

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 410**

51 Int. Cl.:

C12P 21/08 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.09.2002 PCT/US2002/29985**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2003 WO03035887**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2002 E 02768877 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017 EP 1434871**

54 Título: **Selección de células que expresan polipéptidos heterómeros**

30 Prioridad:

20.09.2001 US 323954 P

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

28.06.2017

73 Titular/es:

**IMMUNEX CORPORATION (100.0%)
51 UNIVERSITY STREET
SEATTLE WASHINGTON 98101, US**

72 Inventor/es:

**MCGREW, JEFFREY, T. y
BIANCHI, ALLISON, A.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 620 410 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

Selección de células que expresan polipéptidos heterómeros

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo general de la expresión recombinante de polipéptidos en cultivos de células animales. Más en concreto, la invención se refiere a la selección mejorada en células de vectores modificados de modo recombinante, diseñados para expresar polipéptidos.

10 Antecedentes de la invención

Muchas proteínas importantes desde el punto de vista comercial se producen en células modificadas de modo recombinante que se han adaptado para el crecimiento a largo plazo en cultivo. Con frecuencia, las proteínas se expresan como una única cadena polipeptídica. En estas células también se expresan múltiples polipéptidos heterólogos que pueden asociarse para formar complejos heterómeros, tales como, por ejemplo, un anticuerpo, que se forma por la expresión de partes equivalentes de cadenas pesadas y cadenas ligeras.

Una dificultad que puede aparecer cuando se expresan complejos heterómeros en células es la obtención de cantidades apropiadas de los polipéptidos recombinantes que forman un componente del complejo. Por ejemplo, en la expresión de un anticuerpo, con frecuencia la cadena pesada o la cadena ligera se expresan a unos niveles relativamente elevados con respecto a su correspondiente pareja; sin embargo, la obtención de una línea celular que exprese ambas cadenas a niveles elevados y aproximadamente en cantidades equivalentes resulta difícil.

Estas dificultades dan como resultado la adición de etapas y también la repetición de etapas en el proceso de generar líneas celulares que expresen polipéptidos recombinantes, lo cual produce retrasos que también aumentan sustancialmente los costes asociados con la expresión recombinante de los polipéptidos. Así, en la técnica son necesarios métodos más sencillos para seleccionar un alto nivel de expresión de polipéptidos en cultivos celulares para aumentar la producción de los polipéptidos y, con ello, reducir la inversión de dinero y tiempo necesaria para la selección de células que expresen los polipéptidos. La invención satisface esta necesidad proporcionando un método mejorado para seleccionar células que expresan polipéptidos.

La producción de proteínas recombinantes en células de ovario de hámster chino (CHO) empleando un vector de expresión de intrón de la dihidrofolato reductasa (DHFR) dicistrónico se ha descrito en Lucas *et al.* (1996), *Nucleic Acids Research*, 24:1774-1779.

35 Sumario de la invención

La invención se basa, en parte, en la premisa de que la producción eficaz de complejos heterómeros recombinantes en células mejora si cada componente del complejo se expresa en cantidades proporcionales. Así, la presente invención proporciona sistemas de expresión en hospedadores y métodos, según se define en las reivindicaciones, para seleccionar células modificadas de modo recombinante que expresan más de un polipéptido, en los que los polipéptidos se expresan en cantidades proporcionales, de forma que los polipéptidos pueden asociarse con eficacia para formar un complejo heterómero y se logra una expresión mayor.

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un sistema de expresión en hospedadores que comprende una célula hospedadora que ha sido modificada genéticamente para que exprese un primer vector que codifica un transcrito que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una primera cadena pesada de inmunoglobulina o cadena ligera de inmunoglobulina, en el que la transcripción de dicha primera secuencia de ácido nucleico es inducida simultáneamente con la transcripción de una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una primera subunidad de un marcador seleccionable, y un segundo vector que codifica un transcrito que comprende una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica una segunda cadena pesada de inmunoglobulina o cadena ligera de inmunoglobulina que es capaz de asociarse con la primera cadena pesada de inmunoglobulina o cadena ligera de inmunoglobulina para formar un complejo heterómero, en el que la transcripción de dicha tercera secuencia de ácido nucleico es inducida simultáneamente con la transcripción de una cuarta secuencia de ácido nucleico que codifica una segunda subunidad de un marcador seleccionable, y en el que dichas primera y segunda subunidades del marcador seleccionable se asocian para proporcionar una actividad seleccionable, en el que un sitio de entrada a ribosomas interno aparece entre la primera secuencia de ácido nucleico y la segunda secuencia de ácido nucleico, en el que un sitio de entrada a ribosomas interno aparece entre la tercera secuencia de ácido nucleico y la cuarta secuencia de ácido nucleico, y el complejo heterómero es un anticuerpo.

El marcador seleccionable puede seleccionarse del grupo que consiste en un marcador de resistencia a fármacos y un marcador de supervivencia metabólica. El marcador seleccionable puede seleccionarse del grupo que consiste en dihidrofolato reductasa, resistencia a neomicina, resistencia a higromicina, y beta-galactosidasa. La subunidad del marcador seleccionable puede ser un polipéptido de fusión que comprende un dominio de interacción. El dominio de interacción puede ser una cremallera de leucina procedente de un polipéptido seleccionado del grupo que

consiste en GCN4, C/EBP, c-Fos, c-Jun, c-Myc y c-Max.

En la invención, el sistema de expresión en hospedadores puede codificar además un marcador seleccionable funcional diferente seleccionado de la lista que consiste en zeomicina, neomicina, puromicina, blasticidina S, y GPT. La célula hospedadora puede seleccionarse del grupo que consiste en células CHO, VERO, BHK, HeLa, Cos, MDCK, 293, 3T3, una línea de células de mieloma, y células WI38.

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método para producir un complejo heterómero que comprende la etapa de cultivar la célula hospedadora, según se define en el primer aspecto, bajo condiciones en las que el complejo heterómero es expresado por la célula hospedadora. El método puede comprender además aislar el complejo heterómero.

En la invención, el sistema de expresión en hospedadores puede comprender una célula hospedadora que ha sido modificada genéticamente para que exprese un primer vector que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina, en el que la transcripción de dicha cadena ligera es inducida simultáneamente con la transcripción de una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de una primera subunidad de dihidrofolato reductasa condensada con una secuencia de dimerización, y un segundo vector que comprende una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada de inmunoglobulina, en el que la transcripción de dicha cadena pesada es inducida simultáneamente con la transcripción de una cuarta secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de una segunda subunidad de dihidrofolato reductasa condensada con una secuencia de dimerización, en el que cada subunidad de dihidrofolato reductasa no presenta una actividad seleccionable cuando se expresa por sí sola, y la coexpresión de la primera subunidad de dihidrofolato reductasa con la segunda subunidad de dihidrofolato reductasa proporciona actividad dihidrofolato reductasa. En esta realización, una subunidad de la dihidrofolato reductasa (DHFR) puede estar formada por los aminoácidos 1 a 105 de DHFR, y la otra subunidad de la dihidrofolato reductasa (DHFR) puede estar formada por los aminoácidos 106 a 187 de DHFR. La secuencia de dimerización condensada con la subunidad de dihidrofolato puede derivarse de la secuencia de cremallera de leucina de GCN4.

En la invención, el sistema de expresión en hospedadores puede comprender una célula hospedadora que ha sido modificada genéticamente para que exprese un primer vector que codifica un transcrito que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada de inmunoglobulina, en el que la transcripción de dicha primera secuencia de ácido nucleico es inducida simultáneamente con la transcripción de una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una primera subunidad de un marcador seleccionable, y un segundo vector que codifica un transcrito que comprende una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina, en el que la transcripción de la tercera secuencia de ácido nucleico es inducida simultáneamente con la transcripción de una cuarta secuencia de ácido nucleico que codifica una segunda subunidad de un marcador seleccionable, y en el que dichas primera y segunda subunidades del marcador seleccionable se asocian para proporcionar una actividad seleccionable. El marcador seleccionable puede seleccionarse del grupo que consiste en dihidrofolato reductasa, resistencia a neomicina, resistencia a higromicina, y beta-galactosidasa. La subunidad del marcador seleccionable puede ser un polipéptido de fusión que comprende un dominio de interacción. El dominio de interacción puede ser una cremallera de leucina procedente de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en GCN4, C/EBP, c-Fos, c-Jun, c-Myc y c-Max.

