

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 977**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 15/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2010 PCT/EP2010/052413**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.09.2010 WO2010097437**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2010 E 10709707 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2401295**

54 Título: **Método para producir anticuerpos**

30 Prioridad:

25.02.2009 GB 0903207

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

09.06.2017

73 Titular/es:

UCB BIOPHARMA SPRL (100.0%)

Allée de la Recherche 60

1070 Brussels, BE

72 Inventor/es:

ELLIS, MARK y

NEWNHAM, LAURA ELLEN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 615 977 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

Método para producir anticuerpos

5 La presente invención se refiere a un polinucleótido adecuado para expresar un anticuerpo o uno de sus fragmentos, a una célula que comprende el polinucleótido y a un método para preparar el polinucleótido. La invención también se refiere a un método para producir y expresar un anticuerpo o uno de sus fragmentos.

10 Mediante el uso del ADN recombinante pueden amplificarse y aislarse genes que se identifican como importantes, por ejemplo, en aplicaciones terapéuticas. Las células se emplean muchísimo para producir una proteína recombinante de interés mediante la transfección de las células con un vector que comprende la secuencia polinucleotídica que codifica la proteína de interés. Las células pueden utilizarse para producir cualquier proteína deseada, incluyendo proteínas multiméricas, tales como anticuerpos. El uso de células de mamífero para expresar proteínas recombinantes proporciona una vía de expresión de proteínas "natural", en la que las proteínas son sometidas a la maquinaria de plegamiento de proteínas de las células y al posterior procesamiento corriente abajo. Esto proporciona proteínas recombinantes que presentan la conformación requerida para la actividad *in vivo*.

15 El continuo avance de las técnicas de transfección en mamíferos cada vez está adquiriendo mayor importancia para muchas aplicaciones. Este es el caso concreto de las situaciones en que un gran número de proteínas de interés deben expresarse y analizarse, tal como en proyectos de selección de anticuerpos de alta capacidad de procesamiento.

20 Muchas proteínas para investigación, terapéuticas y de diagnóstico son proteínas multiméricas que comprenden una pluralidad de cadenas de polipéptidos correctamente plegadas. La funcionalidad correcta de la proteína multimérica depende del correcto plegamiento del dominio de proteína de cada cadena polipeptídica individual y de su correcta asociación entre sí. Los anticuerpos son un ejemplo de dichas proteínas multiméricas, en los que cada componente de cadena polipeptídica es una proteína de fusión. Los anticuerpos de IgG comprenden cuatro cadenas polipeptídicas distintas, dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en los que cada cadena es una proteína de fusión de la región variable y la región constante.

25 Un método habitual para la expresión simultánea de una pluralidad de proteínas emplea una pluralidad de vectores en la que cada uno codifica una proteína deseada. Por ejemplo, la producción de anticuerpos recombinantes habitualmente requiere la producción del ADN codificador de las cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables deseadas y la inserción en vectores plasmídicos. Los vectores plasmídicos comprenden los elementos de transcripción necesarios, que incluyen promotores y terminadores, para cada secuencia codificadora. Los vectores también pueden comprender secuencias polinucleotídicas que codifican las regiones constantes de las cadenas pesadas y ligeras. Los vectores después se transfectan en células hospedantes. Tras haber sido transfectados en las células hospedantes, los vectores pueden emplear la maquinaria de transcripción de la célula para transcribir la secuencia de ADN codificadora en los vectores, lo cual constituye una transfección transitoria. Como alternativa, la secuencia de ADN codificadora en los vectores puede integrarse en el genoma de la célula, a partir del cual se transcribe el ADN, lo cual constituye una transfección estable. Después la cadena ligera y la cadena pesada son expresadas por la célula hospedante y se realizan diversas etapas de aislamiento y purificación para obtener el producto final de anticuerpo. Existen una serie de desventajas en el empleo de este método, que incluyen la dificultad de asegurarse de que el mismo número de vectores que codifican cada cadena de anticuerpo sean transfectados y expresados en las células hospedantes. Además, el proceso completo para producir el producto final de anticuerpo es extremadamente complejo y largo y requiere múltiples etapas de digestión y acoplamiento.

Este método también es necesario para la producción de cualquier proteína multimérica recombinante que comprenda dos o más componentes de cadenas polipeptídicas que se ensamblan para formar la proteína multimérica funcional.

45 En la técnica también se conoce la forma de expresar múltiples proteínas a partir de un vector empleando sitios de entrada a ribosomas internos (IRES), que permiten el inicio de la traducción en mitad de una secuencia de ARNm. Este método también presenta desventajas, porque es probable que la secuencia génica colocada cadena abajo de la secuencia IRES proporcione un nivel de expresión más bajo, comparado con la secuencia génica colocada cadena arriba de la secuencia IRES.

50 El documento WO 2005/042774 describe un método de PCR de extensión de solapamiento de múltiplex para unir dos o más secuencias de nucleótidos que codifican dominios o componentes de una proteína heteromérica en una única reacción. Este documento indica que el método puede utilizarse para unir un par cognado de ácidos nucleicos de interés no contiguos que están contenidos dentro de una única célula o que se derivan de esta. Se indica que el método es particularmente útil para unir secuencias codificadoras de regiones variables de cadena pesada de anticuerpos y regiones variables de cadena ligera de anticuerpos de una única célula. El par cognado puede comprender una o más secuencias codificadoras de regiones constantes, además de secuencias codificadoras de regiones variables. Sin embargo, el producto de nucleótidos resultante del método aún requiere de clonación e inserción en un vector de expresión apropiado para permitir la expresión en un hospedante adecuado.

La técnica anterior también incluye al documento WO2004/032841. Este documento describe construcciones para la

producción de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos en las que las secuencias codificadoras están presentes en una única construcción y bajo el control transcripcional de un único promotor. Está presente una IRES.

Por consiguiente, es necesario proporcionar métodos para producir proteínas multiméricas recombinantes que superen las desventajas de los métodos que se emplean en la técnica en la actualidad.

5 Sumario de la Invención

Un objetivo de la presente invención es resolver uno o más de los problemas descritos anteriormente. Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo, en el que el polinucleótido es ADN, que codifica un anticuerpo o uno de sus fragmentos, en el que dicho polinucleótido es adecuado para su expresión en una célula de mamífero y comprende, en el siguiente orden: i) una primera secuencia de promotor, que está unida operablemente a ii) un primer polinucleótido codificador que codifica uno o más dominios del anticuerpo o sus fragmentos, que está unido operablemente a iii) una secuencia de ADN reguladora de la transcripción bidireccional que es capaz de formar el extremo de cada transcripción de ARN formada, que está unida operablemente a iv) una segunda secuencia polinucleotídica codificadora que codifica uno o más dominios del anticuerpo o sus fragmentos, que está unida operablemente a v) una segunda secuencia de promotor, en el que el primer polinucleótido de ii) y el segundo polinucleótido de iv) están una orientación transcripcional convergente.

En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una célula que comprende un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo, según se definió anteriormente.

En un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un sistema de expresión que comprende un polinucleótido, según se definió anteriormente, y un disolvente o medio.

En un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo, según se definió anteriormente, en el que dicho método comprende:

a) proporcionar la primera y la segunda secuencia de promotor, la primera secuencia polinucleotídica codificadora que comprende todo o parte de uno o más dominios del anticuerpo o sus fragmentos; la segunda secuencia polinucleotídica codificadora que comprende todo o parte de uno o más dominios del anticuerpo o sus fragmentos; y una tercera secuencia polinucleotídica que comprende la secuencia de ADN reguladora de la transcripción bidireccional y que comprende opcionalmente una parte de la primera y/o la segunda secuencia polinucleotídica codificadora;

b) fusionar la primera secuencia polinucleotídica codificadora con la tercera secuencia polinucleotídica;

30 c) fusionar la segunda secuencia polinucleotídica codificadora con la tercera secuencia polinucleotídica; y

d) fusionar la primera secuencia de promotor con la primera secuencia polinucleotídica codificadora y fusionar la segunda secuencia de promotor con la segunda secuencia polinucleotídica codificadora.

La presente invención también proporciona un método para obtener un anticuerpo recombinante con una función deseada a partir de una célula de mamífero, que comprende:

35 a) proporcionar una población de células formadoras de anticuerpos que se sospecha que contiene al menos una célula capaz de producir un anticuerpo que muestre la función deseada;

b) generar un polinucleótido lineal recombinante, según se define en la reivindicación 1, en el que el primer y el segundo polinucleótido codificador codifica, cada uno, uno o más dominios variables de anticuerpo, o sus fragmentos, de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos obtenida en a);

40 c) expresar un anticuerpo recombinante empleando el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo generado en la etapa (b);

d) seleccionar el anticuerpo recombinante producido en la etapa (c) para la función deseada; y

e) opcionalmente repetir las etapas (b), (c) y (d) para identificar un anticuerpo recombinante que muestre la función deseada.

45 En un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona un método para expresar un anticuerpo en una célula de mamífero, que comprende:

a) transfectar una célula con el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo, según se definió anteriormente; y

b) expresar el anticuerpo codificado por el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo.

50 El polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo, la célula, el sistema de expresión y los métodos

proporcionados por la presente invención resultan ventajosos porque proporcionan una manera más eficaz, sencilla y rápida de producir un anticuerpo. El polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo, la célula, el sistema de expresión y los métodos evitan la necesidad de múltiples etapas de digestión y acoplamiento para producir vectores, múltiples transformaciones en células hospedantes, y permiten una manera más rápida y fácil de obtener el anticuerpo recombinante final.

La célula según la presente invención también puede ser capaz de ser transfectada con un número mayor de polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos exógenos, comparado con el mismo número de plásmidos. Por consiguiente, la célula y el método de la presente invención pueden proporcionar un método de transfección y expresión más eficaz, y pueden proporcionar un mayor rendimiento del anticuerpo expresado, comparado con el uso de plásmidos.

Breve descripción de los dibujos

En los siguientes dibujos se describen realizaciones específicas de la presente invención solo como ejemplo, en los que:

La figura 1 es un diagrama esquemático de un método convencional conocido empleado para clonar y expresar regiones variables de anticuerpo empleando vectores de expresión, en el que las secuencias codificadoras de la cadena pesada variable (VH) y la cadena ligera variable (VL) son amplificadas mediante PCR en presencia de cebadores (P) que añaden sitios de restricción en los extremos 5' y 3' de las secuencias de VH y VL que se muestran como regiones grisáceas a cada lado de las secuencias de VH y VL; los sitios de restricción permiten la digestión cadena abajo y el acoplamiento en vectores de expresión distintos que pueden comprender secuencias de dominios constantes cadena abajo; los dos vectores de expresión entonces se transfectan a una célula para proporcionar una célula transfectada de modo transitorio o estable capaz de expresar el anticuerpo deseado.

La figura 2 es un diagrama esquemático de un ejemplo de una secuencia polinucleotídica transcripcionalmente activa proporcionada por la presente invención, en la que F1 es una primera secuencia de promotor, F2 es una primera secuencia polinucleotídica codificadora, F3 es una tercera secuencia polinucleotídica que comprende una secuencia reguladora bidireccional, F4 es una segunda secuencia polinucleotídica codificadora, y F5 es una segunda secuencia de promotor.

La figura 3a es un diagrama esquemática de un ejemplo de una secuencia polinucleotídica transcripcionalmente activa proporcionada por la presente invención, en la que F2 es una secuencia codificadora de una cadena ligera de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos, y F4 es una secuencia codificadora de una cadena pesada de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos, y la figura 3b es un ejemplo de una secuencia polinucleotídica transcripcionalmente activa proporcionada por la presente invención, que comprende una secuencia codificadora de cadena ligera variable de conejo (RbVL), una secuencia codificadora de cadena ligera constante de ratón (mCK), una secuencia codificadora de cadena pesada constante de ratón (mCH1) y una secuencia codificadora de cadena pesada variable de conejo (RbVH).

La figura 4 es un diagrama esquemático de un ejemplo de un método empleado para generar un fragmento de una secuencia polinucleotídica transcripcionalmente activa, que comprende una secuencia de poliadenilación bidireccional (poliA) y secuencias de cadena ligera constante de ratón (mCK) y de cadena pesada constante de ratón (mCH1) orientadas en direcciones convergentes opuestas con respecto a sus marcos de lectura.

La figura 5a es un diagrama esquemático de dos secuencias de promotores, CMV y SFFV, que están flanqueadas cada una por sitios de restricción; la figura 5b es una representación esquemática de la amplificación de la cadena ligera variable (VK) procedente de un vector del laboratorio de los inventores pVRbCK empleando los cebadores 8116 y 5839; y la figura 5c es una representación esquemática de la amplificación de la cadena pesada variable (VH) procedente de un vector del laboratorio de los inventores pVRbFab' empleando los cebadores 8792 y 5838.

La figura 6 es un diagrama esquemático de la generación de la secuencia polinucleotídica recombinante lineal transcripcionalmente activa final, que comprende, en el siguiente orden, un promotor de CMV, una secuencia codificadora de cadena ligera variable (VK), una secuencia codificadora de cadena ligera constante (mCK), una secuencia de poliA bidireccional, una secuencia codificadora de cadena pesada constante (mCH1), una secuencia codificadora de cadena pesada variable (VH) y una secuencia de un promotor de SFFV mediante una PCR de arrastre final empleando los cebadores 4332 y 8793.

Breve resumen de las secuencias

SEQ ID NO:1 es la secuencia de nucleótidos de un cebador directo que comprende una región complementaria con el extremo 5' de una secuencia que comprende una secuencia de poliA y una cola de extensión solapante que comprende un sitio EcoRI.

SEQ ID NO:2 es la secuencia de nucleótidos de un cebador inverso que comprende una región complementaria con el extremo 3' de una secuencia que comprende una secuencia de poliA y una cola de extensión solapante que comprende un sitio EcoRI.

SEQ ID NO:3 es la secuencia de nucleótidos de un cebador que comprende una región complementaria con el extremo 5' de una secuencia que contiene un dominio de cadena ligera variable y una cola de extensión solapante complementaria con el extremo 3' de una primera secuencia de promotor de CMV.

5 SEQ ID NO:4 es la secuencia de nucleótidos de un cebador que comprende una región complementaria con el extremo 3' de una secuencia que contiene un dominio de cadena ligera variable y una cola de extensión solapante complementaria con el extremo 5' de una secuencia de dominio de cadena ligera constante.

SEQ ID NO:5 es la secuencia de nucleótidos de un cebador que comprende una región complementaria con el extremo 5' de una secuencia que contiene un dominio de cadena pesada variable y una cola de extensión solapante complementaria con el extremo 3' de una segunda secuencia de promotor de SFFV.

10 SEQ ID NO:6 es la secuencia de nucleótidos de un cebador que comprende una región complementaria con el extremo 3' de una secuencia que contiene un dominio de cadena pesada variable y una cola de extensión solapante complementaria con el extremo 5' de una secuencia de dominio de cadena pesada constante.

SEQ ID NO:7 es la secuencia de nucleótidos de un cebador que es complementaria con una región no codificadora en el extremo 5' de la primera secuencia de promotor de CMV.

15 SEQ ID NO:8 es la secuencia de nucleótidos de un cebador que es complementaria con una región no codificadora en el extremo 5' de la segunda secuencia de promotor de SFFV.

20 SEQ ID NO:9 es la secuencia de nucleótidos que comprende, en el siguiente orden, una secuencia codificadora de un dominio ligero constante (κ), una secuencia de poliA bidireccional, y una secuencia codificadora de dominio pesado constante, en la que la secuencia codificadora de dominio ligero constante y la secuencia codificadora de dominio pesado constante están en una orientación transcripcional convergente.

SEQ ID NO:10 es la secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia del primer promotor de CMV (F1L).

SEQ ID NO:11 es la secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia del segundo promotor de SFFV (F1H).

Descripción detallada de la invención

A continuación se describirá la presente invención con más detalle.

25 Los términos "proteína" y "polipéptido" se utilizan indistintamente en la presente memoria, a menos que el contexto indique lo contrario. Se pretende que "péptido" haga referencia a 10 o menos aminoácidos.

El término "polinucleótido" incluye un gen, ADN, ADNc, ARN, ARNm, etc., a menos que el contexto indique lo contrario. El polinucleótido puede ser bicatenario o monocatenario.

30 Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "que comprende" en el contexto de la presente memoria descriptiva debe ser interpretada como "que incluye".

El término "distinto", en el contexto de la presente invención, significa que los polinucleótidos son diferentes/no idénticos. Los polinucleótidos pueden tener, por ejemplo, una homología del 95% o menor, una homología del 90% o menor, una homología del 85% o menor, una homología del 80% o menor, o una homología del 75% o menor cuando se comparan secuencias de longitud completa, por ejemplo, empleando un software adecuado, tal como BLAST.

El término "exógeno", en el contexto de la presente invención, significa que las secuencias polinucleotídicas se originan fuera de la célula hospedante.

40 La expresión "proteína multimérica", en el contexto de la presente invención, significa un complejo de proteínas que comprende una pluralidad, tal como 2 o 3, de componentes de cadenas de proteínas, en las que los componentes de las cadenas se asocian entre sí mediante enlaces covalentes o no covalentes para formar la proteína multimérica. La proteína multimérica es un anticuerpo.

45 La expresión "proteína de fusión", en el contexto de la presente invención, significa un polipéptido que comprende una pluralidad de subunidades, en las que cada subunidad está codificada por una secuencia polinucleotídica codificadora diferente. Cada secuencia polinucleotídica codificadora comprende una o más secuencias génicas, o sus fragmentos. La traducción de la pluralidad de secuencias polinucleotídicas codificadoras de subunidades produce una única cadena polipeptídica. Las subunidades de la proteína de fusión pueden unirse directamente a la cadena polipeptídica o pueden estar unidas a través de una secuencia de conector adecuada. Generalmente, la proteína de fusión es una cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo que comprende un dominio variable y un dominio constante, o sus fragmentos.

50 La expresión "polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo", en el contexto de la presente invención, significa un polinucleótido lineal que comprende los elementos necesarios requeridos para la transcripción

de las secuencias codificadoras en el polinucleótido después de la transfección en la célula hospedante. El polinucleótido lineal transcripcionalmente activo comprende dos secuencias de promotores y una secuencia de ADN reguladora de la transcripción bidireccional. La secuencia de ADN reguladora de la transcripción bidireccional generalmente es una secuencia capaz de formar el extremo de la transcripción de ARN para cada secuencia polinucleotídica codificadora. La secuencia de ADN reguladora de la transcripción bidireccional puede formar el extremo de cada transcripción de ARN terminando la transcripción y/o cortando cada transcripción de ARN.

De manera tradicional, los polinucleótidos se manipulan en forma de plásmidos. Esto puede ser debido a que el plásmido proporciona una forma relativamente estable en la que el polinucleótido pertinente puede manipularse, conservarse y similares. El ADN plasmídico no es un polinucleótido lineal transcripcionalmente activo dentro del contexto de la presente memoria descriptiva, sino que debe cortarse para proporcionar un polinucleótido lineal transcripcionalmente activo. En una realización, el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo no comprende secuencias del esqueleto del vector. En una realización, el polinucleótido transcripcionalmente activo no es capaz de realizar la replicación autónoma, por ejemplo, el polinucleótido transcripcionalmente activo no comprende un origen de la replicación.

