

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 952**

51 Int. Cl.:

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/79 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2010 E 10702506 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 2393927**

54 Título: **Producción de mezclas oligoclonales de inmunoglobulinas en células individuales**

30 Prioridad:

09.02.2009 EP 09152379

09.02.2009 US 150819 P

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

16.04.2015

73 Titular/es:

**MORPHOSYS AG (100.0%)
Lena-Christ-Strasse 48
82152 Planegg-Martinsried, DE**

72 Inventor/es:

ENZELBERGER, MARKUS

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 533 952 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 mezclas oligoclonales de inmunoglobulinas en células individuales

5 **Antecedentes de la invención**

10 Las mezclas de miembros de pares de unión oligoclonales y policlonales son herramientas valiosas en el tratamiento de enfermedades, especialmente las enfermedades infecciosas y el cáncer. Emplear una composición que contenga varios miembros de pares de unión que se unen a más de un epítipo puede aumentar la eficacia de las composiciones respectivas y disminuir, por ejemplo, el riesgo de escape de epítopos. Tales mezclas de inmunoglobulinas permiten además la administración dirigida a diferentes patógenos o subfamilias o subespecies específicas de un determinado patógeno o a una cierta población celular, especialmente en circunstancias en las que la generación de anticuerpos de reactividad cruzada no es posible o deseable.

15 Existen varias estrategias para la producción de miembros de pares de unión oligoclonales y policlonales, como las mezclas de anticuerpos. En su forma más sencilla cada anticuerpo se produce a partir de una línea celular diferente, es decir, cada anticuerpo se produce a partir de una única línea celular en recipientes de cultivo diferentes, generalmente fermentadores. En lo sucesivo, los anticuerpos individuales se mezclan más tarde para formar la mezcla de anticuerpos oligoclonales o policlonales. Véase el panel A en la figura 1. Como es evidente, este método requiere muchos recursos y por lo tanto no es comercialmente atractivo.

20 En otro método, cada anticuerpo sigue siendo producido a partir de una línea celular diferente, pero las líneas celulares se mezclan en un recipiente de cultivo, normalmente un fermentador. Este método tiene el defecto de que es esencialmente imposible controlar el crecimiento de diferentes líneas celulares en un fermentador, tornando la producción más o menos en un juego de azar. Estas cuestiones se complican aún más si se producen más de dos anticuerpos puesto que alguna línea celular podría ser capaz de multiplicarse más que otras, suprimiendo así la producción de algunas inmunoglobulinas de la mezcla. Véase por ejemplo WO2008/145133. Este método se describe en el panel B de la figura 1.

25 Aún en otro método, se producen dos o más anticuerpos en la misma línea celular, que con mayor razón tiene lugar en un recipiente de cultivo. La desventaja de este método proviene de la naturaleza heterodimérica de las inmunoglobulinas. La cadena pesada variable de un anticuerpo no sólo se apareará con su "propia" cadena ligera, sino que también indeseablemente con la cadena ligera variable del segundo (o cualquier otro subsiguiente) anticuerpo producido por la célula huésped. Esta situación se complica aún más si más de dos anticuerpos son producidos por dicha célula huésped. Los anticuerpos formados por cadenas de inmunoglobulinas apareadas incorrectamente pueden superar el número de anticuerpos formados correctamente, y por lo tanto, este método no es otra cosa que una solución inadecuada. Véase el panel C de la figura 1.

30 Por último, otro método utiliza cadenas ligeras comunes "falsas" (dummy),(véase US 7,429,486). En este método la especificidad del anticuerpo proviene de la cadena pesada variable; y la cadena ligera común a todos los anticuerpos producidos en este sistema es simplemente un medio para proporcionar una inmunoglobulina entera. Sin embargo, puesto que todos los anticuerpos necesitan ser funcionalmente activos, el uso de una cadena ligera común va acompañado de una reducción de los tipos y las propiedades de las inmunoglobulinas que se pueden producir. Además, la producción de una cadena pesada diferente no puede ser controlada adecuadamente, dando lugar a una mezcla de inmunoglobulinas más o menos sin caracterizar. Véase panel D en la figura 1.

35 En conjunto, no existe todavía una manera satisfactoria para producir eficazmente una mezcla policlonal u oligoclonal de inmunoglobulinas. Como resultará evidente, los métodos dados a conocer en la presente invención no son sólo aplicables a las inmunoglobulinas, sino a todas las proteínas multiméricas heteroméricas.

50 **Resumen de la invención**

La presente invención permite por primera vez la producción eficaz y controlable de proteínas multiméricas, como las inmunoglobulinas, a partir de células huésped individuales, en un recipiente de cultivo. La presente invención proporciona un método que permite la separación de la producción de una proteína multimérica de la producción de cualquier cantidad de proteínas multiméricas adicionales. Puesto que la expresión de los genes que codifican las diferentes proteínas multiméricas puede ser separada temporalmente, en una realización preferida las subunidades de una proteína multimérica común se unirán entre sí sin unirse sustancialmente a una subunidad de una proteína multimérica diferente, formando así la proteína multimérica deseada. El apareamiento inadecuado de polipéptidos que conduce a la formación de proteínas multiméricas indeseadas e indeseables es por lo tanto eludido.

