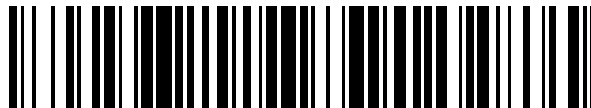


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 499 391**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.10.2008 PCT/JP2008/068588**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2009 WO09051108**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2008 E 08838661 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **14.07.2021 EP 2202307**

54 Título: **Método para la producción de anticuerpos**

30 Prioridad:

15.10.2007 JP 2007267384

11.04.2008 JP 2008103308

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
22.12.2021

73 Titular/es:

**CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)
5-1 Ukima 5-chome Kita-ku
Tokyo 115-8543, JP**

72 Inventor/es:

**YAMADA, YOSHIKI;
KIYASU, TATSUYA;
TABATA, KAZUYUKI;
KUZUMAKI, AKIHIRO y
YAMASHIRO, MAI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

DESCRIPCIÓN

Método para la producción de anticuerpos

Campo técnico

5 La invención se refiere a un método de producción de un anticuerpo IgG1, o un fragmento del mismo, que comprende permitir que una célula animal produzca el anticuerpo o el fragmento, en el que la célula animal contiene un número de copias de un ADN exógeno que codifica la cadena ligera del anticuerpo o un fragmento de la misma mayor que el número de copias contenidas en la célula animal de un ADN exógeno que codifica la cadena pesada del anticuerpo o un fragmento de la misma, y es una célula animal en la que se ha introducido un vector que comprende una copia de un ADN que codifica la cadena pesada del anticuerpo o un fragmento de la misma y dos o
10 más copias de un ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo o un fragmento de la misma, en donde dicho vector comprende una unidad de expresión que consiste en un promotor, dicho ADN exógeno que codifica la cadena pesada o un fragmento de la misma, y una señal poliA, y en el que dicho vector comprende dos o más unidades de expresión que consisten en un promotor, dicho ADN exógeno que codifica la cadena ligera o un fragmento de la misma, y una señal poliA.

15 Antecedentes de la técnica

En la producción de anticuerpos recombinantes útiles como productos farmacéuticos usando tecnología recombinante genética, el uso de células animales posibilita la complicada modificación y plegado postraducciona que las células procarióticas son incapaces de efectuar. Por lo tanto, las células animales se han usado frecuentemente como células hospedadoras para producir anticuerpos recombinantes.

20 Recientemente, se han producido un gran número de productos farmacéuticos biológicos, tales como anticuerpos y proteínas fisiológicamente activas. En particular, en preparaciones de anticuerpo en que las dosis son habitualmente del orden de miligramos (mg) para administración, son necesarias cantidades considerables de anticuerpos como ingredientes activos. Las tecnologías que permiten una producción eficaz de anticuerpos recombinantes por células animales conducirán a una reducción del coste de preparaciones de anticuerpo y ofrecerán un suministro estable a
25 pacientes.

Por lo tanto, se desean métodos más eficaces de producción de anticuerpos recombinantes.

En la preparación de una célula hospedadora para producir un anticuerpo recombinante, se transfieren habitualmente a la célula hospedadora una copia del ADN que codifica la cadena pesada del anticuerpo y una copia del ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo (documentos no de patente nº 1 y 2).

30 [Documento no de patente 1] Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R *et al.* "Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20". Blood. 15 de enero de 1994; 83(2): 435-45.

[Documento no de patente nº 2] Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, *et al.* "Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders". Cancer Res. 15 de octubre de 1997; 57(20): 4593-9.

35 Divulgación de la invención**Problema para resolver por la invención**

40 Por otro lado, no se sabe hasta la fecha si en una célula de expresión estable transformada se contribuye a la mejora de la producción de un anticuerpo recombinante deseado cuando se han transferido a la misma una copia de UN ADN que codifica la cadena pesada del anticuerpo y dos o más copias de un ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo.

Es un objeto de la invención proporcionar un método para la producción elevada de un anticuerpo.

Medios para resolver el problema

45 Como resultado de amplias y arduas investigaciones hacia la solución del problema anterior, se ha encontrado que es posible aumentar los rendimientos de anticuerpo usando una célula que contiene un mayor número de copias de un ADN exógeno que codifica la cadena ligera del anticuerpo de interés que el número de copias de un ADN exógeno que codifica la cadena pesada del anticuerpo que contiene. Por tanto, se ha conseguido la presente invención.

La presente invención se refiere a lo siguiente:

50 1. Un método de producción de un anticuerpo IgG1, o un fragmento del mismo, que comprende permitir que una célula animal produzca el anticuerpo o fragmento, en el que la célula animal contiene un número de copias de un ADN exógeno que codifica la cadena ligera del anticuerpo o un fragmento de la misma mayor que el número

- de copias contenidas en la célula animal de un ADN exógeno que codifica la cadena pesada del anticuerpo o un fragmento de la misma, y es una célula animal en la que se ha introducido un vector que comprende una copia de un ADN que codifica la cadena pesada del anticuerpo o un fragmento de la misma y dos o más copias de un ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo o un fragmento de la misma, en donde dicho vector comprende una unidad de expresión que consiste en un promotor, dicho ADN exógeno que codifica la cadena pesada o un fragmento de la misma, y una señal poliA, y en el que dicho vector comprende dos o más unidades de expresión que consisten en un promotor, dicho ADN exógeno que codifica la cadena ligera o un fragmento de la misma, y una señal poliA.
- 5
2. El método según el ítem 1, en el que la célula es una de ovario de hámster chino.
- 10 3. El método según uno cualquiera de los ítems 1 y 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado o anticuerpo humano.
4. El método según uno cualquiera de los ítems 1 a 3, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo consistente en anticuerpo anti-receptor de IL-6, anticuerpo anti-IL6, anticuerpo anti-glipicano 3, anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-GPIIb/IIIa, anticuerpo anti-TNF, anticuerpo anti-CD25, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo anti-Her2/neu, anticuerpo anti-RSV, anticuerpo anti-CD33, anticuerpo anti-CD52, anticuerpo anti-IgE, anticuerpo anti-CD11a, anticuerpo anti-VEGF y anticuerpo anti-VLA4.
- 15
5. Un vector recombinante que comprende una copia de un ADN que codifica la cadena pesada o un fragmento de la misma de un anticuerpo IgG1 y dos o más copias de un ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo o un fragmento de la misma, en donde dicho vector comprende una unidad de expresión que consiste en un promotor, dicho ADN exógeno que codifica la cadena pesada o un fragmento de la misma, y una señal poliA, y en el que dicho vector comprende dos o más unidades de expresión que consisten en un promotor, dicho ADN que codifica la cadena ligera o un fragmento de la misma, y una señal poliA.
- 20
6. Una célula animal para uso como sistema de producción para preparar o expresar un anticuerpo IgG1 o un fragmento del mismo que tiene el vector según el ítem 5.
- 25 7. Una célula animal cultivada para uso como sistema de producción para preparar o expresar un anticuerpo IgG1 o un fragmento del mismo que tiene un vector que comprende una copia de un ADN que codifica la cadena pesada de un anticuerpo IgG1 o un fragmento de la misma y dos o más copias de un ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo o un fragmento de la misma, en donde dicho vector comprende una unidad de expresión que consiste en un promotor, dicho ADN exógeno que codifica la cadena pesada o un fragmento de la misma, y una señal poliA, y en el que dicho vector comprende dos o más unidades de expresión que consisten en un promotor, dicho ADN que codifica la cadena ligera o un fragmento de la misma, y una señal poliA.
- 30
8. El método según una cualquiera de los ítems 1 a 4, en el que la célula expresa establemente el anticuerpo o el fragmento del mismo.
- 35 9. La célula animal según el ítem 6 o 7, que expresa establemente el anticuerpo o el fragmento del mismo.

Efecto de la invención

Según la presente invención, se hace posible producir un anticuerpo recombinante deseado a bajo coste.

Breve descripción de los dibujos

40 La Fig. 1 muestra el "plásmido de expresión de una copia de cadena L" pHGC33CAG#1 que alberga una copia de la unidad de expresión de cadena ligera y una copia de la unidad de expresión de cadena pesada por plásmido, y el "plásmido de expresión de dos copias de cadena L" pHGC33CAG1 que alberga dos copias de la unidad de expresión de cadena ligera y una copia de la unidad de expresión de cadena pesada por plásmido.

45 La Fig. 2 es una gráfica que muestra la productividad del anticuerpo (anticuerpo humanizado anti-glipicano 3 humano) por el clon o clones celulares transferidos con el "plásmido de expresión de una copia de cadena L" y el clon o clones celulares transferidos con el "plásmido de expresión de dos copias de cadena L".

La Fig. 3 muestra el "plásmido de expresión de una copia de cadena L" que comprende una copia de la cadena pesada del gen de anticuerpo humanizado anti-IL-6R humano y una copia de la cadena ligera del gen, y el "plásmido de expresión de dos copias de cadena L" que comprende una copia de la cadena pesada y dos copias de la cadena ligera.

50 La Fig. 4 es una gráfica que muestra la productividad del anticuerpo (anticuerpo humanizado anti-IL-6R humano) por el clon o clones celulares transferidos con el "plásmido de expresión de una copia de cadena L" y el clon o clones celulares transferidos con el "plásmido de expresión de dos copias de cadena L".

Mejor modo de llevar a cabo la invención

De aquí en adelante en la presente memoria, se describirán con detalle realizaciones de la invención.

