



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 350 248**

51 Int. Cl.:
C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06002567 .3**

96 Fecha de presentación : **01.10.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1652920**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.05.2006**

54 Título: **Procedimiento de producción de bibliotecas de proteínas y de selección de proteínas a partir de las mismas.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.01.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.01.2011

73 Titular/es: **DEUTSCHES
KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES
ÖFFENTLICHEN RECHTS
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es: **Moldenhauer, Gerhard;
Breitling, Frank;
Kuhlwein, Thorsten;
Poustka, Annemarie y
Luttgau, Sandra**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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).

Procedimiento de producción de bibliotecas de proteínas
y de selección de proteínas a partir de las mismas

5 Descripción

La presente invención se refiere a un procedimiento caracterizado con mayor detalle en las reivindicaciones para la humanización de una célula de hibridoma. La presente invención se refiere, pues, a un procedimiento de humanización de
10 una célula de hibridoma, caracterizado porque:

(a) se transfecta a una línea celular de hibridoma una secuencia de DNA que codifica a uno o más dominios constantes de las IgG, IgM, IgA, IgD o IgE humanas;

(b) la secuencia de DNA de los dominios constantes de
15 las IgG, IgM, IgA, IgD o IgE humanas se flanquea con secuencias de DNA, que son homólogas con las regiones genéticas cromosómicas, que flanquean los dominios constantes del locus de gen activo de dichas células de hibridoma, que codifican la cadena larga del anticuerpo;

20 (c) se expande una o pocas células, que gracias a la recombinación homóloga expresan una cadena larga de IgG, IgM, IgA, IgD o IgE con una porción constante humanizada;

(d) se transfecta a la línea celular de hibridoma una secuencia de DNA que codifica a un dominio constante kappa o
25 lambda humano, dicha secuencia de DNA está flanqueada por secuencias de DNA que son homólogas con las regiones genéticas cromosómicas, que flanquean el dominio constante kappa o

lambda del locus de gen kappa o lambda activo de la célula de hibridoma;

(e) a continuación se expanden una o pocas células, que por una recombinación homóloga expresan una cadena kappa o
5 lambda con una porción constante humanizada;
con lo cual los anticuerpos expresados por la unión covalente de a variante de empalme situada en la membrana de la cadena larga de anticuerpo están unidos a la superficie de las células correspondientes que los han expresado, lo cual permite
10 la detección y la selección de las células en cuestión, que presentan dominios constantes de anticuerpo humanizados.

Hasta ahora se han realizado múltiples intentos encaminados a la producción de anticuerpos que tengan la especificidad deseada, en un rendimiento elevado y con buena compatibilidad humana, en especial anticuerpos destinados a agentes
15 terapéuticos, a continuación se describen brevemente los procedimientos individuales.

Anticuerpos de hibridoma. En la década de los años setenta, Köhler y Milstein desarrollaron un método para la producción de anticuerpos, la técnica del hibridoma (Köhler y
20 Milstein, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity; Nature 256, 495-497, 1975). Requiere en primer lugar la inmunización de un animal de ensayo (por lo general un ratón o una rata). A continuación se
25 extraen el bazo o ganglios linfáticos y se obtienen los linfocitos B (materiales previos de la síntesis de células productoras de anticuerpos), que existen en ellos en gran número. Debido a "su" reordenamiento genético individual, cada

linfocito B produce anticuerpos que tienen una única especificidad de unión. Los descendientes de este linfocito B, los clones de linfocito B, producen exclusivamente anticuerpos que tienen esta especificidad de unión.

5 Algunas de las células obtenidas del bazo de un animal inmunizado producen anticuerpos de la especificidad deseada. Para poderlos producir "in vitro", se tienen que multiplicar los linfocitos B en un cultivo celular. Esto se consigue fusionándolos con células de mieloma, derivadas de un tumor de
10 células plasmáticas. Las células de hibridoma resultantes tienen las propiedades de los dos componentes fusionados: por un lado tienen la inmortalidad de las células cancerosas, por lo lado producen el correspondiente anticuerpo del componente linfocito B. Los descendientes de una célula de hibridoma
15 individual (es decir, su clon) producen anticuerpos que tienen una especificidad definida. Por ello, estos anticuerpos se denominan anticuerpos monoclonales. La técnica de la producción de hibridomas se representa esquemáticamente en la figura 1. Una ventaja de los anticuerpos monoclonales con
20 respecto a los anticuerpos policlonales estriba en que pueden producirse en cantidades en principio ilimitadas gracias a las células que ahora son inmortales.

