologies), 0.25 μL de Regulador de Carga de Muestra (Fluidigm), y 2.25 μL de ADNc preamplificado. Para preparar el cebador/sondas, la mezcla de reacción contenía 2.5 μL de ensayo de expresión génica TaqMan 20X y 2.5 μL de regulador de carga de ensayo (Fluidigm). Antes de cargar las muestras y los reactivos de ensayo en las entradas, el chip se cebó en el controlador IFC. Se cargaron cinco microlitros de muestra preparada como se describe en cada entrada de muestra del chip de matriz dinámica, y se cargaron 5 μL de mezcla de ensayo de expresión génica 10X en cada entrada de detector. Al finalizar los pasos de cebado y carga/mezcla de IFC, el chip se cargó en el sistema de PCR en tiempo real BioMark™ para el ciclo térmico.

La expresión anti-miR se evaluó usando el kit QuantiMiR™ RT (System Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones se diluyeron 1:10 en Regulador de Suspensión ADN (TEKnova) para SYBR Green Real Time PCR usando cebadores directos específicos de miR y un cebador reverso universal (System Biosciences). Las reacciones de PCR cuantitativa contenían 1 μL de ADNc QuantiMir diluido, 0.5 μL de cebador reverso universal 10 μM , 1 μL de cebador directo específico de miARN 10 μM , 15 μL de regulador MasterPix 2X SYBR Green qPCR verde y 12.5 μL de H₂O libre de ARNasa. El ciclo térmico se realizó en un instrumento de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7900. Se incluyó un análisis de fusión al final de la ejecución para verificar la especificidad de la reacción de amplificación. Se utilizó U6 ARNns como control interno.

Para el análisis de expresión de dianas ARNm miR-let7a, se sintetizó ADNc a partir de 500 ng de ARN total extraído usando SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Life Technologies) y hexámeros aleatorios siguiendo las instrucciones del fabricante. La preamplificación se realizó mediante los ensayos de expresión génica TaqMan y la mezcla maestra TaqMan PreAmp Master. Las reacciones contenían 5 μL de ADNc, 10 μL de mezcla maestra PreAmp y 5 μL de mezcla de ensayo de expresión génica 0.2X (que comprende todos los cebadores/sondas a analizar) para un volumen final de 20 μL . El ADNc preamplificado se analizó mediante PCR en tiempo real con ensayos de expresión génica TaqMan específicos para genes diana de interés y TaqMan Universal Master Mix (Life Technologies) usando un instrumento BioMark™ (Fluidigm), como se indicó anteriormente para miRs sobreexpresados. La β -actina y la GAPDH se utilizaron como controles internos y los datos se evaluaron utilizando el método delta-delta Ct.

Inmunoprecipitación Western

Las alteraciones de la proteína diana se evaluaron mediante análisis Western de cultivos lisados con o sin modificaciones de miARN. Los lisados celulares de cultivos de CHO que producen anticuerpos se prepararon en regulador de lisis y extracción RIPA (Pierce) con proteasa HALT e inhibidores de fosfatasa (Pierce). Quince microgramos de lisados celulares se resolvieron en geles NuPage al 4-12% (Life Technologies) en regulador de desarrollo 1X MOPS (Life Technologies) en condiciones reductoras y transferidos a membranas PVDF (Life Technologies). Las membranas se bloquearon durante 1 hora en regulador de bloqueo T20 libre de proteínas (PBS) (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL) y se incubaron durante la noche a 4°C con una dilución 1:500 de anti-RAS de conejo (Cell Signaling, Danvers, MA) o una dilución 1:333 de anticuerpos primarios anti-GAPDH de ratón (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Las transferencias se incubaron en anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia: anti-conejo 800CW (LI-COR, Lincoln, NE) y anti-ratón 680LT (LI-COR) para RAS y GAPDH, respectivamente, en PBST 0.1% + 0.02% SDS por 30 min a temperatura ambiente. Las señales fluorescentes y las intensidades de banda se capturaron y cuantificaron utilizando el Odyssey Imaging System (LI-COR) y el software Odyssey (LI-COR).

Análisis de fidelidad/integridad de anticuerpo

Se produjeron y purificaron anticuerpos a partir de líneas modificadas con miR o anti-miR usando cromatografía de afinidad con proteína A. La separación de fase inversa se realizó utilizando un instrumento Agilent serie 1200 equipado con una columna Agilent Zorbax Poroshell SB300 C3 75x1.0mm. Se redujeron 2 μg de muestra de proteína y se

inyectaron en la columna. La columna se equilibró con 90% de solvente A (0.1% de ácido fórmico en H₂O) y 10% de solvente B (0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo), y la elución se logró por gradiente escalonado de 10-60% B. El caudal y la temperatura se mantuvieron a 0.4 ml/min y 35°C durante todo el ciclo.

Los análisis espectrométricos de masas se llevaron a cabo en un modo de iones positivos con un rango de exploración de 300-3000 m/z en un espectrómetro de masas Agilent 6520 LC/MS QTOF (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). El acoplamiento entre el LC y el TOF se realizó a través de una fuente de ionización por electroaspersión (ESI) con nebulizadores dobles, un nebulizador para el eluyente LC y un nebulizador para los compuestos de masa de referencia interna (m/z 322.0481 y m/z 1221.9906). Los espectros de masas ESI se analizaron mediante el análisis cualitativo Agilent MassHunter con Bioconfirm para la desconvolución automatizada y la confirmación de proteínas.

B. Resultados

Anti-miR-let-7a aumenta la productividad de células CHO

MiR-10a, anti-miR-let-7a y anti-miR-143 demostraron los niveles más altos de Qp acumulativo, con incrementos de productividad del 63%, 71% y 53% en comparación con las líneas de control, respectivamente (Figura 1). Además de evaluar la Qp acumulativa, también evaluamos la Qp máxima, calculada en el VCD máximo para cada una de estas líneas celulares modificadas con miR. Los resultados mostraron aumentos en la productividad máxima del 38%, 163% y 64% para miR-10a, anti-miR-let-7a y anti-miR-143 en comparación con las líneas padre/control (Figura 2), respectivamente. Las líneas celulares CHO modificadas con miR adicionales no mostraron cambios significativos, o mostraron una disminución en la Qp en comparación con los cultivos parentales/de control.