La invención proporciona un método de producción de un anticuerpo IgG1, o un fragmento del mismo, que comprende permitir que una célula produzca el anticuerpo o el fragmento, en el que la célula contiene un número de copias de un ADN exógeno que codifica la cadena ligera del anticuerpo o un fragmento de la misma mayor que el número de copias contenidas en la célula de un ADN exógeno que codifica la cadena pesada del anticuerpo o un fragmento de la misma, como se define en las reivindicaciones.

En el método de la invención, una célula que contiene un mayor número de copias de un ADN exógeno que codifica la cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento de la misma que el número de copias contenidas en la célula de un ADN exógeno que codifica la cadena pesada del anticuerpo o un fragmento de la misma puede ser, por ejemplo, una célula transformada en la que se ha introducido una copia de un ADN que codifica la cadena pesada de un anticuerpo recombinante deseado o un fragmento de la misma y dos o más copias de un ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo recombinante deseado o un fragmento de la misma y que es capaz de producir el anticuerpo recombinante deseado o un fragmento del mismo, como se define en las reivindicaciones.

En el método de la invención, el anticuerpo recombinante deseado no está particularmente limitado y puede ser un anticuerpo recombinante de cualquier antígeno, por ejemplo, anticuerpo anti-receptor de IL-6, anticuerpo anti-IL6, anticuerpo anti-glicoproteína 3, anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-GPIIb/IIIa, anticuerpo anti-TNF, anticuerpo anti-CD25, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo anti-Her2/neu, anticuerpo anti-RSV, anticuerpo anti-CD33, anticuerpo anti-CD52, anticuerpo anti-IgE, anticuerpo anti-CD11a, anticuerpo anti-VEGF y anticuerpo anti-VLA4 o similares. El anticuerpo incluye no solo anticuerpos monoclonales derivados de animales tales como ser humano, ratón, rata, hámster, conejo y mono, sino también anticuerpos recombinantes genéticamente modificados artificialmente tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos biespecíficos o similares. El anticuerpo recombinante puede modificarse químicamente, por ejemplo, puede ligarse con diversas moléculas tales como polietilenglicol. La clase de anticuerpo no está particularmente limitada. La clase de inmunoglobulina del anticuerpo es.

Cuando el anticuerpo se va a usar como producto farmacéutico, se prefiere IgG1.

Puede prepararse un ADN que codifica la cadena ligera de un anticuerpo y un ADN que codifica la cadena pesada del anticuerpo como se describe a continuación. Brevemente, se extrae el ARNm de un hibridoma, célula, fago, ribosoma o similar que tiene un gen que codifica el anticuerpo. A partir del ARNm resultante, se prepara ADNc mediante transcripción inversa usando transcriptasa inversa. Se amplifica el gen de cadena ligera o el gen de cadena pesada por PCR usando el ADNc y cebadores que tienen una secuencia nucleotídica complementaria del gen de cadena ligera o cadena pesada. Se obtiene cada gen ligando el producto de PCR en un plásmido de clonación.

En el método descrito en la presente memoria, los ejemplos específicos de fragmentos deseables de anticuerpos recombinantes incluyen Fab, F(ab')₂ y Fv.

Puede prepararse un ADN que codifica un fragmento de cadena ligera de un anticuerpo y un ADN que codifica un fragmento de cadena pesada del anticuerpo como se describe a continuación. Brevemente, se extrae ARNm de un hibridoma, célula, fago, ribosoma o similar que tiene un gen que codifica el anticuerpo. A partir del ARNm resultante, se prepara ADNc mediante transcripción inversa usando transcriptasa inversa. Se amplifica el gen de fragmento de cadena ligera o gen de fragmento de cadena pesada por PCR usando el ADNc y cebadores que tienen una secuencia nucleotídica complementaria del gen de fragmento de cadena ligera o fragmento de cadena pesada. Se obtiene cada gen de fragmento ligando el producto de PCR en un plásmido de clonación.

Se encontró que el uso de una célula transformada en la que se ha introducido una copia de un ADN que codifica la cadena pesada y dos o más copias de un ADN que codifica la cadena ligera aumenta el rendimiento de un anticuerpo recombinante deseado definitiva y significativamente, en comparación con las células transformadas usadas convencionalmente en las que se ha introducido una copia de un ADN que codifica la cadena pesada y una copia de un ADN que codifica la cadena ligera.

El polipéptido de cadena pesada y el polipéptido de cadena ligera de una molécula de anticuerpo se ensamblan con el apoyo de BiP (proteína de unión a la cadena pesada de inmunoglobulina) y se pliegan entonces, consiguiendo así una estructura de anticuerpo completa. Este proceso de ensamblado depende del polipéptido de cadena ligera (*Molecular Biology of the Cell*, 1999, 10, 2209). Por lo tanto, puede pensarse que al aumentar la relación del número de genes de cadena ligera para elevar así la relación de polipéptido de cadena ligera, se promoverá el ensamblado de los polipéptidos de cadena pesada y polipéptidos de cadena ligera y, como resultado, aumentará el rendimiento de anticuerpo.

Sin embargo, particularmente en transformantes estables que expresan anticuerpos recombinantes en sistemas de expresión estables, el nivel de expresión de la cadena pesada se reduce respecto al nivel de expresión en sistemas de expresión transitorios; por tanto, se sugiere que el nivel de expresión de la cadena pesada es más importante

aquí (*Biotechnol. Prog.*, 2005, 21, 122). Por lo tanto, es completamente desconocido cómo controlar los niveles de expresión de la cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo de interés para aumentar el rendimiento de anticuerpo en sistemas de expresión estable.

5 La relación del número de copias de un ADN que codifica la cadena ligera de un anticuerpo recombinante o un fragmento de la misma al número de copias de un ADN que codifica la cadena pesada del anticuerpo o un fragmento de la misma puede ser de 1 o más, preferiblemente estar dentro del intervalo de 1,1 a 5, lo más preferiblemente 2.

10 Como ejemplos de célula que contiene un mayor número de copias de un ADN exógeno que codifica la cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento de la misma que el número de copias contenidas en la célula de un ADN exógeno que codifica la cadena pesada del anticuerpo o un fragmento de la misma, pueden darse las siguientes células: una célula en la que se ha introducido un vector (es decir, en número de uno) que comprende un ADN que codifica la cadena pesada o un fragmento de la misma y otros vectores (es decir, en número de dos o más) que comprenden un ADN que codifica la cadena ligera o un fragmento de la misma; una célula en la que se ha introducido un vector que comprende tanto una copia de un ADN que codifica la cadena pesada o un fragmento de la misma como una copia de un ADN que codifica la cadena ligera o un fragmento de la misma y uno o más vectores distintos que comprenden una copia de un ADN que codifica la cadena ligera o un fragmento de la misma; o una célula en la que se ha introducido un vector que comprende una copia de un ADN que codifica la cadena pesada o un fragmento de la misma y dos o más copias de un ADN que codifica la cadena ligera o un fragmento de la misma. Se prefiere una célula en la que se ha introducido un vector que comprende una copia de un ADN que codifica la cadena pesada o un fragmento de la misma y dos o más copias de un ADN que codifica la cadena ligera o un fragmento de la misma.

20 Cuando se usan una copia de un ADN que codifica la cadena pesada o un fragmento de la misma y dos o más copias de un ADN que codifica la cadena ligera o un fragmento de la misma y al menos una de estas copias está codificada en un vector separado distinto del vector que codifica las copias restantes, el orden de introducción de los vectores no está particularmente limitado. Dichos vectores pueden introducirse separada o simultáneamente.

25 La célula que se usa en la presente memoria para expresar un anticuerpo de interés no está particularmente limitada y puede usarse cualquier célula, por ejemplo, una célula eucariótica tal como una célula animal, célula vegetal o levadura, o una célula procariótica tal como *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*. Los ejemplos preferibles incluyen, pero sin limitación, células animales tales como célula CHO, célula COS, célula 3T3, célula de mieloma, célula BHK, célula HeLa y célula Vero. Se prefiere especialmente la célula CHO. Adicionalmente, para producir un anticuerpo deseado, se prefiere que la célula sea una célula CHO dhfr- o similar que sea adecuada para la introducción de un gen deseado. Por ejemplo, es posible cultivar una célula COS o CHO en la que se ha integrado un gen que codifica un anticuerpo deseado mediante operaciones de ingeniería genética.

30 Con respecto a los vectores que pueden usarse en el método de la presente invención, cuando la célula hospedadora es *E. coli*, el vector tiene preferiblemente un *ori* que posibilita la amplificación a gran escala en *E. coli* (por ejemplo, JM109, DH5 α , HB101 y XL1-Blue) y marcadores selectivos para células *E. coli* transformadas (por ejemplo, genes de resistencia a fármacos capaces de seleccionar transformantes con fármacos tales como ampicilina, tetraciclina, kanamicina o cloranfenicol). Los ejemplos específicos de vectores incluyen, pero sin limitación, vector M13, vector pUC, vector pBR322, vector pBluescript y pCR-Script. Adicionalmente, cuando se pretende la subclonación y escisión de ADNc, se enumeran también pGEM-T, pDIRECT, pT7 y similares además de los vectores anteriormente enumerados. Cuando el vector se usa con el fin de producir el anticuerpo de la presente invención o un fragmento del mismo, son particularmente útiles los vectores de expresión. Cuando el anticuerpo de la presente invención se va a expresar en *E. coli*, se prefiere que el vector de expresión tenga el rasgo anteriormente descrito para asegurar la amplificación en *E. coli*. Además, cuando el hospedador es *E. coli* tal como JM109, DH5 α , HB101 o XL1-Blue, se prefiere que el vector de expresión tenga un promotor que posibilite una expresión suficiente en *E. coli*, por ejemplo, el promotor lacZ (Ward *et al.*, Nature (1989) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427), el promotor araB (Better *et al.*, Science (1988) 240, 1041-1043) o el promotor T7. Los ejemplos específicos de dicho vector incluyen, además de aquellos apuntados anteriormente, pGEX-5X-1 (Pharmacia), pEGFP o pET del sistema QIAexpress (Qiagen) (en este caso, la célula hospedadora es preferiblemente BL21 que expresa ARN polimerasa T7).