60 La presente invención proporciona un método para la producción de al menos dos proteínas exógenas en una célula huésped eucariota, en donde cada uno de los genes que codifican dichas proteínas está bajo el control de un promotor eucariota inducible distinto, donde el método comprende

(a) cultivar dicha célula huésped eucariota en condiciones que permitan la expresión de un gen que codifica una primera proteína exógena, y,

5 (b) cultivar dicha célula huésped eucariota en condiciones que permitan la expresión de un gen que codifica una segunda proteína exógena. Los genes que codifican dichas primera y segunda proteínas exógenas se expresan de manera temporalmente separada, es decir, durante la expresión del gen que codifica dicha primera proteína exógena el gen que codifica dicha segunda proteína exógena no se expresa. Asimismo, durante la expresión del gen que codifica dicha segunda proteína exógena el gen que codifica dicha primera proteína exógena no se expresa. Dichas primera y segunda proteínas exógenas, así como cada una de todas las otras potenciales proteínas exógenas, pueden ser codificadas por genes del mismo vector o por genes de diferentes vectores. La célula huésped puede ser transfectada con dicho vector o vectores de manera transitoria, o mediante transfección estable, por ejemplo, mediante recombinación, tal como integración específica de sitio.

15 El concepto inventivo se ilustra en la figura 2. La presente invención es particularmente útil para la producción de proteínas multiméricas. Dichas proteínas multiméricas pueden ser proteínas que contengan al menos un sitio de unión al antígeno como las inmunoglobulinas.

20 La presente invención también proporciona células huésped y vectores para ser utilizados en los métodos dados a conocer en este documento. Además, la presente invención también proporciona mezclas de al menos dos proteínas exógenas que se pueden obtener por los métodos de la presente invención, así como el uso de dichas mezclas en tratamiento. La presente invención también proporciona recipientes de reacción, como fermentadores, para utilizar en los métodos de la presente invención. La presente invención también proporciona un kit que consiste en

25 (a) una célula huésped que contiene los vectores según la presente invención, e
(b) instrucciones para utilizar dichas células huésped según los métodos descritos en este documento.

Leyendas de las figuras

30 La figura 1 ilustra los métodos disponibles en la actualidad para la producción de anticuerpos oligoclonales o policlonales. Como se describe en este documento, la presente invención es superior respecto a métodos similares conocidos en el estado anterior de la técnica. En aras de la simplicidad, la figura 1 muestra solamente un escenario en el cual se producen dos anticuerpos. La estructura trapezoidal indica un recipiente de cultivo, como un matraz de cultivo. Los óvalos y los círculos indican células huésped. VH y VL indican que las células respectivas codifican y producen las respectivas cadenas pesada variable y ligera variable. Los números entre paréntesis pretenden diferenciar las distintas cadenas pesada variable y ligera variable producidas. Las primeras (1) cadenas pesada y ligera son representadas por líneas sólidas. Las segundas (2) cadenas pesada y ligera son representadas por líneas discontinuas o de puntos. Las diferentes estrategias se explican con más detalle en la sección de "Antecedentes" de este documento.

35 La figura 2 ilustra la estrategia de la presente invención. Una célula huésped transformada con ambos genes VH y VL de la presente invención. Bajo ciertas condiciones de cultivo ("condición de cultivo 0") los genes VH y VL no se transcriben. Al cambiar a otras condiciones de cultivo ("condición de cultivo 1"), se transcriben los genes VH y VL que codifican uno, y sólo un anticuerpo, y el anticuerpo respectivo es producido por la célula huésped. Los genes VH y VL que codifican el segundo anticuerpo no se transcriben (cruz negra). Al cambiar a otras condiciones de cultivo ("condición de cultivo 2"), se transcriben los genes VH y VL que codifican el segundo, y sólo el segundo anticuerpo, y el anticuerpo respectivo es producido por la célula huésped. Los genes VH y VL que codifican el primer anticuerpo no continúan transcribiéndose (cruz negra).

Descripción detallada de la invención

40 La presente invención proporciona un método para la producción de al menos dos proteínas exógenas en una célula huésped eucariota, donde cada una de dichas proteínas está bajo el control de un promotor eucariota inducible distinto,
55 dicho método comprende

(a) cultivar dicha célula huésped eucariota en condiciones que permitan la expresión de un gen que codifica una primera proteína exógena, y,
60 (b) cultivar dicha célula huésped eucariota en condiciones que permitan la expresión de un gen que codifica una segunda proteína exógena.

El término "polipéptido" se utiliza aquí en su sentido más amplio como comprenden los técnicos con experiencia. Los polipéptidos contienen al menos dos aminoácidos unidos a través de un enlace peptídico. Generalmente, los

polipéptidos contienen más de 30 aminoácidos. Los polipéptidos de particular interés en relación con la presente invención son moléculas que contienen al menos un sitio de unión al antígeno.

El término "proteína" también se utiliza en este documento en su sentido más amplio como comprenden los técnicos con experiencia. Una proteína consiste en uno o más polipéptidos, donde al menos parte del polipéptido tiene o es capaz de adquirir una disposición de estructura tridimensional definida mediante la formación de estructuras secundaria, terciaria o cuaternaria dentro de, y/o entre, su(s) cadena(s) polipeptídica(s). Las proteínas pueden ser monoméricas (compuestas de una cadena polipeptídica) o multiméricas (compuestas de dos o más cadenas polipeptídicas). Las proteínas multiméricas pueden ser homoméricas (compuestas de varias cadenas polipeptídicas idénticas) o heteroméricas (compuestas de varias cadenas polipeptídicas, donde al menos dos de esas cadenas polipeptídicas son diferentes).

Los términos "exógeno(a)s" y "heterólogo(a)s" se usan en este documento como sinónimos y se refieren a ácidos nucleicos, polipéptidos o proteínas que no se producen naturalmente en una determinada célula huésped. Normalmente, los ácidos nucleicos, los polipéptidos y las proteínas, exógenos o heterólogos, se introducen artificialmente en la célula huésped. Se pueden originar de una fuente externa a una célula huésped particular o, si provienen de la misma fuente, son modificados a partir de su forma original.