Como el título de polipéptido recombinante y el VCD son los componentes de Qp, se investigaron las alteraciones en estos parámetros para cada línea celular modificada con miR. Aunque miR-10a, anti-miR-143 y anti-miR-let-7a mostraron un aumento de Qp en comparación con los controles, el aumento relativo en su título es similar al observado en las líneas celulares parentales o de control (Figura 3). Además, las células CHO modificadas que producen anti-miR-let-7a, alcanzaron un VCD máximo de solo la mitad de las líneas parentales o de control (Figura 4). Las líneas modificadas MiR-10a y anti-miR-143 alcanzaron su punto máximo en VCD a niveles más altos que los de anti-miR-let-7a en el día 10, pero su crecimiento disminuyó sustancialmente del día 12 al día 14, mientras que anti-miR-let-7a permaneció en un nivel relativamente constante hasta el día 14. El crecimiento a una densidad celular reducida puede indicar una redirección favorable de la energía celular hacia la síntesis de polipéptidos recombinantes en lugar de la proliferación del cultivo (Browne and Al-Rubeai, (2009) Selection methods for high-producing mammalian cell lines. In: Al-Rubeai M, editor. Cell Line Development, Series: Cell Engineering 6, Springer Science+Business Media B.V. p. 127-151). En conjunto, la inhibición de miR-let-7a proporcionó el mayor incremento en Qp con el perfil de crecimiento más prolongado de todas las líneas modificadas con miR evaluadas.

La inhibición fue consistente en una línea celular CHO productora de mAb adicional

Para determinar si los efectos de anti-miR-let-7a sobre el crecimiento y la productividad de CHO fueron específicos de la línea celular productora probada inicialmente, o si este efecto podría generalizarse a otros cultivos de producción, se seleccionó una línea celular CHO adicional con una mayor capacidad de producción y la producción de un mAb diferente. Los resultados en las dos líneas celulares productoras de mAb analizadas fueron similares entre sí en cuanto las líneas celulares anti-miR-let-7a mantuvieron un VCD similar o reducido a lo largo del tiempo con un título de mAb final similar en comparación con el control (Figuras 5 y 6), lo que condujo a 50% y 68% de aumento en la Qp en comparación con el control (Figura 7). Se redujeron 2 µg de anticuerpo purificado de líneas modificadas con miR o anti-miR y se evaluó mediante LC/MS de fase inversa para determinar la equivalencia con las líneas parentales en fidelidad e integridad. La fase inversa LC/MS verificó además que el producto de mAb de las líneas celulares modificadas con anti-miR era equivalente a las líneas parentales en fidelidad e integridad (Figuras 12A y B). Curiosamente, se observó una relación inversa entre las capacidades iniciales de producción de mAb de la línea celular parental y el aumento porcentual de Qp tras la introducción de anti-miR-let-7a (Figura 7). Específicamente, la segunda línea celular mostró una capacidad de producción 1.6 veces mayor en comparación con la primera línea celular, y esto se tradujo en un aumento menor en Qp (aproximadamente 1.4 veces), lo que sugiere que la modificación de miR generalmente puede afectar la producción de polipéptidos recombinantes de una manera positiva, pero puede tener un mayor beneficio para las líneas celulares de menor producción.

Anti-miR-let-7A aumentó las dianas importantes para la productividad de células CHO

Para comprender los efectos funcionales de la inhibición de miR-let-7a, se examinaron múltiples dianas predichas y validadas miR-let-7a que se han demostrado en una miríada de tipos de células y entornos de enfermedades para regular múltiples rutas que incluyen proliferación, estrés resistencia y traducción de proteínas (De Vito et al., (2011) Let-7a is direct EWS-FLI-1 target implicated in Ewing's Sarcoma development. PLoS ONE 6(8):1-11, Sampson et al., (2007) MicroRNA Let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt Lymphoma cells. Cancer Res 67(20):9762-9770; Johnson et al., (2005) RAS is regulated by the let-7 microRNA family. Cell 120:635-647; Mathonnet et al., (2007) MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. Science 317(5845):1764-7).

Como el efecto específico de miR-let-7a en células CHO no se ha examinado previamente, seleccionamos un panel de dianas potenciales implicadas en rutas que podrían ser de relevancia específica para el cultivo de producción. Dentro de este panel de dianas miR-let-7a había tres clases de dianas que podrían ser importantes para el mecanismo de este miR en la productividad de las células CHO: (1) ARNm que previamente se demostró modulados por la degradación de ARNm, incluidos HMGA2, MYC, NF2, N1RF, RAB40C, PRDM1 e Integrina-b3; (2) los ARNm que se muestran regulados por la inhibición de la traducción de miR-let-7a, como RAS, IGF y EIF2A; y (3) los ARNm predichos bioinformáticamente como dianas miR-let-7a, como EIF4A. (Muller (2008) MicroRNAs as targets for engineering of CHO cell factories. Trends in Biotechnology 26(7):359-365; De Vito et al., (2011) Let-7a is direct EWS-FLI-1 target implicated in Ewing's Sarcoma development. PLoS ONE 6(8):1-11; Sampson et al., (2007) MicroRNA Let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt Lymphoma cells. Cancer Res 67(20):9762-9770; Meng et al., (2007) The MicroRNA let-7a modulates interleukin-6-dependent STAT-3 survival signaling in malignant human cholangiocytes. Journal of Biological Chemistry 282(11):8256-8264; Wang et al., (2012) N1RF is frequently upregulated in colorectal cancer and its oncogenicity can be suppressed by let-7a microRNA. Cancer Letters 314:223-231; Yang et al., (2011) Low-level expression of let-7a in gastric cancer and its involvement in tumorigenesis by targeting RAB40C. Carcinogenesis 32(5):713-722; Lin et al., (2011) Follicular dendritic cell-induced microRNA-mediated upregulation of PRDM1 and downregulation of BCL-6 in non-Hodgkin's B-cell lymphomas. Leukemia 25(1):145-152; Muller et al., (2008) MicroRNAs as targets for engineering of CHO cell factories. Trends in Biotechnology 26(7):359-365; Johnson et al., (2007) The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. Cancer Res 67:7713-7722; Lu et al., (2011) Hypermethylation of let-7a-3 in epithelial ovarian cancer is associated with low insulin-like growth factor-II expression and favorable prognosis. Cancer Res 67(21):10117-10122; and Mathonnet et al., (2007) MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. Science 317(5845):1764-7)

Los resultados indicaron que la inhibición de miR-let-7a en dos líneas celulares CHO productoras de mAb diferentes condujo a niveles aumentados de ARNm de múltiples dianas miR-let-7a, que incluyen HMGA2, MYC, NF2, N1RF, RAB40C y EIF4A (Figura 8) Otros genes, como PRDM1, Integrin-B3, IGF, RAS y EIF2A no exhibieron niveles de expresión de ARNm alterados después de la inhibición de miR-let-7a (datos no mostrados). En trabajos anteriores, se ha demostrado que RAS se inhibe por traducción en lugar de a través de la degradación de ARNm; por lo tanto, medimos la expresión de la proteína RAS y se encontraron niveles aumentados tras la inhibición de miR-let-7a (Figura 9). Las vías clave afectadas por el ARNm o las alteraciones de proteínas resultantes de la inhibición de miR-let-7a en las líneas celulares CHO que producen mAb incluyen proliferación, apoptosis, resistencia al estrés, metabolismo celular y regulación de la maquinaria de traducción y/o secretora (Muller et al., (2008) MicroRNAs as targets for engineering of CHO cell factories. Trends in Biotechnology 26(7):359-365; Barron et al., (2011) Engineering CHO cell growth and recombinant protein productivity by over expression of miR-7, Journal of Biotechnology 151(2):204-11; De Vito et al., (2011) Let-7a is direct EWS-FLI-1 target implicated in Ewing's Sarcoma development. PLoS ONE 6(8):1-11; Sampson et al., (2007) MicroRNA Let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt Lymphoma cells. Cancer Res 67(20):9762-9770; Meng et al., (2007) The MicroRNA let-7a modulates interleukin-6-dependent STAT-3 survival signaling in malignant human cholangiocytes. Journal of Biological Chemistry 282(11):8256-8264; Wang et al., (2012) N1RF is frequently upregulated in colorectal cancer and its oncogenicity can be suppressed by let-7a microRNA. Cancer Letters 314:223-231; Yang et al., (2011) Low-level expression of let-7a in gastric cancer and its involvement in tumorigenesis by targeting RAB40C. Carcinogenesis 32(5):713-722).. Estas vías y el papel potencial de los dianas de miR-let-7a en la mediación de estas vías se resumen en la Figura 10.