50 El vector puede comprender una secuencia señal para la secreción de polipéptido. En cuanto a la secuencia señal para la secreción de polipéptido, puede usarse la secuencia señal pelB (Lei, S. P. *et al.* J. Bacteriol. 25 (1987) 169, 4379) cuando el anticuerpo se va a producir en el periplasma de *E. coli*. La introducción del vector en células hospedadoras puede efectuarse mediante el método de cloruro de calcio, electroporación, etc.

55 Cuando la célula hospedadora no es *E. coli*, el vector que puede usarse en la presente invención incluye, pero sin limitación, vectores de expresión derivados de mamífero tales como pcDNA3 (Invitrogen), pEGF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990, 18(17), pág. 5322), pEF, pCDM8 e INPEP4 (Biogen-IDEC); vectores de expresión derivados de célula de insecto tales como el sistema de expresión de baculovirus Bac-to-BAC (GIDCO BRL) y pBacPAK8; vectores de expresión derivados de plantas tales como pMH1 and pMN2; vectores de expresión derivados de virus animales tales como pHSV, pMV y pAdexLcw; vectores de expresión derivados de retrovirus tales como pZlneo; vectores de

expresión derivados de levadura tales como el kit de expresión de Pichia (Invitrogen), pNV11 y SP-Q01) y vectores de expresión derivados de *B. subtilis* tales como pPL608 y pKTH50.

5 Cuando se pretende la expresión de un anticuerpo en una célula animal (tal como una célula CHO, célula COS o célula NIH3T3), el vector tiene preferiblemente un promotor necesario para la expresión intracelular del anticuerpo; por ejemplo, el promotor SV40 (Mulligan *et al.*, Nature (1979) 277, 108), el promotor MMLV-LTR, el promotor EF1 α (Mizushima *et al.*, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322), el promotor CMV (Niwa *et al.*, Gene (1991) 108, 193), el promotor de globina β de ratón (mBGP), etc. Más preferiblemente, el vector tiene genes para seleccionar la transformación en células (por ejemplo, genes de resistencia a fármacos capaces de selección con fármacos tales como neomicina o G418). Los ejemplos de vectores con dichos rasgos incluyen, pero sin limitación, pMAM, pDR2, 10 pBK-RSV, pBK-CMV pOPRSV y pOP13. Es conocido que el ARNm con poliA es estable en células. Por tanto, el vector tiene preferiblemente una señal de poliA necesaria para añadir poliA a un gen de interés, por ejemplo, la señal de poliA de globina β de ratón, la señal de poliA de hormona de crecimiento bovino, la señal de poliA de SV40, etc.

15 La célula descrita en la presente memoria puede expresar el anticuerpo o un fragmento del mismo en un sistema de expresión transitoria o en un sistema de expresión estable. Preferiblemente, el anticuerpo se expresa en un sistema de expresión estable.

20 El "sistema de expresión transitoria" significa un método en el que se captan plásmidos circulares en células mediante el método de fosfato de calcio, electroporación, lipofección, etc. con fines de expresión génica. Puesto que los plásmidos circulares se insertan en cromosomas con baja eficacia, el gen de interés permanece a menudo fuera de los cromosomas. Por lo tanto, es difícil retener la expresión del gen de interés de plásmidos circulares durante largo tiempo.

25 El "sistema de expresión estable" significa un método en el que se captan plásmidos lineales preparados por tratamiento con enzima de restricción o similar en células mediante el método de fosfato de calcio, electroporación, lipofección, etc. con fines de expresión génica. Puesto que los plásmidos lineales se insertan en cromosomas con mayor eficacia que los plásmidos circulares, el gen de interés se mantiene en los cromosomas con mayor eficacia. Por lo tanto, es posible retener la expresión de este gen durante largo tiempo. Adicionalmente, la introducción de genes de resistencia a fármacos en plásmidos posibilita la selección con fármacos. Por tanto, se hace posible seleccionar eficazmente aquellas células que mantienen el gen de interés en sus cromosomas. Como células animales usadas en un sistema de expresión estable, pueden enumerarse la célula CRO, célula NSO, célula SP2/0 30 y similares. Preferiblemente se usa la célula CHO.

35 Adicionalmente, cuando se pretende la expresión estable del gen de interés y la amplificación intracelular del número de copias del gen, puede darse un método en el que se usan células CHO deficientes en la ruta de síntesis de ácido nucleico. Brevemente, se introduce un vector que comprende un gen DHFR complementario de la deficiencia (por ejemplo, pCHO1) en la célula, seguido de amplificación del gen de interés con metotrexato (MTX). Cuando se pretende la expresión transitoria de un gen de interés, puede darse un método en el que se transforma una célula COS que tiene un gen que expresa el antígeno T de SV40 en su cromosoma con un vector que tiene un origen de replicación de SV40 (por ejemplo, pcD). Como origen de replicación, pueden usarse también aquellos derivados de poliomavirus, adenovirus, papilomavirus bovino (BPV) y similares. Adicionalmente, para amplificación del número de copias del gen de interés en sistemas de células hospedadoras, los vectores de expresión pueden 40 comprender los siguientes como marcadores selectivos: gen de aminoglicósido transferasa (APR), gen de timidina cinasa (TK), gen de xantina-guanina fosforribosiltransferasa de *E. coli* (Ecogpt), gen de dihidrofolato reductasa (dhfr), etc.

45 La invención proporciona también un vector recombinante que comprende una copia de un ADN que codifica la cadena pesada de un anticuerpo o un fragmento de la misma y dos o más copias de un ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo o un fragmento de la misma como se caracteriza en las reivindicaciones.

50 El vector descrito en la presente memoria es útil para retener un ADN que codifica un anticuerpo recombinante de interés o un fragmento del mismo o expresar el anticuerpo recombinante o el fragmento del mismo en una célula hospedadora. Al introducir en la célula hospedadora una copia de un ADN que codifica la cadena pesada del anticuerpo recombinante o un fragmento de la misma y dos o más copias de un ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo recombinante o un fragmento de la misma, se promueve el ensamblado del polipéptido de cadena pesada en una molécula de anticuerpo. Por tanto, puede aumentarse la producción del anticuerpo recombinante de interés o un fragmento del mismo en la célula hospedadora.

55 La invención proporciona también la célula hospedadora reivindicada en la que se ha introducido el vector reivindicado. Como se describe aquí, la célula hospedadora en la que se va de introducir el vector descrito en la presente memoria no está particularmente limitada. Por ejemplo, puede usarse *E. coli* o diversas células animales. La célula hospedadora de la presente invención puede usarse como sistema de producción para preparar o expresar el anticuerpo de la presente invención o un fragmento del mismo. Como sistema de producción para polipéptidos, puede usarse un sistema de producción *in vitro* o *in vivo*. Los ejemplos de sistemas de producción *in vitro* incluyen aquellos que usan células eucarióticas y aquellos que usan células procarióticas.

5 Cuando van a usarse células eucarióticas, pueden usarse como hospedador células animales, células vegetales o células fúngicas. Los ejemplos específicos de células animales incluyen, pero sin limitación, células de mamífero tales como células CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945), COS, 3T3, de mieloma, BHK (riñón de cría de hámster), HeLa y Vero; células de anfibio tales como ovocitos de *Xenopus* (Valle, *et al.*, Nature (1981) 291, 358-340) y células de insecto tales como Sf9, Sf21 y Tn5. Con respecto a las células CHO, puede usarse convenientemente una célula CHO que carece del gen DHFR (dhfr-CHO) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 35 (1980) 77, 4216-4220) o una célula CHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275). Cuando se pretende la expresión masiva en células animales, las células CHO son particularmente preferibles. La introducción del vector en la célula hospedadora puede efectuarse mediante el método de fosfato de calcio, el método de DEAE-dextrano, un método que usa DOTAP ribosómico catiónico (Boehringer Mannheim), electroporación, lipofección, etc.

10 Con respecto a células vegetales, es conocida una célula derivada de *Nicotiana tabacum* como sistema de producción polipeptídico y esta puede cultivarse en callo. Con respecto a células fúngicas, son conocidas levaduras tales como *Saccharomyces* (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) y hongos filamentosos tales como *Aspergillus* (por ejemplo, *Aspergillus niger*).

15 Cuando se van a usar células procarióticas, pueden usarse sistemas de producción que usan células bacterianas. Los ejemplos conocidos de dichas células bacterianas incluyen *E. coli* (por ejemplo, JM109, DH5 α y HB101) y *B. subtilis*.

20 Al transformar estas células con un gen de interés y cultivar los transformantes resultantes *in vitro*, puede obtenerse un polipéptido codificado por el gen de interés. El cultivo puede efectuarse según métodos conocidos. Por ejemplo, puede usarse como caldo de cultivo para células animales DMEM, MEM, RPMI1640 o IMDM. Durante este cultivo, puede usarse conjuntamente un suplemento sérico tal como suero fetal bovino (FCS). Como alternativa, el cultivo puede ser un cultivo exento de suero. El pH durante el cultivo es preferiblemente de aproximadamente 6-8. Habitualmente, el cultivo se efectúa a aproximadamente 30-40 °C durante aproximadamente 15-200 horas. El medio de cultivo puede intercambiarse, airearse o agitarse si es necesario.