La expresión "célula huésped" según se usa en este documento puede ser cualquiera de una serie de células comúnmente utilizadas en la producción de proteínas o polipéptidos exógenos. Las células huésped preferidas de la presente invención son células huésped eucariotas, como células de hongos, células de levadura, células vegetales, células de insectos o células de mamíferos. Las que más se prefieren son las células huésped de mamíferos. En otras realizaciones preferidas, dicha célula huésped de mamífero se elige entre una célula CHO (European Collection of Cell Culture; ECACC N° 85050302), una célula PER.C6 (Crucell, Leiden, Los Países Bajos), una célula HKB11 (Bayer HealthCare, Berkley/CA, EE.UU.) y una célula HEK293 (American Type Culture Collection; N° de orden. CRL-1573). Otras células huésped preferidas son las células de levadura. Aún en otras realizaciones preferidas dichas células huésped de levadura se eligen entre células de *Pichia pastoris* y células de *Saccharomyces cerevisiae*.

El término "promotor" según se usa en este documento se refiere a una secuencia de ADN sin traducir generalmente ubicada en dirección 5' de la región codificante que contiene el sitio de unión para una ARN polimerasa dependiente de ADN y que inicia la transcripción del ADN.

La región del promotor también puede incluir otros elementos que actúan como reguladores de la expresión de los genes. Un promotor incluye el sitio de iniciación de la transcripción y sitios de unión para factores de iniciación de la transcripción y la ARN polimerasa, y puede comprender otros diversos sitios (por ejemplo, potenciadores), en los cuales se pueden unir proteínas reguladoras de la expresión del gen.

Otras "regiones reguladoras" que pueden estar involucradas en la conducción y el control de la transcripción (es decir, que regulan) el tiempo y el nivel de la transcripción de una determinada secuencia de ADN, como un ADN que codifica una proteína o un polipéptido, incluyen, por ejemplo, una región reguladora 5' (una secuencia de ADN ubicada secuencia arriba, es decir, en dirección 5', de una secuencia codificante y que comprende el promotor y la secuencia líder sin traducir 5') y una región reguladora 3' (una secuencia de ADN ubicada secuencia abajo, es decir, en dirección 3', de la secuencia codificante y que comprende señales de terminación de la transcripción (y/o regulación) adecuadas, incluidas una o más señales de poliadenilación).

Los diversos promotores utilizados según la presente invención son "distintos" en el sentido de que diferentes estímulos conducen a la expresión del gen bajo el control de cada promotor. Este es un requisito previo para la posibilidad de inducir la expresión de las proteínas bajo el control de cada uno de dichos promotores en cualquier momento dado.

El término "inducible" según se usa en este documento en el contexto de los promotores se refiere a un promotor que puede ser activado por adición de una molécula particular o un agente particular o mediante la exposición a condiciones físicas como irradiación, luz o calor.

Diversos promotores inducibles son conocidos en el área. Los promotores inducibles incluyen promotores elegidos entre promotores sensibles a las hormonas, promotores sensibles a los metales, promotores sensibles al choque térmico, promotores sensibles a los interferones y promotores sensibles a los antibióticos. La adición de inductores adecuados conduce a la expresión desde los respectivos promotores.

En ciertas realizaciones preferidas de la presente invención el promotor inducible es un promotor sensible a las hormonas. Los promotores sensibles a las hormonas promueven la transcripción únicamente cuando son expuestos a una hormona. Los ejemplos de promotores sensibles a las hormonas incluyen, pero no exclusivamente: el promotor de la probasina (que es sensible a la testosterona y otros andrógenos); el promotor MMTV (que es sensible

a dexametasona, estrógeno y andrógenos); el promotor de la proteína ácida del suero y el promotor de la caseína (que son sensibles al estrógeno). Ejemplos de promotores sensibles a hormonas son el promotor GRE (elemento sensible a glucocorticoides) y el promotor sensible a ecdisona.

5 En otras realizaciones preferidas de la presente invención, el promotor inducible es un promotor sensible a los metales. Los promotores sensibles a los metales son inducidos en presencia de uno o más metales, por ejemplo metales pesados. Los promotores sensibles a los metales pueden ser selectivos para iones uranio, cadmio, plutonio o cromo. Un ejemplo de promotor sensible a los metales es el promotor de metalotioneína.

10 En otras realizaciones preferidas de la presente invención, el promotor inducible es un promotor sensible al choque térmico. Los promotores sensibles al choque térmico son inducidos por la temperatura aumentada. Los promotores sensibles al choque térmico conocidos en el área incluyen el promotor Hsp70.

15 En otras realizaciones preferidas de la presente invención, el promotor inducible es un promotor sensible a los interferones. Los promotores sensibles a los interferones se pueden encontrar en diversos genes que aumentan luego de la acción de los interferones. Véase por ejemplo Kuhn *et al.* (1995) *Science*, 269, 1427-9.

20 En otras realizaciones preferidas de la presente invención, el promotor inducible es un promotor sensible a los antibióticos. El más conocido es el promotor tet, que aumenta luego de la adición del antibiótico tetraciclina. Véase por ejemplo Shockett *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 6522-6.