Breve descripción de la figura

Figura 1: Una representación esquemática de las construcciones de ácidos nucleicos utilizadas en los ejemplos, que comprenden, cada una, una subunidad de un marcador seleccionable y que expresan, cada una, un polipéptido diferente, que pueden asociarse para formar un complejo heterómero en una célula. Las abreviaturas son las siguientes: ESPE, elemento de secuencia potenciador de la expresión; CMV, promotor de citomegalovirus; CP, cadena pesada; CL, cadena ligera; SERI, sitio de entrada a ribosomas interno; DHFR, dihidrofolato reductasa; y pA, señal de poliadenilación.

Descripción detallada de la invención

La producción eficaz de complejos heterómeros recombinantes en células mejora si cada componente del complejo se expresa en cantidades proporcionales y elevadas. La presente invención proporciona métodos y composiciones para seleccionar células modificadas de modo recombinante que expresan más de un polipéptido heterólogo en cantidades proporcionales, de forma que los polipéptidos pueden asociarse con eficacia para formar un complejo heterómero a niveles de expresión más altos que los complejos heterómeros preparados de la manera tradicional. La presente invención también resulta ventajosa porque disminuye el tiempo necesario para seleccionar las células que expresan niveles elevados de un complejo heterómero de polipéptidos recombinante deseado.

La invención emplea marcadores seleccionables que pueden existir en forma de dos o más subunidades que, cuando se expresan juntas, interaccionan para proporcionar, con ello, una actividad seleccionable. Las subunidades individuales no tienen una actividad seleccionable significativa por sí mismas, pero sí proporcionan una actividad seleccionable cuando son coexpresadas con su subunidad homóloga. La actividad óptima de las subunidades puede

depender de su interacción y, así, puede verse facilitada por la existencia de dominios de interacción. Estos dominios de interacción pueden ser endógenos a la subunidad o pueden ser heterólogos a la subunidad.

5 Se construyen moléculas de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido y una subunidad del marcador seleccionable, dispuestas de tal forma que la expresión de la subunidad se correlaciona con la expresión del polipéptido. Por tanto, cuando las moléculas de ácido nucleico que codifican ambas subunidades se transfectan a células y se aplican condiciones selectivas, unos niveles de expresión elevados y aproximadamente equivalentes de cada una de las subunidades proporcionarán la actividad seleccionable más alta. Además, los polipéptidos unidos operablemente se expresarán en cantidades elevadas y casi equivalentes, por lo cual se produce una optimización de la selección de las células que expresan cantidades elevadas y equivalentes de los polipéptidos deseados.

10 La invención implica el uso de dos subunidades de un marcador seleccionable, y cada una se expresa como una proteína de fusión con un dominio de interacción. Cuando se expresa, el dominio de interacción estimula la asociación o la dimerización de las dos subunidades, permitiendo, con ello, que las subunidades actúen y proporcionen una actividad seleccionable (como ejemplo, pero si limitarse a esta, la descrita en Pelletier *et al.* (1998), Proc. Natl. Acad. Sci., 95:12141-12146).

15 En la presente también se describe el uso de tres subunidades de un marcador seleccionable, y cada una se expresa como una proteína de fusión con un dominio de interacción, potenciando, con ello, la asociación para proporcionar una actividad seleccionable. En esta realización, existen tres componentes del complejo heterómero. En las secuencias codificadoras del vector o vectores expresados, cada una está unida operablemente a secuencias codificadoras para cada una de las respectivas subunidades del marcador seleccionable, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico que expresa una única cadena pesada y dos cadenas ligeras diferentes, en el que las dos cadenas ligeras son ambas capaces de asociarse con la cadena pesada. En la presente también se describe el uso de marcadores seleccionables conocidos o que aún no se han descrito, que presenten cuatro o incluso más subunidades.

20 Tal como se demostrará a continuación en los ejemplos, se ha descubierto que los sistemas de expresión en hospedadores y los métodos de la invención reducen la cantidad de tiempo necesaria para seleccionar las células deseadas que expresan niveles elevados de un único polipéptido.

25 En la presente también se describe la selección de células que expresan niveles elevados de un polipéptido recombinante.

30 Tal como se describe también en la presente, los ácidos nucleicos que codifican las subunidades del marcador seleccionable están condensados dentro de marco con un ácido nucleico que codifica un conector, que después se condensa dentro de marco con un ácido nucleico que codifica un dominio de interacción. Los conectores pueden incluir cualquier secuencia flexible, relativamente corta, que permita que el dominio de interacción interactúe y que las subunidades actúen para proporcionar una actividad seleccionable. Existen ejemplos abundantes de conectores en la técnica pertinente y estos pueden comprender GGPGG, GPGGG, en los que, en el código de una sola letra para aminoácidos, G es la glicina y P es la prolina. En una realización, el conector es GGGSGGGGS (Curtis *et al.* (1991), Proc. Natl. Acad. Sci., 88(13):5809-5813).

35 Un dominio de interacción es un dominio que incluye, pero no se limita a polipéptidos capaces de facilitar la interacción o la asociación de dos o más polipéptidos homólogos o heterólogos. Tal como se emplean en la presente, los términos "asociar" o "interaccionar" pretenden describir una relación entre al menos dos moléculas, en la que una molécula se une a otras y/o afecta a la actividad de otras. La interacción puede incluir la unión directa o indirecta de dos polipéptidos (o un polipéptido y un ácido nucleico) o la activación o inhibición funcional de la actividad de una molécula por otra molécula.

40 En una realización, el dominio de interacción es un dominio de dimerización. Un dominio de dimerización puede ser un polipéptido capaz de inducir la interacción o la asociación de dos polipéptidos. Existen dos tipos de dímeros, los dímeros capaces de formar homodímeros (con la misma secuencia) o los heterodímeros (con otra secuencia).

45 En una realización ilustrativa, pero no limitante, el dominio de interacción es un polipéptido enrollado de cremallera de leucina enrollada. Una cremallera de leucina generalmente comprende aproximadamente 35 aminoácidos que contienen una repetición de siete restos característica con restos hidrófobos en el primer y el cuarto resto de la repetición (Harbury *et al.* (1993), Science, 262:1401). Por tanto, una cremallera de leucina es susceptible de fusionarse con un polipéptido para la oligomerización del polipéptido, puesto que es una molécula pequeña y es menos probable que altere la función normal del polipéptido con respecto a un dominio de interacción más grande. Los ejemplos de cremalleras de leucina incluyen, pero no se limitan a los dominios de cremallera de leucina procedentes de polipéptidos tales como GCN4, C/EBP, c-Fos, c-Jun, c-Myc y c-Max.

50 Otros ejemplos de dominios de dimerización incluyen los dominios de hélice-bucle-hélice (Murre *et al.* (1989), Cell, 58:537-544). El receptor del ácido retinoico, el receptor de la hormona tiroidea, otros receptores de hormonas nucleares (Kurokawa *et al.* (1993), Genes Dev., 7:1423-1435) y los factores de la transcripción de levaduras GAL4 y

HAP1 (Marmonstein *et al.* (1992), *Nature*, 356:408-414; Zhang *et al.* (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2851-2855; patente de EEUU n.º 5.624.818) presentan dominios de dimerización con este motivo.

5 Tal como se describe también en la presente, el dominio de interacción es un dominio de tetramerización, que consiste en un polipéptido capaz de unirse a tres dominios de tetramerización distintos para formar un complejo tetrámero. Los ejemplos de proteínas que contienen dominios de tetramerización incluyen, pero no se limitan al represor de lactosa de *E. coli* (aminoácidos 46-360; Chakerian *et al.* (1991), *J. Biol. Chem.*, 266:1371; Alberti *et al.* (1993), *EMBO J.*, 12:3227; y Lewis *et al.* (1996), *Nature*, 271:1247), y el dominio de tetramerización de p53 en los restos 322-355 (Clore *et al.* (1994), *Science*, 265:386; Harbury *et al.* (1993), *Science*, 262:1401; patente de EEUU n.º 5.573.925).