25 Al cultivar una célula que contiene un mayor número de copias de un ADN exógeno que codifica la cadena ligera de un anticuerpo de interés o un fragmento de la misma que el número de copias contenidas en la célula de un ADN exógeno que codifica la cadena pesada del anticuerpo o un fragmento de la misma, es posible permitir que esta célula exprese el anticuerpo o un fragmento del mismo con mayor rendimiento que en métodos convencionales. Para cultivar la célula anteriormente descrita, pueden usarse medios usados en el cultivo celular convencional (preferiblemente, células animales). Habitualmente, estos medios contienen aminoácidos, vitaminas, factores lipídicos, fuentes de energía, reguladores osmóticos, fuentes de hierro y tampones de pH. Las cantidades de estos componentes en el medio de cultivo son habitualmente de 0,05 a 1.500 mg/l para aminoácidos, de 0,001 a 10 mg/l para vitaminas, de 0 a 200 mg/l para factores lipídicos, de 1 a 20 g/l para fuentes de energía, de 0,1 a 10.000 mg/l para reguladores osmóticos, de 0,1 a 500 mg/l para fuentes de hierro, de 1 a 10.000 mg/l para tampones de pH, de 0,00001 a 200 mg/l para oligoelementos metálicos, de 0 a 5.000 mg/l para tensioactivos, de 0,05 a 10.000 μ g/l para cofactores de crecimiento y de 0,001 a 50 mg/l para nucleósidos. Sin embargo, sus cantidades no están limitadas a estos intervalos y pueden determinarse apropiadamente dependiendo de factores tales como el tipo de célula que se va a cultivar y el tipo de anticuerpo deseado o fragmento del mismo.

30 Además de los componentes anteriormente apuntados, pueden añadirse también al medio oligoelementos metálicos, tensioactivos, cofactores de crecimiento y nucleósidos.

35 Específicamente, pueden darse medios de cultivo que contienen los siguientes componentes: aminoácidos tales como L-alanina, L-arginina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-cisteína, L-cistina, L-glutamina, L-ácido glutámico, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-ornitina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina y L-valina, preferiblemente L-alanina, L-arginina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-cistina, L-glutamina, L-ácido glutámico, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina y L-valina; vitaminas tales como i-inositol, biotina, ácido fólico, ácido lipoico, nicotinamida, ácido nicotínico, ácido p-aminobenzoico, pantotenato de calcio, hidrocloreto de piridoxal, hidrocloreto de piridoxina, riboflavina, hidrocloreto de tiamina, vitamina B12 y ácido ascórbico, preferiblemente biotina, ácido fólico, ácido lipoico, amida de ácido nicotínico, pantotenato de calcio, hidrocloreto de piridoxal, riboflavina, hidrocloreto de tiamina, vitamina B12 y ácido ascórbico; factores lipídicos tales como cloruro de colina, tartrato de colina, ácido linoleico, ácido oleico y colesterol, preferiblemente cloruro de colina; fuentes de energía tales como glucosa, galactosa, manosa y fructosa, preferiblemente glucosa; reguladores osmóticos tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio y nitrato de potasio, preferiblemente cloruro de sodio; fuentes de hierro tales como hierro-EDTA, citrato férrico, cloruro ferroso, cloruro férrico, sulfato ferroso, sulfato férrico y nitrato férrico, preferiblemente cloruro férrico, hierro-EDTA y citrato férrico y tampones de pH tales como hidrogenocarbonato de sodio, cloruro de calcio, hidrogenofosfato de sodio, HEPES y MOPS, preferiblemente hidrogenocarbonato de sodio.

40 Además de los componentes anteriormente apuntados, pueden añadirse oligoelementos metálicos tales como sulfato de cobre, sulfato de manganeso, sulfato de cinc, sulfato de magnesio, cloruro de níquel, cloruro de estaño, cloruro de magnesio y subsulfato de sodio, preferiblemente sulfato de cobre, sulfato de cinc y sulfato de magnesio; tensioactivos tales como Tween 80 y Pluronic F68; cofactores de crecimiento tales como insulina recombinante, IGF-

1 recombinante, EGF recombinante, FGF recombinante, PDGF recombinante, TGF- α recombinante, hidrocloreto de etanolamina, selenito de sodio, ácido retinoico e hidrocloreto de putrescina, preferiblemente selenito de sodio, hidrocloreto de etanolamina, IGF-1 recombinante e hidrocloreto de putrescina y nucleósidos tales como desoxiadenosina, desoxicitidina, desoxiguanosina, adenosina, citidina, guanosina y uridina. En ejemplos preferidos del medio anterior, pueden estar contenidos antibióticos tales como estreptomina, penicilina G de potasio y gentamicina e indicadores de pH tales como rojo fenol.

El pH del medio difiere con la célula para cultivar, pero es un intervalo adecuado generalmente de pH 6,8 a 7,6, más a menudo de pH 7,0 a 7,4.

Como alternativa, pueden usarse también medios de cultivo disponibles comercialmente para células animales. Por ejemplo, pueden enumerarse D-MEM (medio Eagle modificado por Dulbecco), mezcla D-MEM/F-12 1:1 (medio Eagle modificado por Dulbecco: mezcla nutriente F-12), RPMI1640, CHO-S-SFM II (Invitrogen), CHO-SF (Sigma-Aldrich), EX-CELL 301 (JRH Biosciences), CD-CHO (Invitrogen), IS CHO-V (Irvine Scientific) y PF-ACF-CHO (Sigma-Aldrich).

El medio puede ser un medio exento de suero.

Cuando la célula hospedadora es una célula CHO, la célula puede cultivarse mediante métodos conocidos por los especialistas en la materia. Por ejemplo, la célula CHO puede cultivarse en atmósfera con una concentración de CO₂ de 0 a 40 %, preferiblemente de 2 a 10 %, a 30 a 39 °C, preferiblemente aproximadamente a 37 °C.

El periodo de cultivo apropiado de la célula para producir un anticuerpo recombinante deseado o un fragmento del mismo es habitualmente de un día a tres meses, preferiblemente de un día a dos meses, y más preferiblemente de un día a un mes.

El cultivo puede efectuarse usando diversos dispositivos de cultivo para el cultivo de células animales, por ejemplo, un dispositivo de cultivo de tanque tipo fermentador, un dispositivo de cultivo de tipo agitación de aire, un dispositivo de cultivo de tipo matraz de cultivo, un dispositivo de cultivo de tipo matraz de agitación, un dispositivo de cultivo de tipo micromatriz, un dispositivo de cultivo de tipo lecho fluidificado, un dispositivo de cultivo de tipo fibra hueca, un dispositivo de cultivo de tipo botella rotatoria y un dispositivo de cultivo de tipo lecho empaquetado.

El cultivo puede efectuarse mediante cualquier método tal como cultivo en lotes, cultivo semicontinuo, cultivo continuo o similares. Se prefiere el cultivo semicontinuo o cultivo continuo y es más preferible el cultivo semicontinuo.

En lo que respecta a sistemas *in vivo* para producir anticuerpos o fragmentos de los mismos, pueden darse sistemas de producción que usan un animal o una planta. Se introduce un gen de interés en el animal o planta. Se permite entonces al animal o planta producir un polipéptido de interés en su cuerpo, seguido de recuperación del polipéptido. El término "hospedador" usado en la presente memoria incluye dichos animales o plantas.

Cuando se va a usar un animal, están disponibles sistemas de producción que usan un mamífero o un insecto. Los ejemplos de mamíferos que pueden usarse en la presente invención incluyen, pero sin limitación, cabra, cerdo, oveja, ratón y bovinos (Vicki Glaser, "SPECTRUM Biotechnology Applications", 1993). Cuando se va a usar un mamífero, puede emplearse un animal transgénico no humano.

Son conocidos métodos de preparación de animales transgénicos no humanos. Por ejemplo, puede obtenerse un animal transgénico no humano según el método descrito en Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7380-7384 (1980). Específicamente, se introduce un gen de interés en células totipotentes de un mamífero. Se dejan desarrollar estas células en individuos. Se seleccionan aquellos individuos en que el gen introducido se ha integrado en células somáticas no humanas y células germinales no humanas de los individuos resultantes. Por tanto, puede prepararse un animal de interés transgénico no humano. Como células totipotentes no humanas en las que se va a introducir un gen de interés, pueden mencionarse no solo óvulos fertilizados no humanos y embriones tempranos no humanos, sino también células cultivadas tales como célula ES no humana que tiene multipotencia.

Por ejemplo, puede prepararse un gen de interés (en la presente invención, un ADN que codifica la cadena pesada de un anticuerpo o un fragmento de la misma y un ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo o un fragmento de la misma) en forma de un gen de fusión, fusionándolo con un gen que codifica un polipéptido tal como caseína β de cabra, producido específicamente en leche. Se inyectan fragmentos de un ADN que comprenden este gen de fusión en embriones de cabra, que se transplantan entonces a cabras hembra. El polipéptido de interés (en la invención, un anticuerpo IgG1 o un fragmento del mismo) puede recuperarse de leche producida por cabras transgénicas (nacidas de las cabras que han recibido los embriones modificados) o por su descendencia. Para aumentar la cantidad de leche que contiene el polipéptido producido por las cabras transgénicas, pueden administrárseles hormonas apropiadas (Ebert *et al.*, Bio/Technology (1994) 12, 699-702).

Como alternativa, pueden usarse insectos tales como gusanos de seda. Puede usarse un gen que codifica un polipéptido de interés (en la invención, un ADN que codifica la cadena pesada de un anticuerpo o un fragmento de la misma y un ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo o un fragmento de la misma) insertado en baculovirus para transfectar gusanos de seda, y el polipéptido de interés puede recuperarse del fluido corporal de los gusanos

de seda (Susumu *et al.*, Nature (1985) 315, 592-594).