Cada polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede estar en forma de un fragmento de ADN transcripcionalmente activo, según se describe en el documento US 6.280.977 y en Liang, X. *et al.*, 2002, The Journal of Biological Chemistry, 227(5), 3593-3598, que describen fragmentos de PCR transcripcionalmente activos (TAP) empleados para experimentos de expresión.

Aunque el documento US 6.280.977 y Liang, X. *et al.*, 2002, The Journal of Biological Chemistry, 227(5), 3593-3598 describen un método para producir un polinucleótido lineal transcripcionalmente activo y el uso de un polinucleótido lineal transcripcionalmente activo para expresar una proteína, no se indica ni se sugiere que cada polinucleótido lineal transcripcionalmente activo pueda comprender dos secuencias polinucleotídicas codificadoras convergentes, en las que cada secuencia polinucleotídica codificadora codifica un componente de una proteína multimérica, tal como una cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos, y una secuencia reguladora bidireccional.

La expresión "unido operablemente", en el contexto de la presente invención, se refiere a una disposición de secuencias en la que las secuencias están configuradas para que realicen su función deseada.

El polinucleótido lineal transcripcionalmente activo comprende una secuencia reguladora bidireccional colocada entre dos secuencias polinucleotídicas codificadoras, y una secuencia de promotor está colocada cadena arriba de casa secuencia polinucleotídica codificadora.

El polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico adecuada, tal como ADN o ARN.

Los componentes de secuencias del polinucleótido, que incluyen los promotores y la secuencia reguladora bidireccional y las secuencias codificadoras de proteínas, pueden estar separados por secuencias de nucleótidos no codificadoras/no funcionales.

Cada secuencia codificadora de proteína puede comprender una o más secuencias no codificadoras, tales como intrones, que pueden ser retiradas mediante el corte del ARNm.

En una realización, los componentes de secuencias polinucleotídicas no están separados por secuencias no codificadoras, tales como intrones, y están unidos de modo contiguo.

La primera y la segunda secuencia polinucleotídica codificadora están en una orientación transcripcional convergente, lo cual significa que las hebras codificadoras están en dirección opuesta con respecto a la dirección de la transcripción por una ARN polimerasa. La primera y la segunda secuencia de promotor también están orientadas en direcciones opuestas. Tal como se muestra en la figura 2, el marco de lectura directo del primer promotor (F1) provoca que la ARN polimerasa se una al extremo 5' de la hebra de ADN superior (marco de lectura directo) y que transcriba la hebra codificadora de la primera secuencia polinucleotídica codificadora (hebra de ADN superior de F2), y el marco de lectura inverso del segundo promotor (F5) provoca que la ARN polimerasa se una al marco de lectura inverso (hebra de ADN inferior) y que transcriba la hebra codificadora de la segunda secuencia polinucleotídica codificadora (hebra de ADN inferior de F4).

Puede emplearse cualquier secuencia polinucleotídica codificadora adecuada en el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo. Las secuencias codificadoras pueden ser la secuencia mínima que codifica un componente de un anticuerpo de interés, es decir, consiste fundamentalmente en las secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido pertinente. Cada secuencia polinucleotídica codificadora codifica uno o más genes, o sus fragmentos.

Cada secuencia polinucleotídica codificadora puede ser idéntica a una secuencia polinucleotídica endógena que codifica una proteína, o una versión mutada de esta, por ejemplo, con una actividad biológica atenuada, o uno de sus fragmentos. Como alternativa, cada secuencia codificadora empleada en la presente invención codifica una

proteína heteróloga, que normalmente no es expresada por la célula hospedante.

En una realización, cada secuencia polinucleotídica codificadora es autóloga. Como alternativa, cada secuencia polinucleotídica codificadora puede ser heteróloga.

5 El polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede comprender una pluralidad de secuencias polinucleotídicas codificadoras idénticas y/o una pluralidad de secuencias polinucleotídicas codificadoras distintas.

Las secuencias polinucleotídicas codificadoras pueden codificar una proteína multimérica de interés, que puede ser cualquier proteína multimérica adecuada, incluyendo proteínas terapéuticas, profilácticas o de diagnóstico.

Dichas una o más proteínas expresadas también pueden contener un marcador o etiqueta para ayudar a la purificación/separación.

10 El polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede comprender una o más secuencias polinucleotídicas codificadoras adicionales para la expresión, que forman una o más cadenas polipeptídicas distintas después de la traducción. En una realización, el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo comprende una pluralidad de polinucleótidos codificadores adicionales, en los que cada secuencia polinucleotídica codificadora codifica otro componente de la misma proteína multimérica o de una proteína multimérica diferente.

15 La célula según la presente invención puede comprender además uno o más polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos diferentes adicionales, en los que cada polinucleótido lineal transcripcionalmente activo adicional comprende una secuencia polinucleotídica codificadora, preferiblemente una pluralidad de secuencias polinucleotídicas codificadoras, y cada una codifica un componente de una proteína multimérica, según se definió anteriormente. Preferiblemente, la célula comprende una pluralidad de polinucleótidos lineales transcripcionalmente
20 activos, en los que cada polinucleótido comprende una pluralidad de diferentes secuencias polinucleotídicas codificadoras que codifican diferentes proteínas multiméricas para la expresión, preferiblemente en forma de polinucleótidos, según se definió anteriormente.

Las secuencias polinucleotídicas codificadoras codifican cada una un componente de una proteína multimérica. Cada componente de la proteína multimérica puede asociarse para formar la proteína multimérica mediante
25 cualquier medio adecuado, por ejemplo, a través de enlaces covalentes y/o no covalentes.

La proteína multimérica puede formarse a partir de una pluralidad de proteínas idénticas y/o diferentes expresadas por el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo según la presente invención.

30 El polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede codificar componentes de proteína de una proteína multimérica que forman un par cognado derivado de una sola célula. Por consiguiente, la expresión de las proteínas a partir del polinucleótido lineal transcripcionalmente activo en la célula asegura que la actividad original de la proteína multimérica se mantiene.

Los componentes de secuencias de proteínas preferiblemente se coensamblan en la célula según la presente invención después de la expresión. Por consiguiente, otra ventaja de la presente invención es que la proteína multimérica producida se ensambla en la célula y puede tener la conformación deseada requerida para la actividad
35 *in vivo*.

En una realización, una o ambas de las secuencias polinucleotídicas codificadoras codifican una proteína de fusión que comprende una pluralidad de subunidades.

40 En la realización en la que una o ambas secuencias polinucleotídicas codificadoras codifican una proteína de fusión que comprende una pluralidad de subunidades, cada secuencia codificadora de subunidad puede estar separada por una o más secuencias no codificadoras, tales como intrones, que pueden ser eliminadas mediante el corte del ARNm. En una realización, las secuencias polinucleotídicas codificadoras están separadas por una secuencia de conector, que preferiblemente codifica un conector polipeptídico. El conector polipeptídico puede tener cualquier longitud adecuada para que las subunidades de la proteína de fusión se ensamblen en una proteína de fusión funcional.

45 En una realización, las secuencias polinucleotídicas codificadoras de subunidades de la proteína de fusión no están separadas por secuencias no codificadoras ni secuencias de conector, y están unidas de modo contiguo.

Cada secuencia polinucleotídica codificadora puede comprender cualquier número adecuado de secuencias polinucleotídicas codificadoras de subunidades de la proteína de fusión, que juntas forman una proteína de fusión. Preferiblemente, cada secuencia polinucleotídica codificadora comprende 2 secuencias polinucleotídicas
50 codificadoras de subunidades de la proteína de fusión, 3 secuencias polinucleotídicas codificadoras de subunidades de la proteína de fusión o 4 secuencias polinucleotídicas codificadoras de subunidades de la proteína de fusión.

La proteína multimérica es un anticuerpo, o uno de sus fragmentos, y cada secuencia polinucleotídica codificadora codifica uno o más dominios de anticuerpo, o sus fragmentos.

Los anticuerpos, en el contexto de la presente invención, incluyen anticuerpos completos de cualquier clase adecuada, por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG or IgM, o subclase, tal como IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, y sus fragmentos funcionalmente activos y derivados, y pueden ser, pero no se limitan a anticuerpos monoclonales, humanizados, totalmente humanos o quiméricos. Por tanto, los anticuerpos pueden comprender una molécula de anticuerpo completa que tiene las cadenas pesadas y ligeras de longitud completa, o uno de sus fragmentos, y pueden ser, pero no se limitan a VH, VL, VHH, Fab, Fab modificado, Fab', F(ab')₂, Fv, anticuerpos bi-, tri- o tetravalentes, scFv, anticuerpos bi-, tri- o tetravalentes, bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y fragmentos de unión al epitopo de cualquiera de los anteriores (véase, por ejemplo, Holliger y Hudson, 2005, *Nature Biotech.*, 23(9):1126-1136; Adair y Lawson, 2005, *Drug Design Reviews - Online* 2(3), 209-217). Otros fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab y Fab' descritos en las solicitudes de patente internacional WO2005/003169, WO2005/003170 y WO2005/003171. Los anticuerpos multivalentes pueden comprender múltiples especificidades o pueden ser monoespecíficos (véanse, por ejemplo, los documentos WO 92/22853 y WO05/113605).

Los dominios constantes de la molécula de anticuerpo, si están presentes, pueden seleccionarse considerando la función propuesta de la molécula de anticuerpo y, en particular, las funciones efectoras que puedan requerirse. Por ejemplo, los dominios de región constante pueden ser dominios de IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humanas. En particular, se pueden usar los dominios de región constante de IgG humana, especialmente los isotipos IgG1 e IgG3 cuando la molécula de anticuerpo se destina a usos terapéuticos y se requieren funciones efectoras. Como alternativa, se pueden utilizar los isotipos IgG2 e IgG4 cuando la molécula de anticuerpo se destina a fines terapéuticos y no se requieren funciones efectoras de anticuerpos, por ejemplo, simplemente para bloquear la actividad. Cabe destacar que también se pueden usar variantes de secuencia de dichos dominios de región constante.

Por consiguiente, en la presente invención, cada secuencia polinucleotídica codificadora codifica uno o más dominios de anticuerpo, o sus fragmentos. Un "dominio de anticuerpo", en el contexto de la presente invención, significa un dominio variable o constante, o uno de sus fragmentos, de un anticuerpo. El término "región" puede emplearse de modo intercambiable con el término "dominio". Los ejemplos de dominios de anticuerpo incluyen los dominios variables VH, VL, VHH, IgNAR y los dominios constantes CL, CH1, CH2 y CH3. La referencia a "el dominio de cadena pesada constante" o "uno o más dominios de cadena pesada constantes" puede indicar uno o más dominios de CH1, CH2 y CH3. Cualquier secuencia polinucleotídica codificadora seleccionada puede comprender un dominio de anticuerpo completo, comprender un fragmento de un dominio de anticuerpo, o comprender dos o más dominios de anticuerpo, o sus fragmentos.

Las proteínas expresadas preferiblemente se ensamblan en una proteína de anticuerpo multimérica que comprende una pluralidad de proteínas idénticas y/o diferentes.

Cualquier combinación de uno o más dominios, o sus fragmentos, puede ser codificada por cada secuencia polinucleotídica codificadora.

En los anteriores ejemplos de formatos de anticuerpos que pueden ser un formato de anticuerpo de una única cadena polipeptídica, que incluyen VH, VL, VHH, IgNAR, scFv, la presente invención también proporciona un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo que codifica dos anticuerpos de una única cadena polipeptídica, que comprende, en el siguiente orden, una primera secuencia de promotor, una primera secuencia polinucleotídica codificadora, una secuencia reguladora bidireccional, una segunda secuencia polinucleotídica codificadora y una segunda secuencia de promotor, en el que la primera y la segunda secuencia polinucleotídica codificadora están en una orientación transcripcional convergente, y la secuencia reguladora bidireccional está unida operablemente a la primera y la segunda secuencia polinucleotídica codificadora, y cada secuencia polinucleotídica codificadora codifica un anticuerpo de una única cadena polipeptídica, o uno de sus fragmentos seleccionado de VH, VL, VHH, scFv. Los dominios variables seleccionados en cada secuencia polinucleotídica codificadora pueden ser los mismos dominios o dominios diferentes. Los dominios variables expresados pueden estar separados y no asociarse para formar una proteína multimérica. Como alternativa, los dominios variables pueden asociarse para formar una proteína multimérica, tal como VH-VH, VL-VL, VH-VL o VH-VL. Los componentes de la proteína multimérica pueden asociarse por medios covalentes o no covalentes.

En una realización, una secuencia polinucleotídica codificadora codifica una cadena ligera de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos. En esta realización, la cadena ligera, o su fragmento, preferiblemente está codificada por una secuencia polinucleotídica codificadora de dominio variable y una secuencia polinucleotídica que contiene un dominio constante.

En otra realización, una secuencia polinucleotídica codificadora codifica una cadena pesada de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos. En esta realización, la cadena pesada, o su fragmento, preferiblemente está codificada por una secuencia polinucleotídica codificadora de dominio variable y una secuencia polinucleotídica que contiene un dominio constante.

En una realización preferida, la primera secuencia polinucleotídica codificadora codifica una cadena ligera de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos, y la segunda secuencia polinucleotídica codificadora codifica una cadena pesada de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos. Las secuencias polipeptídicas de la cadena ligera y la cadena pesada codificadas por el polinucleótido transcripcionalmente activo preferiblemente se ensamblan en la célula para

formar el anticuerpo multimérico, o uno de sus fragmentos, después de la expresión, por ejemplo, un fragmento Fab o Fab'.

5 Cada dominio de anticuerpo puede originarse de la misma fuente o de una fuente diferente. Por consiguiente, en la realización en la que el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo codifica un dominio variable y uno o más dominios constantes de una cadena ligera y/o cadena pesada, los dominios variables y los dominios constantes pueden ser heterólogos. Por ejemplo, los dominios variables, o sus fragmentos, pueden originarse de un ratón, y los dominios constantes pueden ser humanos.

10 En una realización, la secuencia de la cadena pesada variable y la secuencia de la cadena ligera variable pueden formar un par cognado de una única célula, manteniendo con ello la afinidad de unión del anticuerpo endógeno de la célula. En otra realización, la secuencia de la cadena pesada variable y la secuencia de la cadena ligera variable no forman un par cognado. En esta realización, las secuencias de la cadena pesada variable y las secuencias de la cadena ligera variable pueden ser secuencias apareadas aleatoriamente derivadas de una población de células genéticamente diversas.

15 Después de la expresión del anticuerpo, o su fragmento, este puede procesarse aún más, por ejemplo, mediante conjugación con otra entidad o, por ejemplo, puede PEGilarse para generar un producto con las propiedades requeridas.

20 En un aspecto, el anticuerpo producido, o su fragmento, es útil en terapia o diagnóstico, investigación, análisis, ensayos o similares. Los anticuerpos de la presente descripción pueden poseer diversas modificaciones. Por ejemplo, los anticuerpos pueden conjugarse con una o más moléculas efectoras o indicadoras, marcadores o etiquetas, tales como un radiomarcador, un marcador luminiscente/fluorescente, para cualquier objetivo de diagnóstico o terapéutico adecuado.

El polinucleótido lineal transcripcionalmente activo comprende una primera secuencia de promotor, una segunda secuencia de promotor y una secuencia reguladora bidireccional.

25 Tal como se emplea en la presente, el término "promotor" es una secuencia de ADN que, en general, se extiende cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción y está implicada en la unión de la ARN polimerasa. El promotor puede contener varios elementos de secuencia corta (<10 pares de bases) que se unen a factores de transcripción, en general dispersados a través de >200 pares de bases. Un promotor que contiene solo elementos reconocidos por factores generales y cadena arriba habitualmente puede ser transcrito en cualquier tipo de célula. Estos promotores pueden ser responsables de la expresión de genes celulares que se expresan constitutivamente (a veces denominados genes constitutivos). También existen los promotores específicos de tejido que se limitan a tipos concretos de células, tales como el promotor de metalotioneína humana (MT) que es sobrerregulado por iones de metales pesados y glucocorticoides. En la presente invención puede emplearse cualquier secuencia de promotor adecuada, dependiendo del tipo de célula hospedante empleada. Los ejemplos de promotores adecuados incluyen promotores de CMV, tales como hCMV, promotor lac (un promotor de células bacterianas), promotores de LTR víricos, promotor de SFFV, promotor de SV40, promotor del factor de alargamiento (EFA1) y promotor temprano inmediato IE1 para células hospedantes de insecto. También puede emplearse cualquier otro promotor de baculovirus que se exprese de modo independiente de la expresión de genes de baculovirus, tal como, por ejemplo, el promotor de gp64. Uno o más de los promotores empleados puede ser un promotor inducible.

40 Los promotores en el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo pueden ser iguales o diferentes. Si los promotores son diferentes, la potencia de los promotores puede seleccionarse de modo ventajoso para infrarregular o sobrerregular selectivamente la expresión de un polinucleótido codificador, comparado con el otro polinucleótido codificador.

45 El polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede comprender una secuencia de potenciador cadena arriba de la secuencia de promotor. Por ejemplo, una secuencia de potenciador de la región homóloga 5 (hr5) puede colocarse cadena arriba de una secuencia de promotor del promotor temprano inmediato (IE1) para células hospedantes de insecto.

50 El polinucleótido lineal transcripcionalmente activo comprende una secuencia reguladora bidireccional. La secuencia reguladora bidireccional es cualquier secuencia de ADN reguladora de la transcripción adecuada que sea capaz de formar el extremo de cada transcripción de ARN, incluyendo ARNm o pre-ARNm, formada a partir de las secuencias polinucleotídicas codificadoras. La secuencia reguladora bidireccional puede formar el extremo de cada transcripción de ARN terminando la transcripción y/o iniciando el corte de la transcripción de ARN durante o después de la transcripción.

55 En la realización en que la secuencia reguladora bidireccional es un terminador de la transcripción, la secuencia generalmente provoca que la ARN polimerasa cese la transcripción formando una estructura de tallo-bucle en el ARN. La estructura de tallo-bucle provoca que la ARN polimerasa se aleje del ADN y, por tanto, se termina la transcripción.

En la realización en que la secuencia reguladora bidireccional inicia el corte de la transcripción de ARN, la secuencia

en la transcripción de ARN provoca que una o más proteínas se unan a la transcripción de ARN y la corten, formando con ello el final de la transcripción de ARN. Una secuencia adecuada es una secuencia de poliadenilación, que es transcrita en el ARN en donde provoca que una enzima se una y catalice el corte del ARN y también provoca que una enzima añada restos A al extremo 3', formando con ello una cola de poliadenilación. La secuencia de poliadenilación puede proteger al ARNm frente a las exonucleasas, estabilizando con ello la producción de ARNm. Los ejemplos de secuencias de poliadenilación incluyen poliA de SV40 o secuencias de poliA derivadas de otros virus, por ejemplo, mastrevirus, y secuencias de poliA sintéticas.

Un ejemplo de una secuencia de poliadenilación es la secuencia de poliA de SV40, que comprende un tramo de 6 nucleótidos TTATTT que se convierte en AAUAAA en el pre-ARNm y atrae a una enzima denominada CPSF ("cleavage/polyadenylation specificity factor", factor de especificidad de corte/poliadenilación). Esta enzima se une a AAUAAA (o a versiones similares de esta secuencia) y comienza el complejo proceso del corte del ARNm (aproximadamente 10 a 30 pares de bases cadena abajo) y la poliadenilación. Este proceso incluye atraer a una serie de proteínas para formar un complejo. Este complejo de proteínas corta el ARNm y una enzima denominada poliadenilato polimerasa añade restos A para formar la cola de poliadenilación.