Los presentes resultados muestran que la inhibición de miR-let-7a en células CHO condujo a cambios en múltiples genes/proteínas previamente asociados con el control/proliferación y apoptosis del ciclo celular, respuesta al estrés, metabolismo celular y transcripción/traducción de proteínas. Específicamente, los presentes resultados indicaron que miR-let-7a alteró RAS, MYC, NF2, RAB40C, N1RF y HMGA2, que se ha demostrado que regulan la proliferación celular y la apoptosis en sistemas distintos de CHO (Figura 10). Además de la proliferación celular y la apoptosis, MYC y RAS pueden influir en la capacidad de adaptarse al estrés y superar las deficiencias metabólicas, que son importantes para el procesamiento adecuado de las proteínas y la regulación de los factores de transcripción (Figura 10). El eIF4a, que desempeña un papel importante en la regulación del inicio de la traducción esencial para las células con altas tasas de síntesis de proteínas, también fue regulado por miR-let-7a.

C. Conclusión

La inhibición de miR-let-7a en múltiples líneas celulares CHO productoras de mAb usadas activamente en el cultivo celular de producción condujo a un aumento de la productividad específica y características de crecimiento favorables a través de la regulación de múltiples ARNm y proteínas diana en rutas importantes para la producción de polipéptidos recombinantes. Tomados en conjunto, los resultados de este estudio indican que la modulación de uno o más microARNs puede ser una herramienta efectiva para aumentar las capacidades de producción más allá de sus límites actuales.

Tabla 1. microARN seleccionados para la modulación en líneas celulares CHO productoras de anticuerpos.

miARN	Justificaciones de ejemplo para la evaluación	Genes diana
miR-let-7a	Regula la proliferación celular, la progresión del ciclo celular y la apoptosis. Regula la iniciación transcripcional. Controla el ciclo celular para evitar la senescencia replicativa inducida por el estrés.	Ras, c-myc, HMGA2, E2F2, CCND2, NF2, CDK6
miR-10a	Sobrerregula la traducción/síntesis de proteínas Altera la supervivencia celular, la apoptosis y las vías de autorrenovación	Genes HOX, proteínas ribosómicas, vía TRAIL
miR-16	Regula la progresión del ciclo celular, la proliferación celular y la apoptosis	BCL-2, CCND1, WT1
miR-21	Sobreexpresado en numerosos cánceres. Regula la apoptosis. Aumenta durante el estrés por frío/choque térmico para facilitar la adaptación a las condiciones de estrés y una mayor supervivencia celular	Caspasa 3, PDCD4, NFIB, TPM1, PTEN/AKT señalización
miR-101	Regula la proliferación, la metilación de histonas y la pluripotencia de células madre	EZH2
miR-145	Subregulado en cánceres múltiples y en tumores malignos de células B. Regula la proliferación celular y la apoptosis.	Myc, IRS1, MAPK7, ERK5, FLI1, DFF45
miR-143	Subregulado en múltiples tipos de cáncer. Regula la proliferación y la apoptosis dependientes de NFkB. Altera el metabolismo de glucosa/energía a través de ORP8 (señalización AKT)	ORP8, AKT señalización, MPAK7, ERK5

Tabla 2. Confirmación por PCR de la expresión de miARN en líneas celulares transducidas con lentivector.

Los niveles de expresión de miR o anti-miR en líneas celulares modificadas con miR en relación con una línea celular parental se evaluaron mediante TaqMan o QuantiMir RT PCR.	
miARN	Multiplicidad de la sobreexpresión
Progenito	1
anti-miR-let-7a	1329
miR-10a	272
anti-miR-10a	No hay cebadores disponibles
anti-miR-16	1304
miR-21	18
anti-miR-21	683
anti-miR-101	No hay cebadores disponibles
anti-miR-143	255

Los niveles de expresión de miR o anti-miR en líneas celulares modificadas con miR en relación con una línea celular parental se evaluaron mediante TaqMan o QuantiMir RT PCR.	
miARN	Multiplicidad de la sobreexpresión
anti-miR-145	65

Tabla 3. VCD relativo en todas las líneas celulares CHO productoras de Ab modificadas con miR. Se muestran las medias $\pm$ DE de los valores triples de VCD en comparación con el valor de referencia de cada línea celular modificada con miR o de control (día 0).

Día de cultivo	Progenitor	anti-miR-let-7a	miR-10a	anti-miR-16	anti-miR-21	miR-21
0	1.0 $\pm$.00	1.0 $\pm$.00	1.0 $\pm$.00	1.0 $\pm$.00	1.0 $\pm$.00	1.0 $\pm$.00
2	3.1 $\pm$.32	4.8 $\pm$.93	3.0 $\pm$.12	3.2 $\pm$.92	2.0 $\pm$.37	5.5 $\pm$.53
4	8.3 $\pm$.29	10.3 $\pm$ 1.9	6.1 $\pm$ 1.3	7.9 $\pm$.81	8.4 $\pm$.59	16.5 $\pm$ 1.0
6	15.8 $\pm$ 1.1	12.2 $\pm$.22	13.2 $\pm$.76	15.1 $\pm$ 2.0	18.1 $\pm$ 1.9	20.0 $\pm$ 4.1
8	23.6 $\pm$ 1.6	11.4 $\pm$.97	13.5 $\pm$ 1.6	15.6 $\pm$ 2.5	23.2 $\pm$.56	24.6 $\pm$ 2.8
10	22.8 $\pm$ 1.5	13.6 $\pm$.24	17.6 $\pm$ 1.7	12.7 $\pm$ 2.5	23.5 $\pm$.92	11.9 $\pm$ 2.9
12	22.1 $\pm$ 3.9	9.9 $\pm$.89	3.4 $\pm$.71	11.0 $\pm$ 2.3	20.8 $\pm$ 1.6	7.8 $\pm$ 4.4
14	13.5 $\pm$ 2.0	9.4 $\pm$ 1.2	3.8 $\pm$.74	8.5 $\pm$ 1.8	20.4 $\pm$.83	6.0 $\pm$.96

