

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 442**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 15/64 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2010 PCT/EP2010/052408**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.09.2010 WO10097435**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2010 E 10706603 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2401294**

54 Título: **Método para producir anticuerpos**

30 Prioridad:

25.02.2009 GB 0903210

25.02.2009 GB 0903209

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

15.02.2019

73 Titular/es:

**UCB BIOPHARMA SPRL (100.0%)
Allée de la Recherche 60
1070 Brussels, BE**

72 Inventor/es:

**STEPHENS, PAUL EDWARD y
WRIGHT, MICHAEL JOHN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 700 442 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

Descripción

5 La invención se refiere a un método para producir y expresar proteínas con una función deseada, particularmente proteínas que son componentes de una proteína multimérica, tal como un anticuerpo. La presente invención se refiere también a un polinucleótido adecuado para expresar una proteína de fusión y una célula que comprende el polinucleótido. La invención también se refiere a una célula huésped capaz de expresar polinucleótidos exógenos que codifican una proteína de interés.

10 Mediante el uso de DNA recombinante, los genes que se identifican como importantes, por ejemplo en aplicaciones terapéuticas, se pueden amplificar y aislar. Las células se utilizan ampliamente para producir una proteína recombinante de interés al transfectar la célula con un vector que comprende la secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de interés. Las células se pueden utilizar para producir cualquier proteína deseada incluyendo proteínas multiméricas, tales como anticuerpos. El uso de células de mamíferos para expresar proteínas recombinantes proporciona una ruta de expresión de proteínas "natural" en las que las proteínas se someten a la maquinaria de plegamiento de proteínas de la célula y al procesamiento posterior adicional. Esto proporciona proteínas recombinantes que tienen la conformación requerida para la actividad *in vivo*.

15 El avance continuo de las técnicas de transfección de mamíferos es cada vez más importante para muchas aplicaciones. Este es particularmente el caso cuando se debe expresar y analizar un gran número de proteínas de interés, tal como en los proyectos de selección de anticuerpos de alto rendimiento.

20 Muchas proteínas de investigación, terapéuticas y de diagnóstico son proteínas de fusión que comprenden una secuencia de polipéptidos codificada por dos o más genes. Las proteínas de fusión se producen de manera natural y también se producen por medios recombinantes. Las proteínas de fusión pueden formar proteínas multiméricas que comprenden un complejo heterogéneo de una pluralidad de cadenas polipeptídicas plegadas correctamente. La correcta funcionalidad de la proteína multimérica depende tanto del plegamiento correcto del dominio de la proteína de cada cadena polipeptídica individual como de su asociación correcta entre sí. Los anticuerpos son un ejemplo de dichas proteínas multiméricas que comprenden una o más proteínas de fusión. Los anticuerpos IgG comprenden cuatro cadenas polipeptídicas separadas, dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en las que cada cadena es una proteína de fusión de la región variable y la región constante.

25 Actualmente la producción de anticuerpos recombinantes requiere múltiples etapas de digestión y ligadura. Una vez que se han identificado las cadenas pesadas variables y ligeras variables, el DNA codificante de cada cadena debe producirse e insertarse en vectores plasmídicos. Los vectores plasmídicos comprenden los elementos reguladores de la transcripción necesarios que incluyen promotores y terminadores para cada secuencia de codificación. Los vectores también pueden comprender secuencias de polinucleótidos que codifican las regiones constantes de las cadenas ligeras y pesadas. Los vectores se transfectan después en células huésped. Una vez transfectados en las células huésped los vectores pueden emplear la maquinaria de transcripción de la célula para transcribir la secuencia de DNA codificante en los vectores, que es una transfección transitoria. Alternativamente, la secuencia de DNA codificante en los vectores se puede integrar en el genoma de la célula, a partir de la cual se transcribe el DNA, que es una transfección estable. La cadena ligera y la cadena pesada se expresan después por las células huésped y se llevan a cabo varias etapas de aislamiento y purificación para obtener el producto de anticuerpo final. Todo el proceso para producir el producto de anticuerpo final es extremadamente complejo y consume mucho tiempo.

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

35 El documento de Patente WO 2005/042774 describe un método de RT-PCR de extensión por solapamiento múltiple para unir dos o más secuencias de nucleótidos que codifican dominios o componentes de una proteína heteromérica en una sola reacción. Este documento describe que el método se puede utilizar para unir un par afín de ácidos nucleicos no contiguos de interés que están contenidos dentro o se derivan de una sola célula. El método se describe como particularmente útil para unir secuencias que codifican regiones variables de cadena pesada y regiones variables de cadena ligera a partir de una única célula. El par afín puede comprender una o más secuencias que codifican regiones constantes además de las secuencias que codifican regiones variables. Sin embargo, el producto de nucleótido resultante del método requiere todavía la clonación y la inserción en un vector de expresión apropiado para permitir la expresión en una célula huésped adecuada.

40 Liao et al, Journal of Virological Methods vol 158, no. 1-2, 21 February 2009, pages 171-179 describen el aislamiento de alto rendimiento de genes de inmunoglobulina de células B humanas individuales y la expresión como anticuerpos monoclonales.

45 El documento de Patente WO2004/032841 describe un sistema para la producción y selección de anticuerpos monoclonales.

Tiller y colaboradores describen la generación eficiente de anticuerpos monoclonales a partir de células B humanas individuales RT-PCT de una sola célula y la clonación del vector de expresión.

Babcook et al, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 7843-7848 describen una nueva estrategia para generar anticuerpos monoclonales a partir de linfocitos individuales, aislados que producen anticuerpos de especificidades definidas.

5 Coloma et al, Journal of Immunological Methods vol 152, no. 1, 31 July 1992, pages 89-104.

El documento de Patente WO 92/02551 describe un método para producir proteínas con la función deseada que permite identificar un solo linfocito que produce un anticuerpo con la especificidad deseada para ser identificado dentro de una gran población de células linfoides y la información genética que codifica la especificidad del anticuerpo (las regiones variables) para ser identificadas a partir de ese linfocito. Tras la identificación de la
 10 secuencia de aminoácidos de las regiones variables o partes de las mismas, las secuencias se pueden utilizar para construir otros anticuerpos con la función deseada mediante la clonación de las secuencias de DNA que codifican las regiones variables en un vector capaz de expresar la proteína. La velocidad y la capacidad de salida de este método están limitadas por una serie de factores, particularmente por la clonación de la región variable en vectores. En consecuencia, existe la necesidad de proporcionar métodos mejorados para producir proteínas que tienen la
 15 función deseada, particularmente anticuerpos, que superan las limitaciones de los métodos utilizados actualmente en la técnica.

Compendio de la invención

Es un objetivo de la presente invención resolver uno o más de los problemas descritos anteriormente.

La presente descripción proporciona un método para obtener un anticuerpo recombinante con una capacidad
 20 deseada para unirse a un antígeno seleccionado que evita múltiples etapas de digestión y ligación para producir vectores y múltiples transformaciones en las células huésped, que comprende:

(a) proporcionar una población de células linfoides formadoras de anticuerpos que se sospecha que contienen al menos una célula capaz de producir un anticuerpo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera que muestran dicha especificidad deseada;

25 (aa) 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 seleccionan para identificar una célula formadora de anticuerpos o una población de células formadora de anticuerpos que producen un anticuerpo que muestra la capacidad deseada;

30 (aaa) identificar y aislar una única célula formadora de anticuerpos que produce un anticuerpo que muestra la capacidad deseada a partir de una población de células formadora de anticuerpos identificada en la primera etapa de selección (aa);

(b) generar un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo que codifica una cadena ligera o un fragmento de la misma y un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo que codifica una
 35 cadena pesada o un fragmento de la misma para cada anticuerpo recombinante a partir de una célula formadora de anticuerpos única, aislada obtenida en la etapa (aaa), en la que cada polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo comprende una primera secuencia de polinucleótidos codificante que codifica un dominio variable de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos única, aislada obtenida en la etapa (aaa), una segunda secuencia de polinucleótidos codificante que codifica una o más secuencias de polinucleótidos que codifican un dominio constante y uno o más elementos reguladores de la transcripción y no es capaz de
 40 replicación autónoma; en donde la etapa (b) comprende:

(bb) proporcionar la primera secuencia de polinucleótidos codificante, la segunda secuencia de polinucleótidos codificante y los uno o más elementos reguladores de la transcripción;

(bbb) unir la primera secuencia de polinucleótidos codificante y la segunda secuencia de polinucleótidos codificante mediante PCR, y

45 (bbbb) unir uno o más elementos reguladores de la transcripción a la primera secuencia de polinucleótidos codificante y/o la segunda secuencia de polinucleótidos codificante mediante PCR;

(c) expresar un anticuerpo recombinante que comprende una cadena pesada y una cadena ligera de los polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos generados en la etapa (b) mediante la
 50 transfección transitoria de los polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos en una célula, cultivando dichas células huésped en un medio apropiado y aislando el anticuerpo de la célula;

(d) seleccionar el anticuerpo recombinante producido en la etapa (c) para la especificidad deseada para unirse a un antígeno seleccionado; y

(e) repetir opcionalmente la etapas (b), (c) y (d) para identificar un anticuerpo recombinante que muestre la especificidad deseada para unirse a un antígeno seleccionado.

5 Los métodos proporcionados por la presente invención son ventajosos porque proporcionan una manera más eficiente, simplificada y más rápida de producir una proteína, particularmente proteínas de fusión que se ensamblan para formar una proteína multimérica, tal como un anticuerpo. El polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo, célula, sistema de expresión, y los métodos evitan la necesidad de múltiples etapas de digestión y ligación para producir vectores, múltiples transformaciones en las células huésped, y permiten una manera más rápida y más fácil de obtener la proteína recombinante final.

10 Las células empleadas según la presente invención también se pueden transfectar con un mayor número de polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos exógenos en comparación con el número de plásmidos. En consecuencia, el método de la presente invención puede proporcionar un método de transfección y expresión más eficiente y puede proporcionar un mayor rendimiento de proteína expresada en comparación con el uso de plásmidos.

Breve descripción de los dibujos

15 En los siguientes dibujos se describen realizaciones específicas de la presente invención solamente a modo de ejemplo, en las que:

20 La Figura 1 es un diagrama esquemático de un método estándar conocido utilizado para clonar y expresar regiones variables de un anticuerpo utilizando vectores de expresión en los que las secuencias codificantes de la cadena pesada variable (VH) y la cadena ligera variable (VL) se amplifican mediante PCR en presencia de cebadores (P) que añaden sitios de restricción a las terminaciones 5' y 3' de las secuencias VH y VL que se muestran como regiones sombreadas a cada lado de las secuencias VH y VL; los sitios de restricción permiten la digestión y ligación posteriores en vectores de expresión separados que pueden comprender secuencias de dominio constante posteriores; los dos vectores de expresión se transfectan después en una célula para proporcionar una célula transfectada transitoria o estable capaz de expresar el anticuerpo deseado.

25 La Figura 2a es un diagrama esquemático del método para producir dos polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos exógenos distintos en los que las secuencias codificantes de la cadena pesada variable (F2 VH) y la cadena ligera variable (F2 VL) se amplifican en una primera PCR (PCR 1) en presencia de los cebadores de extensión de solapamiento P1 y P2, que añaden el extremo 3' del primer elemento regulador de la transcripción (F1) al extremo 5' de la secuencia de polinucleótidos codificante (F2) y el extremo 5' de la secuencia de polinucleótidos del extremo 3' (F3) al extremo 3' de la secuencia de polinucleótidos codificante (F2) produciendo así un producto de PCR intermedio; en una segunda PCR (PCR2) el producto de PCR intermedio se amplifica mediante PCR en presencia de un primer elemento regulador de la transcripción (F1), una secuencia de polinucleótidos del extremo 3' (F3), un tercer cebador (P3) y un cuarto cebador (P4) produciendo así un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo que comprende el primer elemento regulador de la transcripción (F1) y la secuencia de polinucleótidos codificante (F2) y la secuencia de polinucleótidos del extremo 3' (F3); la secuencia de polinucleótidos recombinante transcripcionalmente activa VH y el polinucleótido recombinante transcripcionalmente activo VL se pueden transfectar después en una célula para proporcionar una célula transfectada transitoria o estable capaz de expresar el anticuerpo deseado o un fragmento del mismo.

40 La Figura 2b es un diagrama esquemático del método para producir polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos que codifican una cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo, en donde la secuencia codificante de la cadena pesada variable (F2 VH) se amplifica en una primera PCR (PCR1) en presencia de los cebadores de extensión de solapamiento P1 y P2 que añaden el extremo 3' del primer elemento regulador de la transcripción (F1) al extremo 5' de la secuencia de polinucleótidos codificantes de la cadena pesada variable (F2) y el extremo 5' de la secuencia de cadena pesada constante (F3 CH) al extremo 3' de la secuencia de polinucleótidos codificantes de la cadena pesada variable (F2 VH) produciendo así un producto de PCR intermedio; en una segunda PCR (PCR2) el producto de PCR intermedio se amplifica mediante PCR en presencia de un primer elemento regulador de la transcripción (F1), una secuencia de cadena pesada constante (F3 CH), un tercer cebador (P3) y un cuarto cebador (P4) produciendo así un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo que comprende el primer elemento regulador de la transcripción (F1) y la secuencia de polinucleótidos codificantes de la cadena pesada variable (F2 VH) y la secuencia de polinucleótidos codificante de la cadena pesada constante (F3 CH); PCR1 y PCR2 se repiten con una secuencia codificante de cadena ligera variable (F2 VL) y una secuencia codificante de cadena ligera constante (F3 CL) para producir un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo que comprende el primer elemento regulador de la transcripción (F1) y la secuencia de polinucleótidos codificante de la cadena ligera variable (F2 VL) y la secuencia de polinucleótidos codificante de la cadena ligera constante (F3 CL); la secuencia de polinucleótidos recombinantes transcripcionalmente activos de cadena pesada y los polinucleótidos recombinantes transcripcionalmente activos de cadena ligera se pueden transfectar después en una célula para proporcionar una célula transfectada transitoria o estable capaz de expresar el anticuerpo deseado o un fragmento del mismo.

La Figura 3a muestra una SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio) del producto de PCR intermedio (producto PCR1 VL) de la primera PCR1 para la cadena ligera variable (F2 VL), en donde M1 es una escalera de DNA estándar, B es un control negativo en blanco y 659 es el producto de PCR intermedio.

5 La Figura 3b muestra una SDS-PAGE del producto de PCR2 final (producto PCR2 VL) de la segunda PCR2 para la cadena ligera variable (VL) que comprende una secuencia promotora (F1), la secuencia de cadena ligera variable (F2 VL) y la secuencia de cadena ligera constante y una secuencia de poli A (F3 CL), en donde M2 es una escalera de DNA estándar, B es un control negativo en blanco y 659 es el producto de PCR final.

10 La Figura 4a muestra una SDS-PAGE del producto de PCR intermedio (producto PCR1 VH) de la primera PCR1 para la cadena pesada variable (F2 VH), en donde M2 es una escalera de DNA estándar, B es un control negativo en blanco y 659 es el producto de PCR intermedio VH.

15 La Figura 4b muestra una SDS-PAGE del producto de PCR2 final (producto PCR2 VH) de la segunda PCR2 para la cadena pesada variable (VH) que comprende una secuencia promotora (F1), la secuencia de cadena pesada variable (F2 VH) y la secuencia de cadena pesada constante y la secuencia poli A (F3 CH), en donde M2 es una escalera de DNA estándar, B es un control negativo en blanco y 659 es el producto de PCR final.

Breve compendio de las secuencias

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de nucleótidos de un segundo cebador (P2) que comprende una región complementaria al extremo 3' de una secuencia de dominio de cadena pesada variable (F2) y una cola de extensión de solapamiento complementaria al extremo 5' de una secuencia de dominio de cadena pesada constante (F3).

20 SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 1 del segundo cebador (P2), en donde QGTLVTVSS es el extremo 3' del dominio de cadena pesada variable (F2) y ASTKGP es el extremo 5' de la secuencia de dominio de cadena pesada constante (F3).

25 SEQ ID NO: 3 es la secuencia de nucleótidos de un primer cebador (P1) que comprende una región complementaria al extremo 5' de una secuencia que contiene un dominio de cadena pesada variable (F2) y una cola de extensión de solapamiento complementaria al extremo 3' no codificante de una secuencia promotora (F1).

SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos del extremo 5' de la secuencia que contiene el dominio de cadena pesada variable (F2) codificado por SEQ ID NO: 3 del primer cebador (P1).

30 SEQ ID NO: 5 es la secuencia de nucleótidos de un segundo cebador (P2) que comprende una región complementaria al extremo 3' de una secuencia de dominio de cadena ligera variable y una cola de extensión de solapamiento complementaria al extremo 5' de una secuencia de dominio de cadena ligera constante (F3).

SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 5 del segundo cebador, en donde GTKVEIKR es el extremo 3' del dominio de cadena ligera variable y TVAAPSVF es el extremo 5' de la secuencia de dominio de cadena ligera constante (F3).

35 SEQ ID NO: 7 es la secuencia de nucleótidos de un primer cebador (P1) que comprende una región complementaria al extremo 5' de una secuencia que contiene un dominio de cadena ligera variable (F2) y una cola de extensión de solapamiento complementaria al extremo 3' no codificante de una secuencia promotora (F1).

SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos del extremo 5' de la secuencia que contiene el dominio de cadena ligera variable (F2) codificada por SEQ ID NO: 7 del primer cebador (P1).

40 SEQ ID NO: 9 es la secuencia de nucleótidos de un cuarto cebador (P4) que es complementario a una región no codificante en el extremo 3' de la secuencia de poliadenilación de F3.

SEQ ID NO: 10 es la secuencia de nucleótidos de un tercer cebador (P3) que es complementario a una región no codificante en el extremo 5' de la secuencia promotora (F1).

SEQ ID NO: 11 es la secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia del promotor hCMV (F1).

45 SEQ ID NO: 12 es la secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de cadena Kappa de ratón constante y una secuencia poli A.