En la técnica se sabe que la terminación bidireccional o las secuencias de poliadenilación permiten la transcripción de secuencias convergentes. Bieri, S. *et al.*, 2002, Molecular Breeding, "Geminivirus sequences as bidirectional transcription termination/polyadenylation signals for economic construction of stably expressed transgenes", 10, 107-117 describen el ensayo de secuencias de terminadores de geminivirus de tres virus diferentes para determinar su potencial para permitir una expresión génica eficaz en protoplastos de arroz transfectedos. Se empleó el terminador del virus del enanismo del trigo para expresar dos genes convergentes, GUS y LUC. Aunque se sabe que existen secuencias reguladoras bidireccionales, tales como las secuencias de poliA bidireccionales, tal como se emplean en virus, no se sabe si pueden utilizarse en la expresión de proteínas de interés, tales como anticuerpos, y no se han empleado en una secuencia polinucleotídica transcripcionalmente activa que codifica una proteína multimérica según la presente invención.

En una realización, la secuencia reguladora bidireccional termina la transcripción e inicia el corte de la transcripción de ARN. Por ejemplo, se cree que la secuencia de poliA de SV40 es capaz de iniciar el corte de la transcripción de ARN y también de terminar la transcripción por una ARN polimerasa, lo cual asegura que la transcripción innecesaria continúa después de la secuencia reguladora bidireccional del marco de lectura directo e inverso.

En una realización, el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo comprende un terminador de la transcripción bidireccional. En esta realización, el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede comprender además una secuencia de poliadenilación colocada a ambos lados de la secuencia del terminador bidireccional.

En una realización alternativa, el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo solo comprende una secuencia reguladora bidireccional, tal como una secuencia de poliadenilación bidireccional. Por consiguiente, en esta realización, una secuencia polinucleotídica que comprende dos o más secuencias reguladoras, tales como secuencias de terminadores de la transcripción o de poliadenilación, están excluidas del alcance de la presente invención.

La secuencia reguladora bidireccional está unida operablemente a la primera y la segunda secuencia polinucleotídica codificadora, lo cual significa que la secuencia reguladora bidireccional es capaz de formar el extremo de la transcripción de ARN para la primera y la segunda secuencia polinucleotídica codificadora, que están en una orientación transcripcional convergente y que están colocadas a cada lado de la secuencia reguladora bidireccional, tal como se muestra en la figura 2.

En una realización, se proporciona un polinucleótido lineal transcripcionalmente activo que codifica una proteína multimérica que consiste en dos secuencias polinucleotídicas codificadoras convergentes, una secuencia reguladora bidireccional colocada entre las dos secuencias polinucleotídicas codificadoras, y una secuencia de promotor colocada cadena arriba de cada secuencia polinucleotídica codificadora, en el que cada secuencia polinucleotídica codificadora codifica un componente de la proteína multimérica.

El polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede comprender uno o más intrones. En una realización, una o más de las secuencias polinucleotídicas comprende uno o más intrones dentro de cada secuencia polinucleotídica codificadora y/o entre cada secuencia polinucleotídica codificadora.

En una realización, cada secuencia polinucleotídica codificadora comprende 1, 2 o 3 intrones.

El intrón puede derivarse de cualquier gen, en particular de un gen a partir del cual se deriva la secuencia codificada.

En una realización, el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo no comprende un intrón entre el primer promotor y la primera secuencia polinucleotídica codificadora, y no comprende un intrón entre el segundo promotor y la segunda secuencia polinucleotídica codificadora. En una realización, el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo no comprende ningún intrón.

En una realización, el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo comprende una secuencia Kozak, por

ejemplo, la secuencia natural asociada con la secuencia que codifica el polipéptido deseado. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, se cree que una secuencia Kozak en el ARNm puede desempeñar un papel en el ensamblaje del ribosoma para la traducción del ARNm.

5 En una realización, la secuencia polinucleotídica lineal transcripcionalmente activa no comprende una secuencia de sitio de entrada al ribosoma interno (IRES) que permite el inicio de la traducción en mitad del ARNm. El uso de una o más secuencias IRES en las secuencias polinucleotídicas lineales transcripcionalmente activas no es necesario, porque los distintos promotores inician la transcripción para cada secuencia polinucleotídica codificadora, que son convergentes.

10 Los extremos del polinucleótido lineal transcripcionalmente activo pueden comprender colas de ácidos nucleicos peptídicos (PNA), reclamos y/o "colas cepo" para proteger los extremos del polinucleótido frente a la digestión por exonucleasas después de que los polinucleótidos hayan sido transfectados a una célula. Los PNA adecuados se describen en el documento US 6.280.977. Como alternativa, en una realización, el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo no comprende ni está unido a un PNA, que incluye una cola de PNA, un cepo de PNA, una "cola de reclamo" de PNA o una molécula de PNA.

15 En una realización, una o más de la primera secuencia de promotor, la primera secuencia polinucleotídica codificadora, la secuencia reguladora bidireccional, la segunda secuencia polinucleotídica codificadora y la segunda secuencia de promotor comprende en uno o ambos lados un sitio de restricción. En una realización, cada extremo del polinucleótido lineal transcripcionalmente activo comprende un sitio de restricción adecuado para la clonación del polinucleótido en un vector.

20 La presente invención también proporciona un vector que comprende el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo, según se definió anteriormente. El polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede clonarse directamente en cualquier vector adecuado por medio de cualquier método adecuado.

25 En una realización alternativa, el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo no es adecuado para la clonación en un vector, por ejemplo, cada extremo del polinucleótido lineal transcripcionalmente activo no comprende un sitio de restricción.

La presente invención también proporciona el uso de una secuencia reguladora bidireccional para expresar dos secuencias polinucleotídicas codificadoras, en el que cada secuencia polinucleotídica codificadora codifica un componente de una proteína multimérica. La secuencia reguladora bidireccional, las secuencias polinucleotídicas codificadoras y la secuencia del polinucleótido lineal transcripcionalmente activo que pueden emplearse en el uso son como se definió anteriormente.

30 La presente invención también proporciona una célula que comprende uno o más polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos, según se definió anteriormente.

35 Cualquier célula capaz de expresar la proteína de fusión codificada por el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede emplearse en la presente invención. Las células adecuadas para ser empleadas en la invención incluyen células eucariotas, por ejemplo, células vegetales, células de insecto, tales como Sf9 de *Spodoptera frugiperda*, Sf21 de *Spodoptera frugiperda* y Tni de *Trichoplusia ni*, células de levadura, células animales, tales como células de mamífero, en particular células CHO, células de mieloma, células Viro, células MRC5, células HEK, células COS de mono verde africano, células PerC6 humanas y similares.

40 En algunos casos, resulta deseable emplear una célula de mamífero porque puede producir el producto de proteína con la conformación apropiada requerida para la actividad biológica. La estructura terciaria y la conformación pueden tener una importancia vital, porque una estructura terciaria o conformación incorrecta puede dar como resultado la pérdida de una parte o de toda la actividad biológica. Se ha descubierto que las CHO son particularmente útiles para la expresión en mamíferos, porque las proteínas expresadas en las células CHO tiene glicofomas que, en general, son compatibles y bioactivas en seres humanos. Por consiguiente, en un aspecto, la invención emplea una célula de mamífero, tal como una célula CHO, por ejemplo, una célula CHOS (Invitrogen n.º de catálogo 11619-012; Deaven, L.L. *et al.*, 1973, Chromasoma, 41, 129; D'Anna, J.A. *et al.*, 1996, Methods in Cell Science, 18, 115; D'Anna, J.A. *et al.*, 1997, Radiation Research, 148, 260) o uno de sus derivados.

La presente invención también proporciona un método para expresar un anticuerpo en una célula de mamífero, que comprende:

50 a) transfectar una célula con el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo, según se definió anteriormente; y

b) expresar el anticuerpo codificado por el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo.

55 En una realización preferida, la etapa a) comprende transfectar una célula con un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo que codifica una cadena pesada, o uno de sus fragmentos, y una cadena ligera, o uno de sus fragmentos, de un anticuerpo; y la etapa b) comprende expresar el polipéptido de la cadena pesada, o uno de

sus fragmentos, y el polipéptido de la cadena ligera, o uno de sus fragmentos. En esta realización, el polipéptido de la cadena pesada y el polipéptido de la cadena ligera preferiblemente se ensamblan para formar un anticuerpo, o uno de sus fragmentos.

El método también puede comprender una etapa de aislar el anticuerpo, o uno de sus fragmentos, de la célula.

- 5 El polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede incorporarse a una célula por diversas formas empleando medios habituales conocidos para transfectar un ADN circular.

Además de los elementos de ahorro de tiempo y de simplificación proporcionados por el polinucleótido, la célula y el método de la presente invención, el uso del polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede proporcionar más ventajas debido a que la cantidad de material genético transfectado a la célula es relativamente pequeño. El polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede contener aproximadamente 3.000 a 4.000 pares de bases menos que un plásmido que comprenda las mismas secuencias codificadoras. Las células empleadas para expresar el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo pueden alojar con facilidad una pluralidad de polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos. De hecho, es probable que se inserten múltiples copias de los polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos en cada célula. Es probable que la célula pueda alojar más copias de los polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos, comparado con el número de copias de los correspondientes plásmidos. Así, la eficacia de la expresión por célula puede ser mayor cuando se emplea el presente método, comparado con el caso en que se emplean plásmidos que comprendan las mismas secuencias codificadoras.

En el método según la presente invención, la célula puede transfectarse con uno o más polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos adicionales que codifiquen proteínas distintas. Por consiguiente, la célula puede ser transfectada con dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, o diez o más polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos distintos.

En una realización, el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo se integra en un cromosoma o en el genoma de la célula para permitir una expresión estable. En otra realización de la invención, la célula se transfecta de modo transitorio.

En la realización en que se emplea una pluralidad de polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos distintos, los polinucleótidos pueden introducirse en una célula de modo simultáneo o secuencial. En una realización, los polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos se transfectan de modo secuencial. Si un polinucleótido codifica un polipéptido que se sabe que tarda más en expresarse, comparado con otro polinucleótido, el proceso de la transfección puede iniciarse solo con el polinucleótido que se expresa con más lentitud durante un periodo tal como de 1, 2, 6, 12 o 18 horas, seguido de la adición del segundo polinucleótido después de este periodo inicial.

El polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede introducirse en una célula empleando técnicas convencionales, por ejemplo, empleando electroporación, o métodos basados en lípidos (lipotransfección), transfección aniónica, transfección catiónica, tal como empleando fosfato de calcio, choque térmico, magnetofección, agentes de transfección, tales como lipofectamina, dendrímeros, transfección con DEAE-dextrano, transducción empleando un virus. En una realización, se utiliza una transfección catiónica, tal como empleando fosfato de calcio. Los reactivos de transfección de insectos adecuados incluyen el reactivo de transfección de Novagen Insect GeneJuice®, que es un reactivo de transfección a base de liposomas, y Cellfectin® (Invitrogen).

Cuando se emplea la transfección por electroporación, el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo para la transfección puede añadirse a un medio que comprenda las células pertinentes antes de la electroporación de las células para facilitar el proceso de transfección. Las condiciones adecuadas para la electroporación pueden incluir, por ejemplo, 200-500 voltios, tales como 250 voltios; 1 o 2 pulsos de 100 a 200 microsegundos, con 0,1 a 5 segundos entre los pulsos, realizados en una cubeta de electroporación de 1 mm.

Cuando se emplea la lipotransfección, el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo para la transfección en general requerirá de una preformulación para formar un liposoma antes de la introducción a la célula. Así, si se emplea una pluralidad de polinucleótidos distintos, cada polinucleótido puede formularse por separado para formar liposomas y opcionalmente combinarse antes de la transfección, o una mezcla de polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos pueden formularse en liposomas.

Cuando se emplea la transfección catiónica, una mezcla del polinucleótido lineal transcripcionalmente activo, las células y el agente catiónico puede introducirse de forma concomitante.

El método según la presente invención también puede emplear un sistema de selección para facilitar la selección de las células estables que han sido transfectadas con éxito con el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo. El sistema de selección generalmente emplea la cotransfección de una secuencia polinucleotídica que codifica un marcador de selección. En una realización, el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo transfectado en la célula comprende además una secuencia polinucleotídica que codifica uno o más marcadores de selección. Por consiguiente, la transfección del polinucleótido lineal transcripcionalmente activo y dichos uno o más polinucleótidos que codifican el marcador se produce al mismo tiempo, y el sistema de selección puede emplearse para seleccionar las células que producen las proteínas deseadas.

Las células capaces de expresar dichos uno o más marcadores son capaces de sobrevivir/crecer/multiplicarse bajo ciertas condiciones impuestas de modo artificial. Por ejemplo, puede añadirse una toxina o un antibiótico adecuados al medio de crecimiento según las propiedades dotadas por el componente de polipéptido/gen o de polipéptido del sistema de selección incorporado en ellas (por ejemplo, la resistencia a un antibiótico). Las células que no son capaces de expresar dichos uno o más marcadores no son capaces de sobrevivir/crecer/multiplicarse en las condiciones impuestas de modo artificial. También puede elegirse que las condiciones impuestas de modo artificial sean más o menos vigorosas, según se requiera.

En la presente invención puede emplearse cualquier sistema de selección adecuado. Los sistemas de selección adecuados incluyen el uso de geneticina, también conocida como G418, que es una toxina que puede ser neutralizada por el producto de un gen de resistencia a la neomicina; el uso de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), que es fundamental para la síntesis *de novo* de glicina, purina y timidina, opcionalmente en combinación con un inhibidor de DHFR, concretamente metotrexato; y el uso de la glutamina sintetasa (GS), que cataliza la formación de glutamina a partir de glutamato y amoniaco, opcionalmente en combinación con un inhibidor de GS, tal como metionina sulfoximina (MSX). En la presente invención también puede emplearse el sistema de selección de zeocina.

En una realización, el método según la presente invención comprende además la etapa de cultivar la célula transfectada en un medio para que exprese la proteína multimérica codificada por el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo.

Los expertos en la técnica conocerán, debido a su conocimiento general, métodos adecuados en la técnica que se pueden utilizar para seleccionar los clones de las células modificadas adecuados que expresan la proteína multimérica. Por ejemplo, los expertos en la técnica pueden medir la expresión de ARNm de la proteína de los clones de células transfectadas y determinar si el nivel de expresión de ARNm de la proteína es mayor, comparado con células no modificadas. Las técnicas para medir la expresión de proteínas incluyen ELISA, análisis de PCR y análisis de transferencia Northern. Los clones de las células que muestran la expresión de la proteína deseada después pueden seleccionarse para su posterior cultivo.

En la presente invención puede emplearse un sistema de expresión inducible para expresar la proteína multimérica codificada por los polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos. Los sistemas de expresión inducibles adecuados son conocidos en la técnica.

Puede utilizarse cualquier medio adecuado para cultivar la célula transfectada, por ejemplo, medio Eagle, suero de ternero fetal, Cellgro o un medio patentado de una empresa, tal como Invitrogen. En algunos casos, el medio puede estar exento de suero. El medio puede adaptarse para un sistema de selección específico, por ejemplo, el medio puede comprender un antibiótico, para permitir que solo aquellas células que hayan sido transfectadas con éxito puedan crecer en el medio. El método según la presente invención también puede comprender una etapa de seleccionar las células que han sido transfectadas con éxito, tal como seleccionando células que son capaces de crecer en el medio.

Las células obtenidas del medio pueden someterse a más selecciones y/o purificaciones según sea necesario. El método puede comprender además una o más etapas para extraer y purificar la proteína de interés, según sea necesario.

Una o más etapas del método descrito en la presente pueden realizarse en combinación en un recipiente adecuado, tal como un biorreactor.

La presente invención también se extiende a cultivos celulares que han sido transfectados o transducidos con el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo, tal como se describe en la presente.

En una realización alternativa, la proteína recombinante puede expresarse a partir de dichos uno o más polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos empleando un sistema de expresión sin células. El sistema de expresión sin células puede derivarse directamente de una célula o puede ser un sistema de expresión sin células definido no derivado de una célula. Los sistemas de expresión sin células pueden resultar particularmente ventajosos para la expresión de proteínas a partir de polinucleótidos lineales debido a los menores efectos adversos sobre los polinucleótidos lineales provocados por la expresión celular. El sistema de expresión sin células tampoco requiere un agente para desenrollar los polinucleótidos lineales, tal como es necesario para los vectores polinucleotídicos circulares. En la técnica se conocen sistemas de expresión adecuados que pueden ser utilizados para expresar la proteína recombinante a partir de uno o más polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos, tales como el kit Qiagen® EasyXpress® Insect Kit II que contiene un extracto de células de insecto de *Spodoptera frugiperda*, componentes de reacción de la transcripción *in vitro*, y tampones de reacción (Szatmari, G., Hua, N.M., Vzdomnov, D., Daigle, F., Smoragiewicz, W., Mamet-Bratley, M.D., Karska-Wysocki, B. (2006), *In vitro* expression of the restriction endonucleases LlaMI and ScrFI isolated from *Lactococcus lactis* M19 and UC503, J. Biotechnol., 121,144; y Lamla, T., Hoerer, S., y Bauer, M.M. (2006), Screening for soluble expression constructs using cell-free protein synthesis, Int. J. Biol. Macromol., 39, 111).

La presente invención también proporciona un sistema de expresión que comprende el polinucleótido lineal

5 transcripcionalmente activo, según se definió anteriormente, y un disolvente o medio. El sistema de expresión puede comprender además uno o más polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos distintos, según se definió anteriormente. El sistema de expresión puede ser adecuado para la expresión sin células o la expresión dependiente de células. En una realización preferida, el sistema de expresión comprende una célula hospedante, tal como se definió anteriormente, y un disolvente o medio.

En el sistema de expresión puede utilizarse cualquier disolvente o medio adecuado, que incluye agua o un tampón con base de Tris para el polinucleótido, y un medio de crecimiento adecuado, tal como el medio CD-CHO FreeStyle™ para la célula hospedante.

10 El polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo empleado en la presente invención puede prepararse por medio de cualquier método adecuado.

15 El polinucleótido lineal recombinantes transcripcionalmente activo puede prepararse empleando una PCR, por ejemplo, empleando cebadores oligonucleotídicos adecuados. Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos son muy conocidos en la técnica. Cuando el ácido nucleico que se ha recuperado es ARN, el ARN puede someterse a una transcripción inversa para obtener ADNc. Además de la PCR, pueden emplearse otros procedimientos de amplificación. Otros procedimientos de amplificación incluyen los métodos de T7 y Q-replicasa.