Día de cultivo	Control	anti-miR-10a	anti-miR-143	anti-miR-101	anti-miR-145
0	1.0 $\pm$.00	1.0 $\pm$.00	1.0 $\pm$.00	1.0 $\pm$.00	1.0 $\pm$.00
2	3.1 $\pm$.48	2.9 $\pm$.95	3.2 $\pm$.18	2.0 $\pm$.03	1.5 $\pm$.35
4	9.8 $\pm$ 2.6	10.2 $\pm$ 1.2	7.0 $\pm$ 1.7	7.4 $\pm$ 2.2	6.9 $\pm$.48
6	19.2 $\pm$ 2.9	14.9 $\pm$ 2.5	9.9 $\pm$ 1.7	9.1 $\pm$ 2.9	19.3 $\pm$ 2.2
8	22.7 $\pm$ 1.2	16.7 $\pm$ 3.1	12.2 $\pm$ 2.8	12.6 $\pm$ 3.7	20.1 $\pm$.81
10	22.3 $\pm$.93	16.7 $\pm$ 2.9	27.0 $\pm$ 2.3	26.6 $\pm$ 6.0	21.4 $\pm$ 1.4
12	18.4 $\pm$.77	3.3 $\pm$.27	8.1 $\pm$.63	14.5 $\pm$ 2.8	17.7 $\pm$.65
14	11.8 $\pm$ 3.0	5.4 $\pm$ 1.1	3.3 $\pm$.70	4.9 $\pm$ 5.5	16.2 $\pm$.44

Tabla 4. Título relativo en todas las líneas celulares CHO productoras de Ab modificadas con miR. Se muestran las medias $\pm$ DE de los valores de títulos triplicados en comparación con el valor de referencia de cada línea celular modificada con miR o control (día 2).

Día de cultivo	Progenitor	anti-miR-let-7a	miR-10a	anti-miR-16	anti-miR-21	miR-21
2	1.0 $\pm$.04	1.0 $\pm$.04	1.0 $\pm$.04	1.0 $\pm$.02	1.0 $\pm$.10	1.0 $\pm$.03
4	2.9 $\pm$.12	2.9 $\pm$.25	2.7 $\pm$.10	2.7 $\pm$.56	3.2 $\pm$.26	3.2 $\pm$.12
6	10.3 $\pm$.75	7.3 $\pm$.70	7.0 $\pm$.60	12.0 $\pm$ 1.2	11.6 $\pm$.83	9.7 $\pm$.81
8	24.3 $\pm$ 1.2	14.3 $\pm$ 1.3	15.7 $\pm$ 1.0	11.6 $\pm$ 3.8	26.4 $\pm$ 1.5	15.9 $\pm$.96

ES 2 743 506 T3

10	25.5 ± 1.6	17.3 ± 1.5	25.8 ± 2.0	19.9 ± 1.4	26.5 ± 1.5	14.3 ± .32
12	35.8 ± 2.0	24.2 ± 2.6	36.1 ± 4.7	26.8 ± 6.4	39.5 ± 2.8	15.2 ± 2.3
14	37.5 ± 1.9	23.8 ± 2.6	34.7 ± 2.3	26.3 ± 6.2	38.9 ± 3.7	13.4 ± 2.1

Día de cultivo	Control	anti-miR-10a	anti-miR-143	anti-miR-101	anti-miR-145
2	1.0 ± .01	1.0 ± .03	1.0 ± .08	1.0 ± .01	1.0 ± .01
4	3.1 ± .35	2.7 ± .29	4.1 ± .53	3.1 ± .24	3.1 ± .08
6	9.8 ± 1.2	3.2 ± .40	5.4 ± .36	4.4 ± .12	12.5 ± .95
8	15.9 ± 2.2	6.7 ± .20	9.7 ± .70	6.8 ± .93	19.7 ± 2.6
10	27.4 ± 2.3	13.4 ± .27	18.5 ± 2.9	12.6 ± 2.7	29.6 ± 3.4
12	31.0 ± 1.8	23.8 ± 1.4	30.1 ± 5.5	26.4 ± 6.8	32.1 ± 2.5
14	34.1 ± 4.8	24.0 ± 1.5	27.9 ± 5.7	32.8 ± 5.9	35.9 ± 2.2

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un polipéptido recombinante en un cultivo celular de ovario de hámster chino (CHO), comprendiendo el método:
 - 5 (a) cultivar células CHO que tienen actividad de MiARN-let-7a reducida para producir el polipéptido recombinante; y
 - (b) recuperar el polipéptido,en donde el cultivo de células CHO tiene una productividad específica que se incrementa al menos aproximadamente un 25% en comparación con un cultivo de células CHO de control que no tiene actividad reducida de MiARN-let-7a, en donde la actividad de MiARN-let-7a se reduce por un inhibidor de microRNA o en donde las células CHO comprenden genes genéticos MiARN-let-7a.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde el inhibidor de microARN comprende un inhibidor de oligonucleótido antisentido de MiARN-let-7a.
3. El método de la reivindicación 2, en donde el inhibidor de oligonucleótidos se modifica químicamente para mejorar la resistencia a la nucleasa, para aumentar la resistencia a la escisión dirigida por miARN por RISC y/o para aumentar la afinidad de unión.
- 15 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde las células CHO se transfectan con un vector de expresión que codifica el inhibidor de oligonucleótido antisentido de MiARN-let-7a.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde las células CHO se transfectan de manera estable o transitoria con un inhibidor de oligonucleótido antisentido de MiARN-let-7a.
- 20 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el polipéptido recombinante comprende un anticuerpo o fragmento de unión del mismo.
7. El método de la reivindicación 6, en donde el anticuerpo o fragmento de unión del mismo se selecciona de anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos completamente humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos camelizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados con CDR, Fvs de cadena sencilla (scFv), unidos por disulfuro Fvs (sdFv), fragmentos Fab, fragmentos F(ab') y anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id).
- 25 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el polipéptido recombinante comprende una proteína no anticuerpo, opcionalmente en donde el polipéptido recombinante comprende una proteína de fusión, un receptor, un ligando de una proteína de la superficie celular, una proteína secretada o un enzima.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el cultivo celular tiene una productividad máxima determinada a una densidad celular viable máxima (VCD) que se incrementa al menos aproximadamente un 25% en comparación con un cultivo celular de control que no ha reducido la actividad de MiARN-let-7a.
- 30 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el cultivo celular tiene una densidad celular viable relativa de entre 1% y 30% en comparación con un cultivo celular de control que no tiene actividad reducida de miARN-let-7a.
11. El método de la reivindicación 1, en donde las células CHO tienen actividad incrementada de un segundo microARN seleccionado de miR-10a, miR-21, y combinaciones de los mismos en comparación con un cultivo celular de control, o en donde las células CHO tienen actividad disminuida de un segundo microARN seleccionado entre miR-16, miR-101, miR-145 y combinaciones de los mismos.
- 35 12. Una línea celular CHO configurada para expresar un polipéptido recombinante, que comprende un vector que expresa la proteína recombinante y un inhibidor de miARN-let-7a, en donde la línea celular CHO ha reducido la actividad de miARN-let-7a y una productividad específica que aumenta al menos aproximadamente un 25% en comparación con un cultivo de células CHO de control que no tiene actividad reducida de miARN-let-7a.
- 40