SEQ ID NO: 13 es la secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de cadena gamma 1 de ratón constante y una secuencia poli A.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá ahora con más detalle.

Los términos “proteína” y “polipéptido” se utilizan indistintamente aquí, a menos que el contexto indique lo contrario. “Péptido” pretende referirse a 10 o menos aminoácidos.

El término “polinucleótido” incluye un gen, DNA, cDNA, RNA, mRNA etc a menos que el contexto indique lo contrario. El polinucleótido puede ser bicatenario o monocatenario.

5 Como se utiliza aquí, el término “que comprende” en el contexto de la presente memoria descriptiva se interpretaría como “que incluye”.

El término “distinto” en el contexto de la presente invención significa que los polinucleótidos son diferentes/no idénticos. Los polinucleótidos pueden, por ejemplo, tener 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 la secuencias de longitud completa, por ejemplo, utilizando un software adecuado como BLAST.

El término “exógeno” en el contexto de la presente invención significa que las secuencias de polinucleótidos se originaron desde fuera de la célula huésped.

15 El término “proteína de fusión” en el contexto de la presente invención significa un polipéptido que comprende una pluralidad de subunidades en las que cada subunidad se codifica por una secuencia de polinucleótidos codificante separada. Cada secuencia de polinucleótidos codificante comprende una o más secuencias de genes o fragmentos de las mismas. La traducción de la pluralidad de secuencias de polinucleótidos codificantes da como resultado una cadena polipeptídica única. Las subunidades de la proteína de fusión se pueden unir directamente en la cadena polipeptídica o unirse mediante una secuencia enlazadora adecuada. Típicamente, 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 fragmentos de los mismos.

25 El término “polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo” en el contexto de la presente invención es un polinucleótido lineal que comprende los elementos necesarios requeridos para la transcripción de las secuencias codificantes en el polinucleótido después de la transfección en la célula huésped. El polinucleótido lineal transcripcionalmente activo comprende una o más secuencias de expresión reguladoras. Las una o más secuencias de expresión reguladoras pueden incluir un promotor. Las una o más secuencias de expresión reguladoras pueden incluir una región no traducida 3' tal como una secuencia de poliadenilación y/o una secuencia de terminación. En una realización, cada polinucleótido lineal transcripcionalmente activo comprende un promotor, una pluralidad de secuencias codificantes de proteínas y una secuencia de poliadenilación.

30 Tradicionalmente, los polinucleótidos se manejan en forma de plásmidos. Esto puede deberse a que el plásmido proporciona una forma relativamente estable en la que el polinucleótido relevante se puede manejar, almacenar, manipular y similares. El DNA del plásmido no es un polinucleótido lineal transcripcionalmente activo dentro del contexto de la presente memoria descriptiva, pero puede escindirarse para proporcionar un polinucleótido lineal transcripcionalmente activo. En una realización, el polinucleótido transcripcionalmente activo no comprende las secuencias de vectores del esqueleto. En una realización, el polinucleótido transcripcionalmente activo no es capaz de replicación autónoma, por ejemplo el polinucleótido transcripcionalmente activo no comprende un origen de replicación.

35 Cada polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede estar en forma de un fragmento de DNA transcripcionalmente activo como se describe en el documento de Patente US 6,280,977 y en Liang, X et al, 2002, The Journal of Biological Chemistry, 227 (5), 3593-3598, que describe fragmentos de PCR (TAP) transcripcionalmente activos utilizados para experimentos de expresión.

45 Mientras que el documento de Patente 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 describe ni sugiere que cada polinucleótido lineal transcripcionalmente activo pueda comprender una pluralidad de secuencias de polinucleótidos codificantes en las que cada secuencia de polinucleótidos codificante codifica una subunidad de una proteína de fusión, tal como una cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento del mismo. Además, no se describe ni sugiere que dos polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos distintos se puedan transfectar en una célula para expresar polipéptidos distintos, particularmente polipéptidos distintos que se ensamblen para formar proteínas multiméricas, tales como anticuerpos.

El polinucleótido lineal transcripcionalmente activo comprende uno o más elementos reguladores de la transcripción y una secuencia de polinucleótidos codificante. En una realización el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo comprende una pluralidad de secuencias de polinucleótidos codificantes.

55 El polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede ser cualquier secuencia de ácidos nucleicos adecuada tal como DNA o RNA.

Las secuencias de componentes de los polinucleótidos que incluyen las una o más secuencias de expresión reguladoras y una o más secuencias codificantes de proteínas pueden separarse mediante secuencias de nucleótidos no-codificantes/no-funcionales. En la realización en la que están presentes una pluralidad de secuencias codificantes de proteínas, en las que cada secuencia de codificación codifica una subunidad de una proteína de fusión, se forma preferiblemente un único polipéptido después de la traducción. Cada secuencia codificante de proteínas puede separarse por una o más secuencias no codificantes tales como los intrones, que se pueden eliminar mediante el empalme del mRNA. En una realización las secuencias de polinucleótidos codificantes se separan mediante una secuencia enlazadora, que codifica preferiblemente un enlazador polipeptídico. El enlazador polipeptídico puede ser de cualquier longitud adecuada para permitir que las subunidades de la proteína de fusión se ensamblen en una proteína de fusión funcional. En una realización las secuencias de polinucleótidos codificantes no se separan mediante secuencias no codificantes o secuencias enlazadoras y están unidas de forma contigua.

En una realización el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo comprende una primera secuencia de polinucleótidos codificante (F2), un primer elemento regulador de la transcripción (F1) en el extremo 5' de la primera secuencia de polinucleótidos codificante (F2) y una secuencia de extremo 3' (F3) en el extremo 3' de la secuencia de polinucleótidos codificante (F2). La secuencia de polinucleótidos de extremo 3' (F3) puede comprender un segundo elemento regulador de la transcripción y/o una segunda secuencia de polinucleótidos codificante.

Cualquiera de las una o más secuencias de polinucleótidos codificantes adecuadas se puede emplear en uno o más polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos. La secuencia codificante puede ser la secuencia mínima que codifica una proteína de interés, tal como una subunidad de una proteína de fusión, es decir, que consiste esencialmente en secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido relevante. Cada secuencia de polinucleótidos codificante codifica uno o más genes fragmentos de los mismos.

Cada secuencia de polinucleótidos codificante puede ser idéntica a una secuencia de polinucleótidos endógena que codifica una proteína o una versión mutada de la misma, por ejemplo con una actividad biológica atenuada, o un fragmento de la misma. Alternativamente, cada secuencia codificante empleada en la presente invención codifica una proteína heteróloga, no expresada normalmente por la célula huésped.

En una realización cada secuencia de polinucleótidos codificante es autóloga. Alternativamente, cada secuencia de polinucleótidos codificante puede ser heteróloga.

El polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede comprender cualquier número adecuado de secuencias de polinucleótidos codificantes, que forman preferiblemente una proteína de fusión. Preferiblemente, el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo comprende 2 secuencias de polinucleótidos codificantes, 3 secuencias de polinucleótidos codificantes o 4 secuencias de polinucleótidos codificantes.

En una realización la célula según la presente invención comprende dos polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos en donde cada polinucleótido comprende una pluralidad de secuencias de polinucleótidos codificantes cada una de las cuales codifica una subunidad de una proteína de fusión. Cada polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede comprender una pluralidad de secuencias de polinucleótidos codificantes idénticas y/o una pluralidad de secuencias de polinucleótidos codificantes distintas. Las secuencias de polinucleótidos codificantes pueden codificar una proteína de fusión de interés que puede ser cualquier proteína de fusión adecuada incluyendo proteínas terapéuticas, profilácticas o de diagnóstico.

Las una o más proteínas expresadas pueden contener también una etiqueta o marcaje para ayudar en la purificación/separación.

El polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede comprender una o más secuencias de polinucleótidos codificantes adicionales para la expresión que forman una o más cadenas de polipéptidos separadas después de la traducción. En una realización el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo comprende una pluralidad de polinucleótidos codificantes adicionales, en donde cada secuencia de polinucleótidos codificante codifica una subunidad de una o más proteínas de fusión adicionales. Por ejemplo, un polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede comprender una pluralidad de secuencias de polinucleótidos codificantes que codifican una cadena ligera de un anticuerpo y una pluralidad de secuencias de polinucleótidos codificantes que codifican una cadena pesada de un anticuerpo.

La célula según la presente invención puede comprender también uno o más polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos adicionales distintos, en donde cada polinucleótido lineal transcripcionalmente activo adicional comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína distinta, preferiblemente una pluralidad de secuencias de polinucleótidos codificantes cada una de las cuales codifica una subunidad de una proteína de fusión como se definió anteriormente. Preferiblemente, la célula comprende una pluralidad de polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos, en donde cada polinucleótido comprende una pluralidad distinta de secuencias de polinucleótidos codificantes que codifican distintas proteínas de fusión para la expresión.

En una realización en donde una pluralidad de distintas proteínas está codificada por un polinucleótido lineal transcripcionalmente activo y/o por una pluralidad de distintos polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos,

las distintas proteínas pueden ser proteínas no relacionadas. Estas proteínas pueden no estar unidas conjuntamente y se pueden separar por técnicas rutinarias, después de la expresión.

5 En una realización preferida, la proteína, preferiblemente la proteína de fusión, es un componente de una proteína multimérica. En una realización en la que una pluralidad de proteínas de fusión distintas está codificada por un polinucleótido lineal transcripcionalmente activo y/o por una pluralidad de polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos distintos, preferiblemente cada proteína distinta es un componente de una proteína multimérica en la que cada componente de la proteína multimérica se puede asociar para formar una proteína multimérica, por ejemplo mediante enlaces covalentes y/o no covalentes. Ejemplos de proteínas multiméricas incluyen proteínas que comprenden una cadena alfa y beta tal como hemoglobina, integrina y similares.

10 La proteína multimérica se puede formar a partir de una pluralidad de proteínas de fusión idénticas y/o distintas expresadas por polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos según la presente invención.

15 En esta realización los polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos pueden codificar componentes proteicos de una proteína multimérica que forman un par afín derivado de una única célula. En consecuencia, la expresión de las proteínas a partir de polinucleótidos transcripcionalmente activos en la célula asegura que la actividad original de la proteína multimérica se mantiene.

En esta realización la célula expresa la proteína multimérica preferiblemente en una forma ensamblada. En consecuencia, una ventaja adicional 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 *in vivo*.

20 En la presente invención las una o más proteínas expresadas por una o más de las secuencias de polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos son un anticuerpo o un fragmento del mismo.

Loa anticuerpos en el contexto de la presente invención incluyen anticuerpos completos de cualquier clase adecuada por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG o IgM o subclases tales como IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 y fragmentos funcionalmente activos o derivados de los mismos y pueden ser, pero no están limitados a, anticuerpos monoclonales, humanizados, totalmente humanos o quiméricos.

25 Por lo tanto, los anticuerpos pueden comprender una molécula de anticuerpo completa que tenga cadenas pesadas y ligeras de longitud completa o un fragmento de las mismas, y pueden ser, pero no limitarse a, VH, VL, VHH, Fab, Fab modificado, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, anticuerpos bi, tri o tetravalentes, Bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y fragmentos de unión al epítipo 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 (véase por ejemplo WO92/22853 y WO05/113605).

35 Los dominios constantes de la molécula de anticuerpo, si están presentes, se pueden seleccionar teniendo en cuenta la función propuesta de la molécula de anticuerpo, y en particular, las funciones efectoras que pueden ser necesarias. Por ejemplo, los dominios de región constante pueden ser los dominios de IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humanos. En particular, los dominios de región constante de IgG humana se pueden utilizar, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3 cuando la molécula de anticuerpo está destinada a usos terapéuticos y son necesarias las funciones efectoras del anticuerpo. Alternativamente, los isotipos IgG2 e IgG4 se pueden utilizar cuando la molécula de anticuerpo está destinada para fines terapéuticos y las funciones efectoras del anticuerpo no son necesarias, por ejemplo, para bloquear simplemente la actividad. Se apreciará que también se pueden utilizar variantes de secuencia de estos dominios de región constante.

45 En consecuencia, en una realización de la presente invención cada secuencia de polinucleótidos codificante codifica uno o más dominios de anticuerpo o fragmentos de los mismos. "Dominio de anticuerpo" en el contexto de la presente invención significa un dominio variable o constante o un fragmento del mismo de un anticuerpo. El término "región" se puede utilizar indistintamente con el término "dominio". Ejemplos de dominios de anticuerpos incluyen los dominios variables VH, VL, VHH, IgNAR, y los dominios constantes CL, CH1, CH2 y CH3. La referencia al "dominio de cadena pesada constante" o "uno o más dominios de cadena pesada constante" se puede referir a uno o más dominios de CH1, CH2 y CH3. Cualquier secuencia de polinucleótidos codificante 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 fragmentos del mismo. En consecuencia, cada secuencia de polinucleótidos codificante puede codificar un dominio variable, o un fragmento del mismo, y/o uno o más dominios constantes, o un fragmento de los mismos, de una cadena pesada o ligera de un anticuerpo. Por lo tanto, cada polinucleótido transcripcionalmente activo puede codificar un dominio variable o uno o más dominios constantes o una proteína de fusión de un dominio variable y un dominio constante.

55 En una realización, uno o más de los polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos puede comprender cada uno dos o más secuencias de polinucleótidos codificantes que codifican secuencias polipeptídicas separadas. Por ejemplo, un polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede comprender una secuencia de dominio variable

de cadena pesada y una secuencia de dominio variable de cadena ligera o una secuencia de cadena ligera completa y una secuencia de cadena pesada completa.

5 Las una o más proteínas expresadas pueden ser cadenas individuales que no se ensamblan para formar una proteína de anticuerpo multimérico. Alternativamente, en la realización en la que se expresan una pluralidad de proteínas, las proteínas se pueden ensamblar en una proteína de anticuerpo multimérico que comprende una pluralidad de proteínas idénticas y/o distintas.

Cualquier combinación de uno o más dominios o fragmentos de los mismos se pueden codificar por cada secuencia de polinucleótidos codificantes.

10 En una realización la proteína expresada es una scFv formada a partir de una pluralidad de secuencias de dominio variable. La secuencia de polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos puede comprender dos secuencias de polinucleótidos codificantes en las que cada secuencia de polinucleótidos codificante comprende un dominio variable seleccionado de los dominios variables VH, VL, VHH, IgNAR. Los dominios variables seleccionados en cada secuencia de polinucleótidos codificante pueden ser los mismos o diferentes dominios. Por ejemplo, la proteína de fusión de expresión puede ser VH-VH, VL-VL, VH-VL o VH-VL. Las subunidades de la proteína de fusión se pueden unir mediante una secuencia polipeptídica enlazadora.

15 Uno o más polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos codifican una cadena ligera o un fragmento de la misma.

Uno o más polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos codifican una cadena pesada a partir de un anticuerpo o un fragmento del mismo.

20 En el presente método, uno o más polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos codifican una cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento del mismo y un polinucleótido lineal transcripcionalmente activo codifica una cadena pesada de un anticuerpo o un fragmento del mismo. En consecuencia, dos polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos pueden codificar juntos un anticuerpo o un fragmento del mismo. En una realización alternativa un polinucleótido lineal transcripcionalmente activo codifica tanto la cadena ligera o fragmento de la misma como la cadena pesada o fragmento de la misma.

25 Preferiblemente, la cadena ligera o fragmento de la misma y/o la cadena pesada o fragmento de la misma comprenden un dominio variable o fragmento del mismo y uno o más dominios constantes o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, un polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede comprender una pluralidad de secuencias de polinucleótidos codificantes en donde:

- 30
- una primera secuencia de polinucleótidos codificante codifica un dominio VH y una segunda secuencia de polinucleótidos codificante codifica un dominio CH1; o
 - una primera secuencia de polinucleótidos codificante codifica un dominio VH y un dominio CH1 y una segunda secuencia de polinucleótidos codificante codifica un dominio CH2 y un dominio CH3; o
- 35
- una primera secuencia de polinucleótidos codificante codifica un dominio VH y una segunda secuencia de polinucleótidos codificante codifica un dominio CH1; o
 - una primera secuencia de polinucleótidos codificante codifica un dominio VH, una segunda secuencia de polinucleótidos codificante codifica un dominio CH1, una tercera secuencia de polinucleótidos codificante codifica un dominio CH2 y una cuarta secuencia de polinucleótidos codificante codifica un dominio CH3.

40 En una realización preferida, en la que una pluralidad de proteínas de fusión distintas está codificada por un polinucleótido lineal transcripcionalmente activo y/o por una pluralidad de polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos distintos, el polinucleótido(s) puede codificar una cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento del mismo y una cadena pesada de un anticuerpo o un fragmento del mismo, como se definió anteriormente. Las secuencias de polipéptidos de cadena ligera y cadena pesada codificadas por el polinucleótido(s) transcripcionalmente activo se pueden ensamblar para formar un anticuerpo multimérico o un fragmento del mismo después de la expresión, por ejemplo, un fragmento Fab o Fab'.

45 Cada dominio de anticuerpo puede derivarse de la misma o diferente fuente. En consecuencia, 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 o una cadena pesada, los dominios variables y dominios constantes pueden ser heterólogos. Por ejemplo, los dominios variables, o fragmentos de los mismos, pueden derivarse de un ratón y los dominios constantes pueden ser humanos.

50 En la realización en la que el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo comprende una primera secuencia de polinucleótidos codificante (F2), un primer elemento regulador de la transcripción (F1) en el extremo 5' de la secuencia de polinucleótidos codificante (F2) y una secuencia de extremo 3' (F3) en el extremo 3' de la secuencia de polinucleótidos codificante (F2). La secuencia de polinucleótidos de extremo 3' (F3) puede comprender un segundo

elemento regulador de la transcripción y/o una segunda secuencia de polinucleótidos codificante. En la realización en la que F3 comprende una segunda secuencia de polinucleótidos codificante, la primera secuencia de polinucleótidos codificante (F2) puede codificar un dominio variable o un fragmento del mismo de un anticuerpo y la segunda secuencia de polinucleótidos codificante (F3) puede comprender una secuencia que codifica uno o más dominios constantes o fragmentos de los mismos de un anticuerpo. La segunda secuencia de polinucleótidos codificante (F3) puede comprender también un segundo elemento regulador de la transcripción, tal como una secuencia de poliadenilación.