La presente invención también proporciona un método para producir un polinucleótido recombinante lineal transcripcionalmente activo, según se definió anteriormente, en el que el método comprende:

20 a) proporcionar la primera y la segunda secuencia de promotor, la primera secuencia polinucleotídica codificadora que comprende todo o parte de uno o más dominios del anticuerpo o sus fragmentos; la segunda secuencia polinucleotídica codificadora que comprende todo o parte de uno o más dominios del anticuerpo o sus fragmentos; y una tercera secuencia polinucleotídica que comprende la secuencia de ADN reguladora de la transcripción bidireccional y que comprende, opcionalmente, una parte de la primera y/o la segunda secuencia polinucleotídica codificadora;

b) fusionar la primera secuencia polinucleotídica codificadora con la tercera secuencia polinucleotídica;

25 c) fusionar la segunda secuencia polinucleotídica codificadora con la tercera secuencia polinucleotídica; y

d) fusionar la primera secuencia de promotor con la primera secuencia polinucleotídica codificadora y fusionar la segunda secuencia de promotor con la segunda secuencia polinucleotídica codificadora.

Las etapas a), b), c) y la etapa d) según el método anterior pueden realizarse de modo simultáneo o secuencial en cualquier orden.

30 En una realización preferida, dos o más etapas de las etapas b), c) y d) se realizan de modo simultáneo, preferiblemente la b) y la etapa c) se realizan de modo simultáneo, más preferiblemente las etapas b), c) y d) se realizan de modo simultáneo.

35 En una realización preferida, una o más de las etapas a), b), c) y d) se llevan a cabo empleando una PCR. Preferiblemente, la etapa b) y/o la etapa c) y/o la etapa d) se llevan a cabo empleando una PCR. Resulta particularmente preferido que las etapas b), c) y d) se realicen de modo simultáneo empleando una PCR.

Con referencia a la figura 2, F1 es la primera secuencia de promotor, F2 es la primera secuencia polinucleotídica codificadora, F3 es la tercera secuencia polinucleotídica que comprende la secuencia reguladora bidireccional, F4 es la segunda secuencia polinucleotídica codificadora, y F5 es la segunda secuencia de promotor.

40 En una realización, la primera secuencia polinucleotídica codificadora comprende la secuencia polinucleotídica que codifica el primer componente multimérico completa, y la segunda secuencia polinucleotídica codificadora comprende la secuencia polinucleotídica que codifica el segundo componente multimérico completa.

45 En la realización de la presente invención en la que cada una de las secuencias polinucleotídicas codificadoras codifica una proteína de fusión, cada proteína de fusión comprende una primera secuencia que codifica una subunidad de la proteína de fusión y una segunda secuencia que codifica una subunidad de la proteína de fusión. En esta realización, la etapa a) comprende preferiblemente condensar la primera secuencia que codifica una subunidad de la proteína de fusión y la segunda secuencia que codifica una subunidad de la proteína de fusión para cada secuencia polinucleotídica que codifica un componente multimérico. Esta etapa de condensar la primera secuencia que codifica una subunidad de la proteína de fusión y la segunda secuencia que codifica una subunidad de la proteína de fusión se realiza preferiblemente de modo simultáneo con la etapa b) y/o la etapa c) y/o la etapa d).

50 En una realización, la primera secuencia polinucleotídica codificadora comprende una primera secuencia que codifica una subunidad de la proteína de fusión, la segunda secuencia polinucleotídica codificadora comprende una primera secuencia que codifica una subunidad de la proteína de fusión, y la tercera secuencia polinucleotídica comprende la secuencia reguladora bidireccional que comprende además una segunda secuencia que codifica una subunidad de la proteína de fusión en cada extremo de la secuencia reguladora bidireccional. Por consiguiente, en

esta realización, F2, tal como se muestra en la figura 2, comprende una primera secuencia que codifica una subunidad de la proteína de fusión, F4 comprende una primera secuencia que codifica una proteína de fusión, y F3 comprende la secuencia reguladora bidireccional y dos segundas secuencias que codifican una subunidad de la proteína de fusión, una a cada lado de la secuencia reguladora. En esta realización, la etapa a) preferiblemente comprende condensar las segundas secuencias que codifican una subunidad de la proteína de fusión con la secuencia reguladora bidireccional, formando con ello la tercera secuencia polinucleotídica. Esta etapa de condensar la segunda secuencia que codifica una subunidad de la proteína de fusión con la secuencia reguladora bidireccional puede realizarse de modo simultáneo con la etapa b) y/o la etapa c) y/o la etapa d). Esta etapa de condensar las segundas secuencias que codifican una subunidad de la proteína de fusión con la secuencia reguladora bidireccional se realiza preferiblemente empleando una PCR.

En la realización, cuando la etapa a) se realiza empleando una PCR, la etapa a) preferiblemente comprende:

una primera amplificación con PCR de la primera secuencia polinucleotídica codificadora en presencia de:

un primer cebador (P1) que comprende una región complementaria con el extremo 5' de la primera secuencia polinucleotídica codificadora (F2) y una cola de extensión solapante complementaria con el extremo 3' de la primera secuencia de promotor (F1); y un segundo cebador (P2) que comprende una región complementaria con el extremo 3' de la primera secuencia polinucleotídica codificadora (F2) y una cola de extensión solapante complementaria con el extremo 5' (en el marco de lectura directo) de la tercera secuencia polinucleotídica (F3);

produciendo con ello un primer producto intermedio de la PCR que comprende la primera secuencia polinucleotídica codificadora (F2), el extremo 5' (en el marco de lectura directo) de la tercera secuencia polinucleotídica (F3) en el extremo 3' de la primera secuencia polinucleotídica codificadora (F2) y el extremo 3' de la primera secuencia de promotor (F1) en el extremo 5' de la primera secuencia polinucleotídica codificadora (F2); y

una primera amplificación con PCR de la segunda secuencia polinucleotídica codificadora (F4) en presencia de:

un tercer cebador (P3) que comprende una región complementaria con el extremo 5' de la segunda secuencia polinucleotídica codificadora (F4) y una cola de extensión solapante complementaria con el extremo 3' de la segunda secuencia de promotor (F5); y un cuarto cebador (P4) que comprende una región complementaria con el extremo 3' de la segunda secuencia polinucleotídica codificadora (F4) y una cola de extensión solapante complementaria con el extremo 5' (en el marco de lectura inverso) de la tercera secuencia polinucleotídica (F3);

produciendo con ello un segundo producto intermedio de la PCR que comprende la segunda secuencia polinucleotídica codificadora (F4), el extremo 5' (en el marco de lectura inverso) de la tercera secuencia polinucleotídica (F3) en el extremo 3' de la segunda secuencia polinucleotídica codificadora (F4) y el extremo 3' de la segunda secuencia de promotor (F5) en el extremo 5' de la segunda secuencia polinucleotídica codificadora (F4).

En una realización preferida, la etapa b) y la etapa c) se realizan de modo simultáneo por medio de una segunda amplificación con PCR del primer producto intermedio de la PCR y el segundo producto intermedio de la PCR en presencia de la primera secuencia de promotor (F1), la segunda secuencia de promotor (F5), la tercera secuencia polinucleotídica (F3), un quinto cebador (P5) complementario con el extremo 5' (en el marco de lectura directo) de la primera secuencia de promotor (F1) y un sexto cebador (P6) complementario con el extremo 5' (en el marco de lectura inverso) de la segunda secuencia de promotor (F5), produciendo con ello un polinucleótido lineal recombinante que comprende la primera secuencia de promotor (F1), la primera secuencia polinucleotídica codificadora (F2), la tercera secuencia polinucleotídica (F3), la segunda secuencia polinucleotídica codificadora (F4) y la segunda secuencia de promotor (F5), en el que la primera secuencia de promotor (F1) y la primera secuencia polinucleotídica codificadora (F2) son convergentes con la segunda secuencia polinucleotídica codificadora (F4) y la segunda secuencia de promotor (F5); y la tercera secuencia polinucleotídica (F3) está colocada entre la primera y la segunda secuencia polinucleotídica codificadora, tal como se muestra en la figura 2.

Es importante que los cebadores se diseñen de modo apropiado para asegurar el éxito de este método de amplificación con PCR. Generalmente, se emplean tres pares de cebadores en el método. Consisten en dos pares de "cebadores internos" (P1 y P2 para la primera secuencia codificadora F2, y P3 y P4 para la segunda secuencia codificadora F4), en los que el primer y el tercer cebador (P1 y P3) comprenden una región complementaria con el extremo 5' de la secuencia que comprende la primera o la segunda secuencia polinucleotídica codificadora (F2 o F4) y una cola de extensión solapante complementaria con el extremo 3' de una secuencia que comprende el primer o el segundo promotor (F1 o F5) que estará unida a ellos. El segundo y el cuarto de los cebadores internos (P2 y P4) comprenden una región complementaria con el extremo 3' de la secuencia que comprende la primera o la segunda secuencia polinucleotídica codificadora (F2 o F4) y una cola de extensión solapante complementaria con el extremo 5' del marco de lectura directo o el marco de lectura inverso de la tercera secuencia polinucleotídica (F3) que estará unida a ellos. Las colas de extensión solapantes en el primer y tercer cebador (P1 y P3) y el segundo y cuarto cebador (P2 y P4) aseguran la unión de la primera o la segunda secuencia de promotor (F1 o F5), la primera o la segunda secuencia polinucleotídica codificadora (F2 o F4) y la tercera secuencia polinucleotídica (F3). También consisten en un par de cebadores "externos" (tal como se analizará a continuación, como el quinto cebador (P5) y el sexto cebador (P6)), que, en relación con la secuencia polinucleotídica lineal transcripcionalmente activa global

ensamblada, están localizados en los extremos, es decir, el extremo 5' absoluto de la secuencia en el marco de lectura directo (P5) y el extremo 5' de la secuencia en el marco de lectura inverso (P6).

5 El uso de la ADN polimerasa Taq puede añadir una base adenosina extra (A) en el extremo 3' del fragmento de la PCR producido. En esta situación, puede producirse un desapareamiento entre los productos intermedios de la PCR producidos por la primera etapa de la PCR y la primera y segunda secuencia de promotor (F1 y F5) y la tercera secuencia polinucleotídica (F3). Por consiguiente, en una realización de la presente invención, la primera y la segunda secuencia de promotor (F1 y F5) y la tercera secuencia polinucleotídica (F3) se proporcionan con una base timidina (T) inmediatamente precedente a la región complementaria solapante con el producto intermedio de la PCR. Por consiguiente, si se añaden bases adenosina a los extremos 3' del producto intermedio de la PCR, el producto intermedio de la PCR aún será complementario con el extremo de la primera o segunda secuencia de promotor (F1 y F5) y el extremo de la tercera secuencia polinucleotídica (F3).

La primera y la segunda etapa de la PCR pueden realizarse por separado o de modo simultáneo.

15 En una realización, después de que la primera etapa de la PCR haya producido una cantidad suficiente del producto intermedio de la PCR, puede añadirse un agente a la mezcla de reacción de la PCR que detenga la amplificación con PCR de la PCR 1 con los cebadores P1 y P2 o P3 y P4. Un ejemplo de dicho agente es ExoSap-IT® (USB), que actúa para degradar oligonucleótidos monocatenarios, que incluyen los cebadores P1 y P2 o P3 y P4, asegurando con ello que la amplificación PCR1 no continúa en la amplificación PCR2 con los cebadores P5 y P6. Otro medio más o un medio alternativo para evitar que la amplificación PCR1 con los cebadores P1 y P2 o P3 y P4 continúe durante la amplificación PCR2 con los cebadores P5 y P6 es limitar la cantidad de cebadores P1 y P2 o P3 y P4 empleados en PCR1 a una cantidad adecuada requerida para producir una cantidad suficiente requerida para producir una cantidad suficiente del producto intermedio de la PCR durante PCR1. Una cantidad adecuada de cebadores P1 y P2 o P3 y P4 para producir una cantidad suficiente de los productos intermedios de la PCR1 puede ser determinada por medio de métodos de titulación conocidos en la técnica.

25 Uno o más de los fragmentos polinucleotídicos F1, F2, F3, F4 y F5 puede comprender una o más secuencias de nucleótidos no codificadoras/no funcionales (es decir, secuencias que no codifican secuencia polipeptídicas ni actúan como elemento de transcripción). Por consiguiente, si uno o más de los fragmentos polinucleotídicos F1, F2, F3, F4 y F5 comprende nucleótidos no codificadores/no funcionales en el extremo 5' y/o 3', uno o más de los cebadores P1, P2, P3, P4, P5 y P6 pueden comprender secuencias que son complementarias con la secuencia no codificadora/no funcional del fragmento o pueden comprender secuencias que son parcialmente complementarias con la secuencia no codificadora/no funcional del fragmento y parcialmente complementarias con el elemento de transcripción o la secuencia polinucleotídica codificadora contenidos en el fragmento. Por ejemplo, F1 puede comprender una secuencia de nucleótidos no codificadora/no funcional en el extremo 3' de F1 y, por tanto, el cebador P1 puede comprender una cola de extensión solapante complementaria con la región no codificadora/no funcional en el extremo 3' de F1. Otro ejemplo es cuando F2 puede comprender una secuencia de nucleótidos no codificadora/no funcional en el extremo 5' de la primera secuencia polinucleotídica codificadora, tal como una secuencia conductora, y, por tanto, el cebador P1 puede comprender una región complementaria con el extremo 5' de la secuencia no codificadora/no funcional de F2. Otro ejemplo es cuando F1 puede comprender una secuencia no codificadora/no funcional en el extremo 5' y, por tanto, el cebador P5 puede ser complementario con la secuencia no codificadora/no funcional en el extremo 5' de F1. Otro ejemplo es cuando F5 puede comprender una secuencia no codificadora/no funcional en el extremo 5' (en el marco de lectura inverso) y, por tanto, el cebador P6 puede ser complementario con la secuencia no codificadora/no funcional en el extremo 5' de F5.

Si los fragmentos polinucleotídicos no comprenden una o más secuencias de nucleótidos no codificadoras/no funcionales, los cebadores P1, P2, P3, P4, P5 y P6 pueden comprender secuencias que sean totalmente complementarias con el promotor o la secuencia polinucleotídica codificadora contenidos en el respectivo fragmento.

45 Los polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos finales producidos puede analizarse por cualquier método adecuado, tal como una electroforesis en gel de agarosa, para confirmar que el producto de la PCR generado tiene la longitud esperada.

50 En una realización preferida en la que la primera secuencia que codifica un componente multimérico codifica una cadena ligera, o uno de sus fragmentos, de un anticuerpo, y la segunda secuencia polinucleotídica que codifica un componente multimérico codifica una cadena pesada, o uno de sus fragmentos, de un anticuerpo, el método descrito anteriormente también puede emplearse para producir el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo. La primera etapa de la PCR para la secuencia que codifica la cadena ligera y la secuencia que codifica la cadena pesada puede realizarse de modo simultáneo (es decir, en una etapa múltiplex) o por separado (es decir, no múltiplex). La segunda etapa de la PCR junta la secuencia que codifica la cadena ligera y la secuencia que codifica la cadena pesada con la primera y la segunda secuencia de promotor y la tercera secuencia polinucleotídica que comprende la secuencia reguladora bidireccional.

Cada polinucleótido lineal transcripcionalmente activo preferiblemente comprende una primera secuencia de promotor, una secuencia que codifica la secuencia de la cadena ligera, o uno de sus fragmentos, una secuencia reguladora bidireccional, una secuencia que codifica la secuencia de la cadena pesada, o uno de sus fragmentos, y

una segunda secuencia de promotor, tal como se muestra en la figura 3a y la figura 3b.

La secuencia del dominio variable de cadena pesada o cadena ligera se indica como VH o VL, y dichas una o más secuencias del dominio constante de cadena pesada se indican como CH, y la secuencia del dominio constante de cadena ligera se indica como CL.

5 La generación del polinucleótido lineal transcripcionalmente activo sigue las mismas etapas de PCR descritas anteriormente, en las que:

- la primera secuencia polinucleotídica codificadora (F2) comprende toda o parte de la secuencia de cadena ligera de anticuerpo (por ejemplo, VL-CL o VL); y

10 ▪ la segunda secuencia polinucleotídica codificadora (F4) comprende toda o parte de la secuencia de cadena pesada de anticuerpo (por ejemplo, VH-CH o VH); y

- la tercera secuencia polinucleotídica comprende la secuencia reguladora bidireccional y opcionalmente parte de las secuencias que codifican la cadena ligera y/o la cadena pesada (por ejemplo, poliA o CL-poliA-CH)

En una realización, en la que:

- la primera secuencia polinucleotídica codificadora (F2) comprende la secuencia de cadena ligera variable (VL); y

15 ▪ la segunda secuencia polinucleotídica codificadora (F4) comprende la secuencia de cadena pesada variable (VH); y

- la tercera secuencia polinucleotídica (F3) comprende la secuencia reguladora bidireccional y las secuencias que codifican la cadena ligera constante y la cadena pesada constante (CL-poliA-CH),

la etapa a) del método comprende:

20 una primera etapa de PCR para la cadena ligera, en la que la secuencia de cadena ligera variable de anticuerpo (F2) se amplifica en presencia del primer cebador (P1) y el segundo cebador (P2) para generar el producto intermedio de la PCR que comprende la secuencia de cadena ligera variable (F2) que tiene una secuencia en el extremo 5' complementaria con el extremo 3' de la primera secuencia de promotor (F1) y una secuencia en el extremo 3' complementaria con el extremo 5' (marco de lectura directo) de la secuencia de cadena ligera constante en la
25 tercera secuencia polinucleotídica (F3). El diseño de los cebadores P1 y P2 para la primera etapa de la PCR se basa en el conocimiento de la secuencia codificadora del dominio ligero variable de anticuerpo (F2); y

una primera etapa de PCR para la cadena pesada, en la que la secuencia de cadena ligera variable de anticuerpo (F4) se amplifica en presencia del tercer cebador (P3) y el cuarto cebador (P4) para generar el producto intermedio de la PCR que comprende la secuencia de cadena pesada variable (F4) que tiene una secuencia en el extremo 5' complementaria con el extremo 3' de la segunda secuencia de promotor (F5) y una secuencia en el extremo 3' complementaria con el extremo 5' (marco de lectura inverso) de la secuencia de cadena pesada constante en la
30 tercera secuencia polinucleotídica (F3). El diseño de los cebadores P3 y P4 para la primera etapa de la PCR se basa en el conocimiento de la secuencia codificadora del dominio pesado variable de anticuerpo (F4).

35 En la segunda etapa de la PCR, el producto intermedio de la PCR de cadena ligera variable y el producto intermedio de la PCR de cadena pesada variable generados en las primeras etapas de la PCR se amplifican en presencia de la primera secuencia de promotor (F1), la tercera secuencia polinucleotídica que comprende la secuencia de la cadena ligera constante, la secuencia reguladora bidireccional y la secuencia de la cadena pesada constante (F3), la segunda secuencia de promotor (F5), el cebador P5 que es un cebador externo complementario con el extremo 5' (en el marco de lectura directo) de la primera secuencia de promotor (F1), y el cebador P6 que es un cebador externo complementario con el extremo 5' (en el marco de lectura inverso) de la segunda secuencia polinucleotídica de promotor (F5). La segunda etapa de la PCR genera el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo completo que comprende la primera secuencia de promotor, la secuencia que codifica el dominio variable de cadena ligera, la secuencia que codifica el dominio constante de cadena ligera, la secuencia reguladora bidireccional, la secuencia que codifica el dominio constante de cadena pesada, la secuencia que codifica el dominio variable de cadena
40 pesada y la segunda secuencia de promotor.
45

En esta realización, cuando la tercera secuencia polinucleotídica (F3) comprende las secuencias del dominio constante de cadena ligera y pesada, esta secuencia puede variarse con facilidad para producir una serie de anticuerpos diferentes. Por consiguiente, pueden producirse anticuerpos diferentes con rapidez y facilidad empleando el método descrito anteriormente. Los dominios constantes pueden derivarse de diferentes isotipos y/o
50 especies, tales como de conejo o ratón. Las secuencias F3 también pueden variarse con facilidad para proporcionar diferentes fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, la secuencia F3 puede comprender el dominio constante CH1 para proporcionar un fragmento Fab de anticuerpo o F3 puede comprender CH1-CH2-CH3 para proporcionar un anticuerpo de longitud completa. Por tanto, los polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos empleados en la presente invención permiten producir y expresar con facilidad una gama diversa de anticuerpos para fines de

selección.