FIG. 1

Productividad específica en células CHO productoras de Ab
siguiendo la alteración miR

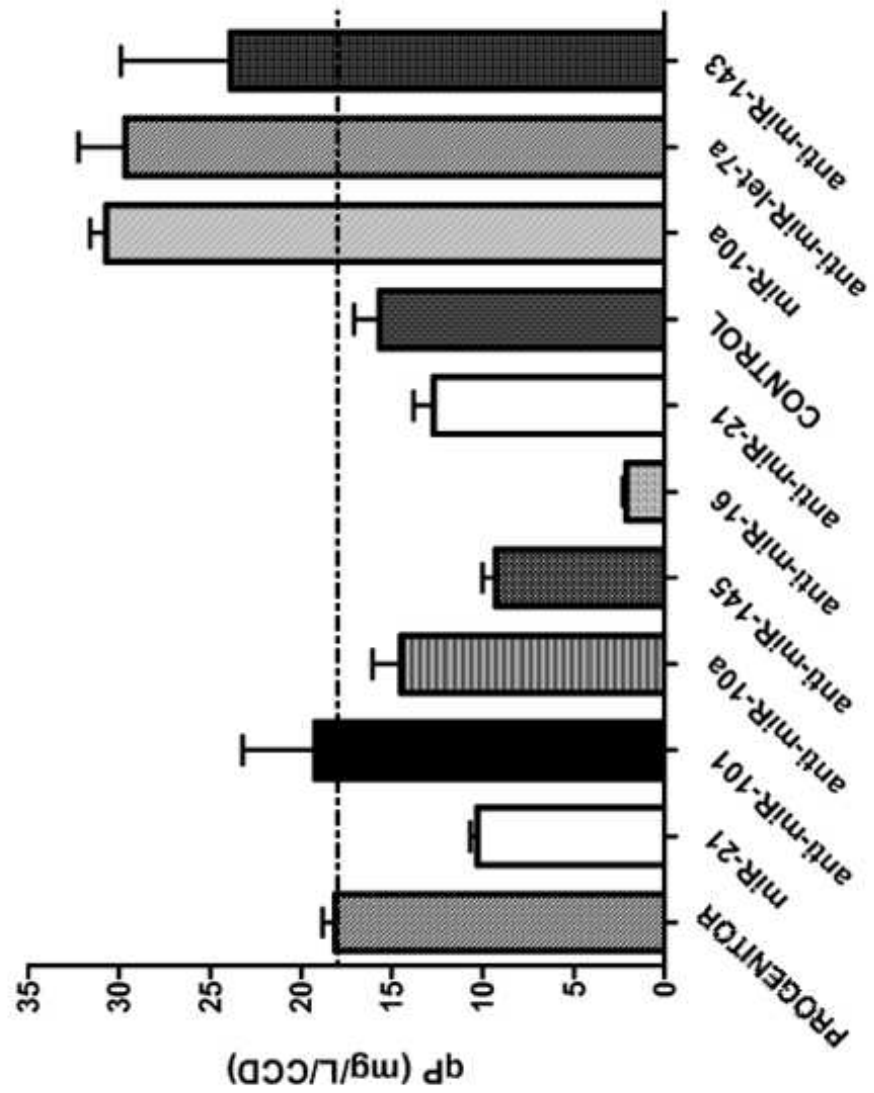


FIG. 2

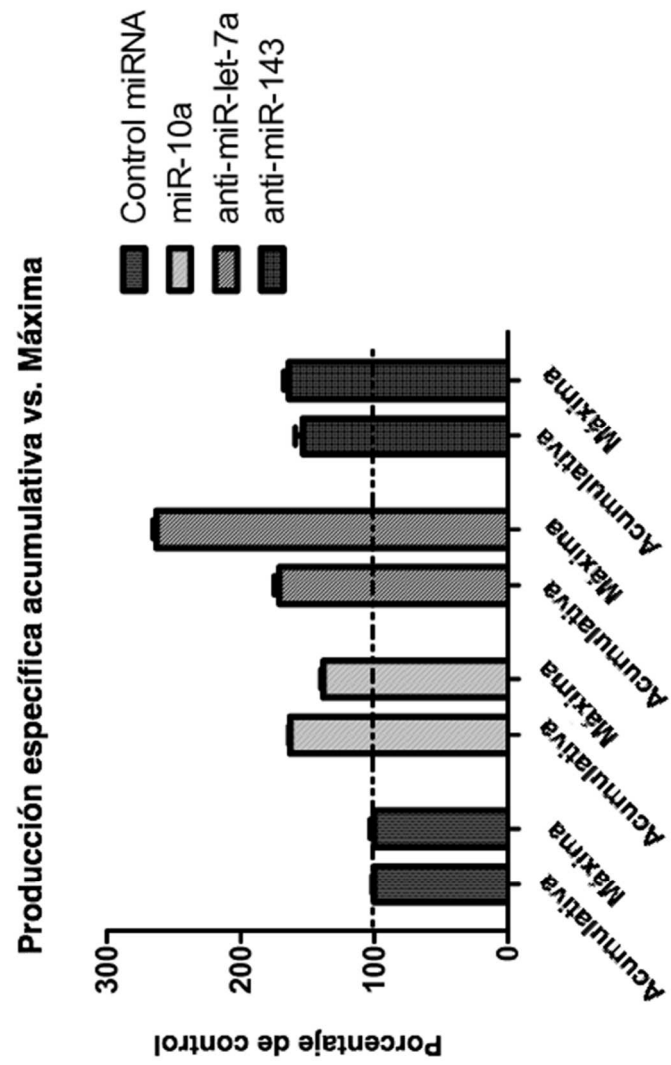


FIG. 3

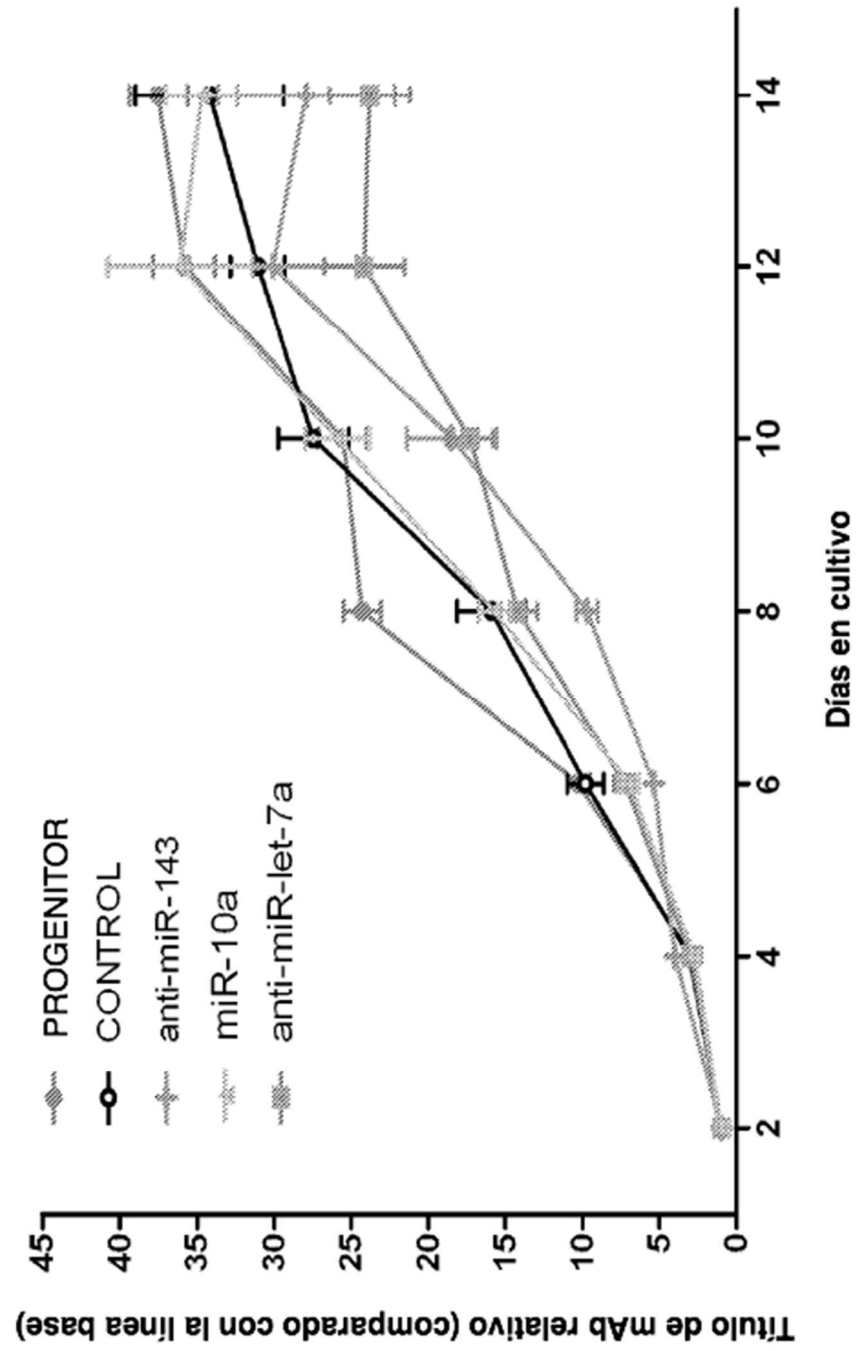


FIG. 4