25 Los promotores preferidos según la presente invención son promotores restringidos o promotores sustancialmente restringidos. El término "restringido" según se usa en este documento en el contexto de los promotores, se refiere a los promotores que son muy exigentes, en el sentido de que no se produce expresión, o no se produce sustancialmente, cuando el promotor no es inducido. El nivel de expresión de un promotor restringido en su estado no inducido es de al menos 10 veces, más preferentemente de al menos 20 veces, aún más preferentemente de al menos 50 veces, incluso más preferentemente de al menos 100 veces y muy preferentemente de al menos 1000 veces menor que el nivel de expresión del promotor en su estado inducido.

30 La expresión "condiciones que permiten la expresión [de un polipéptido]" según se usa en este documento se refiere a las condiciones que conducen a la expresión de un determinado polipéptido. La selección de manera determinada de las condiciones de la célula huésped permite el encendido (o apagado) de la expresión de los polipéptidos de la presente invención. Típicamente tal cambio de condiciones se produce luego de la adición de un compuesto químico o natural, un "inductor", al medio de cultivo de la célula huésped. La naturaleza del inductor varía dependiendo del promotor específico utilizado. Otros cambios de las condiciones que pueden llevar a la expresión de polipéptidos son el aumento de la temperatura o la exposición a la luz o la radiación UV.

35 Los promotores inducibles han sido utilizados en las células vegetales (véase Roy *et al.*; *Plant Cell Tiss Organ Cult* (2008) 9, 1-11). Sin embargo, las proteínas expresadas en Roy *et al.* fueron de mucho menor complejidad y también sirvieron para un propósito totalmente diferente. Sin mayor elaboración sobre las dificultades para transformar los datos experimentales de células vegetales a otras células eucariotas, como células de mamíferos, la presente invención permite además la expresión y la producción de varias proteínas heteroméricas, tales como las inmunoglobulinas, mientras que Roy *et al.* sólo produjeron proteínas monoméricas. Por lo tanto un problema resuelto por la presente invención se encuentra en la producción de mezclas de proteínas heteroméricas, que se caracterizan porque las proteínas heteroméricas están correctamente "apareadas", es decir, las subunidades correctas se disponen para formar las proteínas heteroméricas individuales. Además, las dos proteínas bajo el control del promotor inducible en Roy *et al.* sirven a un propósito diferente: la glioxalasa I es una proteína que confiere tolerancia a la sal a plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, mientras que el segundo gen, Cre recombinasa, es una herramienta genética que se utiliza para quitar el gen marcador seleccionable. Dicho esto, la funcionalidad de las proteínas producidas en Roy *et al.* es totalmente diferente, mientras que en la presente invención lo que se produce es exactamente una mezcla bien definida de polipéptidos heteroméricos (anticuerpos oligoclonales o policlonales). Esto es posible mediante la separación temporal de la expresión génica de conformidad con la presente invención.

55 El término "subsiguientemente" según se utiliza en este documento se refiere a una separación temporal de la expresión de los genes, y por lo tanto de la producción de los polipéptidos de la presente invención, que están bajo el control de promotores inducibles diferentes.

60 Según sea necesario, en ciertas circunstancias también puede ser útil que dos o más genes que codifican dichos polipéptidos se expresen al mismo tiempo. Por lo tanto, en ciertas situaciones, no sería necesario que la separación temporal de la expresión de los genes se mantuviera durante todo el cultivo de la célula huésped en el recipiente de cultivo.

En realizaciones preferidas la presente invención proporciona un método para la producción de al menos dos

proteínas exógenas en una célula huésped eucariota, en el cual cada uno de los genes que codifican dichas proteínas está bajo el control de un promotor eucariota inducible distinto, dicho método comprende

- 5 (a) cultivar dicha célula huésped eucariota en condiciones que permitan la expresión de un gen que codifica una primera proteína exógena, y,
 (b) cultivar dicha célula huésped eucariota en condiciones que permitan la expresión de un gen que codifica una segunda proteína exógena. En ciertas realizaciones preferidas las condiciones que permiten la expresión del gen que codifica la primera proteína exógena en el paso (a) no conducen, o no lo hacen sustancialmente, a la expresión del gen que codifica la segunda proteína exógena. Vice versa, las condiciones que permiten la expresión del gen que codifica la segunda proteína exógena en el paso (b) no conducen, o no lo hacen sustancialmente, a la expresión del gen que codifica la primera proteína exógena. Sin embargo, como ya se mencionó antes, se pueden elegir las condiciones que llevan a la expresión de la primera y la segunda (o incluso adicionales) proteínas exógenas. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la presente invención proporciona métodos, en los cuales durante la expresión de dicho gen que codifica la primera proteína exógena en el paso (a), dicho gen que codifica la segunda proteína exógena no se expresa esencialmente. Asimismo, en otras realizaciones durante la expresión de dicho gen que codifica la segunda proteína exógena en el paso (b), dicho gen que codifica la primera proteína exógena no se expresa esencialmente.

20 "No se expresa esencialmente" según se usa en la presente invención, se refiere a una situación en la que el gen que codifica una proteína o un polipéptido dados no se expresa o se expresa sólo a los niveles de umbral mínimos. Dichos niveles de expresión son contrastados por los niveles de expresión inducida, es decir, las condiciones bajo las cuales la célula huésped de la presente invención produce los polipéptidos o las proteínas. Las condiciones bajo las cuales un polipéptido o una proteína no se expresa tienen como objetivo mantener el nivel de expresión tan bajo como sea técnicamente factible. En un caso preferido los respectivos promotores están restringidos a tales condiciones, pero se apreciará que esto no siempre es completamente posible en sistemas biológicos, por lo que algún grado de tolerancia es aceptable.