En las realizaciones en la que cada proteína de fusión se forma a partir de una secuencia de dominio variable de cadena ligera y una secuencia de dominio variable de cadena pesada o una pluralidad de proteínas de fusión distintas comprendiendo cada una, una secuencia de dominio variable de cadena pesada o cadena ligera están codificadas por un polinucleótido lineal transcripcionalmente activo y/o por una pluralidad de polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos distintos, la secuencia de cadena pesada variable y la secuencia de cadena ligera variable pueden formar un par afín de una única célula, manteniendo así la afinidad de unión del anticuerpo endógeno de la célula. En una realización adicional, la secuencia de cadena pesada variable y la secuencia de cadena ligera variable no forman un par afín. En esta realización las secuencias de cadena pesada variable y las secuencias de cadena ligera variable pueden ser secuencias apareadas aleatoriamente derivadas de una población de células genéticamente diversas.

Después de la expresión del anticuerpo o fragmento del mismo se puede procesar adicionalmente, por ejemplo mediante conjugación a otra entidad o por ejemplo PEGilado para generar un producto con las propiedades requeridas.

En un aspecto el anticuerpo o fragmento del mismo producido 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 informadoras o efectoras, etiquetas o marcajes tales como radiomarcadores, etiquetas luminiscentes/fluorescentes, para cualquier fin de diagnóstico o terapéutico adecuado.

El polinucleótido lineal transcripcionalmente activo de la presente invención comprende uno o más elementos reguladores de la transcripción.

Preferiblemente, el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo comprende un primer elemento regulador de la transcripción que comprende una secuencia promotora. Como se emplea en esta memoria, el término "promotor" es una secuencia de DNA que generalmente se extiende antes del sitio de inicio de la transcripción y participa en la unión de la RNA polimerasa. El promotor puede contener varios elementos de secuencia corta (< 10 pares de bases) que unen factores de transcripción, generalmente dispersos en > 200 pares de bases. Un promotor que contiene solo elementos reconocidos por factores generales y anteriores se transcribe normalmente en cualquier tipo de célula. Tales promotores pueden ser responsables de la expresión de genes celulares que expresan de forma constitutiva (algunas veces llamados genes de mantenimiento). Hay también promotores específicos de tejidos limitados a tipos de células particulares, tal como el promotor de metalotioneína humana (MT) está regulado después por iones metálicos pesados y glucocorticoides. Cualquier secuencia promotora adecuada se puede emplear en la presente invención dependiendo del tipo de célula huésped empleada. Ejemplos de promotores adecuados incluyen CMV tales como hCMV, lac (un promotor de células bacterianas), promotores de LTR víricos, promotor SV40, promotor del factor de elongación (EFA1) y promotor inmediatamente temprano IE1 para células huésped de insectos. También puede utilizarse cualquier otro promotor de baculovirus que se exprese independientemente de la expresión del gen de baculovirus tal como, por ejemplo, el promotor gp64. Uno o más promotores empleados pueden ser promotores inducibles.

En la realización en la que la célula comprende una pluralidad de polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos, cada polinucleótido puede comprender los mismos o diferentes promotores. Si cada polinucleótido lineal transcripcionalmente activo comprende promotores diferentes, la fuerza de los promotores puede seleccionarse ventajosamente para regular antes selectivamente o regular posteriormente la expresión de un polinucleótido lineal transcripcionalmente activo en comparación con otro polinucleótido lineal transcripcionalmente activo.

El polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede comprender una secuencia potenciadora después de la secuencia promotora. Por ejemplo, una secuencia potenciadora de una región homóloga 5 (hr5) se puede colocar después de una secuencia promotora de un promotor inmediatamente temprano (IE1) para células huésped de insectos.

El polinucleótido lineal transcripcionalmente activo se puede transcribir por células sin la presencia de una secuencia de terminación. Así, en un aspecto cada polinucleótido lineal transcripcionalmente activo no comprende un terminador.

En una realización adicional cada polinucleótido lineal transcripcionalmente activo comprende un segundo elemento regulador de la transcripción.

El segundo elemento regulador de la transcripción es preferiblemente cualquier secuencia de DNA adecuada que es capaz de formar el extremo del RNA, incluyendo mRNA, o pre-mRNA, transcrito formado a partir de la secuencia de polinucleótidos codificante. La secuencia reguladora puede formar la terminación del transcrito del RNA mediante la terminación de la transcripción y/o iniciación de la escisión del transcrito del RNA.

5 En una realización en la que la secuencia reguladora es un terminador de la transcripción, la secuencia hace típicamente que la RNA polimerasa cese la transcripción formando una estructura tallo-bucle en el RNA. La estructura tallo-bucle hace que la RNA polimerasa se aleje del DNA, terminando, por tanto, la transcripción. Cualquier terminador de transcripción adecuado se puede utilizar dependiendo del tipo de célula huésped empleada. Una secuencia de terminación inmediatamente temprana IE1 se puede utilizar para células huésped de insectos.

10 En la realización en la que la secuencia reguladora inicia la escisión del transcrito del RNA, la secuencia en el transcrito del RNA hace que una proteína se una al transcrito del RNA y lo escinda, formando así la terminación del transcrito del RNA. Una secuencia adecuada es una secuencia de poliadenilación que se transcribe en el RNA donde hace que una enzima se una y catalice la escisión del RNA y también hace que una enzima agregue residuos A en el extremo 3', formando así una cola de poliadenilación. La secuencia de poliadenilación inicia la escisión del transcrito del RNA y puede proteger el mRNA de las exonucleasas estabilizando así la producción de mRNA. Ejemplos de secuencias de poliadenilación incluyen secuencias SV40 poli A, secuencias BgH poliA y secuencias sintéticas de poli A.

15 En una realización la secuencia reguladora termina la transcripción e inicia la escisión del transcrito del RNA. Por ejemplo, se piensa que la secuencia SV40 polyA es capaz de iniciar la escisión de la transcripción del RNA y también terminar la transcripción por la RNA polimerasa.

20 En una realización la secuencia de polinucleótidos transcripcionalmente activos comprende una secuencia terminadora de la transcripción y una secuencia de poliadenilación. En una realización alternativa la secuencia de polinucleótidos transcripcionalmente activos comprende una secuencia de poliadenilación pero no comprende una secuencia terminadora de la transcripción separada.

25 En una realización en la que las células comprenden una pluralidad de polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos, cada polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede comprender la misma o diferente secuencia que es capaz de formar el terminación del transcrito del RNA.

30 El polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede comprender uno o más intrones. En una realización una o más de las secuencias de polinucleótidos comprenden uno o más intrones dentro de cada secuencia de polinucleótidos codificante y/o entre cada secuencia de polinucleótidos codificante.

En una realización cada secuencia de polinucleótidos codificante comprende 1,2 o 3 intrones.

El intrón puede derivarse de cualquier gen, particularmente un gen del cual se deriva la secuencia codificada.

35 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. Si bien no se desea estar limitado por la teoría, se cree que una secuencia Kozak en el mRNA, puede desempeñar un papel en el ensamblaje del ribosoma para la traducción del mRNA.

40 En una realización la secuencia de polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos puede comprender una secuencia de sitio de entrada del ribosoma interno (IRES) que permite el inicio de la traducción en el medio del mRNA. El uso de una o más secuencias de IRES en las secuencias de polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos puede ser particularmente útil en la realización en la que los polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos comprende una o más secuencias de polinucleótidos codificantes, preferiblemente una pluralidad de secuencias de polinucleótidos adicionales codificando cada una, una subunidad de una proteína de fusión. Una secuencia IRES se puede colocar entre las secuencias de polinucleótidos codificantes, tal como entre una secuencia codificante de cadena pesada y una secuencia codificante de cadena ligera, para permitir la traducción separada del mRNA para producir las secuencias de polipéptidos codificadas.

45 Los extremos del polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede comprender colas del ácido peptidonucleico (PNA), reivindicaciones y/o "colas de sujeción" para proteger las terminaciones del polinucleótido de la digestión por exonucleasas después de que los polinucleótidos se hayan transfectedo en una célula. Los PNAs adecuados se describen en el documento de Patente US 6,280,977. Alternativamente, en una realización el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo no comprende o no está unido a un PNA que incluye una cola de PNA, sujeción de PNA, "cola de sujeción" de PNA o molécula de PNA.

50 La presente invención proporciona también una célula que comprende uno o más polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos como se definió anteriormente. Como se discutió previamente, la célula puede comprender una pluralidad de polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos como se definió anteriormente en los que cada polinucleótido codifica una proteína de fusión distinta, tal como una cadena

55

pesada o un fragmento de la misma de un anticuerpo y una cadena ligera o fragmento de la misma de un anticuerpo.

5 Cualquier célula capaz de expresar la proteína codificada por el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo se puede emplear en la presente invención. Células adecuadas para emplear en la invención incluyen células eucariotas, por ejemplo células vegetales, células de insectos tales como *Spodoptera frugiperda* Sf9, *Spodoptera frugiperda* Sf21 y *Trichoplusia ni* Tni, células de levadura, células animales tales como células de mamíferos, en particular células CHO, células de mieloma, células viro, células MRC5, células HEK, células COS de mono verde africano, células PerC6 humanas y similares.

10 En algunos casos, es deseable emplear una célula de mamífero porque puede producir el producto de proteína con la conformación apropiada necesaria para la actividad biológica. La estructura terciaria y la conformación pueden ser de vital importancia porque una estructura terciaria o conformación incorrecta puede dar como resultado la pérdida de alguna o toda la actividad biológica. Se ha encontrado que las células CHO son particularmente útiles para la expresión en mamíferos debido a que las proteínas expresadas en las células CHO tiene glicoformas que son generalmente compatibles y bioactivas en humanos. En consecuencia, en un aspecto la invención emplea una
15 célula de mamífero tal como una célula CHO, por ejemplo una célula CHOS (Invitrogen Cat. No. 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 un derivado de la misma.

La presente invención también proporciona un método para expresar una proteína, que comprende:

20 a) transfectar una célula con uno o más polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos, como se describió anteriormente, y

b) expresar las una o más proteínas, preferiblemente proteínas de fusión, codificadas por los uno o más polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos.

25 En una realización preferida, la etapa a) comprende transfectar la célula con un primer polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo que codifica una cadena pesada o un fragmento de la misma de un anticuerpo y un segundo polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo que codifica una cadena ligera o un fragmento de la misma de un anticuerpo y/o un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo que codifica tanto una cadena pesada o un fragmento de la misma de una anticuerpo como una cadena ligera o fragmento de la misma de un anticuerpo; y la etapa b) comprende expresar el polipéptido de cadena pesada o un
30 fragmento del mismo y el polipéptido de cadena ligera o un fragmento del mismo. En esta realización, el polipéptido de cadena pesada y el polipéptido de cadena ligera se ensamblan preferiblemente para formar un anticuerpo o fragmento del mismo.

El método puede comprender también una etapa de aislamiento del anticuerpo o fragmento del mismo de la célula.

El polinucleótido lineal transcripcionalmente activo se puede incorporar en una célula de diversas formas utilizando medios rutinarios conocidos para transfectar DNA circular.

35 Además de los elementos que ahorran tiempo y la simplificación proporcionada por el polinucleótido, la célula y el método de la presente invención, puede haber otras ventajas proporcionadas por el uso del polinucleótido lineal transcripcionalmente activo debido a que la cantidad de material genético transfectado en la célula es relativamente pequeña. El polinucleótido lineal transcripcionalmente activo puede contener aproximadamente de 3000 a 4000 pares de bases menos que un plásmido que comprende la misma secuencia codificante. Las células empleadas
40 para expresar el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo pueden acomodar fácilmente 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 albergar más copias de los polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos en comparación con el número de copias de plásmidos correspondientes. Por lo tanto, la eficiencia de la expresión por célula puede ser mayor cuando se emplea
45 el presente método en comparación con cuando se emplea un plásmido que comprende la misma secuencia codificante.

50 En el método según la presente invención, la célula se puede transfectar con uno o más polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos adicionales que codifican distintas proteínas. En consecuencia, la célula se puede transfectar con dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más o diez o más polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos.

En una realización el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo se integra en un cromosoma o el genoma de la célula para permitir una expresión estable. En una realización adicional de la invención la célula es transfectada transitoriamente.

55 En una realización en la que se emplea una pluralidad de polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos distintos, los polinucleótidos se pueden introducir en una célula de forma simultánea o secuencial. En una realización los polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos se transfectan secuencialmente. Si un polinucleótido

codifica un polipéptido que se sabe que tarda más tiempo en expresarse en comparación con otro polinucleótido, el proceso de transfección se puede iniciar con solo el polinucleótido de expresión más lenta durante un período tal como 1, 2, 6, 12 o 18 horas, seguido de la adición del segundo polinucleótido después de este período inicial.

5 La célula según la presente invención puede comprender una cantidad diferente de polinucleótido lineal transcripcionalmente activo. Esta realización es ventajosa porque se puede mejorar el rendimiento de la proteína expresada, particularmente para proteínas multiméricas tales como anticuerpos. Los inventores han descubierto que se logró un mejor rendimiento del anticuerpo al transfectar la célula con más polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos que codifican una cadena ligera en comparación con los polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos que codifican una cadena pesada. Alternativamente, la célula comprende una mayor cantidad de polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos que codifican una cadena pesada en comparación con los polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos que codifican una cadena ligera.

15 El polinucleótido lineal transcripcionalmente activo se puede introducir en una célula utilizando técnicas estándar, 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 DEAE-dextrano, transducción empleando un virus. En una realización, se emplea transfección catiónica tal como empleando fosfato de calcio. Los reactivos de transfección de insectos adecuados incluyen el reactivo de transfección de insecto GeneJuice® de Novagen, que es un reactivo de transfección basado en liposomas y Cellfectin® (Invitrogen).

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

25 Cuando se emplea la lipotransfección, el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo para la transfección necesitará generalmente una preformulación para formar un liposoma antes de la introducción en la célula. Por lo tanto, si se utiliza una pluralidad de distintos polinucleótidos, cada polinucleótido puede formularse por separado para formar liposomas y opcionalmente combinarse antes de la transfección o se puede formular una mezcla de los polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos en los liposomas.

30 Cuando se emplea una transfección catiónica, una mezcla de polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos, las células y el agente catiónico se pueden introducir de manera concomitante.

35 El método según la presente invención puede emplear también un sistema de selección para facilitar la selección de células estables que se han transfectado con éxito con el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo. El sistema de selección emplea típicamente la co-transfección de una secuencia de polinucleótidos que codifica un marcador de selección. En una realización, el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo transfectado en la célula comprende además una secuencia de polinucleótidos que codifica uno o más marcadores de selección. En consecuencia, la transfección del polinucleótido lineal transcripcionalmente activo y los uno o más polinucleótidos que codifican el marcador se produce conjuntamente y el sistema de selección puede emplearse para seleccionar aquellas células que producen las proteínas deseadas.

40 Las células que pueden expresar los uno o más marcadores pueden sobrevivir/crecer/multiplicarse bajo ciertas condiciones impuestas artificialmente. Por ejemplo, se puede agregar una toxina o antibiótico adecuado al medio de cultivo de acuerdo con las propiedades otorgadas por el polipéptido/gen o componente polipeptídico del sistema de selección incorporado en el mismo (por ejemplo, resistencia a los antibióticos). Esas células que no pueden expresar los uno o más marcadores no pueden sobrevivir/crecer/multiplicarse en las condiciones impuestas artificialmente. Las condiciones impuestas artificialmente pueden elegirse para ser más o menos vigorosas, según se requiera.

45 Cualquier sistema de selección adecuado se puede emplear en la presente invención. Sistemas de selección adecuados incluyen el uso de geneticina, también conocida como G418, que es una toxina que se puede neutralizar por el producto de un gen resistente a neomicina; el uso de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), que es esencial para la síntesis de *ново* de glicina, purina y timidina, opcionalmente en combinación con un inhibidor de DHFR, a saber, metotrexato; y el uso de 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). El sistema de selección de zeocina se puede emplear también en la presente invención.

50 En una realización, el método según la presente invención comprende además la etapa de cultivar la célula transfectada en un medio para expresar de este modo la proteína de fusión codificada por el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo.

55 La persona experta en la técnica sabría por su conocimiento general común, utilizar métodos adecuados en la técnica para seleccionar clones celulares adecuados que expresan proteínas. Por ejemplo, la persona experta en la técnica puede medir la expresión del mRNA de la proteína de los clones de las células transfectadas y determinar si el nivel de expresión del mRNA de la proteína es mayor en comparación con las células no modificadas. Las

técnicas para medir la expresión de las proteínas incluyen ELISA, análisis por PCR y análisis de Northern Blot. Los clones celulares que muestran la expresión de la proteína deseada se pueden seleccionar después para un crecimiento adicional.

5 Un sistema de expresión inducible se puede utilizar en la presente invención para expresar la proteína de fusión codificada por los polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos. Sistemas de expresión inducibles adecuados son bien conocidos en la técnica.

10 Cualquier medio adecuado se puede utilizar para cultivar la célula transfectada, por ejemplo medio Eagle, suero de ternera fetal, cellgro o un medio patentado de una compañía como Invitrogen. En algunos caso el medio puede estar libre de suero. El medio se puede adaptar para un sistema de selección específico, por ejemplo, el medio puede comprender un antibiótico, para permitir que solo aquellas células que se han transfectado con éxito crezcan en el medio. El método según la presente invención puede comprender también una etapa de selección de aquellas células en el medio que se han transfectado con éxito, tal como seleccionando células que son capaces de crecer en el medio.