15 Tal como se define en las reivindicaciones, las dos subunidades se expresan a partir de dos vectores, en los que el primer vector comprende un primer ácido nucleico que codifica un primer polipéptido, y en los que el primer ácido nucleico está unido operablemente a un segundo ácido nucleico que codifica una subunidad de un marcador seleccionable. El segundo vector comprende un tercer ácido nucleico que codifica un polipéptido que es capaz de asociarse con el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico, en el que el tercer ácido nucleico está unido operablemente a un cuarto ácido nucleico que codifica una subunidad diferente del marcador seleccionable. Así, ambos vectores se transfectan simultáneamente a una población celular y se aplica una selección para la expresión del marcador seleccionable (formado por dos subunidades).

20 En otra realización, la invención comprende además un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable funcional diferente, además de una subunidad de un marcador seleccionable y un polipéptido de un complejo heterómero. Para los objetivos de la presente, un "marcador seleccionable funcional diferente" no es una subunidad de un marcador seleccionable, sino una proteína con actividad seleccionable totalmente funcional. Pueden emplearse marcadores muy conocidos, tales como neomicina, puromicina, blasticidina S, o GPT, que confieren resistencia al ácido micofenólico, etc., como marcadores seleccionables funcionales diferentes. En esta realización, la invención comprende dos vectores, en los que cada uno de los vectores comprende un primer ácido nucleico que codifica un polipéptido que puede formar un complejo heterómero unido operablemente a un segundo ácido nucleico que codifica al menos una subunidad de un marcador seleccionable, así como también un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable funcional diferente. Además, los respectivos polipéptidos codificados por el primer ácido nucleico de cada vector pueden asociarse para formar un complejo, y la subunidad o subunidades codificadas por el segundo ácido nucleico de cada vector pueden asociarse para proporcionar una actividad seleccionable, y los polipéptidos codificados por el tercer ácido nucleico proporcionan actividades seleccionables diferentes de la actividad seleccionable de las subunidades codificadas por el segundo ácido nucleico. Por ejemplo, el primer vector puede codificar la resistencia a la neomicina y el segundo vector puede codificar la resistencia a la zeomicina, o solo un vector puede contener el marcador seleccionable funcional diferente adicional. Así, un vector se transfecta en una línea celular y se aplica una selección (concretamente, se añade el fármaco G418 a las células resistentes a la neomicina). Después de la selección, pueden emplearse métodos convencionales para determinar la presencia del vector y el nivel de expresión de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos en el vector, por ejemplo, mediante PCR, análisis de la transferencia Southern, ELISA, análisis de la transferencia Western y similares. Tras haber obtenido un nivel elevado de expresión, el segundo vector se transfecta en la línea celular. Mientras se mantiene la selección para el primer vector, se aplica una selección para el segundo marcador seleccionable (concretamente, la resistencia a la zeomicina) y se evalúa la presencia del segundo vector y la expresión de las respectivas proteínas codificadas por el vector. En esta realización, tras determinar que ambos vectores están presentes, se aplica una selección para la expresión de las subunidades que se han asociado en la célula para proporcionar una actividad seleccionable, por ejemplo, dihidrofolato reductasa (DHFR), tal como se describió anteriormente.

50 Tal como se describe en la presente, ambos ácidos nucleicos de la invención que codifican actividades seleccionables independientes se transfectan simultáneamente y se aplica una selección al mismo tiempo. Tras determinar que ambos vectores están presentes, se aplica una selección para la expresión de las subunidades que se han asociado en la célula para proporcionar una actividad seleccionable, por ejemplo, dihidrofolato reductasa (DHFR), tal como se describió anteriormente.

55 Tal como se describe en la presente, los vectores de la invención que codifican actividades seleccionables independientes se transfectan cada uno en líneas celulares diferentes. Tras haber aplicado la selección y haber identificado los clones que expresan niveles elevados de las proteínas codificadas por cada vector deseado, las células se fusionan, tal como se describe en Hori *et al.* (patente de EEUU n.º 5.916.771). Tras completarse la fusión, se aplica una selección para la actividad seleccionable proporcionada por las subunidades.

60 Tal como se describe en la presente, los ácidos nucleicos de la invención que opcionalmente no contienen una actividad seleccionable independiente se transfectan simultáneamente con un tercer vector. El tercer vector codifica una actividad seleccionable distinta, tal como, por ejemplo, la resistencia a neomicina o beta-galactosidasa, que puede permitir realizar una selección preliminar de células que han sido transfectadas con éxito. Tras realizar esta selección preliminar, puede aplicarse una selección para la actividad seleccionable de las subunidades, por ejemplo, DHFR. En esta realización, se transfectan cantidades equivalentes de los dos vectores de expresión, mientras que el

tercer vector se transfecta a un tercio de la concentración de los primeros dos vectores (por ejemplo, una proporción de 3:3:1 o 6:6:1 o similares). Los expertos en la técnica reconocerán que, dentro del alcance de la invención, se incluyen las variaciones en las proporciones.

5 Los ácidos nucleicos que codifican un componente del complejo heterómero deseado pueden obtenerse como un ADNc o como un ADN genómico por medio de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un ARN mensajero que codifique un componente deseado puede aislarse a partir de una fuente adecuada empleando técnicas convencionales de aislamiento de ARN y el uso de una cromatografía de oligo-dT y celulosa para segregar el ARNm de poli-A. Cuando el complejo heterómero que se va a expresar es un anticuerpo, pueden aislarse fuentes
10 adecuadas de los ácidos nucleicos deseados a partir de células B madura o de un cultivo de hibridoma. Además, los ácidos nucleicos para su uso en la invención pueden obtenerse mediante síntesis química.

La expresión "complejo heterómero" pretende incluir un complejo molecular formado por la asociación de al menos dos moléculas diferentes. La asociación puede ser una interacción no covalente o una unión covalente, por ejemplo, enlaces disulfuro. Las dos moléculas diferentes generalmente son dos polipéptidos diferentes, aunque la invención contempla complejos heterómeros entre polipéptidos y ácido nucleicos, y entre diferentes ácidos nucleicos. Tal como se describe en la presente, el complejo heterómero proporciona una actividad funcional, tal como la capacidad de unirse a un sustrato (por ejemplo, una inmunoglobulina capaz de unirse al correspondiente antígeno), una actividad enzimática o similares. En una realización, el complejo heterómero de la invención se segrega hacia el medio de cultivo de la célula hospedadora en que se está produciendo.

Tal como se describe en la presente, el complejo heterómero es una molécula de inmunoglobulina. La inmunoglobulina, en sistemas de vertebrados, es un anticuerpo formado por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Las cuatro cadenas se unen entre sí por medio de enlaces disulfuro, de modo que cada
25 cadena ligera está unida a una cadena pesada y las cadenas pesadas están conectadas a lo largo de sus colas formando, en su conjunto, un complejo heterómero con forma de Y. Se conocen numerosas técnicas mediante las cuales un ADN que codifica moléculas de inmunoglobulina puede manipularse para producir ADN que son capaces de codificar proteínas recombinantes, tales como anticuerpos con afinidad potenciada, u otros polipéptidos basados en anticuerpos (véase, por ejemplo, Larrick *et al.* (1989), *Biotechnology*, 7:934-938; Reichmann *et al.* (1988), *Nature*, 332:323-327; Roberts *et al.* (1987), *Nature*, 328:731-734; Verhoeyen *et al.* (1988), *Science*, 239:1534-1536; Chaudhary *et al.* (1989), *Nature*, 339:394-397).

En la invención también pueden emplearse células recombinantes que producen anticuerpos totalmente humanos (tales como los que se preparan utilizando bancos de anticuerpos y/o animales transgénicos, y que opcionalmente son modificados posteriormente *in vitro*), así como anticuerpos humanizados. Véase, por ejemplo, Cabilly *et al.*, patente de EEUU n.º 4.816.567; Cabilly *et al.*, patente europea n.º 0.125.023 B1; Boss *et al.*, patente de EEUU n.º 4.816.397; Boss *et al.*, patente europea n.º 0.120.694 B1; Neuberger *et al.*, documento WO 86/01533; Neuberger *et al.*, patente europea n.º 0.194.276 B1; Winter, patente de EEUU n.º 5.225.539; Winter, patente europea n.º 0.239.400 B1; Queen *et al.*, patente europea n.º 0.451.216 B1; y Padlan *et al.*, patente europea n.º 0.519.596 A1. Por ejemplo, la invención puede emplearse para inducir la expresión de anticuerpos humanos y/o humanizados que reconocen, de manera inmuno-específica, dianas celulares específicas, por ejemplo, el receptor de EGF humano, el antígeno her-2/neu, el antígeno CEA, el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), CD5, CD11a, CD 18, NGF, CD20, CD45, Ep-cam, otras moléculas de la superficie de células cancerosas, TNF-alfa, TGF-b1, VEGF, otras citoquinas, alfa 4 beta 7 integrina, IgE, proteínas víricas (por ejemplo, citomegalovirus), etc., por nombrar solo
45 unas cuantas.