30 La expresión "recipiente de cultivo" se refiere a todos los medios que se pueden utilizar para cultivar las células huésped de la presente invención. Dependiendo de la naturaleza exacta de la célula huésped utilizada, se pueden utilizar también diferentes recipientes de cultivo. Las opciones respectivas serán obvias para el técnico con experiencia. Los recipientes de cultivo típicos que se pueden usar en la presente invención incluyen matraces, frascos de cultivo rotativos, biorreactores y fermentadores.

35 En ciertas realizaciones de la presente invención, dicha primera y dicha segunda proteínas exógenas son codificadas por genes de diferentes vectores. En tales casos, la célula huésped deberá ser transfectada con ambos vectores. Alternativamente, y preferentemente, dicha primera y dicha segunda proteínas exógenas son codificadas por genes del mismo vector. En este último caso la célula huésped sólo necesita ser transfectada con un vector.

40 La célula huésped puede ser transfectada con el vector (o vectores) de la presente invención por cualquier medio convencional conocido por los técnicos con experiencia. Por ejemplo la transfección puede ser una transfección transitoria. Por lo tanto en ciertas realizaciones de la presente invención uno o ambos de dichos genes que codifican dichas proteínas exógenas es o son introducidos en dicha célula huésped eucariota mediante transfección transitoria.

50 Alternativa y preferentemente, las células huésped son transfectadas mediante transfección estable. Por lo tanto, en ciertas realizaciones de la presente invención uno o ambos de dichos genes que codifican dichas proteínas exógenas es o son introducidos en dicha célula huésped eucariota mediante transfección estable. En este tipo de transfección el material genético que es introducido en la célula huésped es retenido más allá de la reproducción ya que el material genético se integra establemente en el genoma de la célula huésped. Normalmente la integración en el genoma de la célula huésped se produce a través de un evento de recombinación. Dicho evento de recombinación puede ocurrir al azar, o puede ser dirigido por medios experimentales. Se conocen varios sistemas en el área que permiten la integración específica de sitio de ácidos nucleicos en el genoma de una célula huésped. Por lo tanto, en ciertas realizaciones de la presente invención uno o ambos de dichos genes que codifican dichas proteínas exógenas es o son introducidos en dicha célula huésped eucariota mediante integración específica de sitio. En ciertas realizaciones dicha integración estable es efectuada por integración específica de sitio. La integración específica de sitio tiene la ventaja de que el sitio de integración es conocido, y por lo tanto, se minimizan los efectos secundarios no deseados.

60 Se conocen sistemas de integración específicos de sitio que se pueden utilizar en conjunción con la presente invención. Dos ejemplos de sistemas que se pueden utilizar son el sistema cre/lox y el sistema Flp-In. Por lo tanto, en ciertas realizaciones de la presente invención dicha integración específica de lado es integración específica de lado a través del sistema cre/lox o el sistema Flp-In.

El sistema cre/lox es un sistema de recombinación específico de sitio que hace uso de la proteína Cre, una ADN recombinasa específica de sitio. Cre puede catalizar la recombinación del ADN entre sitios específicos en una molécula de ADN. Estos sitios, conocidos como secuencias loxP, contienen sitios de unión específicos para Cre que rodean una secuencia central direccional donde puede ocurrir la recombinación. Véase por ej. Biochem Biophys Res Commun, 237(3), 752-757. El sistema Flp-In (Invitrogen, Carlsbad/CA, EE.UU.) hace uso de un sitio de recombinación Flp (FRT), en el cual se produce la recombinación específica de sitio de las respectivas moléculas de ADN dadoras hechas a medida. Estos y otros sistemas similares de recombinación son conocidos y pueden ser utilizados en conjunción con la presente invención.

La primera y/o la segunda proteínas exógenas producidas de conformidad con la presente invención son preferentemente proteínas multiméricas. Incluso más preferentemente, una proteína multimérica es una proteína multimérica heteromérica. Las ventajas de la invención presentada se vuelven particularmente claras cuando dichas proteínas multiméricas heteroméricas son expresadas y producidas por la célula huésped. La posibilidad de separar temporalmente la expresión de las diversas subunidades de una primera proteína multimérica heteromérica de la expresión de las diversas subunidades de una segunda proteína multimérica heteromérica permite el ensamblaje correcto de las subunidades respectivas de cada una de dichas proteínas multiméricas heteroméricas. Por lo tanto, en ciertas realizaciones de la presente invención, la primera y/o la segunda proteínas exógenas son proteínas multiméricas. En realizaciones más preferidas, ambas, la primera y la segunda proteínas exógenas, son proteínas multiméricas. En realizaciones aún más preferidas, la primera y/o la segunda proteínas exógenas son proteínas multiméricas heteroméricas. En realizaciones muy preferidas, ambas la primera y la segunda proteínas exógenas, son proteínas multiméricas heteroméricas.

Las proteínas multiméricas preferidas, por ej. las proteínas multiméricas heteroméricas son proteínas que contienen al menos un sitio de unión al antígeno como las inmunoglobulinas. En consonancia con el párrafo anterior, la presente invención garantiza y garantiza esencialmente que, si se desea, la cadena ligera variable correcta puede aparearse con la cadena pesada variable correcta y no con una cadena pesada variable de otra inmunoglobulina. En particular, la cadena ligera variable de la primera inmunoglobulina exógena solamente se aparea con la cadena pesada variable de la primera inmunoglobulina exógena, pero no con la cadena pesada variable de la segunda inmunoglobulina exógena. Asimismo, la cadena ligera variable de la segunda inmunoglobulina exógena solamente se aparea con la cadena pesada variable de la segunda inmunoglobulina exógena, pero no con la cadena pesada variable de la primera inmunoglobulina exógena. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la presente invención proporciona proteínas multiméricas que contienen al menos un sitio de unión al antígeno. En otras realizaciones la presente invención proporciona proteínas multiméricas heteroméricas que contienen al menos un sitio de unión al antígeno. En realizaciones preferidas, dichas proteínas multiméricas heteroméricas que contienen al menos un sitio de unión al antígeno son inmunoglobulinas. Aún en otras realizaciones, dichas proteínas multiméricas heteroméricas que comprenden al menos un sitio de unión al antígeno son fragmentos funcionales de una inmunoglobulina. Todavía en otras realizaciones de la presente invención, dichas primera y segunda proteínas exógenas son capaces de formar una proteína multimérica.