15 Las células obtenidas del medio se pueden someter a una selección y/o purificación adicional según se requiera. El método puede comprender además una o más etapas para extraer y purificar la proteína de interés según se requiera.

Una o más etapas del método descritas en la presente memoria se realizan en combinación en un recipiente adecuado tal como un biorreactor.

20 Los sistemas de expresión libres de células pueden derivarse directamente de una célula o puede ser un sistema de expresión libre de células definido no derivado de una célula. Los sistemas de expresión libres de células pueden ser particularmente ventajosos para la expresión de proteínas a partir de polinucleótidos lineales debido a los reducidos efectos adversos en los polinucleótidos lineales provocados por la expresión celular. Un sistema de expresión libre de células tampoco puede necesitar un agente que desenrolle los polinucleótidos lineales como se requiere para los vectores de polinucleótidos circulares. Sistemas de expresión adecuados son conocidos en la técnica, tal como el
25 Qiagen® EasyXpress® Insect Kit II que contiene el extracto celular del insecto *Spodoptera frugiperda*, componentes de reacción de transcripción *in vitro* y tampones de reacción (Szatmari, G., Hua, N.M., Vzdornov, D., Daigle, F., Smoragiewicz, W., Mamet-Bratley, M.D., Karska-Wysocki, B. (2006) In vitro expresión of the restriction endonucleases LlaMI and ScrFI isolated from *Lactococcus lactis* M19 and UC503. J. Biotechnol. 121, 144 y Lamla, T., Hoerer, S., and Bauer, M.M. (2006) Screening for soluble expression constructs using cell-free protein synthesis. Int. J. Biol. Macromol. 39, 111).

30 La presente invención proporciona también un sistema de expresión que comprende el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo, como se definió anteriormente, y un disolvente o medio. El sistema de expresión puede comprender además uno o más polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos distintos adicionales, como se definió anteriormente. El sistema de expresión puede ser adecuado para la
35 expresión dependiente de la célula. En una realización preferida, el sistema de expresión comprende una célula huésped como se definió anteriormente y un disolvente o medio.

Cualquier disolvente o medio adecuado se puede utilizar en el sistema de expresión incluyendo agua o tampón basado en tris para el polinucleótido y un medio de cultivo adecuado tal como el medio CD-CHO FreeStyle™ para la célula huésped.

40 Los polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos empleados en la presente invención se pueden preparar por cualquier método adecuado.

45 Los polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos se pueden preparar empleando PCR, por ejemplo utilizando cebadores de oligonucleótidos adecuados. Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica. Cuando el ácido nucleico que se ha recuperado es RNA, el RNA se puede transcribir de forma inversa para obtener cDNA. Además de la PCR, se pueden utilizar otros procedimientos de amplificación. Otros procedimientos de amplificación incluyen los métodos T7 y Q-replicasa.

50 Los polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos se pueden preparar utilizando la PCR, por ejemplo utilizando cebadores de oligonucleótidos adecuados. Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica. Cuando el ácido nucleico que se ha recuperado es RNA, el RNA se puede transcribir de forma inversa para obtener cDNA. Además de la PCR, se pueden utilizar otros procedimientos de amplificación. Otros procedimientos de amplificación incluyen los métodos T7 y Q-replicasa.

55 En una realización en la que los polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos codifican una cadena ligera y/o una cadena pesada de un anticuerpo, normalmente se empleará la PCR para proporcionar cada polinucleótido que comprende unir el dominio variable de la cadena pesada o cadena ligera identificada, por ejemplo, en una selección previa, a un promotor adecuado en el extremo 5' y opcionalmente una entidad en el extremo 3' que comprende al menos una secuencia de poliadenilación y/o un dominio constante, de modo que se puede formar una secuencia que codifica una cadena pesada o una cadena ligera completa o parcial.

Preferiblemente, los polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos se preparan por el método descrito en el documento de Patente US 6,280,977 y Liang, X et al, 2002, The Journal of Biological Chemistry, 227(5), 3593-3598. Estos documentos describen los fragmentos TAP producidos por amplificación por PCR de una molécula de DNA en presencia de un primer fragmento de DNA que comprende una secuencia promotora; un segundo fragmento de DNA que comprende una secuencia terminadora; un primer cebador complementario al extremo 5' del primer fragmento de DNA; un segundo cebador complementario al extremo 3' del segundo fragmento de DNA; un tercer cebador que comprende una primera región complementaria al extremo 3' del primer fragmento de DNA y una segunda región complementaria al extremo 5' de la molécula de DNA; y un cuarto cebador que comprende una primera región complementaria al extremo 5' del segundo fragmento de DNA y una segunda región complementaria al extremo 3' de la molécula de DNA.

La amplificación por PCR se puede emplear para producir los polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos empleados en la presente invención, en la realización donde cada polinucleótido lineal transcripcionalmente activo comprende una secuencia que comprende una secuencia de polinucleótidos codificante (F2), una secuencia que comprende un primer elemento regulador de la transcripción (F1) en el extremo 5' de la secuencia que comprende la secuencia de polinucleótidos codificante (F2) y una secuencia de extremo 3' (F3) en el extremo 3' de la secuencia que comprende la secuencia de polinucleótidos codificante (F2). En la presente invención la secuencia de polinucleótidos de extremo 3' (F3) puede comprender un segundo elemento regulador de la transcripción y/o una segunda secuencia de polinucleótidos codificante, como se describió previamente.

Es importante que los cebadores se diseñen adecuadamente para garantizar el éxito del método de amplificación por PCR. Típicamente, se emplean dos pares de cebadores en el método. Un par de "cebadores internos" (descritos a continuación como el primer cebador P1 y segundo cebador P2), en donde el primer cebador (P1) comprende una región complementaria al extremo 5' de la secuencia que comprende la secuencia de polinucleótidos codificante (F2) y una cola de extensión de solapamiento complementaria al extremo 3' de la secuencia que comprende el primer elemento regulador de la transcripción (F1) que se unirá al mismo. El segundo cebador interno (P2) comprende una región complementaria al extremo 3' de la secuencia que comprende la secuencia de polinucleótidos codificante (F2) y una cola de extensión de solapamiento complementaria al extremo 5' y la secuencia de polinucleótidos de extremo 3' (F3) que se unirá al mismo. Las colas de extensión de solapamiento en el primer (P1) y segundo cebador (P2) garantizan la unión de la secuencia que comprende el primer elemento regulador de la transcripción (F1), la secuencia que comprende la secuencia de polinucleótidos codificante (F2) y la secuencia de polinucleótidos de extremo 3' (F3). Una pareja de cebadores "externos" (descritos a continuación como el tercer cebador (P3) y el cuarto cebador (P4)), que en relación con la secuencia lineal transcripcionalmente activa general ensamblada se localiza en las extremidades, es decir, el extremo 3' y el extremo 5' absolutos de la secuencia respectivamente.

Como se muestra en la Figura 2a, en la primera etapa de PCR (PCR1) el método comprende la amplificación por PCR de la secuencia que comprende la secuencia de polinucleótidos codificante (F2) en presencia del primer cebador (P1) y el segundo cebador (P2) produciéndose así un producto de PCR intermedio que comprende la secuencia de polinucleótidos codificante (F2), el extremo 3' de la secuencia que comprende el primer elemento regulador de la transcripción (F1) en el extremo 5' de la secuencia que comprende la secuencia de polinucleótidos codificante (F2) y el extremo 5' de la secuencia de polinucleótidos de extremo 3' (F3) en el extremo 3' de la secuencia que comprende la secuencia de polinucleótidos codificante (F2).

Como se muestra en la Figura 2a, en una segunda etapa de PCR (PCR2) el método comprende la amplificación por PCR del producto de PCR intermedio en presencia de la secuencia que comprende el primer elemento regulador de la transcripción (F1), la secuencia de polinucleótidos de extremo 3' (F3), el tercer cebador (P3) y el cuarto cebador (P4) produciendo así un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo que comprende el primer elemento regulador de la transcripción (F1) y la secuencia de polinucleótidos codificante (F2) y la secuencia de polinucleótidos de extremo 3' (F3).

La primera y segunda etapa de PCR se pueden llevar a cabo separada o simultáneamente.

En la realización en la que cada secuencia de polinucleótidos transcripcionalmente activa comprende una pluralidad de secuencias de polinucleótidos codificantes, las secuencias de polinucleótidos codificantes pueden ya estar unidas entre sí y el método de PCR anterior se realiza para fusionar las secuencias de polinucleótidos codificantes con el primer elemento regulador de la transcripción (F1) y la secuencia polipeptídica de extremo 3' (F3). Alternativamente, las secuencias de polinucleótidos codificantes pueden unirse entre sí mediante una PCR de extensión por solapamiento utilizando el método que se describe a continuación.

La presente invención puede proporcionar también un método para producir un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo que comprende una pluralidad de secuencias de polinucleótidos codificantes y uno o más elementos reguladores de la transcripción, en los que cada secuencia de polinucleótidos codificantes codifica una subunidad de una proteína de fusión, en donde el método comprende:

a) proporcionar una primera secuencia de polinucleótidos codificante, una segunda secuencia de polinucleótidos codificante y uno o más elementos reguladores de la transcripción;

b) unir la primera secuencia de polinucleótidos codificante y la segunda secuencia de polinucleótidos codificante, y

c) unir uno o más elementos reguladores de la transcripción a la primera secuencia de polinucleótidos codificante y/o a la segunda secuencia de polinucleótidos codificante.

5 Las etapas b) y c) según el método anterior se pueden llevar a cabo simultánea o secuencialmente en cualquier orden. En una realización la etapa b) y/o la etapa c) se efectúan empleando PCR.

La etapa a) puede comprender proporcionar una o más secuencias de polinucleótidos codificantes adicionales y la etapa b) puede comprender, por tanto, unir las una o más secuencias de polinucleótidos codificantes adicionales a la primera y segunda secuencia de polinucleótidos codificantes.

10 Preferiblemente, la etapa a) comprende la amplificación por PCR de una secuencia que comprende la primera secuencia de polinucleótidos codificante en presencia de:

15 un primer cebador que comprende una región complementaria al extremo 5' de la secuencia que comprende la primera secuencia de polinucleótidos codificante y una cola de extensión de solapamiento complementaria al extremo 3' de una secuencia que comprende un primer elemento regulador de la transcripción; y

un segundo cebador que comprende una región complementaria al extremo 3' de la secuencia que comprende la primera secuencia de polinucleótidos codificante y una cola de extensión de solapamiento complementaria al extremo 5' de una secuencia que comprende la segunda secuencia de polinucleótidos codificante;

20 produciendo, por tanto, un producto de PCR intermedio que comprende la primera secuencia de polinucleótidos codificante, el extremo 3' de la secuencia que comprende el primer elemento regulador de la transcripción en el extremo 5' de la secuencia que comprende la primera secuencia de polinucleótidos codificante y el extremo 5' de la secuencia que comprende la segunda secuencia de polinucleótidos codificante en el extremo 3' de la secuencia que comprende la primera secuencia de polinucleótidos codificante.

25 Preferiblemente la etapa b) y la etapa c) se realizan simultáneamente mediante amplificación por PCR del producto de PCR intermedio en presencia de una secuencia que comprende el primer elemento regulador de la transcripción, una secuencia que comprende la segunda secuencia de polinucleótidos codificante, un tercer cebador complementario al extremo 5' de la secuencia que comprende el primer elemento regulador de la transcripción y un cuarto cebador complementario al extremo 3' de la secuencia que comprende el segundo polinucleótido codificante produciendo, por tanto, un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo que comprende el primer elemento regulador de la transcripción, la primera secuencia de polinucleótidos codificante y la segunda secuencia de polinucleótidos codificante.

30 En una realización preferida la secuencia que comprende la segunda secuencia de polinucleótidos codificante comprende un segundo elemento regulador de la transcripción en el extremo 3' de la segunda secuencia de polinucleótidos codificante, preferiblemente una secuencia de poliadenilación. Se prefiere también que el primer elemento regulador de la transcripción comprenda un promotor en el extremo 5' de la primera secuencia de polinucleótidos codificante.

Los cebadores son los mismos que los discutidos anteriormente.

35 En consecuencia, en la realización donde cada polinucleótido lineal transcripcionalmente activo comprende una secuencia que comprende una primera secuencia de polinucleótidos codificante (F2), una secuencia que comprende un primer elemento regulador de la transcripción (F1) en el extremo 5' de la secuencia que comprende la secuencia de polinucleótidos codificante (F2) y una secuencia que comprende un segundo polinucleótido codificante (F3) en el extremo 3' de la secuencia que comprende la primera secuencia de polinucleótidos codificante (F2), como se muestra en la Figura 2b, la etapa a) comprende preferiblemente una primera etapa de amplificación por PCR (PCR1) de la secuencia que comprende la primera secuencia de polinucleótidos codificante (F2) en presencia del primer cebador (P1) y el segundo cebador (P2) produciendo así un producto de PCR intermedio que comprende la primera secuencia de polinucleótidos codificante (F2), el extremo 3' de la secuencia que comprende el primer elemento regulador de la transcripción (F1) en el extremo 5' de la secuencia que comprende la primera secuencia de polinucleótidos codificante (F2) y el extremo 5' de la secuencia que comprende la segunda secuencia de polinucleótidos codificante (F3) en el extremo 3' de la secuencia que comprende la primera secuencia de polinucleótidos codificante (F2).

40 El uso de la Taq DNA polimerasa puede agregar una base de adenosina extra (A) en el extremo 3' del fragmento de PCR producido. En esta situación, puede haber una falta de coincidencia entre el producto de PCR intermedio producido por la primera etapa de PCR y el primer elemento regulador de la transcripción (F1) y la secuencia de polinucleótidos del extremo 3' (F3). En consecuencia, en una realización de la presente invención, el primer elemento regulador de la transcripción (F1) y la secuencia de polinucleótidos del extremo 3' (F3) se proporcionan

con una base de timidina (T) que precede inmediatamente a la región complementaria de solapamiento con el producto de PCR intermedio. En consecuencia, si las bases de adenosina se añaden a los extremos 3' del producto de PCR intermedio, el producto de PCR intermedio seguirá siendo complementario al extremo del primer elemento regulador de la transcripción (F1) y al extremo de la secuencia de polinucleótidos de extremo 3' (F3).

5 Como se muestra en la Figura 2b, las etapas b) y c) se pueden llevar a cabo simultáneamente en una segunda etapa de amplificación por PCR (PCR2) del producto de PCR intermedio en presencia de la secuencia que comprende el primer elemento regulador de la transcripción (F1), la segunda secuencia de polinucleótidos codificante (F3), el tercer cebador (P3) y el cuarto cebador (P4) produciendo así un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo que comprende el primer elemento regulador de la transcripción (F1) y la
10 secuencia de polinucleótidos codificante (F2) y la segunda secuencia de polinucleótidos codificante (F3).

La primera y segunda etapa de PCR se pueden llevar a cabo separada o simultáneamente.

En una realización, después de que la primera etapa de PCR haya producido una cantidad suficiente del producto de PCR intermedio, se puede añadir un agente a la mezcla de reacción de PCR que detiene la amplificación por PCR de la PCR1 con los cebadores P1 y P2. Un ejemplo de tal agente es ExoSap-IT® (USB), que actúa para
15 degradar los oligonucleótidos monocatenarios, incluyendo los cebadores P1 y P2, garantizando así que la amplificación de PCR1 no continúe en la amplificación de PCR2 con los cebadores P3 y P4. Un medio adicional o alternativo para evitar que la amplificación de PCR1 con los cebadores P1 y P2 continúe durante la amplificación de PCR2 con los cebadores P3 y P4 es limitar la cantidad de cebadores P1 y P2 utilizados en la PCR1 a una cantidad adecuada necesaria para producir una cantidad suficiente del producto de PCR intermedio durante la PCR1. Una
20 cantidad adecuada de los cebadores P1 y P2 para producir una cantidad suficiente de la PCR1 intermedia se puede determinar mediante métodos de titulación conocidos en la técnica.

Uno o más de los fragmentos de polinucleótidos F1, F2 y F3 pueden comprender una o más secuencias de nucleótidos no-codificantes/no-funcionales (es decir, secuencias que no codifican secuencias polipeptídicas o que funcionan como un elemento regulador de la transcripción). En consecuencia, si uno o más de los fragmentos de polinucleótidos F1, F2 y F3 comprenden nucleótidos no-codificantes/no-funcionales en el extremo 5' y/o 3', uno o
25 más de los cebadores P1, P2, P3 y P4 pueden comprender secuencias que son complementarias para la secuencia no-codificante/no-funcional del fragmento o puede comprender secuencias que son parcialmente complementarias para la secuencia no-codificante/no-funcional del fragmento y parcialmente complementarias al elemento regulador de la transcripción o a la secuencia de polinucleótidos codificante contenida en el fragmento. Por ejemplo, F1 puede comprender una secuencia de nucleótidos no-codificante/no-funcional en el extremo 3' de F1 y, por lo tanto, el
30 cebador P1 puede comprender una cola de extensión de solapamiento complementaria a la región no-codificante/no-funcional en el extremo 3' de F1. Un ejemplo adicional es donde el F2 puede comprender una secuencia de nucleótidos no-codificante/no-funcional en el extremo 5' de la primera secuencia de polinucleótidos codificante, tal como una secuencia líder, y, por lo tanto, el cebador P1 puede comprender una región
35 complementaria a la secuencia no-codificante/no-funcional en 5' de F2. Un ejemplo adicional es donde F1 puede comprender una secuencia no-codificante/no-funcional en el extremo 5' y, por lo tanto el cebador P3 puede ser complementario a la secuencia no-codificante/no-funcional en el extremo 5' de F1. Un ejemplo adicional es donde F3 puede comprender una secuencia no-codificante/no-funcional en el extremo 3' y el cebador P4, por tanto, puede ser complementario a la secuencia no-codificante/no-funcional en el extremo 3' de F3.

40 Si los fragmentos de polinucleótidos no comprenden una o más secuencias de nucleótidos no-codificantes/no-funcionales, los cebadores P1, P2, P3 y P4 pueden comprender secuencias que son completamente complementarias para el elemento regulador de la transcripción o la secuencia de polinucleótidos codificante contenida en el fragmento respectivo.