Los ejemplos de complejos heterómeros, además de las inmunoglobulinas, incluyen, pero no se limitan a cualquier proteína heterodímera o hetero-oligómera, por ejemplo, BMP2/BMP7, proteína osteogénica, enzima convertidora de interleuquina 1 (ICE), diversos receptores de interleuquina (por ejemplo, el receptor de IL-18, el receptor de IL-13, el receptor de IL-4 y el receptor de IL-7), receptores del núcleo, tales como receptores retinoides, receptores de células T, integrinas, tales como moléculas de adhesión celular, beta-integrinas, receptor del factor de necrosis tumoral y formas solubles y unidas a membranas de proteínas del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) de clase I y de clase II (MHC). Para los complejos heterómeros que son receptores, la invención incluye las formas solubles y unidas a membranas de los polipéptidos. Pueden encontrarse descripciones de otras proteínas heterómeros que pueden producirse según la invención, por ejemplo, en *Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research*, vol. II (Aggarwal y Gutterman, eds. Blackwell Sciences, Cambridge MA, 1998); *Growth Factors: A Practical Approach* (McKay y Leigh, eds. Oxford University Press Inc., Nueva York, 1993), y *The Cytokine Handbook* (AW Thompson, ed., Academic Press, San Diego CA, 1991).

Tal como se emplea en la presente, la expresión "proteína de fusión" se refiere a una proteína o a un dominio de una proteína (por ejemplo, un dominio extracelular soluble) condensado con una proteína o un péptido heterólogo. Los ejemplos de dichas proteínas de fusión incluyen proteínas expresadas como una fusión con una porción de una molécula de inmunoglobulina, proteínas expresadas como proteínas de fusión con un resto de cremallera, y proteínas polifuncionales nuevas, tales como las proteínas de fusión de citoquinas y factores del crecimiento (concretamente, GM-CSF e IL-3, MGF e IL-3). Los documentos WO 93/08207 y WO 96/40918 describen la preparación de diversas formas oligómeras solubles de una molécula denominada CD40L, que incluyen una

proteína de fusión de inmunoglobulina y una proteína de fusión de cremallera, respectivamente; las técnicas analizadas en estos documentos son aplicables a otras proteínas. Cualquiera de las moléculas descritas en la presente puede expresarse como una proteína de fusión, que incluyen, pero no se limitan al dominio extracelular de una molécula de receptor celular, una enzima, una hormona, una citoquina, una porción de una molécula de inmunoglobulina, un dominio de cremallera y un epítopo.

La invención resulta particularmente útil para mejorar la producción de complejos heterómero a través de procesos de cultivo celular. Las líneas celulares empleadas en la invención pueden modificarse genéticamente para que expresen una proteína de interés comercial o científico. "Modificada genéticamente" significa que la línea celular se ha transfectado, transformado o transducido con una molécula de un polinucleótido recombinante, para que la célula exprese una proteína deseada. Los métodos y los vectores para modificar genéticamente células y/o líneas celulares para que expresen una proteína de interés son muy conocidos por los expertos en la técnica; por ejemplo, se ilustran diversas técnicas en *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.*, eds. (Wiley & Sons, Nueva York, 1988, y las actualizaciones trimestrales), y Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Laboratory Press, 1989).

Además del ácido nucleico que codifica el componente deseado del complejo heterómero, las construcciones de vectores pueden incluir otros componentes para facilitar la replicación en células procariotas y/o eucariotas, la integración de la construcción en un cromosoma eucariota, y marcadores para ayudar a la selección y/o la búsqueda de células que contienen la construcción. Los vectores de la invención son vectores de ADN recombinante que incluyen, pero no se limitan a plásmidos, fagos, fagémidos, cósmidos, virus, retrovirus y similares, que insertan un ácido nucleico deseado en una célula.

Un ácido nucleico está "unido operablemente" cuando está colocado en una relación funcional con otro ácido nucleico. De modo más concreto, unido operablemente significa que la traducción de dos ácidos nucleicos diferentes que codifican polipéptidos diferentes se induce simultáneamente. Unido operablemente también significa que los ácidos nucleicos conectados pueden aparecer contiguos en una única unidad transcripcional, mientras que la traducción se dirige desde uno o más sitios de inicio ribosómicos (por ejemplo, sitios de inicio ribosómicos internos).

Los métodos de la invención también pueden utilizarse en combinación con métodos conocidos o por descubrir para inducir la producción de proteínas recombinantes. "Condiciones inductoras" significa una técnica para aumentar la producción relativa por célula de una proteína recombinante deseada. Estas técnicas incluyen el desplazamiento hacia una temperatura fría, adiciones de productos químicos, y combinaciones de cualquiera de las técnicas conocidas o por descubrir, por mencionar solo algunos ejemplos, así como cualquier técnica de inducción aún por describir y/o descubrir. Generalmente, un lote o un cultivo de perfusión de células a alta densidad se induce para que produzca la proteína recombinante. A menudo se inhiben otros procesos celulares (tales como el crecimiento y la división) para dirigir la mayor parte de la energía de la célula a la producción de proteínas recombinantes.

En los métodos y las composiciones de la invención puede utilizarse cualquier marcador seleccionable que presente subunidades complementarias. Tal como se emplea en la presente, el término "subunidad", cuando se refiere a un marcador seleccionable, indica una porción de un marcador seleccionable. Además, una primera subunidad de un marcador seleccionable puede expresarse con una segunda subunidad diferente del mismo marcador seleccionable para proporcionar un nivel de actividad seleccionable que no está presente en ninguna de las subunidades por sí solas. Una subunidad también puede indicar un polipéptido que contenga mutaciones que son complementadas por otro polipéptido mutado que también es una subunidad diferentes del marcador seleccionable.

En los métodos y las composiciones de la invención pueden utilizarse marcadores seleccionables que confieren resistencia a fármacos concretos que normalmente son tóxicos para una célula animal. Por ejemplo, a continuación se ofrecen ejemplos no limitantes de marcadores seleccionables de resistencia: zeomicina (zeo); puromicina (PAC); blasticidina S (BlaS), GPT, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:2072); el gen de resistencia a la neomicina, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Colberre-Garapin *et al.* (1981), *J. Mol. Biol.*, 150:1); e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre *et al.* (1984), *Gene*, 30:147).

En los métodos y las composiciones de la invención también pueden emplearse enzimas metabólicas que confieren supervivencia a la célula o que inducen la muerte celular bajo condiciones prescritas. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: dihidrofolato reductasa (DHFR); timidina quinasa del virus del herpes simplex (TK) (Wigler *et al.* (1977), *Cell*, 11:223), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT) (Szybalska y Szybalski (1962), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48:2026), y adenina fosforribosiltransferasa (APRT) (Lowy *et al.* (1980), *Cell*, 22:817), cuyos genes pueden emplearse en células que carecen de TK, HGPRT o APRT, respectivamente.

En una realización concreta, la dihidrofolato reductasa (DHFR) es el marcador seleccionable empleado en los métodos y las composiciones de la presente invención. La DHFR también puede utilizarse para la resistencia de antimetabolitos al metotrexato (Wigler *et al.* (1980), *Natl. Acad. Sci. USA*, 77:3567; O'Hare *et al.* (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:1527). Más en concreto, tal como se emplea en la invención, la DHFR se divide en dos subunidades, F[1,2] y F[3] (desde los aminoácidos 1-105 y 106-187) y la asociación de las subunidades en una

célula es estimulada por los dominios de interacción unidos a las respectivas subunidades (véanse los siguientes ejemplos; Pelletier *et al.* (1998), PNAS, 95:12141-12146). Durante el proceso de selección, las células carecen de actividad DHFR, de modo que no crecerán en un medio de selección (-GHT) sin la actividad DHFR. El crecimiento se restablece tras la asociación de los fragmentos de la DHFR. Como alternativa, pueden emplearse células que expresan DHFR endógena, y los transfectantes pueden seleccionarse confiriendo una mayor resistencia a niveles tóxicos de metotrexato.