Si se va a usar una planta, puede usarse tabaco. Cuando se usa tabaco, puede insertarse un gen que codifica un polipéptido de interés (en la invención, un ADN que codifica la cadena pesada de un anticuerpo o un fragmento de la misma y un ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo o un fragmento de la misma) en un vector de expresión vegetal tal como pMON 530, que se introduce en una bacteria tal como *Agrobacterium tumefaciens*. Se usa entonces esta bacteria para transfectar una planta de tabaco tal como *Nicotiana tabacum*, y se recupera el polipéptido de interés (en la presente invención, el anticuerpo o un fragmento del mismo) de sus hojas (Julian *et al.*, Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138).

La invención proporciona también una célula cultivada que contiene un mayor número de copias de un ADN exógeno que codifica la cadena ligera de un anticuerpo IgG1 o un fragmento de la misma que el número de copias contenidas en la célula de un ADN exógeno que codifica la cadena pesada del anticuerpo o un fragmento de la misma. La célula cultivada es como se define en las reivindicaciones.

Adicionalmente, la divulgación describe un método de producción de un anticuerpo o un fragmento del mismo que comprende permitir a la célula producir el anticuerpo o fragmento, expresando dicha célula la cadena ligera del anticuerpo o un fragmento de la misma con mayor rendimiento que la cadena pesada del anticuerpo o un fragmento de la misma. Como ejemplo de célula que expresa la cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento de la misma con mayor rendimiento que la cadena pesada del anticuerpo o un fragmento de la misma, puede mencionarse una célula que contiene un número de copias de un ADN exógeno que codifica la cadena ligera del anticuerpo o un fragmento de la misma mayor que el número de copias contenidas en la célula de un ADN exógeno que codifica la cadena pesada del anticuerpo o un fragmento de la misma. Dicha célula es como se describe anteriormente. Al cultivar una célula que expresa la cadena ligera de un anticuerpo o un fragmento de la misma con mayor rendimiento que la cadena pesada del anticuerpo o un fragmento de la misma, es posible permitir a la célula producir el anticuerpo o fragmento del mismo. El medio de cultivo y condiciones de cultivo son como se describen anteriormente.

El anticuerpo producido mediante el método de producción de la invención incluye no solo anticuerpos monoclonales derivados de animales tales como ser humano, ratón, rata, hámster, conejo y mono, sino también anticuerpos recombinantes genéticamente modificados artificialmente tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos biespecíficos. La clase de anticuerpo no está particularmente limitada. La clase de inmunoglobulina reivindicada del anticuerpo es IgG1.

Cuando el anticuerpo se va a usar como producto farmacéutico, se prefiere IgG1. Adicionalmente, el anticuerpo descrito en la presente memoria incluye no solo anticuerpos enteros sino también fragmentos de anticuerpo tales como Fv, Fab, F(ab)2, etc.

El anticuerpo producido mediante el método de la invención puede ligarse adicionalmente con diversas moléculas tales como polietilenglicol (PEG) y usarse como anticuerpo modificado. Dicho anticuerpo modificado puede obtenerse modificando químicamente el anticuerpo resultante. Los métodos para dicha modificación se han establecido ya en la materia.

El anticuerpo anteriormente descrito de la invención puede prepararse mediante métodos bien conocidos por los especialistas en la materia.

Los hibridomas productores de anticuerpo monoclonal pueden prepararse básicamente usando técnicas conocidas como se describen a continuación. Brevemente, se usa el antígeno deseado o una célula que expresa el antígeno deseado como antígeno sensibilizante, seguido de inmunización de células de acuerdo con procedimientos convencionales. Se fusionan entonces los inmunocitos resultantes con células progenitoras conocidas usando procedimientos convencionales para fusión celular, seguido de la selección de células productoras de anticuerpo monoclonal (hibridomas) mediante procedimientos de cribado convencionales. La preparación de hibridomas puede efectuarse según, por ejemplo, el método de Milstein *et al.* (Kohler, G y Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46). Cuando la inmunogenicidad del antígeno usado es baja, el antígeno puede conjugarse con una macromolécula inmunogénica (por ejemplo, albúmina) antes del uso en inmunización.

Adicionalmente, se clonan genes de anticuerpo de hibridomas, se integran en vectores apropiados y se transfieren entonces a hospedadores para obtener así anticuerpos genéticamente recombinantes producidos con tecnología de recombinación génica (véase, por ejemplo, Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, "THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES", publicado en el Reino Unido por MACMILLAN PUBLISHERS LID, 1990). Específicamente, se sintetiza un ADNc del dominio variable (dominio V) de un anticuerpo de interés a partir de ARNm de hibridoma usando transcriptasa inversa. Una vez se obtiene el ADN que codifica el dominio V del anticuerpo de interés, se liga el ADN con un ADN que codifica el dominio constante (dominio C) del anticuerpo y se integra en un vector de expresión. Como alternativa, el ADN que codifica el dominio V del anticuerpo puede integrarse en un vector de expresión portador de un ADN que codifica el dominio C de anticuerpo. Se integra el constructo de ADN en un vector de expresión de modo que el ADN se exprese bajo el control de regiones reguladoras de la expresión, por ejemplo, un potenciador o un promotor. Se transforman entonces las células

hospedadoras con este vector de expresión para la expresión de anticuerpo.

En la presente memoria, es posible usar anticuerpos genéticamente recombinantes (por ejemplo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados) que se modifican artificialmente típicamente con el fin de reducir la antigenicidad heteróloga frente a seres humanos. Estos anticuerpos modificados pueden prepararse mediante métodos conocidos. Un anticuerpo quimérico está compuesto por dominios variables de cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo mamífero no humano (por ejemplo de ratón) y dominios constantes de cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo humano. Los anticuerpos quiméricos pueden obtenerse ligando ADN que codifican dominios variables de anticuerpo de ratón con ADN que codifican dominios constantes de anticuerpo humano, integrando el constructo de ADN resultante en un vector de expresión y transformando el vector en un hospedador para la producción de anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados se denominan también anticuerpos humanos reformados y se obtienen injertando las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo de un mamífero no humano tal como ratón en las regiones determinantes de la complementariedad de un anticuerpo humano. Las técnicas de recombinación génica generales para prepararlos son bien conocidas. Específicamente, se sintetiza una secuencia de ADN diseñada para permitir el ligamiento de las CDR de un anticuerpo de ratón con las regiones estructurales (FR) de un anticuerpo humano mediante PCR a partir de varios oligonucleótidos preparados para tener secciones que se superponen entre sí en los extremos. El ADN resultante se liga con un ADN que codifica los dominios constantes de anticuerpo humano y se integra en un vector de expresión, seguido de transformación en un hospedador para la producción de anticuerpo (véanse la publicación de patente europea nº EP 239400 y la publicación internacional de patente nº WO 96/02576). Las FR del anticuerpo humano ligadas a través de las CDR se seleccionan de tal manera que las regiones determinantes de la complementariedad formen un sitio de unión a antígeno apropiado. Si es necesario, los anticuerpos humanizados reformados pueden tener algunos cambios aminoacídicos en las regiones estructurales de las regiones variables, de modo que las regiones determinantes de la complementariedad formen un sitio de unión a antígeno apropiado (Sato, K. *et al.*, Cancer Res. (1993) 53, 851-856).

Son también conocidos procedimientos para obtener anticuerpos humanos. Por ejemplo, se sensibilizan linfocitos humanos *in vitro* con un antígeno deseado o una célula que exprese el antígeno deseado y se fusionan entonces los linfocitos sensibilizados con células de mieloma humano (por ejemplo U266), proporcionando un anticuerpo humano deseado que tiene actividad de unión al antígeno (véase la publicación de patente japonesa nº 01-59878). Como alternativa, puede inmunizarse un animal transgénico no humano que tenga todo el repertorio de genes de anticuerpo humanos con un antígeno, obteniéndose un anticuerpo humano deseado (véanse las publicaciones internacionales nº WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096 y WO 96/33735). Son también conocidos métodos para la obtención de un anticuerpo humano mediante inmunopurificación con una colección de anticuerpos humanos. Por ejemplo, pueden seleccionarse fagos que se unen a un antígeno expresando las regiones variables de un anticuerpo humano como fragmentos de anticuerpo monocatenarios (scFv) sobre las superficies de fago mediante un método de presentación en fago. Analizando los genes de los fagos seleccionados, es posible determinar las secuencias de ADN que codifican las regiones variables del anticuerpo humano que se unen al antígeno. Una vez se determinan las secuencias de ADN de los fragmentos de scFv que se unen al antígeno, es posible preparar un vector de expresión apropiado que comprenda la secuencia de ADN y obtener un anticuerpo humano. Estos métodos son ya bien conocidos y pueden encontrarse en los documentos WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438 y WO 95/15388.

El anticuerpo o un fragmento del mismo obtenido como se describe anteriormente pueden purificarse hasta homogeneidad. El aislamiento y purificación del anticuerpo o un fragmento del mismo pueden efectuarse mediante métodos de aislamiento/purificación usados para polipéptidos convencionales. Por ejemplo, el anticuerpo puede aislarse y purificarse seleccionando y combinando apropiadamente columnas de cromatografía (tales como cromatografía de afinidad), filtros, ultrafiltración, desalado, diálisis, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, enfoque isoeléctrico, etc. ("Antibodies: A Laboratory Manual". Ed Harlow and David Lane, Cold, Spring Harbor Laboratory, 1988), pero no está limitado a los apuntados anteriormente. La concentración del anticuerpo así obtenido puede determinarse midiendo la absorbancia o mediante ensayo de inmunosorción ligado a enzima (ELISA).