Los uno o más polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos finales producidos se pueden analizar mediante cualquier método adecuado, tal como la electroforesis en gel de agarosa, para confirmar que el producto de PCR
45 generado es de la longitud esperada.

En una realización en donde la primera secuencia de polinucleótidos codificante codifica un dominio variable o fragmento del mismo de un anticuerpo y la segunda secuencia de polinucleótidos codificante codifica uno o más dominios constantes o fragmentos de los mismos de un anticuerpo, el método descrito anteriormente se puede
50 emplear también para producir un polinucleótido lineal transcripcionalmente activo. En la realización en la que un polinucleótido lineal transcripcionalmente activo codifica una cadena ligera y un polinucleótido lineal transcripcionalmente activo codifica una cadena pesada, cada polinucleótido lineal transcripcionalmente activo se puede producir utilizando el método de PCR descrito anteriormente. La primera etapa de PCR para la secuencia que codifica la cadena ligera y la secuencia que codifica la cadena pesada se puede llevar a cabo de manera simultánea
55 (es decir, en una etapa múltiple) o separadamente (es decir, no múltiple). La segunda etapa de PCR para la secuencia que codifica la cadena ligera y la secuencia que codifica la cadena pesada se puede llevar a cabo simultáneamente (es decir, en una etapa múltiple) o de manera separada (es decir, no múltiple).

Cada polinucleótido lineal transcripcionalmente activo comprende preferiblemente la secuencia promotora en 5', una secuencia que codifica la secuencia de cadena ligera del anticuerpo o fragmento de la misma o una secuencia de

cadena pesada o fragmento de la misma, y una secuencia de poliadenilación en 3'. Cada polinucleótido lineal transcripcionalmente activo comprende preferiblemente una secuencia promotora en 5', una primera secuencia codificante que codifica la secuencia de dominio variable de cadena pesada o cadena ligera o un fragmento de la misma (VH o VL), una segunda secuencia codificante que codifica las una o más secuencias de dominio de cadena pesada (CH1, CH2, CH3) o secuencias de dominio constante de cadena ligera (CL) o fragmento de las mismas y una secuencia de poliadenilación en 3'.

La generación de un polinucleótido lineal transcripcionalmente activo de cadena ligera o un polinucleótido lineal transcripcionalmente activo de cadena pesada sigue las mismas etapas de PCR que se describieron anteriormente, en donde:

- el primer elemento regulador de la transcripción (F1) es una secuencia que comprende el promotor en 5';
- la primera secuencia de polinucleótidos codificante (F2) comprende la secuencia de dominio variable del anticuerpo (VH o VL); y
- la segunda secuencia de polinucleótidos codificante (F3) comprende una secuencia de poliadenilación opcionalmente junto con las uno o más secuencias de dominio constante del anticuerpo (CH o CL) colocada antes de la secuencia de poli A.

En la primera etapa de PCR la secuencia de dominio variable del anticuerpo (F2) se amplifica en presencia del primer cebador (P1) y el segundo cebador (P2) para generar el producto de PCR intermedio que comprende la secuencia de dominio variable (F2) que tiene una secuencia de extremo 5' complementaria al extremo 3' de la secuencia promotora (F1) y una secuencia de extremo 3' complementaria al extremo 5' de la secuencia de polinucleótidos de extremo 3' (F3). El diseño de los cebadores P1 y P2 para la primera etapa de PCR se basa en el conocimiento de la secuencia codificante de dominio variable del anticuerpo (F2). Los cebadores P1 y P2 se pueden diseñar para cada secuencia codificante de dominio variable de cadena ligera y cadena pesada (F2) por separado.

En la segunda etapa de PCR el producto de PCR intermedio generado en la primera etapa de PCR se amplifica en presencia de una secuencia promotora en 5' (F1), la secuencia promotora de extremo 3' (F3), el cebador P3 que es un cebador externo complementario al extremo 5' de la secuencia promotora en 5' (F1) y el cebador P4 que es un cebador externo complementario al extremo 3' de la secuencia de polinucleótidos de extremo 3' (F3). La segunda etapa de PCR genera el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo completo que comprende la secuencia promotora en 5' (F1), la secuencia codificante de dominio variable de cadena ligera o cadena pesada (F2) y la secuencia de poliadenilación opcionalmente junto con la secuencia de dominio constante del anticuerpo (F3).

En una realización de la presente invención, cuando la secuencia F3 comprende una secuencia de dominio constante, una serie de diferentes anticuerpos se pueden producir fácilmente al variar la secuencia de dominio constante de F3. En consecuencia, diferentes anticuerpos pueden producirse rápida y fácilmente utilizando el método descrito anteriormente. Los dominios constantes se pueden derivar de diferentes isotipos y/o especies, tales como el conejo o ratón. La secuencia F3 se puede variar también fácilmente para proporcionar diferentes fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, la secuencia F3 puede comprender el dominio constante CH1 para proporcionar un anticuerpo Fab o el F3 puede comprender CH1-CH2-CH3 para proporcionar un anticuerpo de longitud completa. Por lo tanto, los polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos empleados en la presente invención permiten que una diversa gama de anticuerpos se produzca y expresen fácilmente con fines de selección.

El método puede repetirse para producir un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo de cadena ligera y un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo de cadena pesada. El método puede comprender también una etapa adicional para unir el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo que codifica la cadena pesada y el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo que codifica la cadena ligera.

En una realización la presente invención proporciona una o más secuencias de cebadores seleccionados de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:9. Estas secuencias de cebadores se pueden utilizar para generar uno o más polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos mediante el método descrito anteriormente. Las secuencias de cebadores se describen en detalle anteriormente y en los ejemplos.

Los uno o más elementos reguladores de la transcripción y las secuencias de polinucleótidos codificantes empleadas para producir el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo se pueden generar por cualquier medio adecuado. Los elementos reguladores de la transcripción, tales como las secuencias promotoras y de poliadenilación, se pueden generar mediante digestión de la restricción de un constructo de DNA del plásmido preparado previamente.

Las secuencias de polinucleótidos codificantes se pueden generar mediante cualquier método adecuado incluyendo la amplificación por PCR.

En una realización el método según la presente invención se lleva a cabo después de la identificación de un anticuerpo de interés (o un fragmento del mismo), tal como mediante la tecnología de visualización de fagos.

En una realización en la que una o más de las secuencias de polinucleótidos codificantes comprenden dominios variables de un anticuerpo, las secuencias se pueden generar mediante amplificación por PCR de secuencias de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos generadas mediante SLAM (método de anticuerpos de linfocitos seleccionados) como se establece en el documento de Patente WO92/02551. En consecuencia, en una realización, el método según la presente invención se emplea como una etapa adicional en el proceso SLAM que permite que un solo linfocito que produce un anticuerpo con una especificidad deseada se identifique dentro de una gran población de células linfoides y la información genética que codifica la especificidad del anticuerpo (los dominios o regiones variables) que se va a identificar a partir de ese linfocito (Babcook et al, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci, 93, 7843-7848).

En el proceso de SLAM, una población de células formadoras de anticuerpos se cultiva en un medio que tiene un sistema indicador incorporado que es capaz de indicar la presencia y ubicación de una célula que forma anticuerpos que muestran la función deseada. Esto permite identificar una célula a partir del medio que forma los anticuerpos deseados y se puede determinar la secuencia de aminoácidos del dominio variable que confiere la función deseada del anticuerpo. En el proceso SLAM, la información de la secuencia de dominio variable se utiliza después para sintetizar una proteína con una función deseada, generalmente incorporando la secuencia de DNA que corresponde a la secuencia de aminoácidos del dominio variable en un vector capaz de dirigir la expresión y secreción de una proteína con la función deseada. Esta última etapa de clonación es un proceso de bajo rendimiento en comparación con las etapas anteriores del proceso de SLAM que son de alto rendimiento y capaces de automatización. Sin embargo, la célula y el método según la presente invención permiten un medio más rápido y simplificado para producir anticuerpos o fragmentos de los mismos que incorporan la secuencia de dominio variable identificada por el proceso de SLAM. En consecuencia, la presente invención permite que la etapa final del proceso de SLAM tenga un alto rendimiento, permitiendo así que se produzcan más anticuerpos incorporando más rápidamente varias secuencias de dominio variable identificadas que confieren la actividad deseada a los anticuerpos.

En consecuencia, la presente invención proporciona también un método para obtener un anticuerpo recombinante con una función deseada, que comprende:

- (a) proporcionar una población de células que forman anticuerpos que se sospecha que contienen al menos una célula capaz de producir un anticuerpo que muestre la función deseada;
- (b) generar uno o más polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos a partir de las células formadoras de anticuerpos obtenidas en la etapa (a) en las que cada polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio variable de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos obtenida en la etapa (a) y uno o más elementos reguladores de la transcripción;
- (c) expresar un anticuerpo recombinante utilizando uno o más polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos generados 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 muestra la función deseada.

El uso de uno o más polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos para expresar un anticuerpo recombinante que comprende un dominio variable de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos en el método proporciona muchas mejoras significativas a un método para producir un anticuerpo recombinante. El uso de uno o más polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos proporciona un medio mucho más rápido para clonar genes de dominio variable y expresar anticuerpos recombinantes en comparación con las etapas de digestión y unión múltiples necesarias para producir vectores y permite una forma más rápida y fácil de obtener la proteína recombinante.

La población de células formadoras de anticuerpos proporcionada en la etapa (a) puede ser de cualquier fuente adecuada. Típicamente, la población de células formadoras de anticuerpos se obtiene a partir de un animal que se ha inmunizado con un antígeno seleccionado u obtenido de un animal que generó dichas células durante el curso de una enfermedad seleccionada. Las células formadoras de anticuerpos son típicamente linfocitos B o su progenie, incluyendo las células plasmáticas. Las células pueden secretar anticuerpos o mantener los anticuerpos en la superficie de la célula sin secreción en el entorno celular. Las células formadoras de anticuerpos pueden obtenerse de la sangre o directamente de la médula ósea y/u otro tejido linfoide. Detalles adicionales con respecto al tipo y origen de las células formadoras de anticuerpos se pueden encontrar en el documento de Patente WO 92/02551.

La etapa (b) requiere la generación de uno o más polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos comprendiendo cada uno una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio variable de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos. El polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo y los métodos para generar un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo se han descrito en detalle anteriormente.

El dominio variable de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos se puede incorporar en un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica. En una realización se puede determinar la secuencia del dominio variable o uno o más fragmentos de la misma que confiere la especificidad de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos. El uso de uno o más polinucleótidos lineales para expresar el anticuerpo recombinante permite determinar la secuencia de dominio variable durante la generación de uno o más polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos en la etapa (b) después de cualquier etapa de PCR. Sin embargo, la secuencia de dominio variable o uno o más fragmentos de la misma que confiere la especificidad del anticuerpo no necesita determinarse para generar uno o más polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos. En consecuencia, en una realización el método no comprende una etapa de secuenciación del dominio variable del anticuerpo producido por la célula formadora de anticuerpos antes y/o durante la etapa (b). Los cebadores diseñados especialmente que son complementarios a cada extremo del dominio variable o uno o más fragmentos del mismo del anticuerpo, se pueden utilizar para clonar el dominio variable o uno o más fragmentos del mismo por PCR. Los cebadores pueden ser complementarios a las regiones marco a cada lado de una o más CDRs del anticuerpo. En el documento de Patente WO 92/02551 se pueden encontrar detalles adicionales sobre cómo se puede determinar el dominio variable o una porción del mismo de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos.

En la etapa (b) el dominio variable de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos que se incluye en el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo puede ser el dominio variable completo del anticuerpo o uno o más fragmentos del mismo que confieren la especificidad del anticuerpo incluyendo una, dos o tres regiones CDR de un dominio variable. Cada polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo codifica un dominio variable o un fragmento del mismo de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos. El dominio variable o fragmento del mismo es la cantidad mínima de secuencia derivada de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos que contiene cada polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo. Sin embargo, cada polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo puede comprender uno o más dominios de anticuerpos adicionales, éter derivado de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos o de una fuente diferente. Como se describió anteriormente, cada polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo puede comprender una secuencia que codifica una proteína de fusión de un dominio variable y uno o más dominios constantes.

El anticuerpo producido por la célula formadora de anticuerpos puede ser un anticuerpo de dominio único tal como un VHH. En una realización el anticuerpo producido por la célula formadora de anticuerpos comprende una cadena pesada y una cadena ligera.

El dominio variable de cadena ligera o uno o más fragmentos del mismo y el dominio variable de cadena pesada o uno o más fragmentos del mismo del anticuerpo producido por la célula formadora de anticuerpos se incorporan preferiblemente en los uno o más polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos en la etapa (b). En esta realización, la etapa (b) puede comprender generar dos polinucleótidos recombinantes transcripcionalmente activos distintos para cada anticuerpo recombinante: un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo que codifica una cadena ligera o un fragmento de la misma y un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo que codifica una cadena pesada o un fragmento de la misma para cada anticuerpo recombinante. Alternativamente, o adicionalmente la etapa (b) puede comprender generar un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo que codifica tanto una cadena ligera o un fragmento de la misma como una cadena pesada o un fragmento de la misma para cada anticuerpo recombinante. Como se describió anteriormente, la cadena ligera o un fragmento de la misma está codificada preferiblemente por una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio variable y una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio constante y la cadena pesada o un fragmento de la misma está codificada preferiblemente por una secuencia de polinucleótidos que codifica el dominio variable y una o más secuencias de polinucleótidos que codifican dominios constantes.

En una realización el anticuerpo recombinante codificado por los uno o más polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos comprende dominios variables o una o más de sus CDRs derivadas de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos y además comprende regiones marco de dominio variable y/o uno o más dominios constantes derivados de una fuente diferente, tal como una secuencia de anticuerpos humanos conocida para proporcionar un anticuerpo recombinante quimérico o humanizado. El uso del polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo permite que uno o más dominios variables derivados de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos se incorporen en cualquier formato de anticuerpo recombinante adecuado, como un Fab o un anticuerpo de longitud completa con regiones constantes que varían, fácil y eficientemente.

En esta realización en la que el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, el anticuerpo recombinante expresado en la etapa (c) retiene preferiblemente el emparejamiento 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 llevan juntas en la etapa (b), los anticuerpos recombinantes expresados en la etapa (c) pueden o no retener el par de cadenas ligeras y pesadas originales de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos.

La etapa (c) comprende expresar un anticuerpo recombinante utilizando uno o más polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos generados por la etapa (b). Se pueden producir concentraciones mucho más altas de un anticuerpo recombinante a partir de la etapa (c) del método de la presente invención en comparación con la cantidad de anticuerpo que se produce en una población de células formadoras de anticuerpos, tal como los linfocitos B obtenidos de un animal. En una realización, la etapa (c) comprende transfectar el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo en una célula huésped; y hacer crecer dichas células huésped en un medio apropiado como se describió anteriormente. Alternativamente, o adicionalmente, la etapa (c) comprende expresar el anticuerpo del polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo en un sistema de expresión libre de células como se describió anteriormente. El uso de un sistema de expresión libre de células proporciona un medio adicional para reducir el número de etapas necesarias para producir la proteína recombinante debido a que las etapas tales como la transfección celular no son necesarias para la expresión libre de células. En consecuencia, la proteína se puede producir más rápida y eficientemente.

La etapa (d) comprende seleccionar el anticuerpo recombinante producido por la etapa (c) para la función deseada. La selección se puede llevar a cabo mediante un método adecuado conocido en la técnica para ensayar la función de un anticuerpo. Las funciones del anticuerpo que pueden ensayarse incluyen la capacidad de unirse a un antígeno seleccionado y/o la afinidad del anticuerpo por un antígeno seleccionado y/o la capacidad para funcionar en un ensayo particular, por ejemplo, neutraliza, agoniza o antagoniza una actividad biológica dada. Se apreciará que se puede realizar más de una selección y se puede ensayar más de una función, por ejemplo, la unión y la actividad funcional.

La etapa (d) comprende preferiblemente la selección para detectar la unión del anticuerpo recombinante a un antígeno seleccionado. El antígeno seleccionado puede ser un antígeno purificado o un antígeno expresado en la superficie celular. El antígeno seleccionado puede o no ser conocido. En consecuencia, la etapa de selección en (d) puede incluir detectar una función del anticuerpo que no requiere conocimiento del antígeno tal como el efecto del anticuerpo recombinante en 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 detección adecuados se describen en detalle como sistemas indicadores en el documento de Patente WO92/02551.

En una realización el método comprende una primera etapa de selección previa a la etapa (b) en la que la población de las 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 produciendo un anticuerpo que muestra la función deseada. Como se describió anteriormente para la etapa (d), la primera etapa de selección puede incluir detectar la unión a un antígeno seleccionado y/o la afinidad del anticuerpo a un antígeno seleccionado. La identidad del antígeno puede o no ser conocida en la primera etapa de selección. En consecuencia, la primera etapa de selección puede no necesitar el conocimiento del antígeno seleccionado. La primera etapa de selección puede incluir la detección de una función del anticuerpo que no necesita el conocimiento del antígeno, tal como el efecto del anticuerpo en la modificación de un sustrato o el efecto sobre el crecimiento, 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) los uno o más polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos se generan a partir de la célula o población de células identificadas. La primera etapa de selección puede identificar una célula formadora de anticuerpos individual o una población de células formadoras de anticuerpos que producen un anticuerpo que muestra la función deseada. Se apreciará que la célula o células formadoras de anticuerpos que producen un anticuerpo que muestra 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 para todas las células en una población identificada por la primera etapa de selección producir un anticuerpo que muestre la función deseada.