El metotrexato también se puede utilizar según la invención para amplificar ácidos nucleicos recombinantes después de la selección de células sensibles a -GHT. La selección se realiza habitualmente a una concentración de 25 nM, más preferiblemente 50 nM, aún más preferiblemente 150 nM, y lo más preferiblemente 300 nM de metotrexato. Los expertos en la técnica reconocerán que las concentraciones de metotrexato pueden ser tan altas como de 500 nM o mayor para amplificar ácidos nucleicos recombinantes que presentan resistencia al fármaco, tales como los descritos en la presente. La amplificación empleando los vectores y los métodos de la invención resulta particularmente ventajosa, porque se ha descubierto que, en el caso de la expresión de una cadena pesada y ligera, ambas cadenas se amplifican aproximadamente a niveles equivalentes.

En los métodos y las composiciones de la invención también pueden utilizarse marcadores seleccionables basados en la selección de un color. En un ejemplo concreto, puede emplearse la beta-galactosidasa (Blau *et al.*, documento WO 98/44350). También pueden emplearse marcadores de fluorescencia en los métodos de la presente invención, por ejemplo, se ha empleado GFP para la selección clonal de células para medir las interacciones entre proteínas en ensayos de complementación de fragmentos-proteínas (Remy y Michnick (1999), Proc. Natl. Acad. Sci., 96:5394-5399). De modo similar, puede utilizarse el metotrexato conjugado con fluoresceína para detectar células que expresan fragmentos de DHFR complementarios (Remy y Michnick (2001), Proc. Natl. Acad. Sci., 98:7678-7683). Una ventaja de los marcadores fluorescentes es que esta selección puede realizarse en cualquier tipo de célula animal y no se limita a las que presentan una deficiencia en una vía metabólica, por ejemplo, como en la selección con DHFR, ni tampoco requiere la presencia de sensibilidad frente a un fármaco, por ejemplo, frente a la neomicina.

Tal como se emplea en la presente, el término "polipéptido" incluye las proteínas que aparecen en la naturaleza o expresadas de modo recombinante, que incluye el procesamiento pre- y postraduccional, o sus fragmentos, que generalmente conservan la estructura secundaria. Las proteínas son moléculas grandes con pesos moleculares elevados (de aproximadamente 10.000 para las pequeñas [de 50-100 aminoácidos] hasta más de 1.000.000 para ciertas formas); están compuestas de cantidades variables de los mismos 20 aminoácidos, los cuales, en la proteína intacta, están unidos a través de enlaces químicos covalentes denominados enlaces peptídicos. Los aminoácidos, unidos entre sí, forman estructuras poliméricas lineales no ramificadas denominadas cadenas polipeptídicas; estas cadenas pueden contener cientos de restos aminoácidos; estos están dispuestos en un orden específico para una especie concreta de proteína. El término "péptido" incluye fragmentos cortos de polipéptidos o proteínas, generalmente con una longitud menor que 20 aminoácidos.

La expresión "cultivo celular" pretende incluir el crecimiento y la propagación de células fuera de un tejido u organismo multicelular. Generalmente, el cultivo celular se realiza bajo condiciones atmosféricas y de temperatura controlada estériles, en placas de cultivo de tejidos (por ejemplo, placas de 10 cm, placas de 96 pocillos, etc.), u otro cultivo adherente (por ejemplo, sobre esferas microportadoras) o en un cultivo en suspensión, tal como en botellas rodantes. Los cultivos pueden cultivarse en matraces de agitación, biorreactores a pequeña escala y/o biorreactores a gran escala. Un biorreactor es un dispositivo empleado para cultivar células, en el que las condiciones ambientales, tales como la temperatura, la atmósfera, la agitación y/ el pH, pueden controlarse y ajustarse. Una serie de empresas (por ejemplo, ABS Inc., Wilmington, DE; Cell Trends, Inc., Middletown, MD), así como universidades y/u organizaciones de subvención pública (por ejemplo, The Cell Culture Center, Minneapolis, MN) ofrecen servicios de cultivos celulares bajo contrato.

Los periodos óptimos durante los cuales los cultivos están en contacto con agentes que seleccionan la actividad seleccionable son más largos que el periodo típico para un ciclo de crecimiento normal (por ejemplo, para las células de ovario de hámster chino (células CHO), en las que se ha indicado que un ciclo de crecimiento dura aproximadamente 20-22 horas (Rasmussen *et al.* (1998), Cytotechnology, 28:31-42)). Así, en una realización, los cultivos comprenden condiciones seleccionables, por ejemplo, fármacos, metabolitos, o sustratos de color, preferiblemente durante al menos aproximadamente un día, más preferiblemente durante al menos aproximadamente 3 días, y aún más preferiblemente durante al menos aproximadamente 7 días.

Está disponible una amplia diversidad de líneas de células animales adecuadas para el crecimiento en cultivo, por ejemplo, en la colección americana de cultivos tipo (ATCC, Manassas, VA) y NRRL (Peoria, IL). Algunas de las líneas celulares más establecidas que se emplean generalmente en la industria o en laboratorios académicos incluyen las líneas de células CHO, VERO, BHK, HeLa, Cos, CV1, MDCK, 293, 3T3, PC12, mieloma (por ejemplo, NSO), y WI38, por mencionar unos pocos ejemplos. En otras realizaciones, pueden emplearse líneas de células no animales en los métodos de la invención, por ejemplo, líneas de células vegetales, líneas de células de insecto (por ejemplo, Sf9), células de levaduras o células bacterianas, tales como *E. coli*.

Tal como se describió en la presente, las líneas de células mutantes deficientes en dihidrofolato reductasa (DHFR)

(Urlaub *et al.* (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216-4220) DXB11 y DG-44 son las líneas de células CHO hospedadoras preferidas, debido al eficaz sistema de expresión de genes amplificables y seleccionables de DHFR, que permite un elevado nivel de expresión de proteínas recombinantes en estas células (Kaufman R.J. (1990), Meth. Enzymol., 185:527-566). Además, estas células son fáciles de manipular en forma de cultivos adherentes o en suspensión, y muestran una estabilidad genética relativamente buena. Además, pueden establecerse nuevas líneas de células animales empleando métodos muy conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, mediante transformación, infección vírica y/o selección).

Tal como se indicó anteriormente, puede utilizarse una diversidad de sistemas de vectores de expresión en hospedadores para expresar los complejos heterómeros de la invención. Cuando el complejo heterómero es soluble, el péptido o el polipéptido puede recuperarse del cultivo, es decir, de la célula hospedadora en los casos en que los complejos heterómeros no son segregados, y desde el medio de cultivo en los casos en que los complejos heterómeros son segregados por las células. Sin embargo, los sistemas de expresión también incluyen células hospedadoras modificadas que expresen los complejos heterómeros anclados en la membrana celular.

La purificación o el enriquecimiento de los complejos heterómeros a partir de estos sistemas de expresión puede llevarse a cabo empleando micelas lipídicas y detergentes apropiados y métodos muy conocidos por los expertos en la técnica. Sin embargo, las propias células hospedadoras modificadas pueden emplearse en situaciones en las que resulta importante no solo conservar las características estructurales y funcionales de los complejos heterómeros, sino también evaluar la actividad biológica, por ejemplo, en ensayos de selección de fármacos.

La proteína expresada por medio de los métodos de la invención puede recolectarse. Además, la proteína puede purificarse, o purificarse parcialmente, de dicho cultivo o componente 14 (por ejemplo, del medio de cultivo o de extractos celulares o de fluidos corporales) empleando procesos conocidos. La expresión "purificarse parcialmente" significa que se ha llevado a cabo algún procedimiento o procedimientos de fraccionamiento, aunque están presentes más especies polipeptídicas (al menos 10%) además de la proteína deseada. "Purificada" significa que la proteína es fundamentalmente homogénea, es decir, están presentes menos del 1% de proteínas contaminantes. Los procedimientos de fraccionamiento pueden incluir, pero no se limitan a una o más etapas de filtración, centrifugación, precipitación, separación de fases, purificación por afinidad, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular (SEC), cromatografía de interacción hidrofoba (HIC, que emplea resinas tales como fenil éter, butil éter o propil éter), HPLC, o algunas de sus combinaciones.