En una realización, la presente invención proporciona una o más secuencias de cebadores seleccionadas de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8. Estas secuencias de cebadores pueden emplearse para generar un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo por medio del método descrito anteriormente. Las secuencias de cebadores se han descrito con detalle anteriormente y se describirán en los ejemplos. La presente invención también proporciona SEQ ID NO:9, que codifica una cadena ligera constante, un poliA bidireccional y una cadena pesada constante.

Los promotores, la secuencia reguladora bidireccional y las secuencias polinucleotídicas codificadoras empleadas para producir el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo pueden ser generados mediante cualquier medio adecuado.

Los promotores y la secuencia reguladora bidireccional pueden generarse mediante una digestión de restricción de una construcción de ADN plasmídico previamente preparada.

Las secuencias polinucleotídicas codificadoras pueden ser generadas por medio de cualquier método adecuado, que incluye una amplificación con PCR.

En una realización, el método según la presente invención se realiza después de la identificación de un anticuerpo de interés (o uno de sus fragmentos), tal como mediante la tecnología de presentación de fagos.

En la realización en que las secuencias polinucleotídicas codificadoras comprenden dominios variables de un anticuerpo, las secuencias pueden generarse por medio de una amplificación con PCR de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo, generadas por SLAM ("Selected Lymphocyte Antibody Method", método de anticuerpos de linfocitos seleccionados), según se indica en el documento WO92/02551. Por consiguiente, en una realización, el método según la presente invención se emplea como una etapa más en el proceso SLAM, que permite identificar a un único linfocito que está produciendo un anticuerpo con una especificidad deseada dentro de una población grande de células linfoides e identificar la información genética que codifica la especificidad del anticuerpo (los dominios o regiones variables) a partir de ese linfocito (Babcook *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., 93, 7843-7848).

En el proceso SLAM, se cultiva una población de células formadoras de anticuerpos en un medio que lleva incorporado un sistema indicador que es capaz de indicar la presencia y la localización de una célula que forma anticuerpos que muestren la función deseada. Esto permite identificar una célula del medio que forma los anticuerpos deseados y puede determinarse la secuencia de aminoácidos del dominio variable que confiere la función deseada al anticuerpo. En el proceso SLAM, después se emplea la información de la secuencia del dominio variable para sintetizar una proteína con una función deseada, habitualmente por medio de la incorporación de la secuencia de ADN que se corresponde con la secuencia de aminoácidos del dominio variable en un vector capaz de dirigir la expresión y la secreción de una proteína con la función deseada. Esta etapa de clonación final es un proceso de baja capacidad de procesamiento, en comparación con las etapas previas del proceso SLAM, que poseen una alta capacidad de procesamiento y pueden automatizarse. Sin embargo, la célula y el método según la presente invención ofrecen un medio más rápido y simplificado para producir anticuerpos, o sus fragmentos, que incorporan la secuencia del dominio variable identificada por medio del proceso SLAM. Por consiguiente, la presente invención permite que la etapa final del proceso SLAM sea de alta capacidad de procesamiento, y así se pueden producir más anticuerpos con mayor rapidez que incorporan diversas secuencias de dominios variables que se han identificado como que confieren la actividad deseada a los anticuerpos.

Por consiguiente, la presente invención también proporciona un método para obtener un anticuerpo recombinante con una función deseada a partir de una célula de mamífero, que comprende:

a) proporcionar una población de células formadoras de anticuerpos que se sospecha que contiene al menos una célula capaz de producir un anticuerpo que muestre la función deseada;

b) generar un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo, según se definió anteriormente, en el que el primer y el segundo polinucleótido codificador codifica, cada uno, uno o más dominios variables de anticuerpo, o sus fragmentos, de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos obtenida en (a);

c) expresar un anticuerpo recombinante empleando el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo generado en la etapa (b);

d) seleccionar el anticuerpo recombinante producido en la etapa (c) para la función deseada; y

e) opcionalmente repetir las etapas (b), (c) y (d) para identificar un anticuerpo recombinante que muestre la función deseada.

El uso de un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo para expresar un anticuerpo recombinante que comprende los dominios variables de un anticuerpo producido por una célula formadora de

anticuerpos en el método proporciona muchas ventajas significativas a un método para producir un anticuerpo recombinante. El uso de un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo proporciona un medio mucho más rápido para clonar genes de la región variable y de expresar anticuerpos recombinantes, comparado con las múltiples etapas de digestión y acoplamiento requeridas para producir vectores, y ofrece una manera más rápida y fácil de obtener la proteína recombinante.

La población de células formadoras de anticuerpos en la etapa (a) puede proceder de cualquier fuente adecuada. Generalmente, la población de células formadoras de anticuerpos se obtiene de un animal que ha sido inmunizado con un antígeno seleccionado o se obtiene de un animal que ha generado dichas células durante el desarrollo de una enfermedad seleccionada. Las células formadoras de anticuerpos generalmente son linfocitos B o su progenie, que incluyen células plasmáticas. Las células pueden segregar anticuerpos o mantener anticuerpos sobre la superficie de la célula sin secreción hacia el entorno celular. Las células formadoras de anticuerpos pueden obtenerse de la sangre o directamente de la médula ósea y/u otro tejido linfóide. Pueden encontrarse más detalles con respecto al tipo y al origen de las células formadoras de anticuerpos en el documento WO 92/02551.

En la etapa b), la primera secuencia polinucleotídica codificadora codifica un dominio variable, o uno de sus fragmentos, de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos en la etapa a), y la segunda secuencia polinucleotídica codificadora codifica un dominio variable, o uno de sus fragmentos, de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos en la etapa a). Preferiblemente, la primera y la segunda secuencia polinucleotídica codificadora codifica dominios variables, o sus fragmentos, derivados de un anticuerpo producido por una célula productora de anticuerpos. El polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo y los métodos para generar un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo se han descrito con detalle anteriormente.

El dominio variable de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos puede incorporarse en un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo empleando cualquier método adecuado conocido en la técnica. En una realización, puede determinarse la secuencia del dominio variable, o uno o más de sus fragmentos, que confiere la especificidad a un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos. El uso de un polinucleótido lineal para expresar el anticuerpo recombinante permite determinar la secuencia del dominio variable durante la generación de uno más polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos en la etapa (b) después de cualquier etapa de la PCR. Sin embargo, no es necesario determinar la secuencia del dominio variable, o de uno o más de sus fragmentos, que confiere la especificidad al anticuerpo para generar el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo. Por consiguiente, en una realización, el método no comprende una etapa de secuenciar el dominio variable del anticuerpo producido por la célula formadora de anticuerpos antes y/o durante la etapa (b). Pueden emplearse cebadores especialmente diseñados que son complementarios con cada extremo del dominio variable, o uno o más de sus fragmentos, del anticuerpo, para clonar la región variable, o uno o más de sus fragmentos, mediante PCR. Los cebadores pueden ser complementarios con las regiones de marco en cada lado de una o más CDR del anticuerpo. Pueden encontrarse más detalles acerca de la forma de determinar la región variable, o una de sus porciones, de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos en el documento WO 92/02551.

En la etapa (b), la primera y la segunda secuencia polinucleotídica codificadora puede codificar, cada una, el dominio variable completo de un anticuerpo, o uno o más de sus fragmentos, que confiere la especificidad al anticuerpo, que incluya una, dos o tres regiones CDR de un dominio variable. Cada secuencia codificadora en el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo codifica un dominio variable, o uno de sus fragmentos, de un anticuerpo producido por una célula productora de anticuerpos. El dominio variable, o sus fragmentos, es la cantidad mínima de secuencia derivada de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos que contiene cada secuencia codificadora. Sin embargo, cada secuencia codificadora puede comprender uno o más dominios de anticuerpos adicionales derivados de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos o procedente de una fuente diferente. Tal como se describió anteriormente, cada secuencia codificadora puede codificar una proteína de fusión de un dominio variable y uno o más dominios constantes.

El polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo generado en la etapa (b) puede comprender una primera secuencia polinucleotídica codificadora y una segunda secuencia polinucleotídica codificadora, y cada una codifica un anticuerpo de una única cadena polipeptídica, o uno de sus fragmentos, seleccionada de VH, VL, VHH, Fab, scFv. Por consiguiente, el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo puede generar dos anticuerpos de dominio único, tales como VHH.

El anticuerpo producido por la célula formadora de anticuerpos preferiblemente comprende una cadena pesada y una cadena ligera. El polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo generado en la etapa (b) preferiblemente comprende una primera secuencia polinucleotídica codificadora que codifica un dominio variable de cadena ligera, o uno o más de sus fragmentos, y una segunda secuencia polinucleotídica codificadora que codifica un dominio variable de cadena pesada, o uno o más de sus fragmentos, del anticuerpo producido por la célula formadora de anticuerpos. Tal como se analizó previamente, la cadena ligera, o uno de sus fragmentos, está preferiblemente codificada por una secuencia polinucleotídica que codifica un dominio variable y una secuencia polinucleotídica que codifica un dominio constante, y la cadena pesada, o uno de sus fragmentos, está preferiblemente codificada por una secuencia polinucleotídica que codifica un dominio variable y una o más

secuencias polinucleotídicas que codifican un dominio constante.

En una realización, el anticuerpo recombinante codificado por el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo comprende dominios variables, o una o más de sus CDR, derivados de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos y comprende además regiones de marco de dominio variable y/o uno o más dominios constantes derivados de una fuente diferente, tal como una secuencia de anticuerpo humano conocida, para proporcionar un anticuerpo recombinante quimérico o humanizado. El uso de un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo permite que los dominios variables derivados de un anticuerpo producido por una célula productora de anticuerpos se incorporen en cualquier formato de anticuerpo recombinante adecuado, tal como un Fab o un anticuerpo de longitud completa con regiones constantes variadas, de un modo fácil y eficaz.

En esta realización en la que el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, el anticuerpo recombinante expresado en la etapa (c) preferiblemente conserva el apareamiento de cadena ligera y cadena pesada original de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos. Sin embargo, en una realización, en la que una pluralidad de células formadoras de anticuerpos se someten juntas a la etapa (b), los anticuerpos recombinantes expresados en la etapa (c) pueden o no conservar el apareamiento de cadena ligera y pesada original de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos.

La etapa (c) comprende expresar un anticuerpo recombinante empleando el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo generado en la etapa (b). Pueden producirse concentraciones mucho mayores de un anticuerpo recombinante en la etapa (c) del método de la presente invención, comparado con la cantidad de anticuerpo que produce una población de células formadoras de anticuerpos, tales como linfocitos B obtenidos de un animal. En una realización, la etapa (c) comprende transfectar el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo en una célula hospedante; y cultivar dicha célula hospedante en un medio apropiado, tal como se describió anteriormente. Como alternativa o además, la etapa (c) comprende expresar el anticuerpo a partir del polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo en un sistema sin células, según se describió anteriormente. El uso de un sistema de expresión sin células proporciona otro medio para reducir el número de etapas necesarias para producir una proteína recombinante, porque no son necesarias etapas, tales como la transfección de células, para una expresión sin células. Por consiguiente, la proteína puede producirse de modo más rápido y eficaz.

La etapa (d) comprende seleccionar el anticuerpo recombinante producido en la etapa (c) para la función deseada. La selección puede realizarse por medio de cualquier método adecuado conocido en la técnica para ensayar la función de un anticuerpo. Las funciones del anticuerpo que pueden ensayarse incluyen la capacidad para unirse a un antígeno seleccionado y/o la afinidad del anticuerpo por un antígeno seleccionado. La etapa (d) preferiblemente comprende una selección para detectar la unión del anticuerpo recombinante a un antígeno seleccionado y/o la capacidad para actuar en un ensayo concreto, por ejemplo, para la neutralización, como agonista o antagonista de una actividad biológica concreta. Se apreciará que puede realizarse más de una selección y que puede ensayarse más de una función, por ejemplo, unión y actividad funcional. El antígeno seleccionado puede ser un antígeno purificado o un antígeno expresado sobre la superficie celular. El antígeno seleccionado puede o no ser conocido. Por consiguiente, la etapa de selección en (d) puede incluir la detección de una función del anticuerpo que no requiera conocer el antígeno, tal como el efecto del anticuerpo recombinante sobre la modificación de un sustrato o el efecto sobre el crecimiento, la viabilidad o la función de una capa de células o el efecto sobre la patogenicidad de un microorganismo patógeno. Los ensayos de selección adecuados se describen en detalle como sistemas indicadores en el documento WO92/02551.

En una realización, el método comprende una primera etapa de selección antes de la etapa (b) en la que la población de células formadoras de anticuerpos proporcionadas en la etapa (a) se seleccionan para identificar una célula formadora de anticuerpos o una población de células formadoras de anticuerpos que producen un anticuerpo que muestra la función deseada. Tal como se describió anteriormente para la etapa (d), la primera etapa de selección puede incluir la detección de la unión a un antígeno seleccionado y/o la afinidad del anticuerpo por un antígeno seleccionado. La identidad del antígeno puede o no conocerse en la primera etapa de selección. Por consiguiente, la primera etapa de selección puede no requerir conocer el antígeno seleccionado. La primera etapa de selección puede incluir la detección de una función del anticuerpo que no requiera conocer el antígeno, tal como el efecto del anticuerpo recombinante sobre la modificación de un sustrato o el efecto sobre el crecimiento, la viabilidad o la función de una capa de células o el efecto sobre la patogenicidad de un microorganismo patógeno. En esta realización, la primera etapa de selección identifica una célula o una población de células y, en la etapa (b), se genera el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo a partir de la célula o población de células identificada. La primera etapa de selección puede identificar una célula formadora de anticuerpos individual o una población de células formadoras de anticuerpos que produce un anticuerpo que muestre la función deseada. Se apreciará que la célula o células formadoras de anticuerpos que producen un anticuerpo que muestre la función deseada pueden estar dentro de una población de otras células que no producen anticuerpos que muestran la función deseada, es decir, no es necesario que todas las células en una población identificada por medio de la primera etapa de selección produzcan un anticuerpo que muestre la función deseada.

En esta realización, el método preferiblemente comprende además una etapa de aislamiento antes de la etapa (b) para aislar una única célula formadora de anticuerpos que produce un anticuerpo que muestra la función deseada

5 identificado por medio de la primera etapa de selección y, en la etapa (b), se genera el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo a partir de la única célula formadora de anticuerpos aislada. La única célula formadora de anticuerpos puede aislarse de una población de células formadoras de anticuerpos identificada por medio de la primera etapa de selección. La inclusión de una etapa de aislamiento resulta particularmente ventajoso cuando el anticuerpo producido por la célula formadora de anticuerpos comprende una cadena pesada y una cadena ligera, porque permite que se exprese un único anticuerpo recombinante que conserva el apareamiento de dominios variables de cadena pesada y cadena ligera original del anticuerpo producido por la célula formadora de anticuerpos.

10 La etapa de aislamiento puede realizarse mediante cualquier medio adecuado. En una realización, la primera etapa de selección y la etapa de aislamiento se realizan de modo simultáneo. En otra realización, la primera etapa de selección se realiza primero para identificar una célula formadora de anticuerpos o una población de células formadoras de anticuerpos que producen un anticuerpo que muestra la función deseada, y la etapa de aislamiento se realiza después. En esta realización, la etapa de aislamiento puede comprender una segunda etapa de selección para identificar una célula formadora de anticuerpos que produce un anticuerpo que muestra la función deseada. Como alternativa, la etapa de aislamiento comprende aislar una única célula formadora de anticuerpos sin una segunda etapa de selección para identificar una célula formadora de anticuerpos que produce un anticuerpo que muestra la función deseada. La única célula formadora de anticuerpos puede aislarse de una población de células formadoras de anticuerpos identificada por medio de la primera etapa de selección.

20 Un ejemplo de un método adecuado para realizar la etapa de aislamiento, que preferiblemente permite la selección y aislamiento simultáneos, se describe en el documento WO 92/02551. El método descrito en el documento WO 92/02551 comprende:

- 25 i) suspender la población de células formadoras de anticuerpos obtenidas en la etapa (a) en un medio, y el medio lleva incorporado un sistema indicador, y dicho sistema indicador es capaz de indicar la presencia y la localización de una célula que forma anticuerpos que muestran la función deseada;
- ii) identificar una única célula que forma un anticuerpo que muestra la función deseada; y
- iii) aislar la célula formadora de anticuerpos identificada del medio.

30 Tal como se describe en el documento WO 92/02551, el sistema indicador manifiesta una actividad deseada específica en respuesta al anticuerpo sobre la superficie de la célula formadora de anticuerpos o liberado en su vecindad, permitiendo así la identificación y el aislamiento de la célula que produce el anticuerpo con la función deseada. Tal como se describió anteriormente, la indicación de anticuerpos que muestran la función deseada en la etapa i) puede comprender la detección de la unión a un antígeno seleccionado y/o la afinidad del anticuerpo por un antígeno seleccionado. La identidad del antígeno puede o no conocerse en la etapa i). La etapa i) puede incluir la detección de una función de un anticuerpo que no requiera conocer el antígeno.

Tal como se describe en el documento WO 92/02551, el sistema indicador en la etapa i) puede comprender:

- 35 • una capa de células cuyo crecimiento, viabilidad o función se ve afectado por los anticuerpos que muestran una función deseada producidos por la célula formadora de anticuerpos aislada;
- uno o más microorganismos patógenos, y una capa de células susceptible de ser infectada por dichos microorganismos, en el que dichos anticuerpos que muestran una función deseada se identifican como los anticuerpos que afectan a la patogenicidad del microorganismo;
- 40 • un conjunto de dos tipos de células seleccionadas del grupo que consiste en células de distintos tipos de antígenos de histocompatibilidad HLA, tipos de antígenos de grupo sanguíneo, y células tumorales y células normales del mismo linaje, en el que dichos anticuerpos que muestran una función deseada se identifican como los anticuerpos que aglutinan o lisan una célula de la pareja;
- 45 • eritrocitos u otras partículas revestidas con un antígeno, y dicho anticuerpo que muestra una función deseada se identifica como el anticuerpo que se une al antígeno, provocando con ello que las partículas se aglutinen;
- eritrocitos u otras partículas revestidas con un antígeno, y dicho anticuerpo que muestra una función deseada se identifica como el anticuerpo que se une al antígeno, lisa las células o partículas en presencia de un complemento;
- 50 • un factor complejante, y dicha célula formadora de anticuerpos se identifica como la célula que se une al factor complejante, formando una roseta; o
- un sustrato, y dicho anticuerpo que muestra una función deseada se identifica como el anticuerpo que modifica al sustrato de una manera detectable.