En esta realización el método comprende preferiblemente además una etapa de aislamiento previa a la etapa (b) de aislamiento de una sola célula formadora de anticuerpos que produce un anticuerpo que muestra la función deseada identificada por la primera etapa de selección y en la etapa (b) se generan uno o más polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos a partir de una sola célula formadora de anticuerpos aislada. La única célula formadora de anticuerpos se puede aislar a partir de una población de células formadoras de anticuerpos identificada en la primera etapa de selección. La inclusión de una etapa de aislamiento es particularmente ventajosa cuando el anticuerpo producido por la célula formadora de anticuerpos comprende una cadena pesada y una cadena ligera debido a que permite que se exprese un único anticuerpo recombinante que retiene el par de dominios variables de cadena pesada y cadena ligera originales del anticuerpo producido por la célula formadora de anticuerpos.

La etapa de aislamiento se puede llevar a cabo por cualquier medio adecuado. En una realización la primera etapa de selección y la etapa de aislamiento se puede realizar simultáneamente. En una realización adicional, la primera etapa de selección se lleva a cabo 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 posteriormente. 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. Alternativamente, 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 se puede aislar de una población de células formadoras de anticuerpos identificada a partir de la primera etapa de selección.

Un ejemplo de un método adecuado para llevar a cabo la etapa de aislamiento, que permite preferiblemente la selección y aislamiento simultáneo, se describe en el documento de Patente WO 92/02551. El método descrito en el documento de Patente WO 92/02551 comprende

i) suspender la población de células formadoras de anticuerpos obtenida en la etapa (a) en un medio, el medio que tiene incorporado un sistema indicador, dicho sistema indicador puede indicar la presencia y ubicación de una célula que forma anticuerpos que muestran la función deseada;

ii) identificar una sola célula que forma un anticuerpo que muestra la función deseada; y

iii) aislar la única célula formadora de anticuerpos identificada del medio.

Como se describe en el documento de Patente WO 92/02551 el sistema indicador manifiesta una actividad específica deseada en respuesta al anticuerpo en la superficie de o liberado en las proximidades de una célula formadora de anticuerpos, lo que permite así la identificación y aislamiento de la célula que produce el anticuerpo con la función deseada. Como se describió anteriormente, la indicación de anticuerpos que muestran la función deseada en la etapa i) puede comprender detectar la unión a un antígeno seleccionado y/o la afinidad del anticuerpo a un antígeno seleccionado. La identidad del antígeno puede o no ser conocida en la etapa i). La etapa i) puede incluir detectar una función del anticuerpo que no necesita conocimiento del antígeno.

Como se describió en el documento de Patente WO 92/02551 el sistema indicador en la etapa i) puede comprender:

- una capa de células cuyo crecimiento, viabilidad, o función se ve afectado por los anticuerpos que muestran una función deseada producida por la célula formadora de anticuerpos aislada;

- uno o más microorganismos patógenos, y una capa de células susceptible a la infección por dichos microorganismos, en donde dichos anticuerpos que muestran una función deseada se identifican como aquellos que afectan la patogenicidad del microorganismo;

- 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 grupos sanguíneos y células tumorales y células normales del mismo linaje, en donde dichos anticuerpos que muestran una función deseada se identifican como aquellos que se aglutinan o lisan una célula de la pareja;

- los eritrocitos u otras partículas recubiertas con antígeno, y dicho anticuerpo que muestran la función deseada se identifican como los que se unen al antígeno, provocando así que las partículas se aglutinen;

- los eritrocitos u otras partículas recubiertas con antígeno, y dicho anticuerpo que muestran la función deseada se identifican como los que se unen al antígeno, lisando las células o partículas en presencia de un complemento;

- un factor de complejación y dicha célula formadora de anticuerpos se identifican como los que se unen al factor de complejación, formando una roseta; o

- un sustrato, y dicho anticuerpo que muestra una función deseada se identifican como lo que modifica el sustrato de una manera detectable.

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

Un ejemplo adicional de un método adecuado para llevar a cabo la etapa de aislamiento, que permite preferiblemente la selección y aislamiento simultáneo, se describe en el documento de Patente WO 2004/106377. El método descrito en 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 sin capturar;

iii) cultivar una pluralidad de células formadoras de anticuerpos capturadas en las que las células formadoras de anticuerpos no se han clasificado en células formadoras de anticuerpos únicas inmediatamente antes del cultivo;

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

5 v) aislar la única célula formadora de anticuerpos identificada.

Como se describió en el documento de Patente WO 2004/106377, la etapa de separación es preferiblemente panorámica y las células capturadas se cultivan directamente después de la formación. El agente de captura es preferiblemente un antígeno.

10 La etapa de aislamiento de una única célula formadora de anticuerpos puede realizarse también mediante citometría de flujo de clasificación de células individuales. La citometría de flujo de clasificación de células individuales se puede utilizar para aislar una única célula formadora de anticuerpos utilizando cualquier parámetro medible adecuado. Por ejemplo, la citometría de flujo se puede utilizar para aislar una única célula formadora de anticuerpos que tiene un marcador de células formadoras de anticuerpos, como un marcador de células B. La citometría de flujo se puede utilizar para aislar una única célula formadora de anticuerpos capaz de unirse a un antígeno seleccionado.

15 Los métodos adecuados de clasificación celular que se pueden utilizar en el método de la presente invención, específicamente en la etapa de aislamiento, se describen en los documentos de Patente WO05/019824 y WO05/019823.

Un ejemplo adicional de medios para aislar una única célula formadora de anticuerpos es mediante microscopía y manipulación automatizadas, como la microscopía de captura láser.

20 En una realización, antes de la etapa (b), el método comprende una etapa de aislamiento para aislar directamente un única célula formadora de anticuerpos de la población de células formadoras de anticuerpos obtenida en la etapa (a) sin seleccionar primero 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) los uno o más polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos se generan a partir de la única célula aislada formadora de anticuerpos.

25

En esta realización el método no comprende una etapa de selección separada previa a la etapa de aislamiento, que se mencionó anteriormente como la primera etapa de selección. Sin embargo, la etapa de aislamiento puede comprender, por sí misma, una etapa de selección simultánea para identificar una célula formadora de anticuerpos que producen un anticuerpo que muestra la función deseada, a la que se hace referencia anteriormente como la segunda etapa de selección. Alternativamente, la etapa de aislamiento comprende aislar una única célula formadora de anticuerpos sin una etapa de selección separada previa 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, incluyendo el método descrito en el documento de Patente WO 92/02551, el método descrito en el documento de Patente WO 30 2004/051268 y en el documento de Patente WO 2005/121789, el método descrito en el documento de Patente WO 2004/106377, citometría de flujo de clasificación de células individuales o microscopía y manipulación automatizada.

35

En esta realización el método no comprende una primera etapa de selección previa a la generación de los uno o más polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos. En consecuencia, la velocidad y la eficacia del método se incrementan aún más al eliminar las etapas de detección temprana. El uso de uno o más polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos permite eliminar la(s) etapa(s) de selección temprana de las células formadoras de anticuerpos porque permite una expresión del alto rendimiento del anticuerpo recombinante. La selección se realiza después de la generación del anticuerpo recombinante en la etapa (d). Una serie de ventajas resultan 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 en comparación con la selección de la población de células formadoras de anticuerpos para la función deseada. Una ventaja es que hay menos interferencias de factores desconocidos en los medios de expresión de anticuerpos recombinantes producidos en la etapa (c) en comparación con los medios que comprenden la población de células formadoras de anticuerpos. Además, llevar a cabo la selección en la población de células productoras de anticuerpos obtenidas en la etapa (a) puede dar como resultado que los anticuerpos que tienen la función deseada se ignoren incorrectamente. Sin embargo, el método de la presente invención permite un mayor número y variedad de anticuerpos recombinantes producidos en la etapa (c) para seleccionar para la función deseada, ya que todos se expresan a niveles altos.

40

45

50

Vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados que incluyen disolventes, solubilizantes, rellenos, estabilizantes y similares son bien conocidos en la técnica. La composición farmacéutica se puede formular para cualquier vía de administración prevista, incluyendo pero no limitado a administración parenteral, intravenosa, oral, por inhalación, tópica y sistemática. En una realización, el polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo como se definió anteriormente y/o una célula como se definió anteriormente son adecuados para el suministro de genes para ser introducido en un paciente. El polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo se puede

55

encapsular en un liposoma para el suministro de genes. Varios otros métodos para introducir genes en un paciente son bien conocidos en la técnica.

5 La secuencia de polinucleótidos codificante en los polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos puede codificar una proteína de fusión terapéutica o profiláctica adecuada para el tratamiento de un animal humano o no-humano que lo necesite. En consecuencia, la proteína producida por el método según la presente invención, tal como un anticuerpo, se puede utilizar para el tratamiento de una enfermedad tal como el HIV; malaria; alergia; HCV; enfermedades autoinmunes como el síndrome del intestino irritable, la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple; cáncer en particular cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, leucemia, mieloma y similares.

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

Ejemplos

Ejemplo 1 – La primera etapa de PCR (PCR1) en la generación de polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos.

15 Cebadores para PCR1

Los cebadores se diseñaron adecuados para una primera amplificación (PCR1) de una secuencia codificante de cadena pesada variable (F2 VH) y una secuencia codificante de cadena ligera variable (F2 VL) de un anticuerpo de ratón de citoquina soluble antihumana de secuencia conocida. Las secuencias VH y VL se derivaron utilizando SLAM (método de anticuerpos de linfocitos seleccionados).

20 Los cebadores fueron proporcionados por Sigma Aldrich y Eurogentec.

Para PCR1 de F2 VH se proporcionaron los siguientes cebadores:

P1:

25 Un primer cebador (P1), como se muestra en SEQ ID NO: 3, que comprende una región complementaria al extremo 5' de una secuencia que contiene un dominio de cadena pesada variable (F2), específicamente a una secuencia líder en el extremo 5' de la secuencia de dominio de cadena pesada variable, y una cola de extensión de solapamiento complementaria al extremo 3' no codificante de una secuencia promotora (F1). SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos del extremo 5' de la secuencia líder de la secuencia de dominio de cadena pesada variable (F2) codificada por SEQ ID NO: 3 del primer cebador (P1).

P2:

30 Un segundo cebador (P2), como se muestra en SEQ ID NO:1, que comprende una región complementaria al extremo 3' de una secuencia de dominio de cadena pesada variable (F2) y una cola de extensión de solapamiento complementaria al extremo 5' de una secuencia de dominio de cadena pesada constante y una secuencia poli A (F3). SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 1 del segundo cebador (P2), en el que QGTLVTVSS es el extremo 3' del dominio de cadena pesada variable (F2) y ASTKGP es el extremo 5' de la secuencia de dominio de cadena pesada y poli A (F3). Para PCR1 de F2 VL se proporcionaron los siguientes cebadores:

P1:

40 Un primer cebador (P1), como se muestra en SEQ ID NO: 7, que comprende una región complementaria al extremo 5' de una secuencia que contiene el dominio de cadena ligera variable (F2), específicamente a una secuencia líder en el extremo 5' de la secuencia de dominio de cadena ligera variable, y una cola de extensión de solapamiento complementaria al extremo 3' no-codificante de una secuencia promotora (F1). SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos del extremo 5' de la secuencia líder de la secuencia de dominio de cadena ligera variable (F2) codificada por SEQ ID NO: 7 del primer cebador (P1).

P2:

45 Un segundo cebador (P2), como se muestra en SEQ ID NO: 5, que comprende una región complementaria al extremo 3' de una secuencia de dominio de cadena ligera variable y una cola de extensión de solapamiento complementaria al extremo 5' de una secuencia de dominio de cadena ligera constante y una secuencia poli A (F3). SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 5 del segundo cebador, en el que GTKVEIKR es el extremo 3' del dominio de cadena ligera variable y TVAAPSVF es el extremo 5' de la secuencia de dominio de cadena ligera constante y poliA (F3).

50 Amplificación por PCR de la secuencia de cadena ligera variable (F2 VL)

ES 2 700 442 T3

La secuencia codificante F2 VL se amplificó por PCR en presencia del cebador P1 (SEQ ID NO: 7) y el cebador P2 (SEQ ID NO: 5), como se estableció anteriormente.

La secuencia codificante VL se generó mediante digestión de restricción a partir de un vector de expresión.

Las condiciones de reacción utilizadas se proporcionan a continuación:

5	10 x tampón KOD	2,5 µl
	Polimerasa KOD	0,5 µl
	dNTPs	2,5 µl
	Cebador (P1) (SEQ ID NO: 7)	2,0 µl (1,25 pmol/µl)
	Cebador (P2) (SEQ ID NO: 5)	2,0 µl (1,25 pmol/µl)
10	MgSO ₄	1,0 µl
	Agua	13,5 µl
	Plantilla de DNA (F2 VL)	1,0 µl *

El programa de PCR KOD#R para PCR1 se llevó a cabo de la siguiente manera:

	Etapa 1. 95°C	2 minutos
15	Etapa 2. 95°C	20 segundos
	Etapa 3. 55°C	10 segundos
	Etapa 4. 72°C	5 segundos e ir a la etapa 2 (las etapas 2 a 4 se repiten 24 veces más)
	Etapa 5. 4°C	Captura

20 La PCR1 generó un producto de PCR intermedio que comprende la secuencia F2 VL (aproximadamente 420 pares de bases) que tiene una secuencia de extremo 5' complementaria al extremo 3' de la secuencia promotora (F1) y una secuencia de extremo 3' complementaria al extremo 5' de la secuencia de dominio constante y de poliadenilación (F3). Una electroforesis en gel de agarosa se llevó a cabo para confirmar la producción del producto de PCR intermedio, como se muestra en la Figura 3a el VL de PCR1 es el producto de PCR intermedio para VL. En la Figura 3a, M1 es una escalera de DNA estándar de Biorline llamada Hyperladder 1, B es un control negativo en blanco y 659 es el producto de PCR intermedio VL.

25

Amplificación por PCR1 de la secuencia de cadena pesada variable (F2 VH)

En cuanto a la PCR1 de F2 VL, la secuencia que codifica F2 VH se amplificó por PCR en presencia del cebador P1 (SEQ ID NO: 3) y el cebador P2 (SEQ ID NO: 1), como se estableció anteriormente.

Las condiciones de reacción utilizadas se proporcionan a continuación:

30	10 x tampón KOD	2,5 µl
	Polimerasa KOD	0,5 µl
	dNTPs	2,5 µl
	Cebador (P1) (SEQ ID NO: 3)	2,0 µl (1,25 pmol/µl)
	Cebador (P2) (SEQ ID NO: 1)	2,0 µl (1,25 pmol/µl)
35	MgSO ₄	1,0 µl
	Agua	13,5 µl
	Plantilla de DNA (F2 VH)	1,0 µl *

La secuencia VH se generó mediante digestión de restricción a partir de un vector de expresión.

40 Los mismos ciclos de programa de PCR que se establecieron anteriormente para la PCR1 de F2 VL se utilizaron también para la PCR1 de F2 VH.

ES 2 700 442 T3

5 La PCR1 generó un producto de PCR intermedio que comprende la secuencia F2 VH (aproximadamente 400 pares de bases) que tienen una secuencia de extremo 5' complementaria al extremo 3' de la secuencia promotora (F1) y una secuencia de extremo 3' complementaria al extremo 5' de la secuencia de dominio constante y de poliadenilación (F3). Una electroforesis en gel de agarosa se llevó a cabo para confirmar la producción del producto de PCR intermedio, como se muestra en la Figura 4a, la VH de la PCR1 es el producto de PCR intermedio para VH. En la Figura 4a, M2 es una escalera de DNA estándar de Novagen llamada Perfect™ 0,1-12 kb, B es un control negativo en blanco y 659 es el producto de PCR intermedio VH.

Ejemplo 2 – La segunda etapa de PCR (PCR2) en la generación de polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos.

10 Cebadores para PCR2

Los cebadores se diseñaron adecuados para una segunda amplificación por PCR (PCR2) del producto de PCR intermedio F2 VL y el producto de PCR intermedio F2 VH a partir de PCR1.

Para la PCR2 de los productos de PCR intermedios de F2 VH y F2 VL se proporcionaron los siguientes cebadores:

P3:

15 Un tercer cebador (P3), como se muestra en SEQ ID NO: 10, es complementario a una región no codificante en el extremo 5' de una secuencia promotora (F1).

Un cuarto cebador (P4), como se muestra en SEQ ID NO: 9, es complementario a una región no codificante en el extremo 3' de la secuencia de poliadenilación de F3.

Generación de la secuencia de dominio de cadena ligera constante y Poli A (F3)

20 Una secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia que codifica una cadena ligera (Kappa) murina constante y una secuencia poli A (F3) se generó por digestión de restricción a partir de un vector de expresión.

Las condiciones de reacción utilizadas fueron las siguientes:

Plantilla de DNA	10 µl (1 ug/ul)
Tampón H(x10 Roche)	5,0 µl
25 BsiWI	2 µl (10 U/µl de New England Biolabs)
NotI	2 µl (10 U/µl de New England Biolabs)
Agua	31 µl

La reacción se incubó a 37°C durante la noche (~ 16 horas) para liberar un fragmento de 598 pares de bases que comprende una secuencia que codifica una cadena ligera murina constante y una secuencia poli A (F3).

30 El fragmento se extrajo en gel y se comprobó por electroforesis en gel de agarosa.

La SEQ ID NO: 12 muestra la secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de cadena Kappa de ratón constante y la secuencia poli A. En SEQ ID NO: 12 la secuencia de nucleótidos 2 a 321 es la secuencia de la cadena Kappa de ratón constante y la secuencia de nucleótidos 348 a 597 es la secuencia poli A. El nucleótido 1 y los nucleótidos 598 a 605 son nucleótidos de los sitios de restricción para BsiWI y NotI debido a la generación de la secuencia por digestión de la restricción de un vector.

35 Generación de la secuencia de dominio de cadena pesada constante y secuencia Poli A (F3)

El fragmento de dominio de isotipo murino gamma 1 de longitud completa constante con secuencia posterior poliA se generó por digestión de restricción a partir de un vector de expresión.

Las condiciones de reacción utilizadas son las siguientes.