La invención opcionalmente incluye además formular las proteínas en un momento posterior. El término "formular" significa que las proteínas pueden someterse a un intercambio de tampón, esterilizarse, envasarse a granel y/o envasarse para un usuario final. Para los objetivos de la invención, la expresión "forma a granel estéril" significa que una formulación está exenta, o fundamentalmente exenta, de contaminación microbiana (en la medida en que sea aceptable para fines alimentarios y/o farmacológicos) y tiene una composición y una concentración definidas.

La expresión "forma de dosis unitaria" significa una forma que es apropiada para la administración o el consumo por parte del cliente y/o del paciente. Estas composiciones pueden comprender una cantidad eficaz de la proteína, en combinación con otros componentes, tales como un diluyente, vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable. La expresión "fisiológicamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente o ingredientes activos.

Habiendo descrito la invención, los siguientes ejemplos se ofrecen como ilustración y no como limitación.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de vectores de complementación de DHFR

La construcción de vectores recombinantes que expresan subunidades de un marcador seleccionable se realizó como sigue. Se eligió la dihidrofolato reductasa (DHFR) como marcador seleccionable para ser empleada en los siguientes experimentos. Trabajos previos han demostrado que, debido a su estructura tridimensional modular, la DHFR puede romperse en dos partes y, cuando se expresa como una proteína que presenta un dominio de interacción, las subunidades después pueden reasociarse en una célula para proporcionar una actividad seleccionable. Véase la figura 1 para un resumen general del orden de los diversos ácidos nucleicos descritos en una realización de la invención.

Se empleó la reacción en cadena de la polimerasa secuencial (PCR) SOEing para generar ácidos nucleicos adecuados para clonar en vectores de expresión que codifican una fusión de un dominio de interacción de cremallera de leucina condensado con un polipéptido conector condensado con una subunidad de DHFR. Brevemente, la PCR SOEing consiste en el corte y empalme de genes mediante extensión de solapamiento para recombinar moléculas de ADN en zonas de unión sin utilizar endonucleasas de restricción ni ligasa (Methods in Molecular Biology, vol. 15, "PCR protocols: Current Methods and Applications," y "Chapter 25: In Vitro Recombination," editor. B.A. White, 1993, Humana Press, Inc., Totowa, NJ; y Mutagenesis of DNA, Robert M. Horton, pp. 251-261).

ES 2 620 410 T3

Los fragmentos de los genes que se van a recombinar se generan en reacciones en cadena de la polimerasa distintas (PCR). Los cebadores se diseñan de modo que los extremos de los productos contengan secuencias complementarias, tales como un sitio de restricción común, concretamente, BamH1. Cuando estos productos de la PCR posteriormente se mezclan, se desnaturalizan y se reasocian, las hebras que poseen secuencias que se aparean en sus extremos 3' se solapan y actúan como cebadores entre sí (Horton *et al.* (1989), *Gene*, 77(1):61-68).

Los cebadores empleados en el presente ejemplo son los siguientes:

JM238 5'-ATATCTCGAGATCCGTGCCATCATGTCTGACCGTATGAAAC-3'
JM239 5'-GCCACCGCCGGATCCACCGCCACCCCGCTCGCCTACCAGCTTTT'-3'
JM240 5'-GGTGGATCCGGCGGTGGCGGCG-GCTCAATGGTTCGACCATTGAAC-3'
PDHFR106 5'-ATATCAATTGTTATTCCGGTTGTTCAATAAGTC-3'
JM242 5'-GTGGATCCGGCGGTGGCGGCGGCTCATTGGCAAGTAAAGTAGACA-3'
JM244 5'-ATATCAATTGTTAGTCTTCTTCTCGTAGACTT-3'

Se empleó la siguiente estrategia para crear un ácido nucleico que codifica un dominio de interacción de cremallera de leucina condensado dentro de marco con un conector condensado dentro de marco con los aminoácidos 1-105 de DHFR. La primera reacción de PCR amplifica la cremallera de leucina de GCN4 de levaduras (Lz) empleando los cebadores JM238 (SEQ ID NO:1) y JM239 (SEQ ID NO:2). Todas las reacciones de PCR utilizan el sistema de PCR Roche Expand High Fidelity, que incluye todos los reactivos necesarios, excepto por los dNTP 10 mM, que están disponibles en el mercado. Las condiciones térmicas del ciclo (condición 1 de la PCR) fueron las siguientes:

94 °C durante 5 min
94 °C durante 30 seg -----
37 °C durante 30 seg |--- 25 ciclos
72 °C durante 30 seg -----
72 °C durante 7 minutos
4 °C (mantenimiento).

El cebador JM238 presenta un sitio Xho1 en el extremo 5' terminal, y el cebador JM239 presenta un sitio BamH1 en el extremo 5' terminal. Al mismo tiempo, se emplearon los cebadores JM240 (SEQ ID NO:3) y PDHFR106 (SEQ ID NO:4) para amplificar mediante PCR los aminoácidos 1-105 que codifican una subunidad de DHFR (SEQ ID NO:5) [igual que antes, excepto con 1 minuto de duración a 94 °C y a 72 °C para los 25 ciclos (condición 2 de la PCR)]. El JM240 tiene un sitio BamH1 en su extremo 5' terminal y el PDHFR106 tiene un sitio Mfe1 en su extremo 5' terminal. Cada respectivo producto de la PCR se purificó en gel empleando técnicas de purificación en gel convencionales, y se realizó una segunda reacción de PCR empleando la condición 2 de la PCR. Después el producto resultante se clonó en un vector pGEM-T (Promega) y se secuenció.

Se empleó una estrategia similar para crear un ácido nucleico que codifica una cremallera de leucina condensada dentro de marco con un conector condensado dentro de marco con los aminoácidos 106-187 de DHFR. La primera reacción de PCR amplifica la cremallera de leucina de GCN4 de levaduras empleando los cebadores JM238 (SEQ ID NO:1) y JM239 (SEQ ID NO:2) empleando la condición 1 de la PCR. El cebador JM238 presenta un sitio Xho1 en el extremo 5' terminal, y el cebador JM239 presenta un sitio BamH1 en el extremo 5' terminal. Al mismo tiempo, se emplearon los cebadores JM242 (SEQ ID NO:6) y JM244 (SEQ ID NO:7) para amplificar mediante PCR los aminoácidos 106-187 que codifican una subunidad de DHFR (SEQ ID NO:5) empleando la condición 1 de la PCR. El JM242 tiene un sitio BamH1 en su extremo 5' terminal y el JM244 tiene un sitio Mfe1 en su extremo 5' terminal. Cada respectivo producto de la PCR se purificó en gel empleando técnicas de purificación en gel convencionales, y se realizó una segunda reacción de PCR empleando la condición 1 de la PCR. Después el producto resultante se clonó en un vector pGEM-T vector (Promega) y se secuenció.

Tras haber verificado las secuencias correctas, los fragmentos Lz-conector-DHFR 1-105 (363 pb) y Lz-conector-DHFR 106-187 (343 pb) se cortaron del vector pGEM-T con Xho1 y Mfe1, y los ácidos nucleicos se purificaron en gel. El vector pDC317 se digirió con Not1 y Xho1, y el elemento de entrada a ribosomas interno (SIRE) de 558 pb se recuperó mediante purificación en gel. Puesto que Xho1 no es un sitio exclusivo sobre pDC317, se realizó un acoplamiento triple entre el elemento Not1/Xho1 SIRE, el Xho1/Mfe1 Lz-conector-DHFR 1-105 y el Lz-conector-DHFR 106-187 en pDC317 y los aislados se ensayaron y se confirmó que portaban el acoplamiento correcto mediante digestión de restricción.