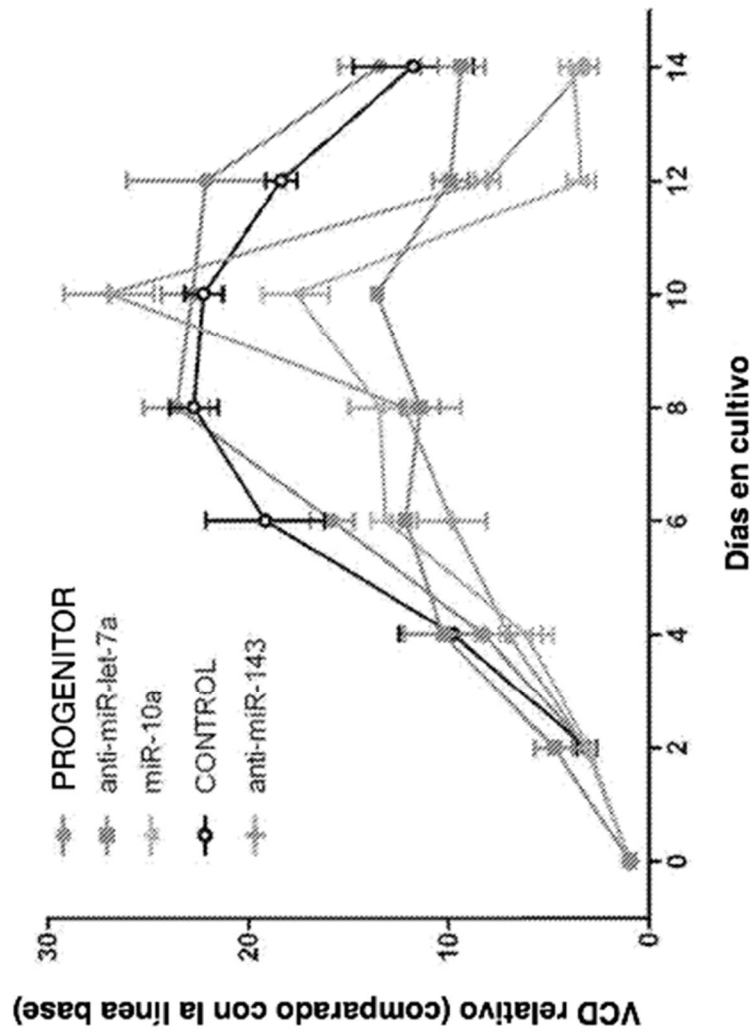


FIG. 5

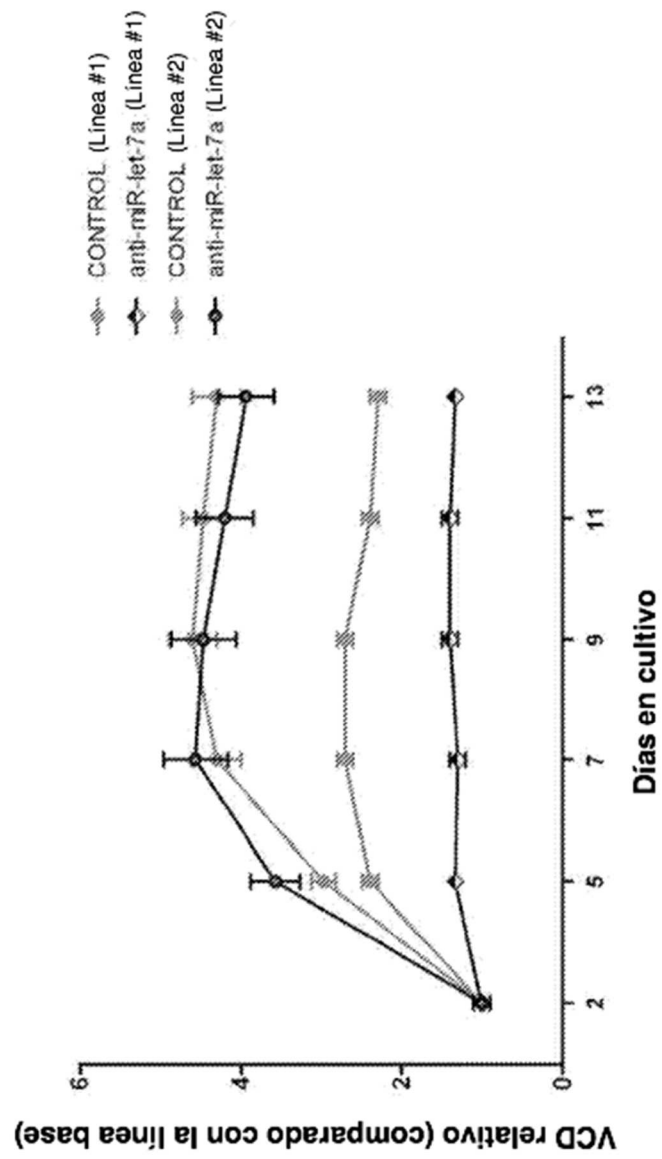


FIG. 6

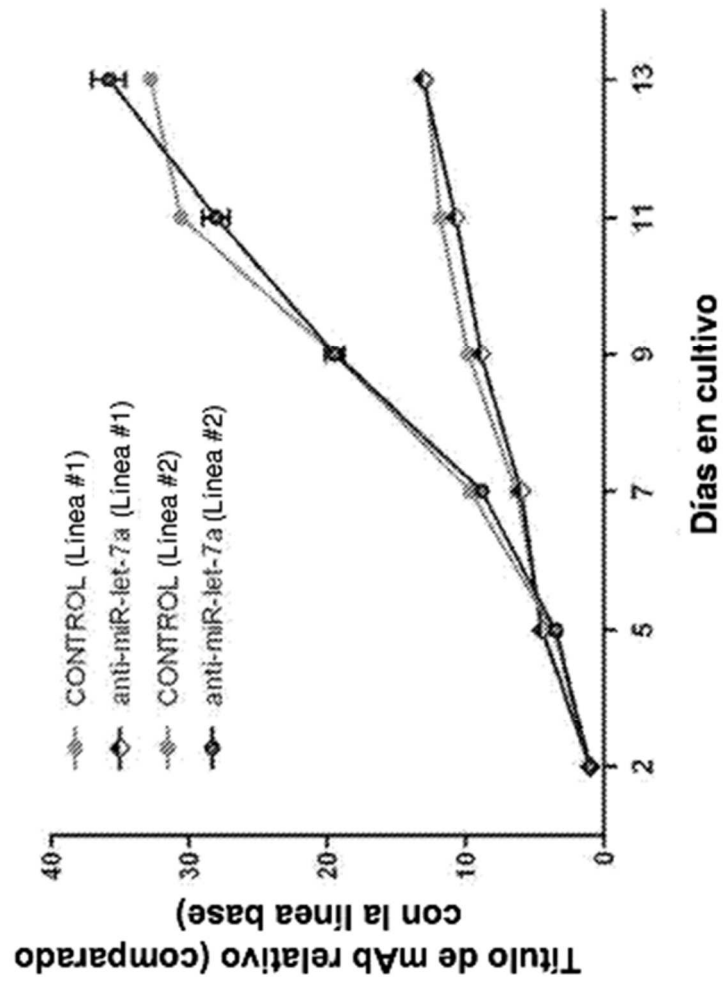


FIG. 7

Línea celular que produce mAb	Nivel de producción relativo (comparado con la línea #1)	% de aumento en Qp sobre control