Inconvenientes. Con la anterior técnica de hibridoma se inmunizan ratones y después se fusionan los linfocitos B de
25 ratón con una línea celular de mieloma. Las células de hibridoma así formadas se propagan después por separado en forma de clones individuales de células y se analiza el líquido sobrenadante de los clones individuales para determinar si

tiene la especificidad de anticuerpo deseada. Los clones individuales identificados tienen que subclonar a continuación de modo inmediato en una segunda ronda de selección, ya que en esta fase temporal son genéticamente inestables.

5 Este procedimiento requiere mucha dedicación de tiempo, de modo que a fin de cuentas solamente podrán verificarse como máximo algunos millares de clones de hibridoma y determinar si tienen la especificidad deseada. La construcción y la exploración de una biblioteca de hibridomas con esta técnica solamente son posibles de forma muy limitada. Por ello,
10 la automatización de este procedimiento es muy difícil. Esta técnica convencional no permite la producción de anticuerpos humanos.

Razas de ratones, que producen anticuerpos de hibridomas humanos.
15 Un caso especial son los anticuerpos de hibridomas humanos, que se obtienen de ratones transgénicos, cuyo lugar o locus de gen de inmunoglobulina se reemplaza por porciones del locus de gen de inmunoglobulina humana (Jakobovits, Production of fully human antibodies by transgenic mice; Curr. Opin. Biotechnol. 6, 561-566, 1995; Lonberg y Huszar, Human antibodies from transgenic mice; Int. Rev. Immunol. 13, 65-93, 1995; Kucherlapati y col., patente US-6114598: Generation of xenogeneic antibodies). Los genes de anticuerpos humanos se reordenan, sufren un cambio de clase
20 (class switch) y una hipermutación somática. Estos ratones transgénicos producen, pues, anticuerpos humanos en células de ratones, que (a diferencia de las células de hibridomas humanos) conducen a hibridomas murinos estables.

Inconvenientes. Es cierto que con esta técnica se pueden producir anticuerpos humanos, pero esta técnica es tan laboriosa y complicada como la técnica de los hibridomas antes debatida. Hasta el presente se sabe muy poco de la calidad real de las razas de ratones transgénicos que se generan. Por ello se han formulado preguntas como las siguientes: ¿Interfieren los anticuerpos humanizados en otras señales de los ratones? ¿Qué calidad tiene la respuesta inmune de los ratones? ¿Cuántos genes de anticuerpo funcionan / están en el genoma del ratón? Etc. Por consiguiente, actualmente no está claro si estos "ratones humanizados" podrán satisfacer las esperanzas que se han puesto en ellos.

Anticuerpos de hibridoma humanizados. Ya se dispone de un gran número de anticuerpos de hibridoma de ratón que son potencialmente interesantes desde el punto de vista terapéutico. Pero un problema para su utilización terapéutica estriba en su origen murino, ya que el sistema inmune humano detecta como ajenas las proteínas de una especie ajena. Esto se aplica también a los anticuerpos de ratón. Surge la llamada respuesta inmune "HAMA" (anticuerpos humanos anti-ratón). En pocos días, los anticuerpos generados por el sistema inmune humano suelen neutralizar los anticuerpos de ratón empleados con fines terapéuticos y los convierten en ineficaces. Por lo tanto, una terapia reiterada solo es posible con muchas limitaciones (Courtenay-Luck y col., Development of Primary and Secondary Immune Responses to Mouse Monoclonal Antibodies Used in the Diagnosis and Therapy of Malignant Neoplasms; Cancer Res. 46, 6489-6493, 1986; Lamers y col., Inhibition of

bispecific monoclonal antibody (bsAb) targeted cytotoxicity by human anti-mouse antibodies in ovarian carcinoma patients treated with bsAb targeted activated T lymphocytes; Int. J. Cancer 60, 450-457, 1995).