Los genes de cadena pesada y ligera del anticuerpo (Ab), que codifican un anticuerpo que reconoce específicamente el receptor de interleuquina-4 murino (IL4R), se clonaron cada uno en los vectores preparados como se describió anteriormente. La cadena pesada (CP) del anti-IL4R se digirió con Not1 y Sal1. A partir de esta digestión se aisló un fragmento de 1413 pb mediante purificación en gel. De forma similar, la cadena ligera (CL) del anticuerpo anti-IL4R se cortó de un vector con las mismas enzimas, y el fragmento de cadena ligera de 736 pb se purificó en gel. Los vectores Lz-CONECTOR-DHFR-pDC317 (ambos 1-105 y 106-187) también se cortaron con Not1 y Sal1, y las cadenas pesada y ligera se clonaron en los correspondientes vectores de expresión. Se obtuvieron las siguientes combinaciones:

IL4R Ab HC: Lz-conector-DHFR 1-105 pDC317
 IL4R Ab LC: Lz-conector-DHFR 106-187 pDC317
 IL4R Ab LC: Lz-conector-DHFR 1-105 pDC317
 IL4R Ab HC: Lz-conector-DHFR 106-187 pDC317

5

Ejemplo 2: Construcción de un segundo conjunto de vectores de complementación de DHFR

La construcción de un segundo conjunto de vectores recombinantes que expresan subunidades de un marcador seleccionable se realizó como sigue. Los vectores bicistrónicos que contienen el sitio de entrada a ribosomas interno (SIRE) se basan en pED4 (Kaufman (1991), Nuc. Acids Res., 19(16):4485-4490). El vector básico, pDC318, es un derivado de pG2.1 (Aldrich (1998), Cytotechnology, 28:9-17) que contiene una porción de 600 pares de bases truncada del elemento de secuencia de potenciación de la expresión (ESPE). El pDC317 es un vector similar que contiene el ESPE más grande de 3,6 kilobases. Se empleó una PCR para condensar una cremallera de leucina de GCN4 (LZ) y un conector flexible a dos fragmentos distintos del marcador seleccionable dihidrofolato reductasa (DHFR). El primer fragmento se extiende desde los aminoácidos 1-105 y el segundo fragmento incluye los aminoácidos 106-187. Los productos finales de la PCR después se clonaron en pDC317 o pDC318 justo cadena abajo del elemento SIRE.

10

15

20

25

El elemento SIRE se modificó basándose en el vector pED3 creado por Davies *et al.*, para potenciar la traducción de los fragmentos LZ-conector-DHFR (Davies (1992), J. Virol., 66(4):1924-1932). Este cambio se incorporó en los fragmentos SIRE LZ-conector-DHFR en pDC317 por medio de una PCR empleando el cebador JM256 (5'-GATAATATGGCCACAACCATGTCTGACCGTATGAAACA-3'). El ATG subrayado marca la transición del SIRE de pED3 a LZ. Después los fragmentos se subclonaron en pGEM-T (Invitrogen) que contenía la secuencia SIRE de longitud completa. Los fragmentos pED3 SIRE LZ-conector-DHFR 1-105 y 106-187 después se clonaron en pDC318 para crear pDC321 y pDC322, o en pDC317 para crear pDC323 o pDC324, respectivamente.

30

Las cadenas del anticuerpo anti-IL4R murino se clonaron en los sitios de clonación múltiple de pDC321 y pDC322, justo cadena arriba del SIRE de pED3 para crear pDC321 CL, pDC321 CP, pDC322 CL, y pDC322 CP. De modo similar, las cadenas pesada y ligera se clonaron en los sitios de clonación múltiple de pDC323 y pDC324 para crear pDC323 CL, pDC323 CP, pDC324 CL, y pDC324 CP.

30

Ejemplo 3: Transfección y selección

35

Se realizó la transfección de los vectores anteriores en una línea de células CHO deficiente en DHFR. Se emplearon protocolos de transfección convencionales. Se incubaron células a 37 °C hasta que alcanzaron la fase logarítmica y se transfectaron con una concentración apropiada de plásmidos purificados con 150 ul de lipofectamina (Gibco BRL), según recomienda el fabricante. Las transfecciones con lipofectamina (Invitrogen) se realizaron con una proporción 6:6:1 de pDC321 CL:pDC322 CP:pCDNA3 (Invitrogen), pDC321 C:PpDC322 CL:pCDNA3, pDC323 CL:pDC323 CP:pCDNA3, o pDC324 CP:pDC324 CL:pCDNA3.

40

45

La selección inicial se realizó en matraces de agitación en un medio de selección sin DHFR con G418, con la recuperación de hasta 70% de viabilidad, seguido de una selección en medio de selección de DHFR que carecía de glicina, hipoxantina y timidina (-GHT), con una recuperación de hasta 90% de viabilidad. Las agrupaciones establecidas después de la selección con G418 y -GHT se expusieron a metotrexato 25 nM para intentar amplificar las cadenas de los anticuerpos y, por tanto, potenciar la producción de anticuerpos en las agrupaciones. Tanto las agrupaciones no amplificadas como las agrupaciones amplificadas mostraron una producción estable de anticuerpos durante este periodo de tiempo.

50

Para la clonación, las células transfectadas se diluyeron y se cultivaron directamente en placas de 96 pocillos en medio de crecimiento -T. No fue necesaria una preselección en G418 ni -GHT.

55

Para los vectores pDC321 y pDC322, la agrupación no amplificada mantuvo una qP de 1 µg/10⁶ células/día. Un aumento en la qP para la agrupación amplificada se correlaciona con un aumento en la viabilidad después de la recuperación de las células de la selección. La qP de la agrupación amplificada varío de 8-18 µg/10⁶ células/día, lo cual indica un aumento en 8-18 veces en la producción de anticuerpos, comparado con la agrupación no amplificada. Se evaluaron cinco agrupaciones independientes y se descubrió que mostraban niveles de expresión similares. Además del análisis de las agrupaciones, dos de los clones se escalaron en matraces de agitación, se amplificaron con metotrexato 25 nM y se evaluaron para la expresión. La expresión fue similar a los resultados descritos para las agrupaciones.

60

Para los vectores pDC323 y pDC324, es decir, los vectores con el elemento ESPE de 3,6 kilobases, la agrupación no amplificada mantuvo una qP de aproximadamente 5 µg/10⁶ células/día.

Ejemplo 4: Expresión de anticuerpos procedentes de los vectores de complementación

Después las agrupaciones no amplificadas y las agrupaciones amplificadas se evaluaron bajo condiciones de producción simuladas. Un desplazamiento hacia una temperatura más baja, por ejemplo, 31 °C, conduce a unas titulaciones mayores. La inducción se realizó en 20 ml de cultivos de matraces agitados sometidos a una temperatura más baja. Las titulaciones de los anticuerpos se midieron mediante ELISA. Una agrupación no amplificada produjo 80 µg/ml de anticuerpo en 9 días, manteniendo, al mismo tiempo, una viabilidad final de 65,8%. Se analizaron tres agrupaciones independientes. Las agrupaciones amplificadas produjeron un promedio de 407,8 µg/ml de anticuerpo en 10 días, con un promedio de viabilidad final de 47,2%. La productividad específica (qP) de las agrupaciones varió de 10-20 µg/10⁶ células/día.

Ejemplo 5: Análisis de la transferencia Western de anticuerpos

Se aislaron anticuerpos expresados a partir de las células transfectadas con los vectores pDC321 o pDC322 empleando métodos convencionales, se purificaron y se ensayaron en geles nativos y desnaturizantes. Se utilizó un gel de Tris al 4-20%-glicina de 1 mm, 10 pocillos (Invitrogen, n.º de catálogo E6025) a 125 V durante aproximadamente 2 horas. Las muestras no se calentaron y se suspendieron en 2X tampón de muestras de gel de Tris-glicina nativo (Invitrogen, n.º de catálogo LC2673) con (reducido) o sin (no reducido) beta-mercaptoetanol al 5% (concentración final del 2,5%). El tampón de muestra fue 1X tampón de ensayo de SDS. Los geles no eran desnaturizantes porque, en ellos, no había SDS ni agentes reductores, solo los tampones de muestra.

La transferencia a nitrocelulosa (papeles de filtro de membrana de nitrocelulosa Nitrocellulose Membrane Filter Paper Sandwich, Invitrogen, LC2001) se realizó durante 45 minutos a 33 V. Las membranas se bloquearon durante la noche a 4 °C en leche en polvo desnatada al 5% en PBST (Tween 20 al 0,1%) o disolución "de transferencia". El anticuerpo anti-IgG de ratón de cabra (H+L) conjugado con HRP purificado por afinidad de calidad de transferencia (Bio-Rad, n.º de catálogo 170-6516) se diluyó 1:2000 en disolución de transferencia y se aplicó a las transferencias durante 2,5 horas. Después las transferencias se enjuagaron 5X durante 5 minutos cada una en PBST y se revelaron durante 30 segundos con los reactivos de detección de análisis de la transferencia Western ECL (Amersham Pharmacia Biotech, n.º de catálogo RPN2106).