En una realización, la etapa i) puede comprender el método descrito en los documentos WO 2004/051268 y WO 2005/121789 de incubar dicha población de células productoras de anticuerpos obtenida en la etapa (a) con un antígeno seleccionado y un anticuerpo anti-anticuerpo marcado, en el que dicho anticuerpo anti-anticuerpo es capaz de distinguir las células que producen un anticuerpo que se une al antígeno seleccionado de las que células que no lo producen; y la etapa ii) comprende identificar una única célula formadora de anticuerpos capaz de producir un anticuerpo que se une al antígeno seleccionado. Tal como se describe en los documentos WO 2004/051268 y WO 2005/121789, el anticuerpo anti-anticuerpo marcado es preferiblemente un anticuerpo anti-Fc. El anticuerpo anti-anticuerpo preferiblemente está marcado con un conjugado fluorescente.

Otro ejemplo de un método adecuado para realizar la etapa de aislamiento, que preferiblemente permite la selección y el aislamiento simultáneos, se describe en el documento WO 2004/106377. El método descrito en el documento WO 2004/106377 comprende:

i) poner en contacto la población de células formadoras de anticuerpos obtenida en la etapa (a) con un agente de captura;

ii) separar las células formadoras de anticuerpos capturadas de las células formadoras de anticuerpos no capturadas;

iii) cultivar una pluralidad de células formadoras de anticuerpos capturadas, en el que las células formadoras de anticuerpos no han sido clasificadas en células formadoras de anticuerpos individuales inmediatamente antes del cultivo; y

iv) seleccionar una pluralidad de células formadoras de anticuerpos cultivadas para identificar una única célula que forma un anticuerpo que muestra la función deseada; y

v) aislar la única célula formadora de anticuerpos identificada.

Tal como se describe en el documento WO 2004/106377, la etapa de separación es preferiblemente una inmunoadsorción ("panning") y las células capturadas se cultivan directamente después de la inmunoadsorción. El agente de captura preferiblemente es un antígeno.

La etapa de aislar una única célula formadora de anticuerpos también puede realizarse por medio una citometría de flujo de clasificación de una única célula. La citometría de flujo de clasificación de una única célula puede emplearse para aislar una única célula formadora de anticuerpos empleando cualquier parámetro mensurable adecuado. Por ejemplo, la citometría de flujo puede emplearse para aislar una única célula formadora de anticuerpos que posea un marcador de célula formadora de anticuerpos, tal como un marcador de células B. La citometría de flujo puede emplearse para aislar una única célula formadora de anticuerpos capaz de unirse a un antígeno seleccionado. Los métodos adecuados para clasificar células que pueden emplearse en el método de la presente invención, específicamente en la etapa de aislamiento, se describen en los documentos WO05/019824 y WO05/019823.

Otro ejemplo de un medio para aislar una única célula formadora de anticuerpos es mediante microscopía y manipulación automáticas, tal como microscopía de captura de láser.

En una realización, antes de la etapa (b), el método comprende una etapa de aislamiento para aislar directamente una única célula formadora de anticuerpos de la población de células formadoras de anticuerpos obtenida en la etapa (a) sin primero seleccionar la población de células formadoras de anticuerpos proporcionada en la etapa (a) para una célula formadora de anticuerpos que produce un anticuerpo que muestra la función deseada y, en la etapa (b), se genera el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo a partir de la única célula formadora de anticuerpos aislada.

En esta realización, el método no comprende una etapa de selección separada antes de la etapa de aislamiento, que se menciona anteriormente como la primera etapa de selección. Sin embargo, la etapa de aislamiento puede comprender en sí misma una etapa de selección simultánea para identificar una célula formadora de anticuerpos que produce un anticuerpo que muestra la función deseada, que se menciona anteriormente como la segunda etapa de selección. Como alternativa, la etapa de aislamiento comprende aislar una única célula formadora de anticuerpos sin una etapa de selección anterior separada o una etapa de selección simultánea para identificar una célula formadora de anticuerpos que produce un anticuerpo que muestra la función deseada. Los medios adecuados para aislar una única célula formadora de anticuerpos se han descrito en detalle anteriormente, e incluyen el método descrito en el documento WO 92/02551, el método descrito en los documentos WO 2004/051268 y WO 2005/121789, el método descrito en el documento WO 2004/106377, la citometría de flujo de clasificación de una sola célula o la microscopía y manipulación automáticas.

En esta realización, el método no comprende una primera etapa de selección antes de la generación del polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo. Por consiguiente, la velocidad y la eficacia del método aumentan aún más eliminando una o más etapas de selección tempranas. El uso de un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo permite eliminar una o más etapas de selección tempranas de las células formadoras de anticuerpos, porque permite la expresión de alta capacidad de procesamiento del anticuerpo

recombinante. La selección se realiza después de la generación del anticuerpo recombinante en la etapa (d). Una serie de ventajas surgen de la selección del anticuerpo recombinante para la función deseada en la etapa (d) después de utilizar uno o más polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos para expresar el anticuerpo recombinante, comparado con la selección de la población de células formadoras de anticuerpos para la función deseada. Una ventaja es que se produce menos interferencia de factores desconocidos en el medio de expresión del anticuerpo recombinante producido en la etapa (c), comparado con el medio que comprende la población de células formadoras de anticuerpos. Además, la realización de una selección de la población de células productoras de anticuerpos obtenida en la etapa (a) puede dar como resultado que los anticuerpos que tengan la función deseada se rechacen de modo incorrecto. Sin embargo, el método de la presente invención permite seleccionar un mayor número y variedad de anticuerpos recombinantes producidos en la etapa (c) para la función expresada, puesto que todos se expresan a unos niveles elevados.

La presente descripción también proporciona una proteína de anticuerpo producida según el método definido anteriormente.

La presente descripción también incluye una composición farmacéutica que comprende el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo según se describió anteriormente y/o una célula según se definió anteriormente. La presente descripción también incluye una composición farmacéutica que comprende una o más proteínas multiméricas producidas por el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo, según se describió anteriormente.

La presente descripción también incluye una composición que comprende el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo según se describió anteriormente y/o una célula según se definió anteriormente, para su uso como un medicamento. La presente descripción también incluye una composición que comprende una o más proteínas multiméricas producidas por el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo, según se describió anteriormente, para su uso como un medicamento.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados, que incluyen disolventes, solubilizantes, cargas, estabilizantes y similares, son muy conocidos en la técnica. La composición farmacéutica puede formularse para cualquier vía de administración prevista, que incluye, pero no se limita a la administración parenteral, intravenosa, oral, por inhalación, tópica y sistémica. En una realización, el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo según se definió anteriormente y/o una célula según se definió anteriormente, son adecuados para el transporte de genes para ser introducidos en un paciente. El polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo puede encapsularse en un liposoma para el transporte de genes. En la técnica se conocen diversos otros métodos para introducir genes en un paciente.

La secuencia polinucleotídica codificadora en los polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos puede codificar una proteína multimérica terapéutica o profiláctica adecuada para el tratamiento de un ser humano o un animal no humano que lo necesite. Por consiguiente, la proteína producida por la célula y el método según la presente invención, tal como un anticuerpo, pueden emplearse para el tratamiento de enfermedades, tales como VIH; malaria; alergias; HCV; enfermedades autoinmunitarias, tales como el síndrome del intestino irritable, la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple; el cáncer, en particular cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, leucemia, mieloma y similares.

Una o más realizaciones de la invención descrita en la presente pueden combinarse, a menos que sean técnicamente incompatibles.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Generación de una secuencia de poliA bidireccional que comprende secuencias que codifican una cadena pesada constante y una cadena ligera constante

Una secuencia comprende, en el siguiente orden: una secuencia que codifica una cadena ligera constante de ratón (mCK), una secuencia de poliA bidireccional y una secuencia que codifica la cadena pesada constante de ratón (mCH1), en la que mCH1 está orientada en la dirección convergente opuesta a la secuencia de mCK con respecto al marco de lectura, tal como se muestra en la figura 3b. Esta secuencia se generó como sigue:

La secuencia codificadora de mCK se sometió a una digestión de restricción empleando las enzimas de restricción HindIII y EcoRI utilizando técnicas de biología molecular convencionales a partir del vector pVmCK del laboratorio de los inventores. Esto liberó el dominio mCK, que está flanqueado por los sitios de restricción HindIII y EcoRI y presenta un sitio BsiWI interno en el extremo 5' del dominio constante.

Un vector pVmFab' del laboratorio de los inventores se sometió a una digestión con enzimas de restricción empleando las enzimas de restricción EcoRI/XhoI empleando técnicas de biología molecular convencionales para liberar el dominio mCH1' que está flanqueado por los sitios de restricción EcoRI y XhoI.

La secuencia de poliA bidireccional se generó en una reacción de PCR, tal como se muestra en la etapa 5 en la figura 4. La reacción de PCR requiere el uso de dos cebadores oligonucleotídicos que amplifican la secuencia de

poliA e introducen dos (uno en cada extremo) sitios EcoRI. Estos cebadores se numeraron como 8794 (SEQ ID NO:1) y 8795 (SEQ ID NO:2).

5 SEQ ID NO:1 es la secuencia de nucleótidos de un cebador directo 8794 que comprende una región (GAATTCATTGATC) complementaria con el extremo 5' de una secuencia que comprende una secuencia de poliA y una cola de extensión solapante que comprende un sitio EcoRI.

SEQ ID NO:2 es la secuencia de nucleótidos de un cebador inverso 8795 que comprende una región (GAATTCATCCAGACATGATAAGATAC) complementaria con el extremo 3' de una secuencia que comprende una secuencia de poliA y una cola de extensión solapante que comprende un sitio EcoRI.

10 Tal como se representa en la etapa 1 de la figura 4, el vector pIMMS2 del laboratorio de los inventores se digirió con HindIII y XhoI y después se combinó en un acoplamiento de tres vías con los fragmentos de dominio constante mCK y mCH1 digeridos, lo cual genera un vector que comprende mCK y mCH1 orientados en una dirección convergente opuesta con respecto a sus marcos de lectura.

15 Se realizó un análisis de la secuencia de ADN para confirmar que se había generado la construcción correcta. Tal como se representa en la etapa 2 de la figura 4, el vector después se sometió a una digestión con EcoRI. Tal como se representa en la etapa 3 de la figura 4, a la digestión le siguió una reacción de acoplamiento con el fragmento de poliA bidireccional digerido con EcoRI para generar el vector pIMMS2 que comprende la secuencia codificadora de mCK, la secuencia de poliA y la secuencia codificadora de mCH1 en los marcos de lectura correctos, y los extremos externos de las tres secuencias comprenden los sitios de restricción BsiWI y XhoI. Este vector se confirmó por medio de un análisis de la secuencia de ADN.

20 Tal como se represente en la etapa 5 de la figura 4, el vector pIMMS2 se empleó para liberar las tres secuencias (mCK, poliA y mCH1) empleando una digestión de restricción doble con BsiWI/XhoI. La secuencia generada se muestra en SEQ ID NO:9.

Ejemplo 2 - Generación de secuencias de promotores

25 La generación de los dos fragmentos de promotores de CMV y SFFV se llevó a cabo por medio de una digestión con enzimas de restricción a partir de vectores del laboratorio de los inventores que contenían estas secuencias de promotores.

30 El promotor de CMV en la dirección directa (tal como se muestra en la figura 5a y SEQ ID NO:10), que conduce la transcripción de los genes de la cadena ligera en la secuencia polinucleotídica lineal transcripcionalmente activa final, se digirió con el vector pKH11 del laboratorio de los inventores empleado una digestión doble con HindIII y MluI. El promotor de SFFV (tal como se muestra en la figura 5b y SEQ ID NO:11) se extrajo por digestión del vector pLentiSam6 del laboratorio de los inventores empleando las enzimas de restricción EcoRI y BamHI.

Ejemplo 3 - Generación de las secuencias que codifican la región variable de cadena pesada y ligera

Las secuencias de la región variable fueron regiones variables de anticuerpos de conejo específicas para un antígeno de ratón.

35 Los fragmentos variables de cadena pesada y ligera se amplificaron empleando cebadores oligonucleotídicos específicos que reconocen las regiones variables y las secuencias de solapamiento adicionales introducidas, de modo que pueden combinarse con la región constante y el promotor correctos en la reacción de PCR de arrastre final para generar la secuencia polinucleotídica transcripcionalmente activa.

Amplificación de la región variable de cadena ligera (VK)

40 Se emplearon cebadores oligonucleotídicos (cebadores numerados como 8116 directo (SEQ ID NO:3) y 5839 inverso (SEQ ID NO:4)) específicos para el dominio VK del anticuerpo de conejo, para amplificar el dominio a partir de un vector del laboratorio de los inventores (pVRbCK) que contiene el dominio VK de anticuerpo, según se represente en la etapa 6 en la figura 5b.

45 SEQ ID NO:3 es la secuencia de nucleótidos de un cebador 8116 que comprende una región (ATGGACAYGAGGGCCCCCACTC) complementaria con el extremo 5' de una secuencia que contiene el dominio de cadena ligera variable, en la que Y es un código de ambigüedad de ADN que representa C o T, y una cola de extensión solapante complementaria con el extremo 3' de la secuencia de un primer promotor (CMV) (CTGCAGTCACCGTCCTTGACACGA).

50 SEQ ID NO:4 es la secuencia de nucleótidos de un cebador 5839 que comprende una región (TTYGACSACCACCTYGGTCCCTC) complementaria con el extremo 3' de una secuencia de dominio de cadena ligera variable, en la que Y es un código de ambigüedad de ADN que representa C o T, y S es un código de ambigüedad de ADN que representa G o C, y una cola de extensión solapante (CTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGCAGCATCCGTAC) complementaria con el extremo 5' de la secuencia de un dominio de cadena ligera constante.

Las condiciones de reacción de la PCR para la amplificación de la secuencia que codifica la cadena ligera (VK) empleando los cebadores 8116 y 5839 fueron las siguientes:

Mezcla de reacción: volúmenes en microlitros	
Vector (40 ng/ul)	2,0
10 X tampón KOD	2,5
dNTP (2 mM cada uno)	2,5
MgSO4 (25 mM)	1,0
Cebador 8116 (5 uM)	1,2
Cebador 5839 (5 uM)	1,2
Agua	14
KOD polimerasa	0,5
Volumen total	25
Condiciones de la PCR:	
1. 96°C	2 minutos
2. 96°C	15 s
3. 55°C	15 s
4. 68°C	50 s
5. ir a la etapa 2	40 ciclos en total
6. 68°C	3 minutos
7. 4°C	detención

Amplificación de la región variable de cadena pesada (VH)

5 Se emplearon cebadores oligonucleotídicos (cebadores numerados como 8792 directo (SEQ ID NO:5) y 5838 inverso (SEQ ID NO:6)) específicos para el dominio VH del anticuerpo de conejo, para amplificar el dominio VH a partir de un vector del laboratorio de los inventores (pVRbFab') que contiene el dominio VH de anticuerpo, según se representa en la etapa 7 en la figura 5c.

10 SEQ ID NO:5 es la secuencia de nucleótidos de un cebador 8792 que comprende una región (ACGCTCACCATGGAGACTGGGC) complementaria con el extremo 5' de una secuencia que contiene un dominio de cadena pesada variable y una cola de extensión solapante (CCGACAGACTGAGTCGCCCGGGG) complementaria con el extremo 3' de una segunda secuencia de promotor (SFFV).

15 SEQ ID NO:6 es la secuencia de nucleótidos de un cebador 5838 que comprende una región (ACGGTGACCSAGGGTSCCYKGGCCC) complementaria con el extremo 3' de una secuencia de dominio de cadena pesada variable, en la que S es un código de ambigüedad de ADN que representa G o C, Y es un código de ambigüedad de ADN que representa C o T, y K es un código de ambigüedad de ADN que representa G o T, y una cola de extensión solapante (GACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGCACTCGA) complementaria con el extremo 5' de la secuencia de un dominio de cadena pesada constante.

Las condiciones de reacción de la PCR para la amplificación de la secuencia que codifica la cadena pesada (VH) empleando los cebadores 8792 y 5838 son las mismas que se mostraron anteriormente para la amplificación de la secuencia que codifica la cadena ligera (VK).

Ejemplo 4 - PCR final para la generación del polinucleótido transcripcionalmente activo (TAP)

5 En la PCR final, los dos promotores, la secuencia central que comprende la cadena ligera constante mCK, la poliA y la cadena pesada constante mCH1 y los dos productos de la PCR de VK y VH amplificados en efecto fueron cosidos por la PCR de arrastre final, tal como se muestra en la figura 6. Esta PCR fue dirigida por dos oligonucleótidos externos 4332 (SEQ ID NO:7) y 8793 (SEQ ID NO:8).

10 SEQ ID NO:7 es la secuencia de nucleótidos de un cebador 4332 que es complementaria con una secuencia cadena arriba de la primera secuencia de promotor (CMV).

SEQ ID NO:8 es la secuencia de nucleótidos de un cebador 8793 que es complementario con una secuencia cadena arriba de la segunda secuencia de promotor (SFFV) y el extremo 5' de la secuencia de promotor de SFFV.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

Mezcla de reacción de la PCR: volúmenes en microlitros	
Producto de la PCR de VH	1,0
Producto de la PCR de VK	1,0
10 X tampón	2,5
dNTP (2 mM cada uno)	2,5
MgSO4 (25 mM)	1,0
Cebador 4332 (2,5 uM)	2,5
Cebador 8793 (2,5 uM)	2,5
Fragmento del promotor de CMV	10 ng
Fragmento del promotor de SFFV	10 ng
Fragmento de mCK, poliA, mCH1	10 ng
Agua	Hasta 24,5
Después añadir KOD	0,5
Total	25

15 **Condiciones:**

1. 96°C	2 minutos
2. 96°C	1 minuto
3. 50°C	1 minuto
4. 68°C	4 minuto
5. ir a la etapa 2	25 ciclos en total
6. 68°C	10 minutos
7. 4°C	detención

El diseño de los cebadores oligonucleotídicos empleados en el ejemplo 4 para amplificar las regiones variables asegura que todas las secuencias diferentes (5) de la PCR se alinean correctamente y se juntan para producir la secuencia de TAP de longitud completa.

5 La secuencia de TAP final producida se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa para confirmar que se había producido una construcción con el tamaño adecuado.

Ejemplo 5 - Transfección del fragmento de TAP y expresión de Fab

La secuencia polinucleotídica transcripcionalmente activa producida por el ejemplo 5 después se transfectó de modo transitorio en células HEK 293 empleando el kit "293fectin" como sigue:

10 Se diluyen 10 ul de ADN por pocillo en 70 ul de medio Opti-MEM, en tubos Eppendorf (tubos de policarbonato). En 70 ul de Opti-MEM se diluyen 4 ul de 293fectin por pocillo (NB es importante introducir primero el medio), de nuevo utilizando tubos Eppendorf (tubo de policarbonato). Se incuba durante 5 min a temperatura ambiente (no más). Se combinan ADN + 293fectin y se mezcla con cuidado (no permitir que 293fectin quede en reposo en el medio durante más de 5 min). Se incuba durante 20 min a temperatura ambiente.

15 Se resuspenden las células HEK293 en medio FreeStyle™ templado, a 1×10^6 /ml, y se preparan 2 ml de células por pocillo de transfección. Se añaden las células al bloque de 24 pocillos. Se añade el complejo a las células. Se incuba a 37 °C en una plataforma de agitación para mantener la suspensión celular (225 rpm). Se recolecta el sobrenadante después de 4 días de incubación.