40 Plantilla de DNA	10 µl (1 ug/ul)
Tampón H (x10 Roche)	5,0 µl
XhoI	2 µl (10U/µl de New England Biolabs)
Sall	2 µl (10U/µl de New England Biolabs)
Agua	31 µl

ES 2 700 442 T3

La reacción se incubó a 37°C durante la noche (~ 16 horas) para liberar un fragmento de 1578 pares de bases. El fragmento se extrajo en gel y se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa.

5 SEQ ID NO: 13 muestra la secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de la cadena gamma 1 constante del ratón y la secuencia poli A. En SEQ ID NO: 13 la secuencia de nucleótidos 2 a 986 es la secuencia de la cadena gamma 1 constante del ratón y la secuencia de nucleótidos 1059 a 1307 es la secuencia poli A. El nucleótido 1 y los nucleótidos 1580 a 1585 son nucleótidos de los sitios de restricción para XhoI y Sall debido a la generación de la secuencia por digestión de la restricción de un vector.

Generación de la secuencia promotora (F1):

10 Se usó una digestión similar utilizando las enzimas de restricción MluI y HindIII para liberar el fragmento (F1) que contiene el promotor hCMV anterior de 2089 pares de bases, como se muestra en SEQ ID NO: 11. En SEQ ID NO: 11 la secuencia de nucleótidos 89 a 2080 es la secuencia promotora hCMV. Los nucleótidos 1 a 6 y los nucleótidos 2084 a 2089 son nucleótidos de los sitios de restricción para MluI y HindIII debido a la generación de la secuencia por digestión de la restricción de un vector.

Amplificación por PCR2 del producto de PCR intermedio de la secuencia de cadena ligera variable (F2 VL)

15 El producto de PCR intermedio de F2 VL se amplificó por PCR en presencia del cebador P3 (SEQ ID NO: 10) y el cebador P4 (SEQ ID NO: 9), una secuencia promotora F1 (SEQ ID NO: 11) y una secuencia que comprende la secuencia de cadena ligera constante y la secuencia poli A F3 (SEQ ID NO: 12).

	Tampón 10 x KOD	2,5 µl
	Polimerasa KOD	0,5 µl
20	dNTPs	2,5 µl
	Cebador 3 (P3 SEQ ID NO: 10)	2,0 µl (1,25 pmol/µl)
	Cebador 4 (P4 SEQ ID NO: 9)	2,0 µl (1,25 pmol/µl)
	Fragmento ligero constante & poli A (F3 SEQ ID NO: 12)	1,0 µl (2 ng/µl)
	Secuencia promotora (F1 SEQ ID NO: 11)	1,0 (2 ng/µl)
25	MgSO ₄	1,0 µl
	Agua	10,5 µl
	Plantilla de DNA (producto de PCR intermedio F2 VL)	2,0 µl

Las condiciones de reacción utilizadas para la PCR2 se proporcionan a continuación:

El programa de PCR KOD#T para PT-PCR es...

30	Etapas	Temperatura	Tiempo
	Etapa 1.	95°C	2 minutos
	Etapa 2.	95°C	20 segundos
	Etapa 3.	55°C	30 segundos
	Etapa 4.	72°C	2 minutos e ir a la etapa 2 (las etapas 2 a 4 se repiten 29 veces más)
	Etapa 5.	4°C	Captura

35 La PCR2 generó el producto de PCR lineal transcripcionalmente activo final (TAP ligero) que comprende la secuencia promotora (F1) (aproximadamente 2100 pares de bases), la secuencia F2 VL (aproximadamente 420 pares de bases) y la secuencia de dominio constante y poliadenilación F3 (aproximadamente 600 pares de bases). Una electroforesis en gel de agarosa se llevó a cabo para confirmar la producción del producto de PCR final, como se muestra en la Figura 3b el PCR2 VL es el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo final para VL, que tiene el tamaño esperado. En la Figura 3b, M2 es una escalera de DNA estándar de Novagen llamada Perfect™ 0,1-12 kb, B es un control negativo en blanco y 659 es el producto de PCR final.

Amplificación por PCR2 del producto de PCR intermedio de la secuencia de cadena pesada variable (F2 VH)

En cuanto a la PCR2 del producto de PCR intermedio de F2 VL, el producto de PCR intermedio de F2 VH se amplificó por PCR en presencia del cebador P3 (SEQ ID NO: 10) y el cebador P4 (SEQ ID NO: 9), una secuencia

ES 2 700 442 T3

promotora F1 (SEQ ID NO: 11) y una secuencia que comprende la secuencia de cadena pesada constante y la secuencia poli A F3 (SEQ ID NO: 13).

Las condiciones de reacción utilizadas se proporcionan a continuación:

	Tampón 10 x KOD	2,5 µl
5	Polimerasa KOD	0,5 µl
	dNTPs	2,5 µl
	Cebador 3 (P3 SEQ ID NO: 10)	2,0 µl (1,25 pmol/µl)
	Cebador 4 (P4 SEQ ID NO: 9)	2,0 µl (1,25 pmol/µl)
	Fragmento pesado constante & poli A (F3 SEQ ID NO: 13)	1,0 µl (2 ng/µl)
10	Secuencia promotora (F1 SEQ ID NO: 11)	1,0 (2 ng/µl)
	MgSO ₄	1,0 µl
	Agua	10,5 µl
	Plantilla de DNA (producto de PCR intermedio F2 VH)	2,0 µl

15 Los mismos ciclos de programa de PCR que se expusieron anteriormente para la PCR2 del producto de PCR intermedio de F2 VL se utilizaron también para la PCR2 del producto de PCR intermedio de F2 VH.

20 La PCR2 generó el producto de PCR lineal transcripcionalmente activo final (TAP pesado) que comprende la secuencia promotora (F1) (aproximadamente 2100 pares de bases), la secuencia F2 VH (aproximadamente 400 pares de bases) y la secuencia de dominio constante y poliadenilación F3 (aproximadamente 1600 pares de bases). Una electroforesis en gel de agarosa se llevó a cabo para confirmar la producción del producto de PCR final, como se muestra en la Figura 4b la PCR2 VH es el polinucleótido lineal transcripcionalmente activo final para VH, que tiene el tamaño esperado. En la Figura 4b, M2 es una escalera de DNA estándar de Novagen llamada Perfect™ 0,1-12kb, B es un control negativo en blanco y 659 es el producto de PCR final.

Ejemplo 3 – Transfección de los TAP pesados y TAP ligeros en células huésped.

25 Se utilizaron placas de 6 pocillos (10 cm², 35 mm por pocillo) para realizar la transfección de los productos de TAP pesados y TAP ligeros de la PCR2 en el Ejemplo 2. Aproximadamente 5 µg del DNA del TAP se transfirieron a cada pocillo que comprende 2,5 µg del TAP pesado y 2,5 µg del TAP ligero. Esto es aproximadamente 5 µl de cada PT-PCR dando 10 µl que se añadieron a 170 µl del medio Opti-MEM en tubos de microcentrifuga de policarbonato.

Otros 170 µl de Opti-MEM se añadieron a 10 µl de 293fectina en un tubo de policarbonato nuevo para cada pocillo de células que se van a transfectar. Esta mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.

30 La mezcla DNA Opti-MEM y las mezclas 293fectina Opti-MEM se combinaron después y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Las células HEK293 se prepararon en un medio FreeStyle™, a una densidad celular de 1x10⁶/ml con 5 ml de células por pocillo de transfección. Las células se dispensaron en los pocillos individuales de la placa de 6 pocillos y la mezcla Opti-MEM se añadió directamente al pocillo.

35 La placa se incubó después en una plataforma de agitación suave en una incubadora de CO₂ humidificada durante 4 a 5 días.

El anticuerpo se expresó y se secretó en el sobrenadante a un nivel aproximado de 2 µg/ml.

Procedimientos similares para la expresión de anticuerpos utilizando los polinucleótidos lineales transcripcionalmente activos han proporcionado rendimientos de hasta 9 µg/ml de anticuerpo.

40 Ejemplo 4 – Análisis de la actividad del anticuerpo expresado utilizando ELISA

El anticuerpo IgG murino de longitud completa producido a partir de la transfección transitoria de células huésped en el Ejemplo 3 se analizó para determinar su actividad utilizando un ensayo ELISA estándar basado en antígeno, con el siguiente protocolo:

45 Cada pocillo de una placa de bioensayo Nunc Maxisorp™ de 96 pocillos se recubrió con 100 µl de anticuerpo F(ab')₂ específico de la Fcγ de IgG anti-ratón suministrada por Jackson (Número de catálogo 115-006-071) a 1 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato.

La placa se lavó tres veces con 300 µl de PBS 0,1% de Tween 20 en un lavador de placas automatizado.

Cada pocillo de la placa se bloqueó con 200 µl de una solución al 1% (peso/volumen) de albúmina de suero bovino (BSA) en PBS y se incubó a temperatura ambiente durante al menos una hora.

5 Se utilizó una dilución en serie de un anticuerpo gamma 1 de ratón "MOPC21" de concentración conocida como estándar para este ensayo.

Este estándar y las diluciones de las muestras de los sobrenadantes del Ejemplo 3 que contienen el anticuerpo IgG murino producido por el TAP pesado y TAP ligero se detectaron posteriormente utilizando 100 µl de conjugado de peroxidasa F(ab')₂ de IgG de anti-ratón de cabra, suministrado por Jackson (Número de catálogo 115-035-072) diluido 1/5000 en solución de bloqueo, incubado durante una hora.

10 El ensayo ELISA se desarrolló mediante la adición de 100 µl de reactivo TBM (3-3', 5,5'-tetrametilbencidina) y se leyó a 630 nm utilizando un lector de placas espectrofotométrico automatizado.

El anticuerpo se midió a 0,45 µg/ml.

Esta muestra se analizó mediante la resonancia de plasmón de superficie Biacore.

15 Una muestra que comprende el anticuerpo IgG murino expresado en el Ejemplo 3 se capturó en una superficie de microchip de dextrano carboximetilado en la que se había inmovilizado irreversiblemente un anticuerpo anti-ratón.

20 El anticuerpo anti-ratón inmovilizado capturó de manera estable el anticuerpo IgG murino expresado en el Ejemplo 3. Después, el antígeno del anticuerpo IgG murino se pasó a concentraciones conocidas y los datos resultantes producidos por el aumento en masa (medido mediante una técnica llamada resonancia de plasmón de superficie) permiten la determinación de la afinidad entre los dos socios de unión, el anticuerpo IgG murino y el antígeno. Se midió un valor de afinidad de 0,367 pM.

Los resultados del ensayo de ELISA y el ensayo Biocore muestran de manera concluyente que el anticuerpo se estaba expresando y retuvo la especificidad del antígeno con la afinidad predicha en comparación con las muestras expresadas previamente del anticuerpo producido por métodos de clonación estándar.

25 Si bien esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencia a las realizaciones preferidas, los expertos en la técnica entenderán que pueden realizarse diversos cambios en la forma y el detalle sin apartarse del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Listado de secuencias

30 <110> UCB Pharma S.A.

<120> Método para producir proteínas

<130> G0081-WO01

35 <150> GB0903209.5

<151> 2009-02-25

<150> GB0903210.3

<151> 2009-02-25

40 <160> 13

<170> Patente en versión 3.5

45 <210> 1

<211> 49

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Secuencia de cebadores

<400> 1

55 gccaggaac tctgtgaca gtctcgagcg ctctacaaa gggcccatc 49

<210> 2

ES 2 700 442 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia codificada del cebador

<400> 2
 Gln Gly Thr Leu val Thr val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 1 5 10 15

10

<210> 3
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Secuencia del cebador

<400> 3

20

gcagtcaccg tccttgacac gaagcttgcc accatggagt ggtcctg 47

<210> 4
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Secuencia codificada por cebadores

30

<400> 4
 Met Glu Trp Ser
 1

35

<210> 5
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Secuencia del cebador

<400> 5

45

gaagacagat ggggccgcta ccgtacgctt gatctccact ttagtgccc 49

<210> 6
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Secuencia codificada por cebador

55

<400> 6
 Gly Thr Lys val Glu Ile Lys Arg Thr val Ala Ala Pro Ser val Phe
 1 5 10 15

60

<210> 7
 <211> 50
 <212> DNA

ES 2 700 442 T3

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia de cebador
5
<400> 7
cgtccttgac acgaagctat tcgtaagctt gccacatgt cggttccac 50
10
<210> 8
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
15
<220>
<223> Secuencia codificada por cebador
<400> 8
Met Ser Val Pro
1
20
<210> 9
<211> 28
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
25
<220>
<223> Secuencia de cebador
<400> 9
30
acatgataag atacattgat gagtttg 28
<210> 10
<211> 42
35
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia de cebador
40
<400> 10
acgcgtttg agatttctgt cgccgactaa attcatgtcg cg 42
45
<210> 11
<211> 2089
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
50
<220>
<223> Secuencia que comprende la secuencia promotora hCMV
<400> 11

ES 2 700 442 T3

acgcgTTTTg agatttctgt cgccgactaa attcatgtcg cgcgatagtg gtgtttatcg 60
 ccgatagaga tggcgatatt ggaaaaatcg atatttgaaa atatggcata ttgaaaatgt 120
 cgccgatgtg agtttctgtg taactgatat cgccattttt ccaaaagtga tttttgggca 180
 tacgcgatat ctggcgatag cgcttatatc gtttacgggg gatggcgata gacgactttg 240
 gtgacttggg cgattctgtg tgtcgcaaat atcgcagttt cgatataggt gacagacgat 300
 atgaggctat atcgccgata gaggcgacat caagctggca catggccaat gcatatcgat 360
 ctatacattg aatcaatatt ggccattagc catattattc attggttata tagcataaat 420
 caatattggc tattggccat tgcatacgtt gtatccatat cataatatgt acatttatat 480
 tggctcatgt ccaacattac cgccatgttg acattgatta ttgactagtt attaatagta 540
 atcaattacg gggtcattag ttcatagccc atatatggag ttccgcgta cataacttac 600
 ggtaaattggc ccgcctggct gaccgcccaa cgacccccgc ccattgacgt caataatgac 660
 gtatgttccc atagtaacgc caatagggac tttccattga cgtcaatggg tggagtattt 720
 acggtaaact gccacttgg cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cgccccctat 780

ES 2 700 442 T3

tgacgtcaat gacggtaa at ggcccgcctg gcattatgcc cagtacatga ccttatggga 840
 ctttcctact tggcagtaca tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcbggtt 900
 ttggcagtac atcaatgggc gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca 960
 cccattgac gtcaatggga gtttgttttg gcacaaaaat caacgggact ttccaaaatg 1020
 tcgtaacaac tccgccccat tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggt gggagggtcta 1080
 tataagcaga gctcgttttag tgaaccgtca gatcgccctgg agacgccatc cacgctgttt 1140
 tgacctccat agaagacacc gggaccgatc cagcctccgc ggccgggaac ggtgcattgg 1200
 aacgcggatt ccccgtgcca agagtgcgt aagtaccgcc tatagagtct ataggcccac 1260
 ccccttggt tcttatgcat gctatactgt ttttggttg gggctatac acccccgtt 1320
 cctcatgtta taggtgatgg tatagcttag cctatagggtg tgggttattg accattattg 1380
 accactcccc tattggtgac gatactttcc attactaatc cataacatgg ctctttgcca 1440
 caactctctt tattggctat atgccaatac actgtccttc agagactgac acggactctg 1500
 tatttttaca ggatggggtc tcatttatta tttacaaatt cacatataca acaccaccgt 1560
 ccccagtgcc cgcagttttt attaaacata acgtgggatc tccacgcgaa tctcgggtac 1620
 gtgttccgga catgggctct tctccggtag cggcggagct tctacatccg agccctgctc 1680
 ccatgcctcc agcgactcat ggtcgctcgg cagctccttg ctctaacag tggaggccag 1740
 acttaggcac agcacgatgc ccaccaccac cagtgtgccg cacaaggccg tggcggtagg 1800
 gtatgtgtct gaaaatgagc tcggggagcg ggcttgacc gctgacgcat ttggaagact 1860
 taaggcagcg gcagaagaag atgcaggcag ctgagttggt gtgttctgat aagagtcaga 1920
 ggtaactccc gttgcgggtc tgtaacggt ggagggcagt gtagtctgag cagtactcgt 1980
 tgctgccgcy cgcgccacca gacataatag ctgacagact aacagactgt tcctttccat 2040
 gggctttttc tgcagtcacc gtccttgaca cgaagctatt cgtaggcct 2089

<210> 12
 <211> 605
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

ES 2 700 442 T3

<220>

<223> Secuencia que comprende la secuencia de cadena ligera constante de ratón y la secuencia poli A

5 <400> 12
 cgtacggatg ctgcaccaac tgtatccatc ttcccacat ccagtgagca gttaacatct 60
 ggaggtgcct cagtcgtgtg cttcttgaac aacttctacc ccaaagacat caatgtcaag 120
 tggaagattg atggcagtga acgacaaaat ggcgtcctga acagttggac tgatcaggac 180
 agcaaagaca gcacctacag catgagcagc accctcacgt tgaccaagga cgagtatgaa 240
 cgacataaca gctataacctg tgaggccact cacaagacat caacttcacc cattgtcaag 300
 agcttcaaca ggaatgagtg ttagctgctc ctcagttcca gcctgggaat tcattgatca 360
 ttaatcagcc ataccacatt tgtagaggtt ttacttgctt taaaaaacct cccacacctc 420
 cccctgaacc tgaacataa aatgaatgca attgttgttg ttaacttgtt tattgcagct 480
 tataatggtt acaataaag caatagcatc acaaatttca caataaagc atttttttca 540
 ctgcattcta gttgtggtt gtccaaactc atcaatgtat cttatcatgt ctggatcgcg 600
 gccgc 605

<210> 13

<211> 1585

10 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia que comprende la secuencia de cadena pesada constate gamma 1 de ratón y la secuencia poli A