La expresión "sitio de unión al antígeno" según se usa en este documento se refiere a cualquier tramo del polipéptido compuesto por una estructura tridimensional capaz de unirse específicamente a un epítipo. Dicho sitio de unión al antígeno puede contener el dominio VH y/o VL de un anticuerpo o de una cadena de inmunoglobulina, preferentemente al menos el dominio VH. Dicho sitio de unión al antígeno también puede estar comprendido en un scFv. Los sitios de unión al antígeno también están presentes en otras moléculas proteínicas que se pueden utilizar como andamios, como las proteínas con dominios de unión a fibronectina, anticualinas, proteínas AR diseñadas (DARPs), receptores de linfocitos T, proteínas que contienen dominios de proteína A, dominios de proteína Z o dominios de Kunitz, anticuerpos, ectoínas, GFP, citocromo b562, adnectinas, proteínas de la familia Knottin, gamma-cristalina y ubiquitina.

La presente invención también proporciona métodos para la producción de más de dos proteínas exógenas en una célula huésped eucariota, en donde cada uno de los genes que codifican dichas proteínas está bajo el control de un promotor eucariota inducible distinto, dicho método comprende los pasos de

- (a) cultivar dicha célula huésped eucariota en condiciones que permitan la expresión de un gen que codifica una primera proteína exógena,
- (b) subsiguientemente, cultivar dicha célula huésped eucariota en condiciones que permitan la expresión de un gen que codifica una segunda proteína exógena,
- (c) subsiguientemente, cultivar dicha célula eucariota en condiciones que permitan la expresión de un gen que codifica una tercera proteína exógena, y, opcionalmente,
- (d) subsiguientemente, cultivar dicha célula eucariota en condiciones que permitan la expresión de incluso más genes que codifican proteínas exógenas. Como será evidente, las realizaciones de la invención descritas en este documento también son aplicables a todo escenario en el que más de dos, por ejemplo tres, cuatro, cinco,

diez o más de diez proteínas exógenas son producidas según la presente invención.

Aún en otras realizaciones, la presente invención proporciona un recipiente de cultivo para utilizar en cualquiera de los métodos estipulados en la presente invención. Las células huésped de la presente invención que contienen los vectores, o los vectores descritos antes, se cultivan en dichos recipientes de cultivo y se producen las proteínas exógenas según se describe.

Todavía en otras realizaciones, la presente invención proporciona una mezcla de al menos dos proteínas exógenas obtenidas por los métodos de la presente invención. Aún en otras realizaciones, la presente invención proporciona una mezcla de al menos dos proteínas exógenas obtenibles por los métodos de la presente invención. Dicha mezcla de al menos dos proteínas exógenas es preferentemente una mezcla de al menos dos inmunoglobulinas, como una mezcla de anticuerpos policlonales o inmunoglobulinas y una mezcla de anticuerpos oligoclonales o inmunoglobulinas.

Todavía en otras realizaciones, la presente invención estipula el uso de dicha mezcla de al menos dos proteínas exógenas obtenidas u obtenibles por los métodos de la presente invención, en medicina. Preferentemente, dichas proteínas exógenas son inmunoglobulinas y también preferentemente dicho uso es el uso en el tratamiento de una enfermedad. Dependiendo de la naturaleza y las propiedades de unión al antígeno de las inmunoglobulinas, se puede tratar cualquier enfermedad. Especialmente enfermedades como cáncer y enfermedades infecciosas.

Aún en otras realizaciones, la presente invención proporciona células huésped que contienen el vector o los vectores como los dados a conocer y descritos antes en este documento. Las células huésped son capaces de producir mezclas de al menos dos proteínas exógenas. Preferentemente, dichas proteínas exógenas son inmunoglobulinas, y muy preferentemente dicha mezcla de al menos dos proteínas exógenas es una mezcla de anticuerpos policlonales u oligoclonales.

Todavía en otras realizaciones, la presente invención proporciona vectores que contienen los genes que codifican dichas proteínas bajo el control de dichos promotores eucariotas inducibles.

Aún en otras realizaciones, la presente invención proporciona un kit que consiste en

- (a) la célula huésped que contiene el vector o los vectores de la presente invención, e
- (b) instrucciones para utilizar dichas células huésped en los métodos descritos en la presente invención. Dichas instrucciones se pueden suministrar en cualquier forma adecuada, como en forma escrita, por ejemplo en papel, o en forma electrónica, por ejemplo en un CD o cualquier otro dispositivo de almacenamiento electrónico.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de un vector adecuado para utilizar en los métodos de la presente invención

El gen que codifica una primera inmunoglobulina entera se clona detrás de un primer promotor eucariota inducible, de modo que la expresión de la primera inmunoglobulina entera sea inducida tras la adición del inductor de dicho primer promotor eucariota inducible. Se usa el promotor tet como primer promotor eucariota inducible. La expresión desde este promotor puede ser inducida por adición de tetraciclina al medio de cultivo. La clonación se produce de manera tal que la primera inmunoglobulina entera, incluido su promotor inducible, se pueda integrar en el genoma de una célula huésped usando el sistema cre/lox, es decir, los sitios de reconocimiento respectivos están presentes en el vector.