20 Después de 4 a 5 días, el sobrenadante de estas células se ensaya en dos ensayos basados en ELISA, uno para demostrar que se había producido el anticuerpo (Fab) y otro para demostrar que es capaz de unirse a la diana original, como sigue:

25 Una placa de ELISA Nunc Maxisorb de 96 pocillos se revistió durante la noche con 2 ug/ml de Fab antirratón de cabra (Jackson) en PBS a 5 °C, 100 ul/pocillo. La placa se lavó cuatro veces en PBS y Tween 20 al 0,1%. La placa se bloqueó en BSA al 2% (PBS) (SIGMA) a temperatura ambiente durante 1 hora, 300 ul/pocillo. La placa se lavó cuatro veces en PBS y Tween 20 al 0,1%. Se emplea TN3 quimérico 1 ug/ml como patrón, y las muestras y el patrón se añadieron en diluciones semilogarítmicas a la placa de bloque (solo se añadió a la fila inferior del bloque) a 100 ul/pocillo. La placa se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó cuatro veces en PBS y Tween 20 al 0,1%. Se añadió HRP kappa antirratón de cabra (Jackson) a una dilución de 1 en 5.000 al bloque, a 100 ul/pocillo, y la placa se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó cuatro veces en PBS y Tween 20 al 0,1%. La placa se reveló con TMB (Calbiochem) a 100 ul/pocillo y la absorbancia se leyó a 630 nm.

30 Una placa de ELISA Nunc Maxisorb de 96 pocillos se revistió durante la noche con 2 ug/ml de Fc antihumano de cabra (Jackson) en PBS a 5 °C. La placa se lavó cuatro veces en PBS y Tween 20 al 0,1%. La placa se bloqueó en BSA al 2% (PBS) (SIGMA) a temperatura ambiente durante 1 hora, 300 ul/pocillo. La placa se lavó cuatro veces en PBS y Tween 20 al 0,1%. Se añadió Fc quimérico de antígeno humano de ratón (Jackson) a 250 ng/ml en el bloque de 100 ul/pocillo y se dejó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó cuatro veces en PBS y Tween 20 al 0,1%. Se emplea antígeno antirratón de conejo 685 a 1 ug/ml como patrón, y las muestras y el patrón se añadieron en diluciones semilogarítmicas a la placa de bloque (solo se añadió a la fila inferior del bloque) a 100 ul/pocillo. La placa se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó cuatro veces en PBS y Tween 20 al 0,1%. Se añadió HRP kappa antirratón de cabra (Jackson) a una dilución de 1 en 5.000 al bloque, a 100 ul/pocillo, y la placa se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora, excepto por el patrón, HRP Fab anticonejo de cabra (Jackson). La placa se lavó cuatro veces en PBS y Tween 20 al 0,1%. La placa se reveló con TMB (Calbiochem) a 100 ul/pocillo y la absorbancia se leyó a 630 nm.

40 Los resultados de los experimentos descritos anteriormente indicaron que las células HEK293 habían producido el Fab y que este era específico para el antígeno diana.

45

Secuencias

SEQ ID NO:1

5 CCATGATAAGAATTCATTGATC

SEQ ID NO:2

10 CACTGATGAATTCATCCAGACATGATAAGATAC

SEQ ID NO:3

CTGCAGTCACCGTCCTTGACACGAAGCTTCGAAGCCACCATGGACAYGAGG
GCCCCACTC

15 SEQ ID NO:4

CTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGCAGCATCCGTACGTTYGACS
ACCACCTYGGTCCCTC

SEQ ID NO:5

20 CCGACAGACTGAGTCGCCCCGGGGGAAGCTTACGCTCACCATGGAGACTGGG
C

SEQ ID NO:6

25 GACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGCACTCGAGACGGTGACSAAGGGTSCCYKG
GCCCC

SEQ ID NO:7

30 ACGCGTTTTGAGATTTCTGTCGCCGACTAAATTCATGTGCGG

SEQ ID NO:8

TTCCTGCAGCCCCGATAAAATAAAAG

35 SEQ ID NO:9

TCGAGTGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGATCTG
CTGCCCAAACCTAATCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTT
CCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGT
GCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCA
GTGACTGTCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTG
CCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATT
GTGGTTGTGCAGCCTAATGAATTCATCCAGACATGATAAGATACATTGATG
AGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTG
AAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACA
AGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTG
TGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTATGGCTGATT
ATGATCAATGAATTCCCAGGCTGGAACCTGAGGAGCAGCTAACACTCATTCC
TGTTGAAGCTCTTGACAATGGGTGAAGTTGATGTCTTGTGAGTGGCCTCACA
GGTATAGCTGTTATGTCGTTTACTACTCGTCCTTGGTCAACGTGAGGGTGCTG
CTCATGCTGTAGGTGCTGTCTTTGCTGTCCTGATCAGTCCAACCTGTTTCAGGA
CGCCATTTTGTGCTTCACTGCCATCAATCTTCCACTTGACATTGATGTCTTTG
GGGTAGAAGTTGTTCAAGAAGCACACGACTGAGGCACCTCCAGATGTTAAC
TGCTCACTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGCAGCATCC

SEQ ID NO:10

40

CGCGTTTTGAGATTTCTGTGCGCCGACTAAATTCATGTCGCGCGATAGTGGTG
 TTTATCGCCGATAGAGATGGCGATATTGGAAAAATCGCGGCGGCCCGCGAT
 ATTTGAAAAATATGGCATATTGAAAATGTCGCCGATGTGAGTTTCTGTGTAAC
 TGATATCGCCATTTTTCCAAAAGTGATTTTTGGGCATACGCGATATCTGGCG
 ATAGCGCTTATATCGTTTACGGGGGATGGCGATAGACGACTTTGGTGACTION
 GGCGATTCTGTGTGTCGCAAATATCGCAGTTTCGATATAGGTGACAGACGAT
 ATGAGGCTATATCGCCGATAGAGGGGACATCAAGCTGGCACATGGCCAATG
 CATATCGATCTATACATTGAATCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATT
 GGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATC
 CATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATG
 TTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTA
 GTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCC
 CGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGT
 ATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGA
 GTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCA
 AGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATG
 CCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATT
 AGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGT
 GGATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCA
 ATGGGAGTTTTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAA
 CAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGT
 CTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCA
 TCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGC
 GGCCGGGAACGGTGCATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAAGAGTGACGTA
 AGTACCGCCTATAGAGTCTATAGGCCACCCCTTGGCTTCTTATGCATGCT
 ATACTGTTTTTGGCTTGGGGTCTATACACCCCGCTTCCCTCATGTTATAGGTG
 ATGGTATAGCTTAGCCTATAGGTGTGGGTATTGACCATTATTGACCCTCC
 CCTATTGGTGACGATACTTTCCATTACTAATCCATAACATGGCTCTTTGCCA
 CAACTCTCTTTATTGGCTATATGCCAATACACTGTCCTCAGAGACTGACAC
 GGACTCTGTATTTTTACAGGATGGGGTCTCATTATTATTACAAATTCACAT
 ATACAACACCACCGTCCCCAGTGCCCGCAGTTTTTTATTAACATAACGTGGG
 ATCTCCACGCGAATCTCGGGTACGTGTTCCGGACATGGGCTCTTCTCCGGTA
 GCGGGCGAGCTTCTACATCCGAGCCCTGCTCCCATGCCTCCAGCGACTCATG
 GTCGCTCGGCAGCTCCTTGCTCCTAACAGTGGAGGCCAGACTTAGGCACAG
 CACGATGCCACCACCACAGTGTGCCGACAAGGCCGTGGCGGTAGGGTA
 TGTGTCTGAAAATGAGCTCGGGGAGCGGGCTTGACCCGCTGACGCATTTGG
 AAGACTTAAGGCAGCGGCAGAAGAAGATGCAGGCAGCTGAGTTGTTGTGT
 CTGATAAGAGTCAGAGGTAACCTCCCGTTGCGGTGCTGTTAACGGTGGAGGG
 CAGTGTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCCGCGCGCCACCAGACATAA
 TAGCTGACAGACTAACAGACTGTTCCCTTCCATGGGTCTTTTCTGCAGTCAC
 CGTCCCTGACACGA

SEQ ID NO:11

AATTCCTGCAGCCCCGATAAAAATAAAAGATTTTTATTTAGTCTCCAGAAAAA
 GGGGGGAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTGCAGTAAC
 GCCATTTTGCAAGGCATGGAAAAATACCAAACCAAGAATAGAGAAGTTTCAG
 ATCAAGGGCGGGTACATGAAAATAGCTAACGTTGGGCCAAACAGGATATCT
 GCGGTGAGCAGTTTCGGCCCCGGCCCCGGGGCCAAGAACAGATGGTCACCGC
 5 AGTTTCGGCCCCGGCCCCGAGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATATGGCCC
 AACCTCAGCAGTTTCTTAAGACCCATCAGATGTTTCCAGGCTCCCCCAAGG
 ACCTGAAATGACCCTGCGCCTTATTTGAATTAACCAATCAGCCTGCTTCTCG
 CTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCTTCCCCGAGCTCTATAAAAGAGCTCACAACCC
 CTCACTCGGCGCGCCAGTCCCTCCGACAGACTGAGTCGCCCGGGGG

Lista de secuencias

- 5 <110> UCB Pharma S.A.
 <120> Método para producir proteínas
 <130> G0083-WO01
- 10 <150> GB0903207.9
 <151> 25-02-2009
 <160> 11
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 22
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador directo complementario con el extremo 5' de poliA
- 25 <400> 1
 ccatgataag aattcattga tc 22
 <210> 2
 30 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Cebador inverso complementario con poliA
 <400> 2
 cactgatgaa ttcattccaga catgataaga tac 33
- 40 <210> 3
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 45 <220>
 <223> Cebador complementario con el extremo 5' de la secuencia de VL y con el extremo 3' de CMV
- 50 <400> 3
 ctgcagtcac cgtccttgac acgaagcttc gaagccacca tggacaygag ggccccact 60
 c 61
- 55 <210> 4
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Cebador con el extremo 3' de VL y el extremo 5' de CL
 <400> 4

ES 2 615 977 T3

```

ctggatggtg ggaagatgga tacagttggt gcagcatccg tacgttygac saccacctyg      60

gtccctc                                                                    67

<210> 5
<211> 52
5 <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador complementario con el extremo 5' de VH y con el extremo 3' del promotor de SFFV
10 <400> 5

ccgacagact gactgcgccg gggaagctt acgctcacca tggagactgg gc 52

15 <210> 6
   <211> 56
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

20 <220>
   <223> Cebador complementario con el extremo 3' de VH y el extremo 5' de CH

   <400> 6

25 gacagatggg ggtgtcgtt tggcactcga gacggtgacs aggttscykg ggcccc 56

   <210> 7
   <211> 42
30 <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

   <220>
   <223> Cebador complementario con la región no codificadora de la secuencia del promotor de CMV

35 <400> 7

acgcgttttg agatttctgt cgccgactaa attcatgtcg cg      42

40 <210> 8
   <211> 26
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

   <220>
45 <223> Cebador complementario con el extremo 5' de la secuencia del promotor de SFFV

   <400> 8

50 ttctgcagc cccgataaaa taaaag 26

   <210> 9
   <211> 924
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

55 <220>
   <223> Secuencia que codifica: cadena ligera constante, poliA bidireccional y cadena pesada constante

   <400> 9

60

```

ES 2 615 977 T3

tcgagtgcc aaacgacacc cccatctgtc tatccactgg cccctggatc tgctgccc a 60
 actaactcca tggtgaccct gggatgcctg gtcaagggct atttcctga gccagtgaca 120
 gtgacctgga actctggatc cctgtccagc ggtgtgcaca ccttcccagc tgtcctgcag 180
 tctgacctct aactctgag cagctcagtg actgtcccct ccagcacctg gccagcgag 240
 accgtcacct gcaacgttg ccacccggcc agcagcacca aggtggaca gaaaattgtg 300
 cccagggatt gtggttgtgc agcctaata attcatccag acatgataag atacattgat 360
 gagtttgac aaaccacaac tagaatgcag tgaaaaaat gctttatttg tgaaattgt 420
 gatgctattg ctttatttga aaccattata agctgcaata aacaagttaa caacaacaat 480
 tgcattcatt ttatgtttca ggttcagggg gaggtgtggg aggtttttta aagcaagtaa 540
 aacctctaca aatgtggtat ggctgattat gatcaatgaa ttcccaggct ggaactgagg 600
 agcagctaac actcattcct gttgaagctc ttgacaatgg gtgaagtga tgtcttgtga 660
 gtggcctcac aggtatagct gttatgtcgt tcatactcgt ccttgggtcaa cgtgagggtg 720
 ctgctcatgc ttaggtgct gtctttgctg tcctgatcag tccaactgtt caggacgcca 780
 ttttgcgtt cactgccatc aatcttccac ttgacattga tgtctttggg gtagaagttg 840
 ttcaagaagc acacgactga ggcacctcca gatgttaact gctcactgga tgggtgggaag 900
 atggatacag ttggtgcagc atcc 924

5 <210> 10
 <211> 2084
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Promotor de CMV

<400> 10

cgcgttttga gatttctgtc gccgactaaa ttcatgtcgc gcgatagtgg tgtttatcgc 60
 cgatagagat ggcgatattg gaaaaatcgc ggcggccgcc gatatttgaa aatatggcat 120
 attgaaaatg tcgccgatgt gagtttctgt gtaactgata tcgccatttt tccaaaagtg 180
 atttttgggc atacgcgata tctggcgata gcgcttatat cgtttacggg ggatggcgat 240
 agacgacttt ggtgacttgg gcgattctgt gtgtcgcaaa tatcgcagtt tcgatatagg 300
 15 tgacagacga tatgaggcta tatcgccgat agaggcgaca tcaagctggc acatggccaa 360

ES 2 615 977 T3

tgcataatcga tctataacatt gaatcaatat tggccattag ccatattatt cattggttat	420
atagcataaa tcaatattgg ctattggcca ttgcatacgt tgtatccata tcataatatg	480
tacatttata ttggctcatg tccaacatta ccgccatggt gacattgatt attgactagt	540
tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga gttccgcggt	600
acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgcca acgacccccg cccattgacg	660
tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga ctttcattg acgtcaatgg	720
gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt	780
acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcct ggcattatgc ccagtacatg	840
accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg	900
gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg cgtggatagc ggtttgactc acggggattt	960
ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcaccaaaa tcaacgggac	1020
tttcaaaat gtcgtaacaa ctccgcccc a ttgacgcaa tgggcggtag gcgtgtacgg	1080
tgggaggctt atataagcag agctcgttta gtgaaccgtc agatcgctg gagacgcat	1140
ccacgctggt ttgacctcca tagaagacac cgggaccgat ccagcctccg cggccgggaa	1200
cggtgcatg gaacgcggat tccccgtgcc aagagtgacg taagtaccgc ctatagagtc	1260
tataggccca cccccttggc ttcttatgca tgctatactg tttttggctt ggggtctata	1320
cacccccgt tctcatggt ataggtgatg gtatagctta gcctataggt gtgggttatt	1380
gaccattatt gaccactccc ctattggtga cgatactttc cattactaat ccataacatg	1440
gctctttgcc acaactctct ttattggcta tatgccaata cactgtcctt cagagactga	1500
cacggactct gtatttttac aggatggggt ctcatattatt atttacaat tcacatatac	1560
aacaccaccg tccccagtgc ccgagtttt tattaacat aacgtgggat ctccacgca	1620
atctcgggta cgtgttccgg acatgggctc ttctccgta gcggcggagc ttctacatcc	1680
gagccctgct cccatgcctc cagcgactca tggctgctcg gcagctcctt gctcctaaca	1740

ES 2 615 977 T3

gtggaggcca gacttaggca cagcacgatg cccaccacca ccagtgtgcc gcacaaggcc 1800
 gtgpcggtag ggtatgtgtc tgaaaatgag ctcggggagc gggcttgcac cgctgacgca 1860
 tttggaagac ttaaggcagc ggcagaagaa gatgcaggca gctgagttgt tgtgttctga 1920
 taagagtcag aggtaactcc cgttgpcggtg ctgttaacgg tggagggcag tgtagtctga 1980
 gcagtactcg ttgctgccgc gcgcgccacc agacataata gctgacagac taacagactg 2040
 ttcctttcca tgggtctttt ctgcagtcac cgtccttgac acga 2084

<210> 11
 <211> 507
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Promotor de SFFV

10

<400> 11
 aattcctgca gccccgataa aataaaagat tttatttagt ctccagaaaa aggggggaat 60
 gaaagacccc acctgtaggt ttggcaagct agctgcagta acgccatttt gcaaggcatg 120
 gaaaaatacc aaaccaagaa tagagaagtt cagatcaagg gcgggtacat gaaaatagct 180
 aacgttgggc caaacaggat atctgcggtg agcagtttcg gccccggccc ggggccaaga 240
 acagatggtc accgcagttt cggccccggc ccgaggccaa gaacagatgg tccccagata 300
 tggccaacc ctgagcagtt tcttaagacc catcagatgt ttccaggctc cccaaggac 360
 ctgaaatgac cctgcgcctt atttgaatta accaatcagc ctgcttctcg cttctgttcg 420
 cgcgcttctg cttcccgagc tctataaaag agctcacaac ccctcactcg gcgcgccagt 480
 cctccgacag actgagtcgc ccggggg 507

15

REIVINDICACIONES

- 1.- Un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo, en el que el polinucleótido es ADN, que codifica un anticuerpo, o uno de sus fragmentos, en el que dicho polinucleótido es adecuado para la expresión en una célula de mamífero, y que comprende, en el siguiente orden:
- 5 i. una primera secuencia de promotor, que está unida operablemente a
- ii. un primer polinucleótido codificador que codifica uno o más dominios del anticuerpo, o uno de sus fragmentos, que está unido operablemente a
- iii. una secuencia de ADN reguladora de la transcripción bidireccional que es capaz de formar el extremo de cada transcripción de ARN formada, que está unida operablemente a
- 10 iv. una segunda secuencia polinucleotídica codificadora que codifica uno o más dominios del anticuerpo, o uno de sus fragmentos, que está unida operablemente a
- v. una segunda secuencia de promotor,
- en el que el primer polinucleótido de ii) y el segundo polinucleótido de iv) están en una orientación transcripcional convergente.
- 15 2.- Un polinucleótido según la reivindicación 1, en el que una de las secuencias polinucleotídicas codificadoras codifica una cadena ligera de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos, en el que, opcionalmente, la cadena ligera, o uno de sus fragmentos, está codificada por una secuencia polinucleotídica que codifica un dominio variable y secuencias polinucleotídicas que codifican un dominio constante.
- 20 3.- Un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una de las secuencias polinucleotídicas codificadoras codifica una cadena pesada de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos, en el que la cadena pesada, o uno de sus fragmentos, es codificada por una secuencia polinucleotídica que codifica un dominio variable y una o más secuencias polinucleotídicas que codifican un dominio constante.
- 4.- Un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la secuencia de ADN reguladora de la transcripción bidireccional se selecciona de una secuencia de terminador de la transcripción bidireccional y una
- 25 secuencia de poliadenilación bidireccional, en el que, opcionalmente, el polinucleótido comprende dos secuencias de promotor diferentes.
- 5.- Una célula que comprende un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 6.- Un sistema de expresión que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un
- 30 disolvente o medio, en el que, opcionalmente, el sistema de expresión comprende además una célula hospedante.
- 7.- Un método para producir un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo según la reivindicación 1, en el que el método comprende:
- a. proporcionar la primera y la segunda secuencia de promotor, la primera secuencia polinucleotídica codificadora que comprende todo o parte de uno o más dominios del anticuerpo, o sus fragmentos; la segunda secuencia
- 35 polinucleotídica codificadora que comprende todo o parte de uno o más dominios del anticuerpo, o sus fragmentos; y una tercera secuencia polinucleotídica que comprende la secuencia de ADN reguladora de la transcripción bidireccional y que comprende, opcionalmente, una parte de la primera y/o la segunda secuencia polinucleotídica codificadora;
- b. fusionar la primera secuencia polinucleotídica codificadora con la tercera secuencia polinucleotídica;
- 40 c. fusionar la segunda secuencia polinucleotídica codificadora con la tercera secuencia polinucleotídica; y
- d. fusionar la primera secuencia de promotor con la primera secuencia polinucleotídica codificadora y fusionar la segunda secuencia de promotor con la segunda secuencia polinucleotídica codificadora,
- en el que, opcionalmente, la etapa b) y la etapa c) se realizan de modo simultáneo.
- 8.- Un método según la reivindicación 7, en el que, opcionalmente, las etapas b), c) y d) se realizan de modo
- 45 simultáneo.
- 9.- Un método según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que la etapa b) y/o la etapa c) y/o la etapa d) se llevan a cabo empleando una PCR.
- 10.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la primera secuencia polinucleotídica codificadora comprende dichos uno o más dominios de anticuerpo completos, o sus fragmentos, y la segunda

secuencia polinucleotídica codificadora comprende dichos uno o más dominios de anticuerpo completos, o sus fragmentos.