15 <400> 13
 ctcgagtgcc aaaacgacac ccccatctgt ctatccactg gcccttgat ctgctgccca 60

ES 2 700 442 T3

aactaactcc atggtgaccc tgggatgcct ggtcaagggc tatttcctg agccagtgac 120
agtgacctgg aactctggat ccctgtccag cgggtgtgac accttcccag ctgtcctgca 180
gtctgacctc tacactctga gcagctcagt gactgtcccc tccagcacct ggcccagcga 240
gaccgtcacc tgcaacgttg cccacccggc cagcagcacc aaggtggaca agaaaattgt 300
gccagggat tgtggttgta agccttgcat atgtacagtc ccagaagtat catctgtctt 360
catcttcccc ccaaagccca aggatgtgct caccattact ctgactccta aggtcacgtg 420
tgttggtgta gacatcagca aggatgatcc cgaggtccag ttcagctggt ttgtagatga 480
tgtggaggty cacacagctc agacgcaacc ccgggaggag cagttcaaca gcactttccg 540
ctcagtcagt gaacttccca tcatgcacca ggactggctc aatggcaagg agttcaaatg 600
cagggtaaac agtgcagctt tccctgcccc catcgagaaa accatctcca aaaccaaagg 660
cagaccgaag gctccacagg tgtacacat tccacctccc aaggagcaga tggccaagga 720
taaagtcagt ctgacctgca tgataacaga cttcttcctt gaagacatta ctgtggagtg 780
gcagtggaat gggcagccag cggagaacta caagaacact cagcccatca tggacacaga 840
tggctcttac ttcgtctaca gcaagctcaa tgtgcagaag agcaactggg aggcaggaaa 900
tactttcacc tgctctgtgt tacatgaggg cctgcacaac caccatactg agaagagcct 960
ctccccactc cctggtaa at gatcccagtg tccttggagc cctctggtcc tacaggactc 1020
tgacacctac ctccaccct ccctgtataa ataataagaa ttcattgatc ataatcagcc 1080
ataccacatt tgtagagggt ttacttgctt taaaaaacct cccacacctc cccctgaacc 1140
tgaacataa aatgaatgca attggtgttg ttaacttggt tattgcagct tataatggtt 1200
acaataaag caatagcatc acaaatcca caataaagc attttttcca ctgcattcta 1260
gttggtggtt gtccaaactc atcaatgtat cttatcatgt ctggatcctc tacgccggac 1320
gcatcgtggc cggcatcacc ggcgccacag gtgcggttgc tggcgcctat atcgccgaca 1380

ES 2 700 442 T3

```
tcaccgatgg ggaagatcgg gctcgccact tcgggctcat gagcgcttgt ttcggcgtgg 1440
gtatggtggc aggccccgtg gccgggggac tgttgggcgc catctccttg catgcacat 1500
tccttgccgc ggcggtgctc aacggcctca acctactact gggctgcttc ctaatgcagg 1560
agtcgataa gggagagcgt cgact 1585
```

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener un anticuerpo recombinante con una capacidad deseada para unirse a un antígeno seleccionado que evita múltiples etapas de digestión y ligación para producir vectores y múltiples transformaciones en células huésped, que comprende:
 - 5 (a) proporcionar una población de células linfocíticas formadoras de anticuerpos que se sospecha que contienen al menos una célula capaz de producir un anticuerpo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera que muestra dicha especificidad deseada;
 - (aa) una primera etapa de selección previa a 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
 10 una población de células formadoras de anticuerpos que producen un anticuerpo que muestra la capacidad deseada:
 - (aaa) identificar y aislar una única célula formadora de anticuerpos que produce un anticuerpo que muestra la capacidad deseada a partir de una población de células formadoras de anticuerpos identificada por la primera etapa de selección (aa);
 - 15 (b) generar un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo que codifica una cadena ligera o un fragmento de la misma y un polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo que codifica una cadena pesada o un fragmento de la misma para cada anticuerpo recombinante a partir de la única célula aislada formadora del anticuerpo obtenida en la etapa (aaa), en la que cada polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo comprende una primera secuencia de polinucleótidos codificante que codifica un dominio variable de un anticuerpo producido por la única célula aislada formadora de anticuerpos obtenida en la etapa (aaa), una segunda secuencia de polinucleótidos codificante que codifica una o más secuencias de polinucleótidos codificantes de dominio constante y uno o más elementos reguladores de la transcripción y no es capaz de replicación autónoma; en donde la etapa (b) comprende:
 - 20 bb) proporcionar la primera secuencia de polinucleótidos codificante, la segunda secuencia de polinucleótidos codificante y los uno o más elementos reguladores de la transcripción;
 - 25 bbb) unir la primera secuencia de polinucleótidos codificante y la segunda secuencia de polinucleótidos codificante mediante PCR, y
 - bbbb) unir uno o más elementos reguladores de la transcripción a la primera secuencia de polinucleótidos codificante y/o a la segunda secuencia de polinucleótidos codificante mediante PCR;
 - 30 (c) expresar un anticuerpo recombinante que comprende una cadena pesada y una cadena ligera de polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos generados en la etapa (b) mediante transfección transitoria de los polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos en una célula, cultivando dichas células huésped en un medio apropiado y aislando el anticuerpo a partir de la célula;
 - (d) seleccionar el anticuerpo recombinante producido por la etapa (c) para la capacidad deseada; y
 - 35 (e) repetir opcionalmente las etapas (b), (c) y (d) para identificar un anticuerpo recombinante que muestra la capacidad deseada.
 2. El método según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo recombinante expresado en la etapa (c) mantiene el emparejamiento de cadena ligera y cadena pesada original de un anticuerpo producido por una célula formadora de anticuerpos.
 - 40 3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cadena ligera o un fragmento de la misma se codifica por una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio variable y una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio constante de cadena ligera y la cadena pesada o un fragmento de la misma se codifica por una secuencia de polinucleótidos que codifica un dominio variable y secuencias de polinucleótidos que codifican los dominios constantes CH1, CH2 y CH3.
 - 45 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las células formadoras de anticuerpos se obtienen de un animal que se ha inmunizado con un antígeno seleccionado.
 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las células formadoras de anticuerpos se obtienen de un animal que generó dichas células durante el curso de una enfermedad seleccionada.
 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los polinucleótidos lineales recombinantes transcripcionalmente activos no comprenden un origen de replicación.
 - 50 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde cada polinucleótido lineal recombinante transcripcionalmente activo comprende un primer elemento regulador de la transcripción que

comprende una secuencia promotora y una segunda secuencia reguladora de la transcripción capaz de terminar la transcripción y/o iniciar la escisión del transcripto del RNA.

- 5 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la primera etapa de selección aa) y la etapa de aislamiento aaa) se llevan a cabo de manera simultánea, la etapa (aa) comprende suspender la población de las células formadoras de anticuerpos proporcionadas en la etapa (a) en un medio, el medio que tiene un sistema indicador incorporado en sí mismo, siendo dicho sistema indicador capaz de indicar la presencia y localización de una célula formadora de anticuerpos o una población de células formadoras de anticuerpos produciendo un anticuerpo que muestra la capacidad deseada y la etapa (aaa) comprende identificar y aislar la única célula formadora de anticuerpos.
- 10 9. El método según la reivindicación 8, en donde el sistema indicador comprende un antígeno seleccionado y un anticuerpo de anti-anticuerpo marcado.

Figura 1

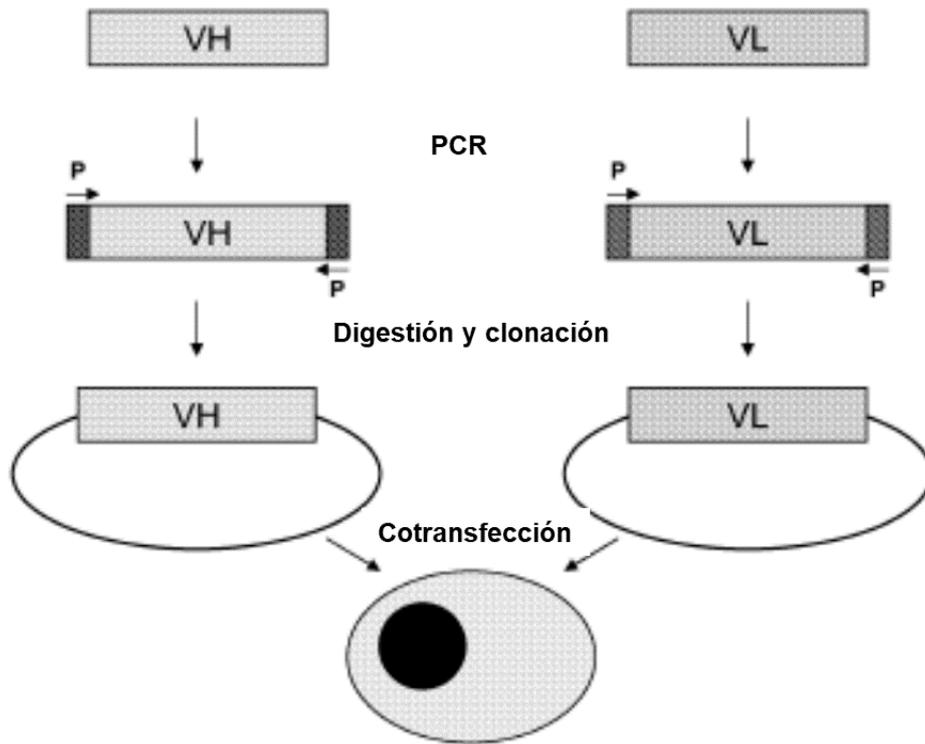


Figura 2a

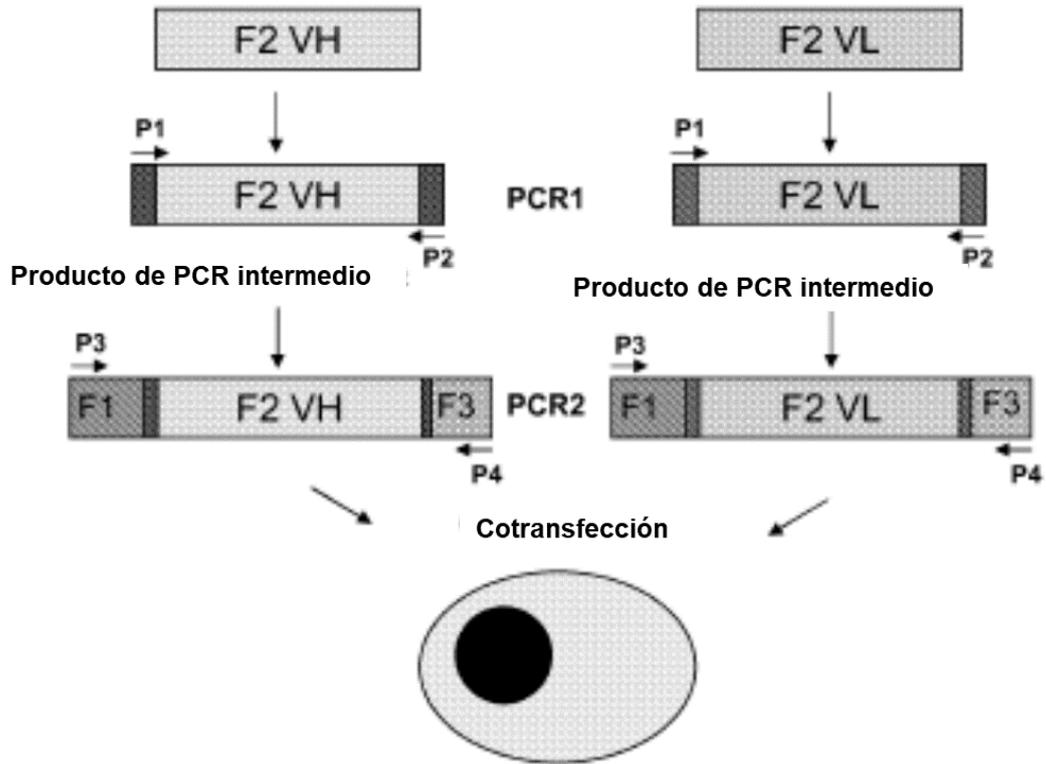


Figura 2b

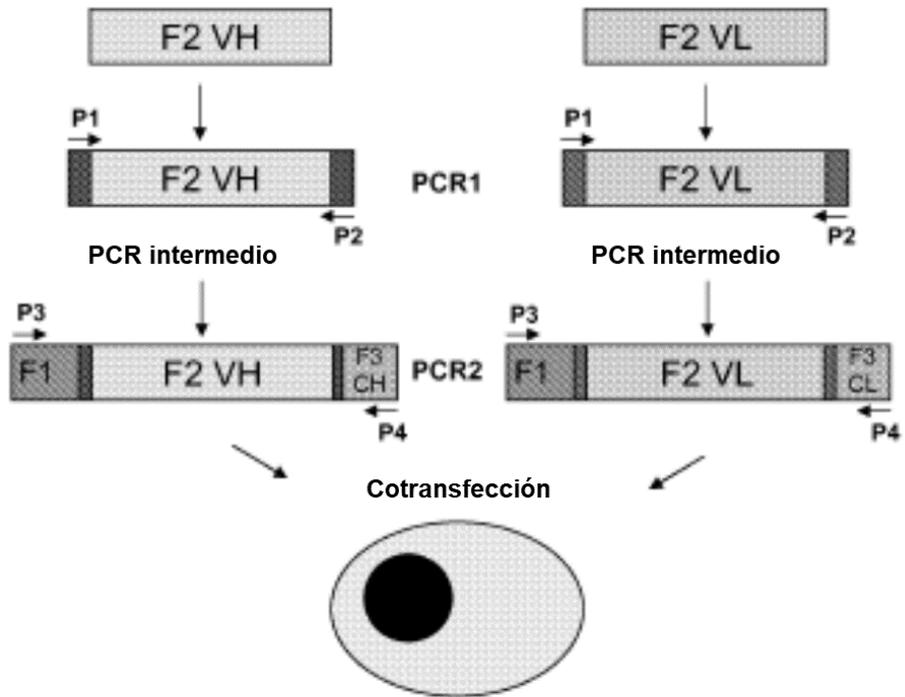


Figura 3a

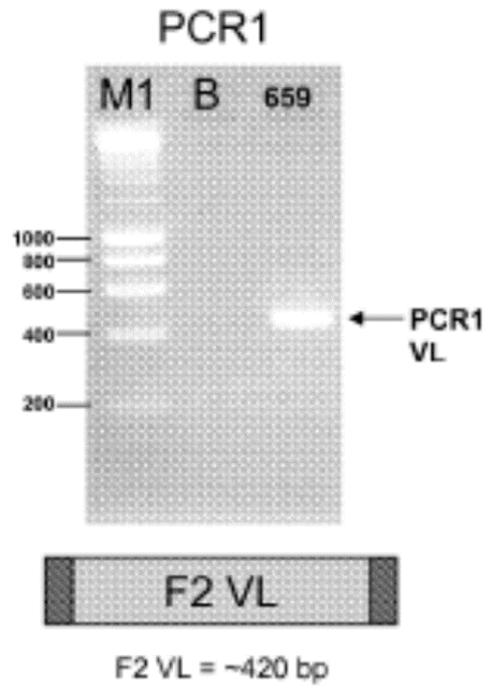


Figura 3b

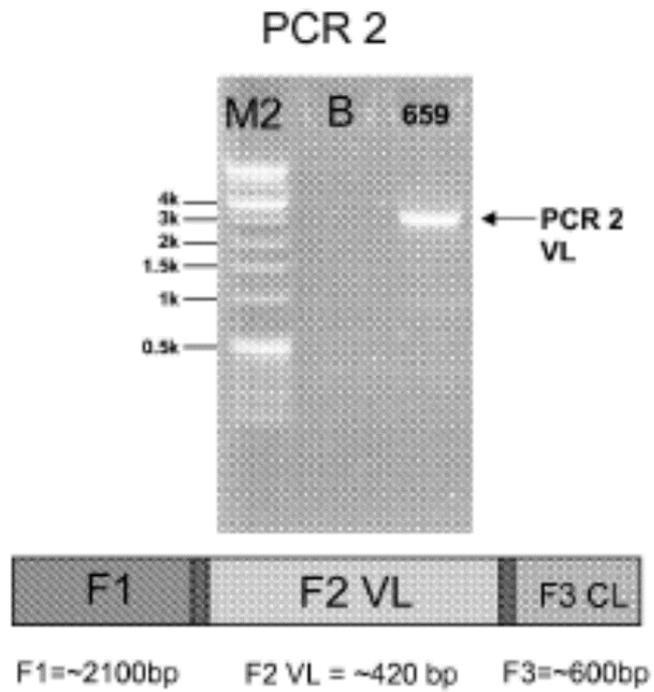
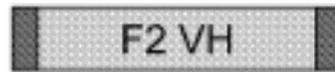
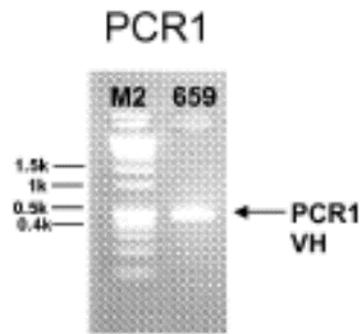
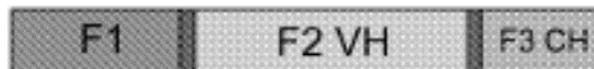
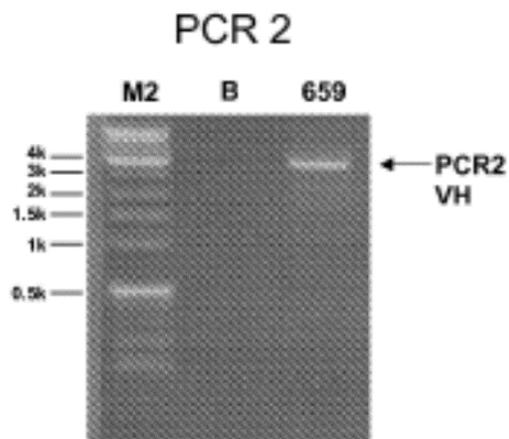


Figura 4a



F2 VH = ~400 bp

Figura 4b



F1 ~2100bp

F2 VH = ~400

F3 ~1600bp