Asimismo, el gen que codifica una segunda inmunoglobulina entera se clona detrás de un segundo promotor eucariota inducible, de modo de inducir la expresión de la segunda inmunoglobulina entera tras la adición del inductor de dicho segundo promotor eucariota inducible. El primero y el segundo promotores eucariotas inducibles son diferentes. En particular, el inductor del primer promotor eucariota inducible no conduce a la expresión desde el segundo promotor eucariota inducible y el inductor del segundo promotor eucariota inducible no conduce a la expresión desde el primer promotor eucariota inducible. El promotor de metalotioneína se utiliza como el segundo promotor eucariota inducible. La expresión de este promotor puede ser inducida por la adición de cobre o cadmio. La clonación se produce de manera tal que la segunda inmunoglobulina entera, incluido su promotor inducible, se pueda integrar en el genoma de una célula huésped usando el sistema Flp-In, es decir, los sitios de reconocimiento respectivos están presentes en el vector.

La cadena ligera variable y la cadena pesada variable de la primera inmunoglobulina entera están bajo el control del mismo primer promotor eucariota inducible. Asimismo, la cadena ligera variable y la cadena pesada variable de la segunda inmunoglobulina entera están bajo el control del mismo segundo promotor eucariota inducible. Entre las cadenas ligera variable y pesada variable, los tramos de ácidos nucleicos respectivos contienen sitios de unión del ribosoma adicionales para permitir la traducción por separado de las respectivas cadenas variables.

5 Ambas inmunoglobulinas enteras se pueden clonar en el mismo vector o en vectores diferentes, utilizando pasos de clonación molecular estándar conocidos por los técnicos con experiencia. Como ejemplo de referencia nos referimos a Maniatis *et al*, Molecular cloning: a laboratory manual (Cold Spring Harbour Laboratory Press).

5 Ejemplo 2: Transfección del vector en células huésped adecuadas

10 La célula huésped es transfectada con el vector (si un vector contiene ambas inmunoglobulinas enteras) o los vectores (si las dos inmunoglobulinas enteras están contenidas en vectores diferentes) generados en el ejemplo 1. Se usan células HEK293 como células huésped y la transfección es una transfección estable.

15 Según los procedimientos estándar la población de células huésped se elige para células, en las cuales tanto la primera como la segunda inmunoglobulinas enteras están integradas establemente en el genoma. Se elige y se propaga un clon de la célula huésped de ese tipo para usar en experimentos posteriores.

15 Ejemplo 3: Expresión y producción de una mezcla oligoclonal de anticuerpos

20 La célula huésped que contiene la primera y la segunda inmunoglobulinas enteras integradas establemente en su genoma se cultiva en un recipiente de cultivo adecuado. Cuando se ha alcanzado una cierta densidad celular el inductor del primer promotor eucariota inducible, es decir, tetraciclina, se añade en cantidad suficiente para permitir la expresión de dicha primera inmunoglobulina entera. Se producen tanto la cadena ligera variable como la cadena pesada variable de la primera inmunoglobulina, y las respectivas cadenas variables forman una primera inmunoglobulina intacta entera.

25 Después de que la primera inmunoglobulina entera se produce en cantidades suficientes, se agrega el inductor del segundo promotor eucariota inducible, es decir cobre, en cantidad suficiente para permitir la expresión de dicha segunda inmunoglobulina entera. Se producen tanto la cadena ligera variable como la pesada variable de la segunda inmunoglobulina, y las cadenas variables respectivas forman una segunda inmunoglobulina intacta entera.

30 Después de que la segunda inmunoglobulina entera se produce en cantidades suficientes, ambas inmunoglobulinas enteras se purifican del caldo de cultivo de modos equivalentes conocidos por los expertos.