5 11.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que cada secuencia polinucleotídica codificadora codifica una proteína de fusión de un dominio variable y un dominio constante, y comprende una primera secuencia de dominio variable que codifica una subunidad de la proteína de fusión y una segunda secuencia de dominio constante que codifica una subunidad de la proteína de fusión.

10 12.- Un método según la reivindicación 11, en el que la etapa a) comprende fusionar la primera secuencia que codifica una subunidad de la proteína de fusión y la segunda secuencia que codifica una subunidad de la proteína de fusión para cada secuencia polinucleotídica codificadora, en el que, opcionalmente, la etapa de fusionar la primera secuencia que codifica una subunidad de la proteína de fusión y la segunda secuencia que codifica una subunidad de la proteína de fusión se realiza de modo simultáneo con la etapa b) y/o la etapa c) y/o la etapa d).

15 13.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 8, 9, 11 o 12, en el que la primera secuencia polinucleotídica codificadora comprende una primera secuencia que codifica una subunidad de la proteína de fusión, la segunda secuencia polinucleotídica codificadora comprende una primera secuencia que codifica una subunidad de la proteína de fusión, y la tercera secuencia polinucleotídica comprende la secuencia de ADN reguladora de la transcripción bidireccional que comprende además una segunda secuencia que codifica una subunidad de la proteína de fusión en cada extremo de la secuencia de ADN reguladora de la transcripción bidireccional.

20 14.- Un método según la reivindicación 13, en el que la etapa a) comprende fusionar la segunda secuencia que codifica una subunidad de la proteína de fusión con la secuencia de ADN reguladora de la transcripción bidireccional, formando con ello la tercera secuencia polinucleotídica, en el que, opcionalmente, la etapa de fusionar la segunda secuencia que codifica una subunidad de la proteína de fusión con la secuencia de ADN reguladora de la transcripción bidireccional se realiza de modo simultáneo con la etapa b) y/o la etapa c) y/o la etapa d).

25 15.- Un método según la reivindicación 14, en el que la etapa de fusionar la segunda secuencia que codifica una subunidad de la proteína de fusión con la secuencia de ADN reguladora de la transcripción bidireccional se realiza empleando una PCR.

16.- Un método para obtener un anticuerpo recombinante con una función deseada a partir de una célula de mamífero, que comprende:

(a) proporcionar una población de células formadoras de anticuerpos que se sospecha que contiene al menos una célula capaz de producir un anticuerpo que muestre la función deseada;

30 (b) generar un polinucleótido lineal recombinante, según se define en la reivindicación 1, en el que el primer y el segundo polinucleótido codificador codifica, cada uno, uno o más dominios variables de anticuerpo, o sus fragmentos, de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos obtenida en (a);

(c) expresar un anticuerpo recombinante empleando el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo generado en la etapa (b);

35 (d) seleccionar el anticuerpo recombinante producido en la etapa (c) para la función deseada; y

(e) opcionalmente repetir las etapas (b), (c) y (d) para identificar un anticuerpo recombinante que muestre la función deseada.

40 17.- El método según la reivindicación 16, en el que el método comprende una primera etapa de selección antes de la etapa (b), en la que la población de células formadoras de anticuerpos proporcionada en la etapa (a) se selecciona para identificar una célula formadora de anticuerpos o una población de células formadoras de anticuerpos que producen un anticuerpo que muestra la función deseada y, en la etapa (b), se genera el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo a partir de la célula o la población de células identificadas por medio de la primera etapa de selección, en el que, opcionalmente, el método comprende además una etapa de aislamiento antes de la etapa (b) para aislar una única célula formadora de anticuerpos que produce un anticuerpo que muestra la función deseada a partir de una población de células formadoras de anticuerpos identificada por la primera etapa de selección y, en la etapa (b), se genera el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo a partir de la única célula formadora de anticuerpos aislada.

18.- El método de la reivindicación 17, en el que la primera etapa de selección y la etapa de aislamiento se realizan de modo simultáneo.

50 19.- El método según la reivindicación 16, en el que, antes de la etapa (b), el método comprende una etapa de aislamiento para aislar directamente una única célula formadora de anticuerpos de la población de células formadoras de anticuerpos obtenida en la etapa (a) sin primero seleccionar la población de células formadoras de anticuerpos proporcionada en la etapa (a) para una célula formadora de anticuerpos que produce un anticuerpo que muestra la función deseada y, en la etapa (b), se genera el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo a partir

de la única célula formadora de anticuerpos aislada.

20.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en el que las células formadoras de anticuerpos producen anticuerpos que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera.

5 21.- El método según la reivindicación 20, en el que el anticuerpo recombinante expresado en la etapa (c) conserva el apareamiento de cadena ligera y cadena pesada original de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos.

10 22.- El método según la reivindicación 20 o la reivindicación 21, en el que la etapa (b) comprende generar un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo, en el que la primera secuencia polinucleotídica codificadora codifica una cadena ligera, o uno de sus fragmentos, y la segunda secuencia polinucleotídica codificadora codifica una cadena pesada, o uno de sus fragmentos, para cada anticuerpo recombinante.

15 23.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en el que la cadena ligera, o uno de sus fragmentos, está codificada por una secuencia polinucleotídica que codifica un dominio variable y una secuencia polinucleotídica que codifica un dominio constante, y la cadena pesada, o uno de sus fragmentos, está codificada por una secuencia polinucleotídica que codifica un dominio variable y una o más secuencias polinucleotídicas que codifican un dominio constante.

24.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en el que la etapa (d) comprende realizar una selección para detectar la unión del anticuerpo recombinante a un antígeno seleccionado.

20 25.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 24, en el que la etapa (c) comprende transfectar el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo en una célula hospedante; y cultivar dicha célula hospedante en un medio apropiado.

26.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 24, en el que la etapa (c) comprende expresar el anticuerpo a partir del polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo en un sistema de expresión sin células.

27.- Un método *in vitro* para expresar un anticuerpo en una célula de mamífero, que comprende:

25 a) transfectar una célula con el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; y

b) expresar el anticuerpo codificado por el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo.

Figura 1

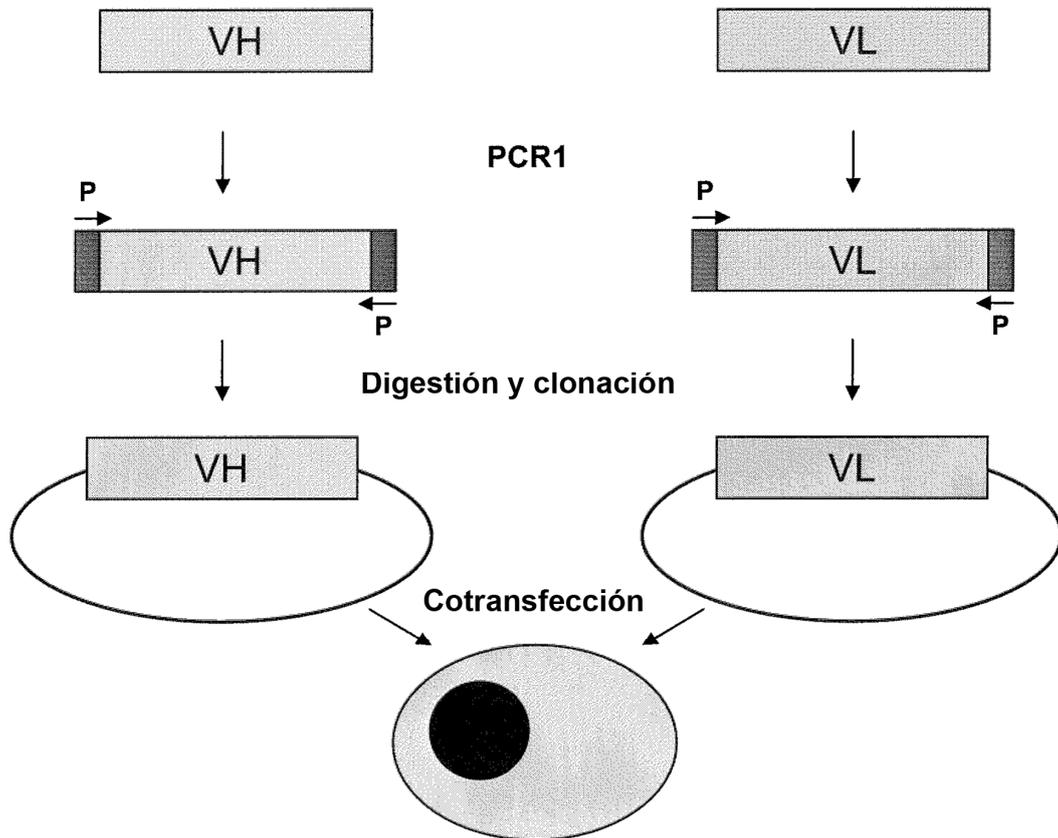


Figura 2

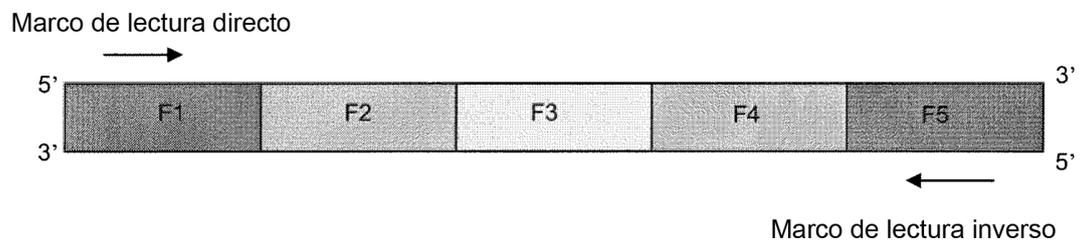


Figura 3a

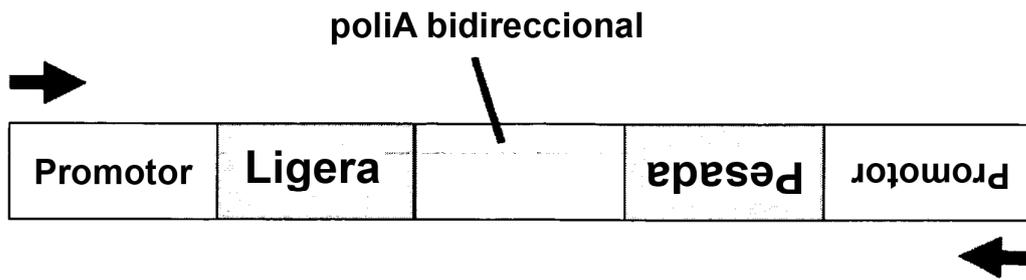


Figura 3b

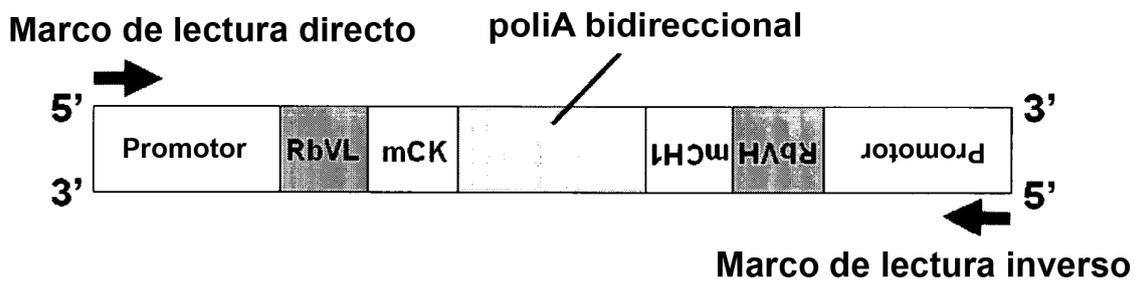


Figura 4

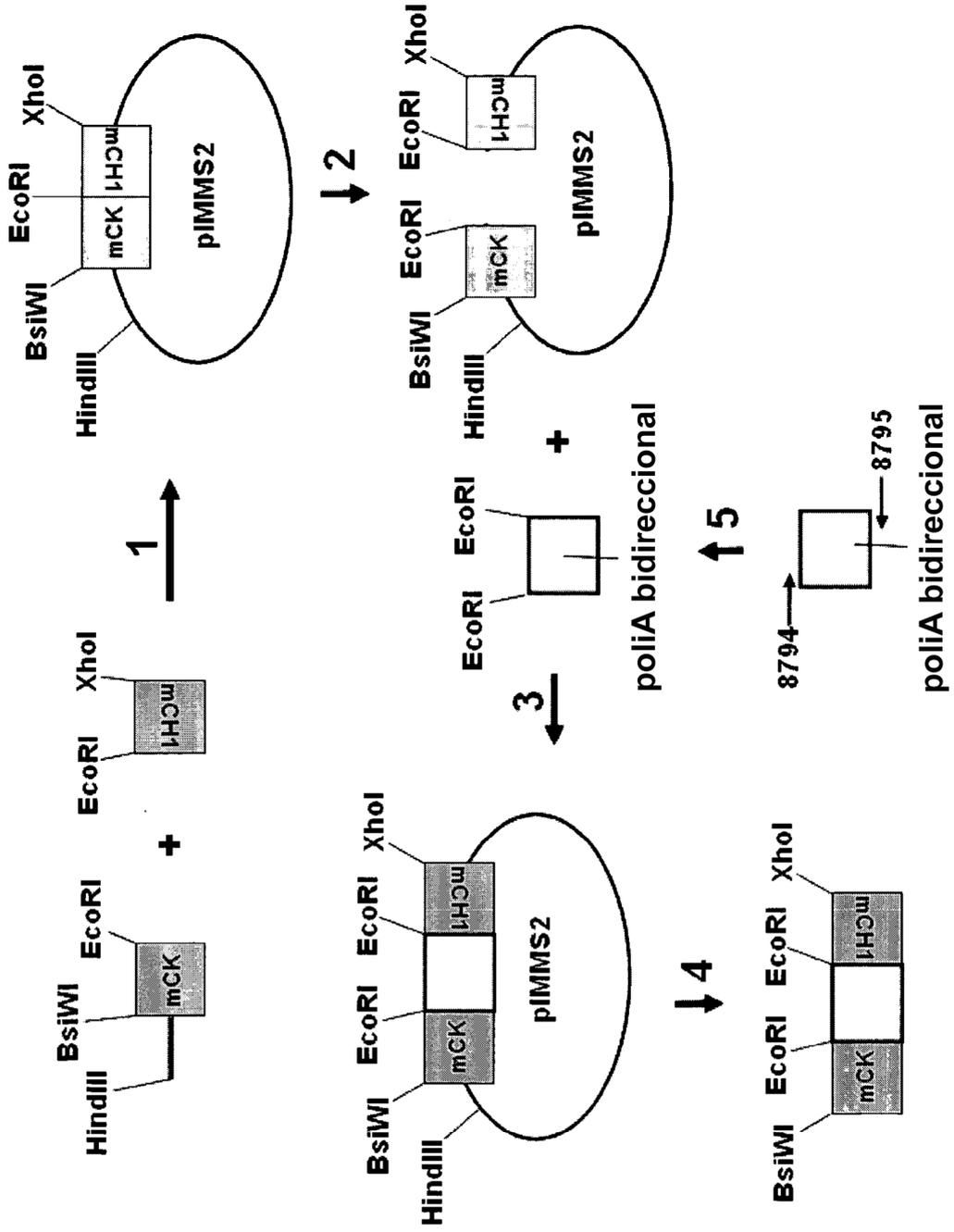


Figura 5a

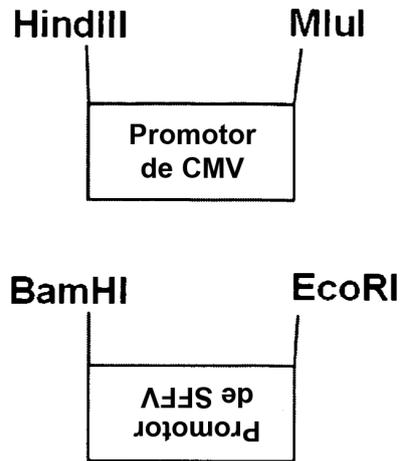


Figura 5b

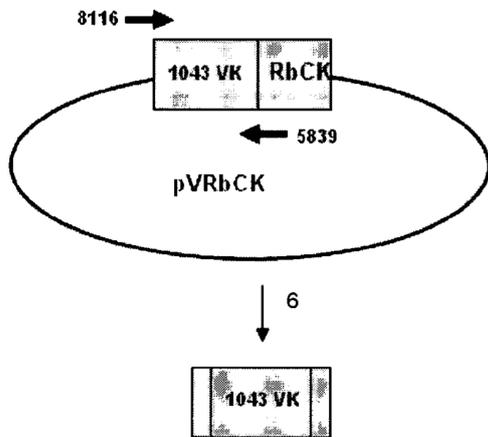


Figure 5c

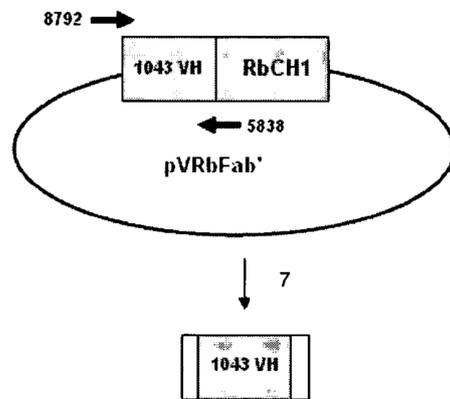


Figura 6