1	1	68%
2	1.6	50%

FIG. 8

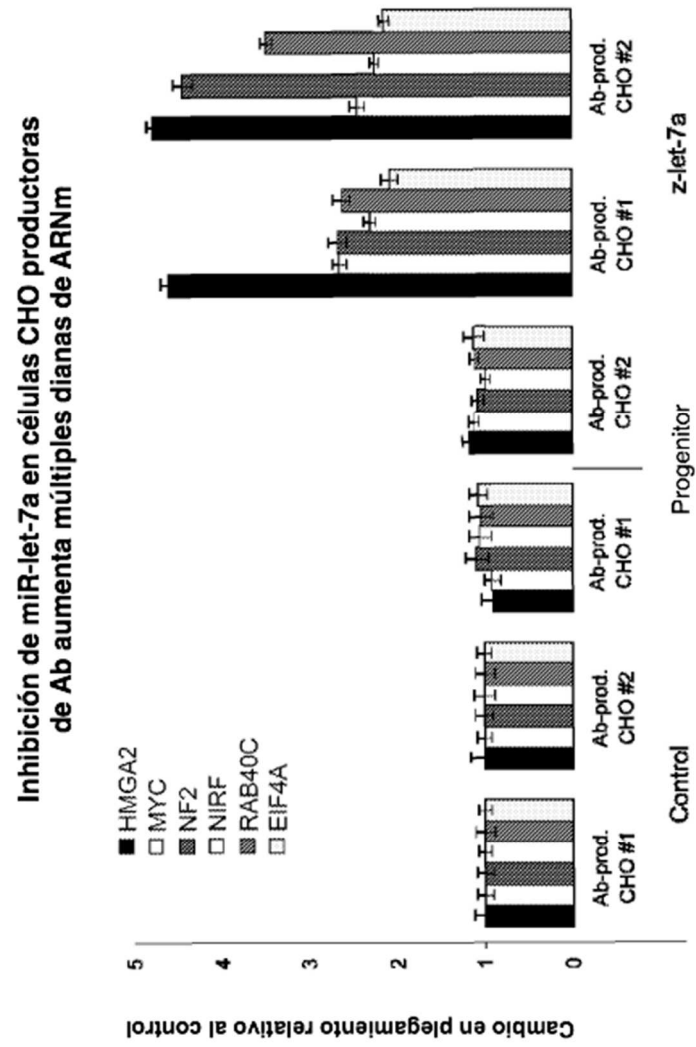


FIG. 9

A.

Expresión de RAS			
	Progenitor	Control	Anti-miR-let7a
Normalizado a GAPDH	0.0526	0.0500	0.0680
Multiplicidad de aumento en comparación con el control	1.05	1.00	

B.