35 Ejemplo 4: Uso de la mezcla oligoclonal de anticuerpos en tratamiento

35 La mezcla de las dos inmunoglobulinas enteras se formula adecuadamente. La preparación farmacéutica resultante se usa para tratar a pacientes que lo necesitan.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para la producción de al menos dos proteínas exógenas en una célula huésped de mamífero o de levadura, en el cual cada uno de los genes que codifican dichas proteínas está bajo el control de un promotor eucariota inducible distinto, dicho método comprende
- 10 (a) cultivar dicha célula huésped en condiciones que permitan la expresión de un gen que codifica una primera proteína exógena, y, subsiguientemente,
- (b) cultivar dicha célula huésped en condiciones que permitan la expresión de un gen que codifica una segunda proteína exógena.
- donde cada una de dichas proteínas exógenas es una proteína multimérica heteromérica.
- 15 **2.** El método de la reivindicación 1, en el que durante la expresión de dicho gen que codifica la primera proteína exógena en el paso (a), dicho gen que codifica la segunda proteína exógena no se expresa esencialmente.
- 3.** El método de la reivindicación 1 o 2, en el que durante la expresión de dicho gen que codifica la segunda proteína exógena en el paso (b), dicho gen que codifica la primera proteína exógena no se expresa esencialmente.
- 20 **4.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha primera y dicha segunda proteínas exógenas son codificadas por genes de vectores diferentes.
- 5.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha primera y dicha segunda proteínas exógenas son codificadas por genes del mismo vector.
- 25 **6.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que uno o ambos de dichos genes que codifican dichas proteínas exógenas es o son introducidos en dicha célula huésped eucariota mediante una transfección estable o mediante una infección transitoria.
- 30 **7.** El método de la reivindicación 6, en el que dicha integración estable es efectuada mediante una integración específica de sitio como el sistema cre/lox o a través del sistema Flp-In.
- 8.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dichas proteínas multiméricas contienen al menos un sitio de unión al antígeno.
- 35 **9.** El método de la reivindicación 8 en el que dichas proteínas multiméricas que contienen al menos un sitio de unión al antígeno son inmunoglobulinas.
- 10.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha primera y dicha segunda proteínas exógenas son capaces de formar una proteína multimérica.
- 40 **11.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dichos promotores eucariotas inducibles se eligen entre promotores sensibles a las hormonas, promotores sensibles a los metales, promotores sensibles al choque térmico, promotores sensibles a los interferones y promotores sensibles a los antibióticos.
- 45 **12.** El método de la reivindicación 11, en el que dicho promotor se elige entre el promotor tet, el promotor de metalotioneína, el promotor GRE y el promotor sensible a la ecdisona.
- 50 **13.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicha célula huésped de mamífero se elige entre una célula CHO, una célula PER.C6, una célula HKB11 y una célula HEK293.
- 14.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende además los pasos de
- 55 (c) cultivar dicha célula huésped en condiciones que permitan la expresión de un gen que codifique una tercera proteína exógena, y, opcionalmente,
- (d) cultivar dicha célula huésped en condiciones que permitan la expresión de incluso más genes que codifiquen proteínas exógenas.

Figura 1

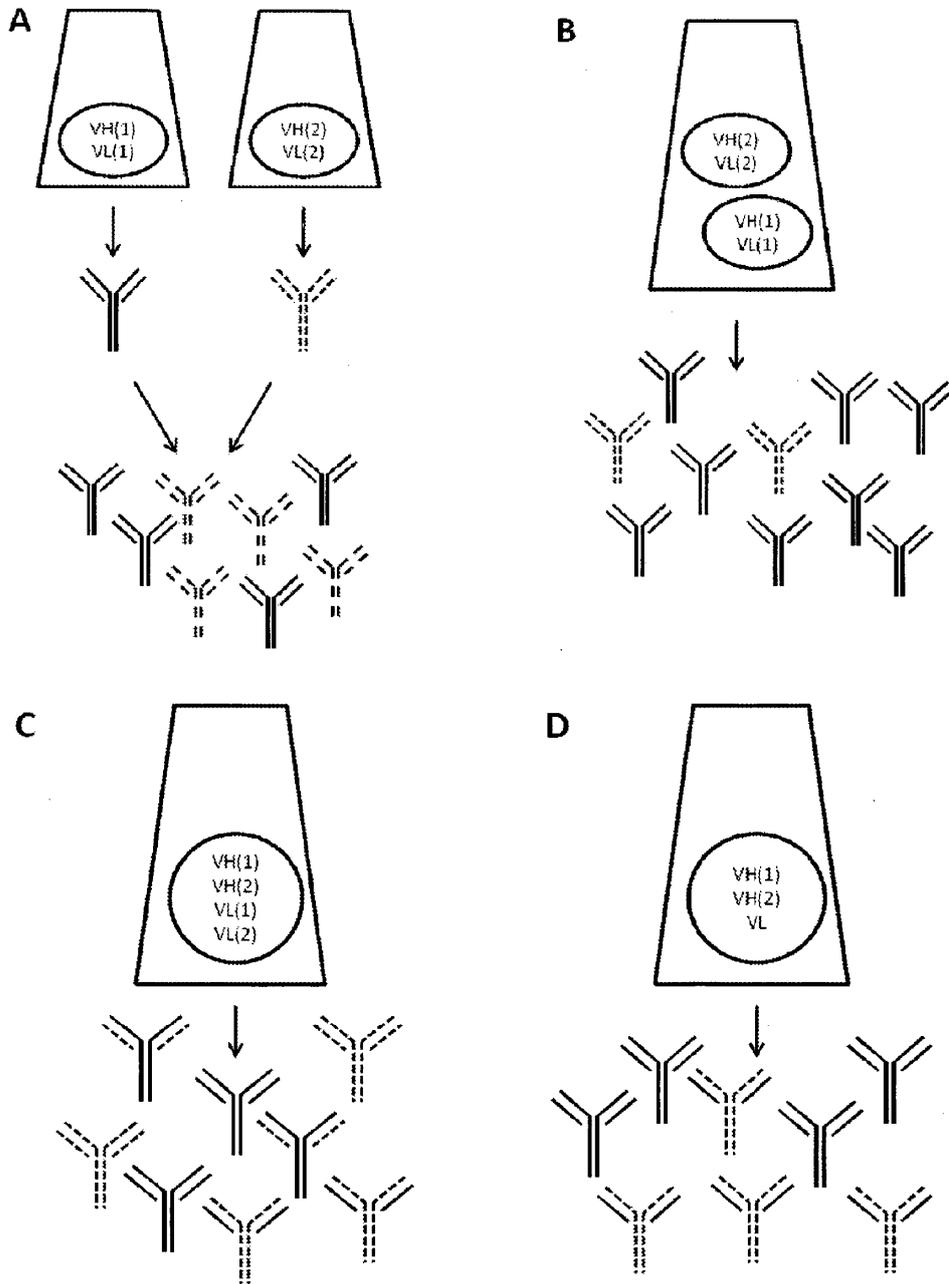


Figura 2