Como columnas para usar en cromatografía de afinidad, pueden mencionarse la columna de proteína A y la columna de proteína G. Los ejemplos de columnas de proteína A incluyen Hyper D, POROS y Sepharose F. F. (Pharmacia).

Las cromatografías distintas de la cromatografía de afinidad incluyen, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel, cromatografía en fase inversa y cromatografía de adsorción ("Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual". Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Estas cromatografías pueden efectuarse en forma de cromatografía líquida tal como HPLC o FPLC.

También es posible tratar el polipéptido producido con una enzima modificadora de polipéptidos apropiada antes o después de purificar, para añadir así una modificación deseada o para retirar parcialmente un péptido. Las enzimas modificadoras de polipéptidos incluyen tripsina, quimotripsina, lisil endopeptidasa, proteína cinasa, glucosidasa, etc.

Cuando el anticuerpo IgG1 o un fragmento del mismo producido mediante el método de la invención tiene una actividad biológica aplicable como producto farmacéutico, es posible preparar productos farmacéuticos mezclando y formulando el polipéptido con portadores o aditivos farmacéuticamente aceptables.

5 Estos portadores o aditivos farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, agua, disolventes orgánicos farmacéuticamente aceptables, colágeno, polivinilalcohol, polivinilpirrolidona, polímero de carboxivinilo, carboximetilcelulosa de sodio, poliacrilato de sodio, alginato de sodio, dextrano hidrosoluble, carboximetilalmidón de sodio, pectina, metilcelulosa, etilcelulosa, goma de xantana, goma arábica, caseína, agar, polietilenglicol, diglicerol, glicerol, propilenglicol, vaselina, parafina, alcohol estearílico, ácido esteárico, seroalbúmina humana (HSA), manitol, sorbitol, lactosa y tensioactivos farmacéuticamente aceptables.

10 Los portadores o aditivos pueden seleccionarse solos o en una combinación adecuada de las sustancias anteriormente apuntadas dependiendo de la forma de dosificación del producto farmacéutico de la invención. Debería darse por hecho que los portadores o aditivos no están limitados a los apuntados anteriormente. Por ejemplo, cuando el polipéptido descrito en la presente memoria se usa como preparación para inyección, el polipéptido purificado puede disolverse en un disolvente (tal como disolución salina fisiológica, tampón o disolución de glucosa), seguido de la adición a la disolución de un agente inhibidor de la absorción tal como Tween80, Tween20, gelatina o seroalbúmina humana. Como alternativa, el polipéptido descrito en la presente memoria puede liofilizarse, dando una forma de dosificación que puede disolverse para reconstitución antes del uso. Como excipientes para liofilización, pueden usarse alcoholes de azúcar y azúcares tales como manitol y glucosa.

20 La dosis eficaz del anticuerpo o un fragmento del mismo se selecciona apropiadamente dependiendo del tipo de anticuerpo o fragmento del mismo, del tipo de enfermedad que se va a tratar o prevenir, de la edad del paciente, de la gravedad de la enfermedad, etc. Por ejemplo, cuando el anticuerpo es anticuerpo antiglipicano 3 y se usa como agente anticanceroso, la dosis eficaz del anticuerpo se selecciona dentro del intervalo de 0,001 a 1000 mg/kg de peso corporal por administración. Como alternativa, puede seleccionarse una dosis de 0,01 a 100.000 mg/kg de peso corporal. Sin embargo, la dosis no está limitada a estos niveles.

25 La administración del anticuerpo o un fragmento del mismo puede ser oral o parenteral, pero es preferible la administración parenteral. Específicamente, pueden enumerarse la inyección (administración sistémica o local por inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea), la administración nasal, administración pulmonar, administración transdérmica o similar.

Ejemplos

30 De aquí en adelante en la presente memoria, se describirá la invención específicamente con referencia a los ejemplos.

Ejemplo 1

Preparación del plásmido de expresión de anticuerpo humanizado anti-glipicano 3 humano

35 En primer lugar, se preparó como se describe a continuación el gen de cadena pesada de anticuerpo humanizado anti-glipicano 3 humano. Se usó un fragmento de glipicano 3 (obtenido expresando un gen de proteína de fusión con GST por PCR) para inmunizar ratones (MRL/lpr, Charles River Japan). Se prepararon células de hibridoma usando esplenocitos de estos ratones. Se cribaron las células de hibridoma por ELISA usando glipicano 3 como antígeno, seleccionando así aquellos clones que producían anticuerpos de unión a glipicano 3. Se extrajo el ARNm de las células de hibridoma y se preparó el ADNc mediante transcripción inversa con transcriptasa inversa. Se amplificó el gen del dominio variable de cadena pesada de anti-glipicano 3 de ratón por PCR usando el ADNc y un cebador (CAGGGGCCAGTGGATAGACCGATG) (SEQ ID NO: 1) que tiene una secuencia nucleotídica complementaria del gen del dominio variable de cadena pesada de ratón, y se obtuvo ligando en pGEM-T easy (Promega). Se buscó el gen del dominio variable de cadena pesada de anticuerpo humano que tiene homología con las regiones estructurales del gen del dominio variable de cadena pesada de anti-glipicano 3 de ratón y se identificó usando la base de datos Kabat. Se diseñó y sintetizó por PCR la secuencia nucleotídica de un gen del dominio variable de cadena pesada de anti-glipicano 3 humanizado en el que cada porción estructural del gen del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo humano identificado se ligaba a cada porción de CDR del dominio variable de cadena pesada de anti-glipicano 3 de ratón. Se ligó el gen del dominio variable de cadena pesada de anti-glipicano 3 humanizado con el gen del dominio constante de IgG1 humano, seguido de optimización mediante sustitución aminoacídica. Por tanto, se preparó el gen de cadena pesada de anti-glipicano 3 humanizado (véase el documento WO06/06693). Se ligó el gen de cadena pesada del anticuerpo humanizado anti-glipicano 3 humano en dirección 3' del promotor CAG, y se ligó la señal poliA de globina β de ratón en dirección 3' de este gen de cadena pesada, para preparar así una unidad de expresión de cadena pesada. Es posible escindir la unidad de expresión de cadena pesada usando los sitios de restricción BamBI e HindIII en dirección 5' de la unidad de expresión y el sitio de restricción XhoI en dirección 5' de la unidad de expresión.

Posteriormente, se preparó como se describe a continuación el gen de cadena ligera del anticuerpo humanizado anti-glipicano 3 humano. Brevemente, se inmunizaron ratones con un fragmento de glipicano 3. Se prepararon células de hibridoma usando esplenocitos de estos ratones. Se cribaron las células de hibridoma por ELISA usando

glipicano 3 como antígeno para seleccionar así aquellos clones que producían anticuerpos de unión a glipicano 3. Se extrajo el ARNm de las células de hibridoma y se preparó el ADNc mediante transcripción inversa con transcriptasa inversa. Se amplificó el gen del dominio variable de cadena ligera de anti-glipicano 3 por PCR usando el ADNc y un cebador (GCTCACTGGATGGTGGGAAGATG) (SEQ ID NO: 2) que tiene una secuencia nucleotídica complementaria del gen del dominio variable de cadena ligera de ratón, y se obtuvo por ligamiento en pGEM-T Easy (Promega). Se buscó el gen del dominio variable de cadena ligera de anticuerpo humano que tiene homología con las regiones estructurales del gen del dominio variable de cadena ligera de anti-glipicano 3 de ratón y se identificó usando la base de datos Kabat. Se diseñó y sintetizó por PCR la secuencia nucleotídica de un gen del dominio variable de cadena ligera de anti-glipicano 3 humanizado en el que cada porción estructural del gen del dominio variable de cadena ligera de anticuerpo humano identificado estaba ligado a cada porción de CDR del dominio variable de cadena ligera de anti-glipicano 3 de ratón. Se ligó el gen del dominio variable de cadena ligera de anti-glipicano 3 humanizado con el gen del dominio constante κ de IgG humana, seguido de optimización mediante sustitución aminoacídica. Por tanto, se preparó el gen de cadena ligera de anti-glipicano 3 humanizado (véase el documento WO06/06693). Se ligó el gen de cadena ligera del anticuerpo humanizado anti-glipicano 3 humano en dirección 3' del promotor CAG y se ligó la señal poliA de globina β de ratón en dirección 3' de este gen de cadena ligera, para preparar así una unidad de expresión de cadena ligera. Es posible escindir la unidad de expresión de cadena ligera con HindIII.

Se ligaron el plásmido INPEP4 (IDEC) digerido con BamHI y XhoI y la unidad de expresión de cadena pesada para preparar así pINP-GC33-H1. Se ligaron pINP-GC33-H1 digerido con HindIII y la unidad de expresión de cadena ligera escindida con HindIII. Mediante estas operaciones, se prepararon los dos siguientes plásmidos: el plásmido de expresión de una copia de cadena L phGC33CAG#1, que retiene una copia de la unidad de expresión de cadena ligera y una copia de la unidad de expresión de cadena pesada por plásmido, y el plásmido de expresión de dos copias de cadena L phGC33CAG1, que retiene dos copias de la unidad de expresión de cadena ligera y una copia de la unidad de expresión de cadena pesada por plásmido (Fig. 1)

Ejemplo 2

Preparación de clones celulares de expresión estable de anticuerpo humanizado anti-glipicano 3 humano

Se introdujeron phGC33CAG#1 o phGC33CAG1 en la cepa DXB11 de la célula CHO por electroporación. Se seleccionaron aquellos clones que comprendían el plásmido de expresión introducido en los mismos mediante cultivo de las células en presencia de G418 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se cultivaron adicionalmente los clones seleccionados en presencia de MTX 10-100 nM con fines de amplificación génica del plásmido de expresión.