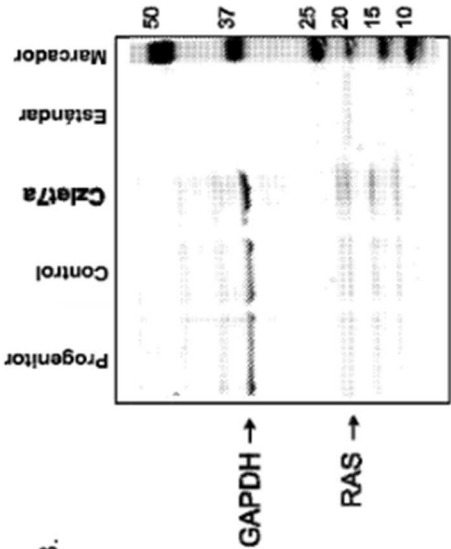


FIG. 10

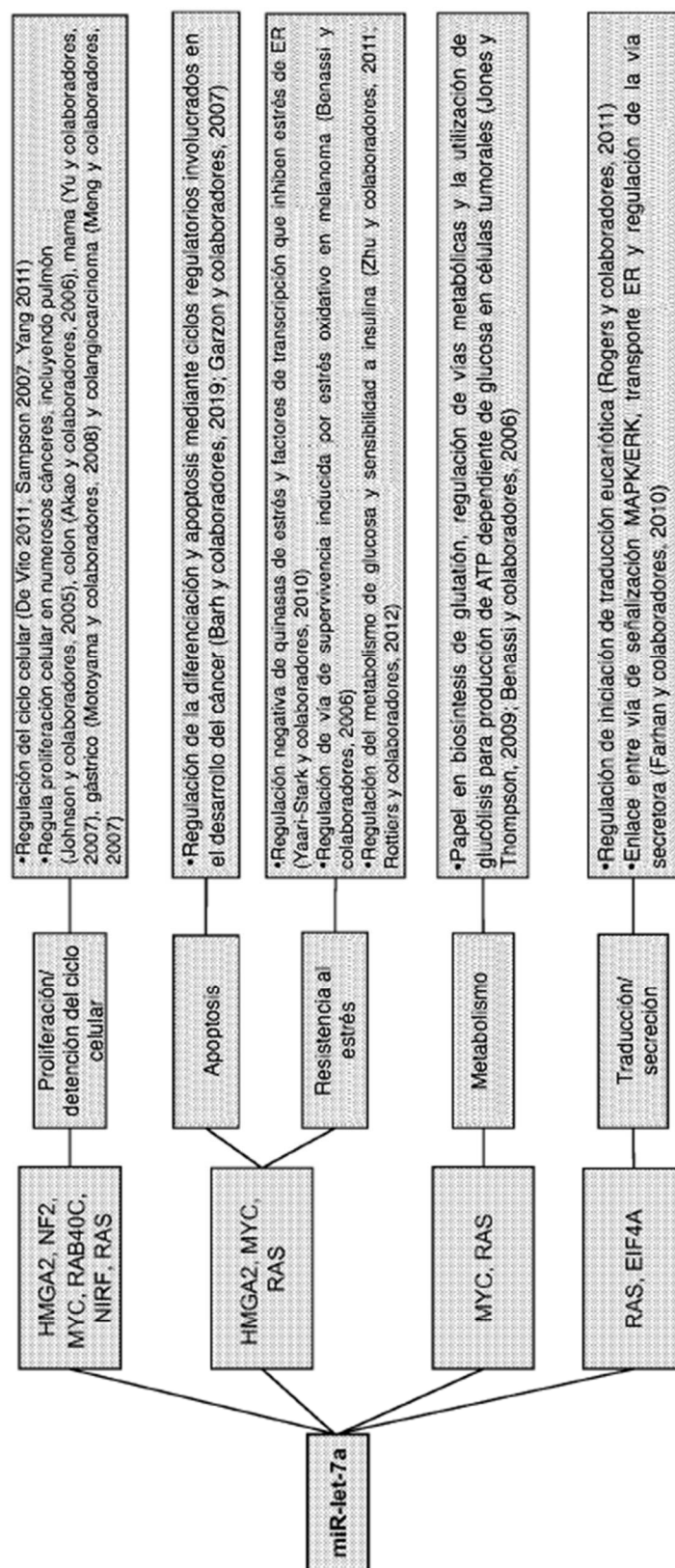
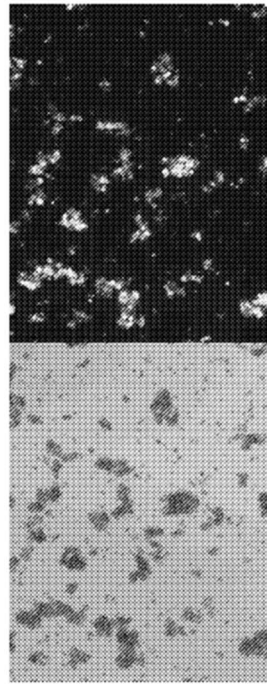
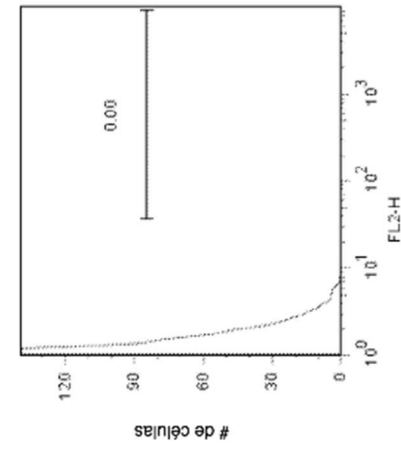


FIG. 11

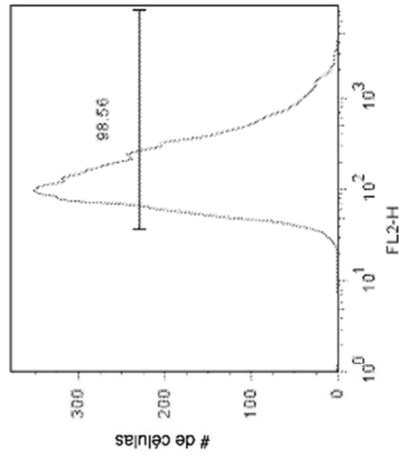


A.



Datos: 001
Recuento: 19661
FSC-H, subconjunto SSC-H; progenitor

B.



Datos: 004
Recuento: 19704
FSC-H, subconjunto SSC-H; O-21 p30

C.

FIG. 12 A

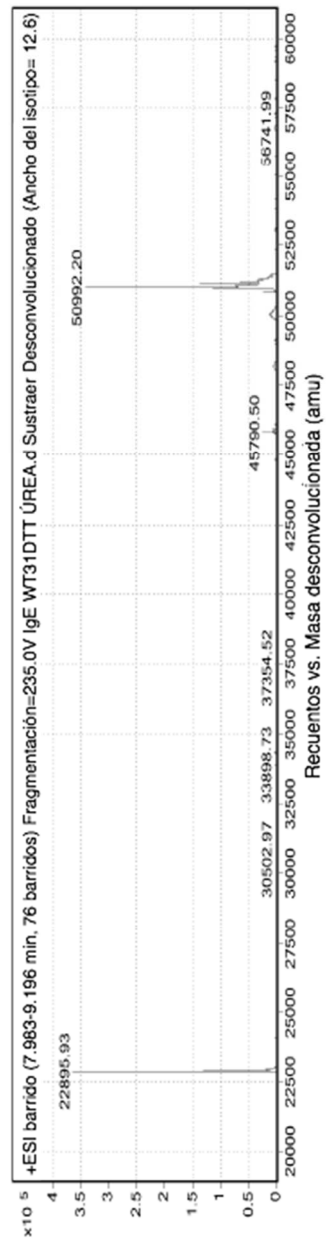


FIG. 12 B