Las muestras se derivaron todas de los sobrenadantes de transferencia 90 de los cultivos. De modo específico, el anticuerpo purificado se extrajo de un cultivo inducido no amplificado y se purificó en una columna de proteína G. El sobrenadante de 0 nM se concentró hasta 10X en un concentrador Millipore (UFV2BCC40) a 3000 rpm, puesto que su concentración, según Mu FC ELISA, era menor que en las otras muestras. El gel no reducido demostró que el anticuerpo con la cadena pesada y ligera estaba presente en todos los casos y que existe muy poca cantidad de cadena ligera libre o cadena ligera dimerizada en los sobrenadantes de 25 y 50 nM, mientras que no aparecía en los sobrenadantes de 0 nM y sí aparecía una pequeña cantidad de cadena ligera dimerizada en el Ab purificado.

Las cadenas pesadas y las cadenas ligeras estaban presentes en todos los sobrenadantes en proporciones equivalente al del anticuerpo purificado y, de modo significativo, aparecía una cantidad considerablemente mayor de anticuerpo total en los sobrenadantes amplificados con metotrexato, lo cual resulta coherente con los resultados del ejemplo 3.

También se purificaron anticuerpos procedentes de las células transfectadas con los vectores pDC323 o pDC324. Los anticuerpos procedentes de los sobrenadantes de las células presentaban proporciones equivalentes de cadenas pesadas y ligeras en el gel no reducido, con una cantidad muy pequeña de cadena ligera libre o cadena ligera dimerizada.

Ejemplo 6: Análisis FACS de la expresión de DHFR

Se empleó la clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) para verificar una amplificación concurrente de la expresión de DHFR después de la exposición a metotrexato. Las agrupaciones no amplificadas y amplificadas se marcaron con metotrexato marcado con fluoresceína, que se une a DHFR, y se analizaron en un analizador FACS Calibur. Se emplearon células CS9 no marcadas y no transfectadas como control. Tanto las agrupaciones no amplificadas como las agrupaciones amplificadas mostraron actividad DHFR, tal como se esperaba. Se observó un grado mayor de fluorescencia en la agrupación amplificada con metotrexato 25 nM, comparada con la agrupación no amplificada con metotrexato 0 nM. Esto verifica que la amplificación de la expresión del anticuerpo se correlaciona con una amplificación de la expresión de DHFR.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de expresión en hospedadores que comprende una célula hospedadora que ha sido modificada genéticamente para que exprese un primer vector que codifica un transcrito que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una primera cadena pesada de inmunoglobulina o cadena ligera de inmunoglobulina, en el que la transcripción de dicha primera secuencia de ácido nucleico es inducida simultáneamente con la transcripción de una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una primera subunidad de un marcador seleccionable, y un segundo vector que codifica un transcrito que comprende una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica una segunda cadena pesada de inmunoglobulina o cadena ligera de inmunoglobulina que es capaz de asociarse con la primera cadena pesada de inmunoglobulina o cadena ligera de inmunoglobulina para formar un complejo heterómero, en el que la transcripción de dicha tercera secuencia de ácido nucleico es inducida simultáneamente con la transcripción de una cuarta secuencia de ácido nucleico que codifica una segunda subunidad de un marcador seleccionable, y en el que dichas primera y segunda subunidades del marcador seleccionable se asocian para proporcionar una actividad seleccionable, en el que un sitio de entrada a ribosomas interno aparece entre la primera secuencia de ácido nucleico y la segunda secuencia de ácido nucleico, en el que un sitio de entrada a ribosomas interno aparece entre la tercera secuencia de ácido nucleico y la cuarta secuencia de ácido nucleico, y el complejo heterómero es un anticuerpo.
2. El sistema de expresión en hospedadores de la reivindicación 1, en el que el marcador seleccionable se selecciona del grupo que consiste en un marcador de resistencia a fármacos y un marcador de supervivencia metabólica.
3. El sistema de expresión en hospedadores de la reivindicación 2, en el que el marcador seleccionable se selecciona del grupo que consiste en dihidrofolato reductasa, resistencia a neomicina, resistencia a higromicina, y beta-galactosidasa.
4. El sistema de expresión en hospedadores de la reivindicación 1, en el que la subunidad del marcador seleccionable es un polipéptido de fusión que comprende un dominio de interacción.
5. El sistema de expresión en hospedadores de la reivindicación 4, en el que el dominio de interacción es una cremallera de leucina procedente de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en GCN4, C/EBP, c-Fos, c-Jun, c-Myc y c-Max.
6. El sistema de expresión en hospedadores de la reivindicación 1, que codifica además un marcador seleccionable funcional diferente seleccionado de la lista que consiste en zeomicina, neomicina, puromicina, blastidina S y GPT.
7. El sistema de expresión en hospedadores de la reivindicación 1, en el que la célula hospedadora se selecciona del grupo que consiste en células CHO, VERO, BHK, HeLa, Cos, MDCK, 293, 3T3, una línea de células de mieloma, y células WI38.
8. Un método para producir un complejo heterómero, que comprende la etapa de cultivar la célula hospedadora, según se define en la reivindicación 1, bajo condiciones en las que el complejo heterómero es expresado por la célula hospedadora.
9. El método de la reivindicación 8, que comprende además aislar el complejo heterómero.
10. El método de la reivindicación 9, que comprende además formular el complejo heterotrímero en una forma a granel estéril o una forma de dosis unitaria estéril.
11. El sistema de expresión en hospedadores de la reivindicación 1, que comprende una célula hospedadora que ha sido modificada genéticamente para que exprese un primer vector que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina, en el que la transcripción de dicha cadena ligera es inducida simultáneamente con la transcripción de una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de una primera subunidad de dihidrofolato reductasa condensada con una secuencia de dimerización, y un segundo vector que comprende una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada de inmunoglobulina, en el que la transcripción de dicha cadena pesada es inducida simultáneamente con la transcripción de una cuarta secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de una segunda subunidad de una dihidrofolato reductasa condensada con una secuencia de dimerización, en el que cada subunidad de dihidrofolato reductasa no presenta una actividad seleccionable cuando se expresa por sí sola, y la coexpresión de la primera subunidad de dihidrofolato reductasa con la segunda subunidad de dihidrofolato reductasa proporciona actividad dihidrofolato reductasa.
12. El sistema de expresión en hospedadores de la reivindicación 11, en el que una subunidad de la dihidrofolato reductasa (DHFR) está formada por los aminoácidos 1 a 105 de DHFR, y la otra subunidad de la dihidrofolato reductasa (DHFR) está formada por los aminoácidos 106 a 187 de DHFR.

13. El sistema de expresión en hospedadores de la reivindicación 12, en el que la secuencia de dimerización condensada con la subunidad de dihidrofolato reductasa se deriva de la secuencia de cremallera de leucina de GCN4.
- 5 14. El sistema de expresión en hospedadores de la reivindicación 1, que comprende una célula hospedadora que ha sido modificada genéticamente para que exprese un primer vector que codifica un transcrito que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada de inmunoglobulina, en el que la transcripción de dicha primera secuencia de ácido nucleico es inducida simultáneamente con la transcripción de una segunda
10 secuencia de ácido nucleico que codifica una primera subunidad de un marcador seleccionable, y un segundo vector que codifica un transcrito que comprende una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina, en el que la transcripción de la tercera secuencia de ácido nucleico es inducida simultáneamente con la transcripción de una cuarta secuencia de ácido nucleico que codifica una segunda subunidad de un marcador seleccionable, y en el que dichas primera y segunda subunidades del marcador seleccionable se asocian para proporcionar una actividad seleccionable.
- 15 15. El sistema de expresión en hospedadores de la reivindicación 14, en el que el marcador seleccionable se selecciona del grupo que consiste en dihidrofolato reductasa, resistencia a neomicina, resistencia a higromicina y beta-galactosidasa.
- 20 16. El sistema de expresión en hospedadores de la reivindicación 15, en el que la subunidad del marcador seleccionable es un polipéptido de fusión que comprende un dominio de interacción.
- 25 17. El sistema de expresión en hospedadores de la reivindicación 16, en el que el dominio de interacción es una cremallera de leucina procedente de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en GCN4, C/EBP, c-Fos, c-Jun, c-Myc y c-Max.

Figura 1