Se obtuvieron clones celulares transformados con plásmido de expresión de una copia de cadena L (N= 4) y clones celulares transformados con plásmido de expresión de dos copias de cadena L (N= 5). Se compararon estos clones por cultivo en lotes en matraces de 125 ml. Se efectuó el cultivo en las siguientes condiciones: volumen del caldo de cultivo: 50 ml; densidad celular inicial: 2×10^5 células/ml; temperatura de cultivo: 37 °C y velocidad de agitación: 110 rpm. Los días 3, 5, 6 y 7 de cultivo se midieron y compararon las concentraciones de anticuerpo en el caldo de cultivo. El rendimiento de anticuerpo el día 7 era de aproximadamente 60-260 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en los clones celulares transformados con plásmido de expresión de una copia de cadena L (N= 4). Por otro lado, el rendimiento de anticuerpo el día 7 era de aproximadamente 420-690 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en clones celulares transformados con plásmido de expresión de dos copias de cadena L (N= 5). El rendimiento de anticuerpo de los clones celulares transformados con plásmido de expresión de dos copias de cadena L era más de dos veces mayor que el de los clones celulares transformados con plásmido de expresión de una copia de cadena L (Fig. 2).

Se confirmó por los resultados anteriores que el rendimiento de anticuerpo puede potenciarse introduciendo en una célula hospedadora los genes de cadena pesada y cadena ligera a una relación génica de cadena pesada:cadena ligera de 1:2, en contraposición a la relación de 1:1 usada en procesos convencionales.

Ejemplo 3

Preparación de clones celulares de expresión estable de anticuerpo humanizado anti-IL-6R humano

Se ligaron promotores CAG en dirección 5' del gen de cadena pesada de anticuerpo humanizado anti-IL-6R humano y del gen de cadena ligera de anticuerpo humanizado anti-IL-6R humano (ambos dados a conocer en el documento W092/019759), respectivamente. Posteriormente, se ligaron señales de poliA de globina β de ratón en dirección 3' de los dos genes, respectivamente. Por tanto, se prepararon una unidad de expresión de cadena pesada y una unidad de expresión de cadena ligera. La unidad de expresión de cadena pesada y la unidad de expresión de cadena ligera se ligaron con pBluescript que integraba el gen de resistencia a neomicina y *dhfr*; como resultado, se prepararon un plásmido de expresión compuesto por una copia de la cadena pesada del gen de anticuerpo humanizado anti-IL-6R humano y una copia de la cadena ligera, y un plásmido de expresión de dos copias de cadena L compuesto por una copia de la cadena pesada y dos copias de la cadena ligera (Fig. 3). Se introdujeron estos plásmidos en la cepa DXB11 de la célula CHO por electroporación. Se seleccionaron aquellos clones que comprendían el plásmido de expresión introducido en los mismos cultivando posteriormente las células en presencia de G418 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

5 Se obtuvieron clones celulares transformados con plásmido de expresión de una copia de cadena L (N= 176) y clones celulares transformados con plásmido de expresión de dos copias de cadena L (N= 176). Se compararon estos clones en cultivo por lotes en placas de 24 pocillos. Se efectuó el cultivo en las siguientes condiciones: volumen de caldo de cultivo: 0,7 ml; temperatura de cultivo: 37 °C y velocidad de agitación: 160 rpm. El día 12 de cultivo, se midieron las concentraciones de anticuerpo en el caldo de cultivo. Después de disponer los clones por rendimiento de anticuerpo, se compararon los dos grupos de clones (Fig. 4). Generalmente, el rendimiento de anticuerpo de células transformadas con plásmido de expresión de dos copias de cadena L era mayor que el de células transformadas con plásmido de expresión de una copia de cadena L.

10 Se confirmó a partir de los resultados anteriores que el rendimiento de anticuerpo puede potenciarse introduciendo en una célula hospedadora los genes de cadena pesada y cadena ligera a una relación génica de cadena pesada:cadena ligera de 1:2, en contraposición con la relación de 1:1 usada en procesos convencionales.

La presente invención es aplicable a todas las células productoras de anticuerpo.

Aplicabilidad industrial

La invención es aplicable a la producción de anticuerpo de IgG1.

15 **Texto libre del listado de secuencias**

<SEQ ID NO: 1>

La SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de un cebador que tiene una secuencia nucleotídica complementaria del gen del dominio variable de cadena pesada de ratón.

20 La SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de un cebador que tiene una secuencia nucleotídica complementaria del gen del dominio variable de cadena ligera de ratón.

Listado de secuencias

<110> Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha

25 <120> Un método de preparación de anticuerpos

<130> FP-122PCT

<150> JP P2008-103308

30 <151> 2008-04-11

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

35 <210> 1

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

40 <220>

<223> cebador

<400> 1

45 caggggccag tggatagacc gatg 24

<210> 2

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de un anticuerpo IgG1, o un fragmento del mismo, que comprende permitir que una célula animal produzca el anticuerpo o fragmento, en el que la célula animal contiene un número de copias de un ADN exógeno que codifica la cadena ligera del anticuerpo o un fragmento de la misma mayor que el número de copias contenidas en la célula animal de un ADN exógeno que codifica la cadena pesada del anticuerpo o un fragmento de la misma, y es una célula animal en la que se ha introducido un vector que comprende una copia de un ADN que codifica la cadena pesada del anticuerpo o un fragmento de la misma y dos o más copias de un ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo o un fragmento de la misma, en donde dicho vector comprende una unidad de expresión que consiste en un promotor, dicho ADN exógeno que codifica la cadena pesada o un fragmento de la misma, y una señal poliA, y en el que dicho vector comprende dos o más unidades de expresión que consisten en un promotor, dicho ADN exógeno que codifica la cadena ligera o un fragmento de la misma, y una señal poliA.
2. El método según la reivindicación 1, en el que la célula es una de ovario de hámster chino.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado o anticuerpo humano.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo consistente en anticuerpo anti-receptor de IL-6, anticuerpo anti-IL6, anticuerpo anti-glicoproteína 3, anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD20, anticuerpo anti-GPIIb/IIIa, anticuerpo anti-TNF, anticuerpo anti-CD25, anticuerpo anti-EGFR, anticuerpo anti-Her2/neu, anticuerpo anti-RSV, anticuerpo anti-CD33, anticuerpo anti-CD52, anticuerpo anti-IgE, anticuerpo anti-CD11a, anticuerpo anti-VEGF y anticuerpo anti-VLA4.
5. Un vector recombinante que comprende una copia de un ADN que codifica la cadena pesada o un fragmento de la misma de un anticuerpo IgG1 y dos o más copias de un ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo o un fragmento de la misma, en donde dicho vector comprende una unidad de expresión que consiste en un promotor, dicho ADN exógeno que codifica la cadena pesada o un fragmento de la misma, y una señal poliA, y en el que dicho vector comprende dos o más unidades de expresión que consisten en un promotor, dicho ADN que codifica la cadena ligera o un fragmento de la misma, y una señal poliA.
6. Una célula animal para uso como sistema de producción para preparar o expresar un anticuerpo IgG1 o un fragmento del mismo que tiene el vector según la reivindicación 5.
7. Una célula animal cultivada para uso como sistema de producción para preparar o expresar un anticuerpo IgG1 o un fragmento del mismo que tiene un vector que comprende una copia de un ADN que codifica la cadena pesada de un anticuerpo IgG1 o un fragmento de la misma y dos o más copias de un ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo o un fragmento de la misma, en donde dicho vector comprende una unidad de expresión que consiste en un promotor, dicho ADN exógeno que codifica la cadena pesada o un fragmento de la misma, y una señal poliA, y en el que dicho vector comprende dos o más unidades de expresión que consisten en un promotor, dicho ADN que codifica la cadena ligera o un fragmento de la misma, y una señal poliA.
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la célula expresa establemente el anticuerpo o el fragmento del mismo.
9. La célula animal según la reivindicación 6 o 7, que expresa establemente el anticuerpo o el fragmento del mismo.

Fig. 1

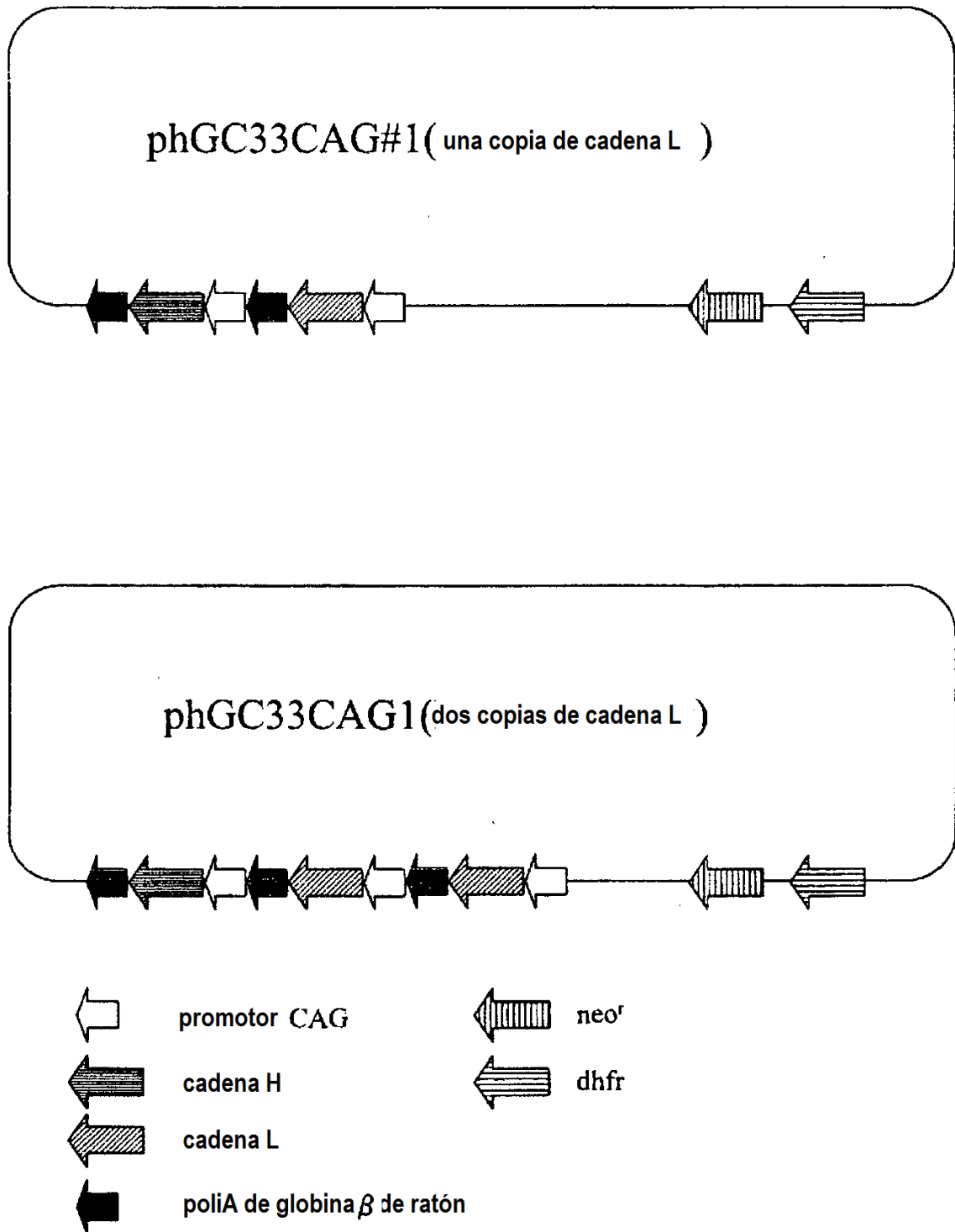


Fig. 2

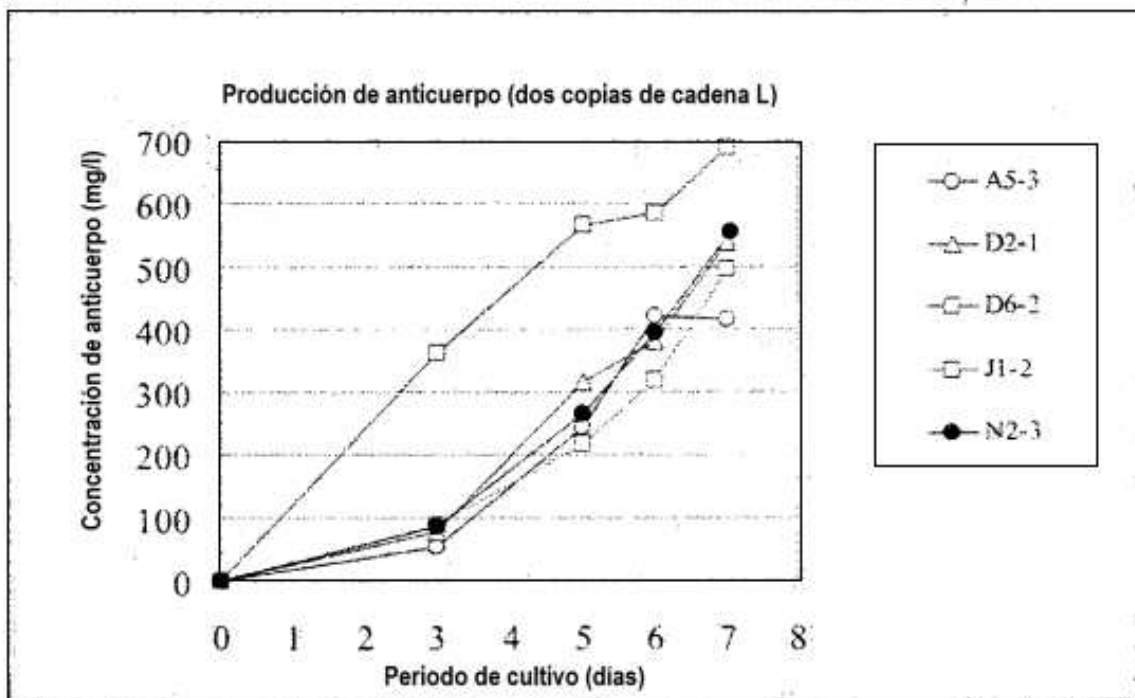
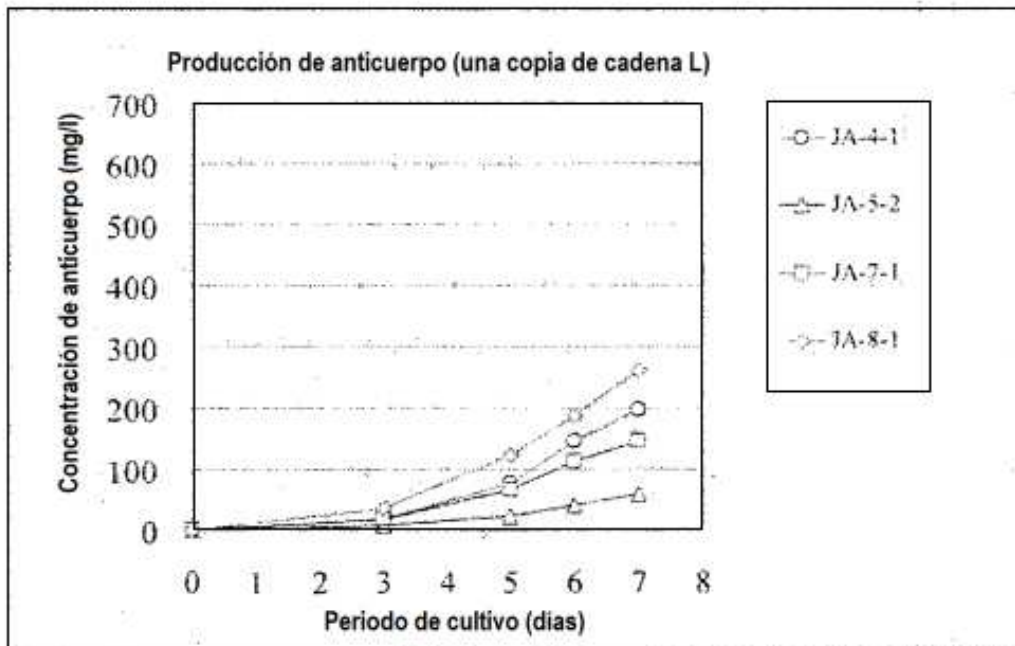
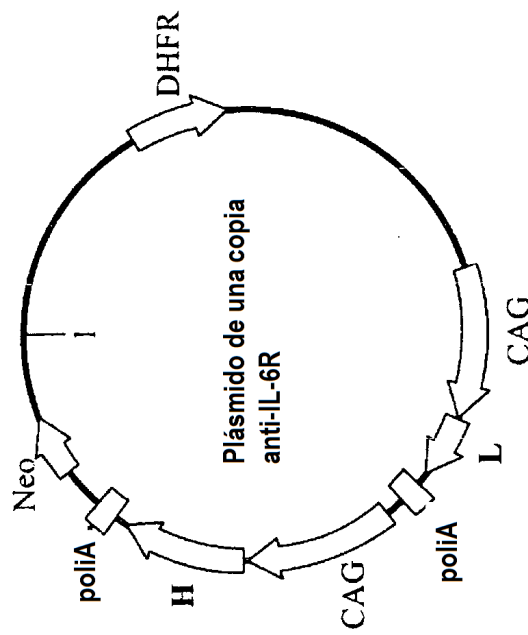
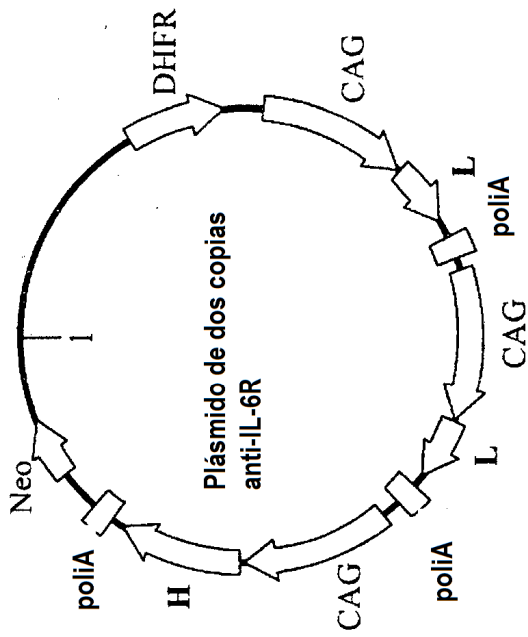


Fig. 3



CAG: Promotor CAG
 L: ADNc de cadena ligera de anticuerpo anti-IL-6R
 H= ADNc de cadena pesada de anticuerpo anti-IL-6R
 PolIA: señal de polIA
 Neo: neo'

Fig. 4