5 La gran mayoría de anticuerpos HAMA va dirigida contra la porción constante de los anticuerpos, razón por la cual se ha pasado a la producción de anticuerpos quiméricos. Estos contienen un dominio variable de anticuerpo de ratón, al que siguen los dominios constantes de anticuerpo humano. Para
10 ello se coloca en primer lugar un gen de anticuerpo humano en un vector de clonación (Wright y col., Genetically engineered Antibodies: Progress and Prospects; Critical Rev. Immunol. 12, 125-168, 1992). Los distintos dominios del anticuerpo forman unidades compactas de plegado, que están unidades en-
15 tre sí mediante una hebra peptídica. Si se reemplazan dominios completos de anticuerpo, las posibilidades de fallo del funcionamiento de los anticuerpos serán mínimas. Con la invención de la PCR es posible sin ningún problema la producción de cDNA quiméricos, porque con esta técnica se simplifi-
20 can notablemente las clonaciones exactas. Los anticuerpos quiméricos resultantes se siguen fijando sobre el antígeno, pero se reduce en gran manera la respuesta HAMA.

 Pero más importante que la reacción HAMA es todavía otro punto: dado que los dominios constantes proceden ahora
25 del hombre, estos anticuerpos quiméricos activan también mucho mejor algunas funciones del auxiliar (helper), como son la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) o la activación de complemento. Esta es otra razón, por la que

algunos de tales anticuerpos humanizados ya se están utilizando clínicamente (McLaughlin y col., Clinical status and optimal use of Rituximab for B-cell lymphomas; Oncology 12, 1763-1777, 1998).

5 Inconvenientes. También la humanización de anticuerpos de hibridoma ya existentes es muy laboriosa y requiere mucha dedicación de tiempo. Además a menudo suele ser también problemática la estabilidad de los hibridomas así obtenidos: las células mutan o secretan pocos anticuerpos al medio.

10 Humanización por recombinación homóloga. En la patente US-5202238 se describe un método, con el que se pueden humanizar los anticuerpos murinos monoclonales. La parte central del método consiste en la llamada "recombinación homóloga". Con ella se recombinan secuencias humanas, flanqueadas por
15 secuencias murinas genómicas apropiadas, en una posición exacta del locus activo del anticuerpo. La gran ventaja de este método está en que se conservan en su mayor parte las señales del locus del anticuerpo optimizadas para una buena producción de anticuerpo (Yarnold y Fell, Chimerization of
20 antitumor antibodies via homologous recombination conversion vectors; Cancer Research 54, 506-512, 1994; Fell y col., Homologous recombination in hibridoma cells: heavy chain chimeric antibody produced by gene targeting; PNAS 86, 8507-8511, 1989).

25 Inconvenientes. De modo similar a la generación de hibridomas, en este procedimiento se requiere mucha dedicación de tiempo antes de poder aislar un solo hibridoma humanizado. Millares de clones tienen que cultivarse por separado

y analizarse. Otro inconveniente deriva del marcador de selección empleado: este conduce al parecer a un número elevado de revertidos (el locus del anticuerpo humano recombinado se recorta de nuevo en la reacción inversa) y/o a una merma del nivel de expresión (Baker y col., J. Immunological Methods 168, 25-32, 1994). Por otro lado, los genes de resistencia empleados impiden la presentación de los anticuerpos en la superficie, cuando se incorporan al intrón entre el exón CH3 y el exón M1 de una IgG.

10 Anticuerpos recombinantes. En los últimos años, con la construcción de los anticuerpos recombinantes se ha abierto una nueva vía para la producción de fragmentos de anticuerpo basada en métodos de tecnología genética (Breitling y Dübel, 1997, "Rekombinante Antikörper", editorial Spektrum, ISBN 3-15 8274-0029-5). En este método ya no se generan los anticuerpos en un animal experimental (ni en el organismo humano), sino "in vitro", en bacterias o en un cultivo celular. Para ello es esencial la parte del anticuerpo que se une al antígeno. Por lo general, con el fin de conseguir un buen rendimiento, se prescinde del resto de la molécula del anticuerpo. Estos fragmentos ya no pueden transmitir de modo natural todas las funciones de un anticuerpo obtenido de forma natural. Pero trabajando así se pueden fusionar de modo relativamente fácil con enzimas o con otros anticuerpos. Estos anticuerpos recom-
25 binantes adquieren así propiedades completamente nuevas. El término "anticuerpos recombinantes" indica un fragmento de anticuerpo producido "in vitro" por tecnología genética, que

por lo demás se define exclusivamente por su especificidad de antígeno.

Inconvenientes. A los anticuerpos recombinantes les falta la parte constante de anticuerpo y, por tanto, las funciones efectoras que son esenciales para muchos usos terapéuticos. Por consiguiente, para muchos usos se "injertan" "cabezas buscadoras de anticuerpo" de nueva creación en los vectores eucariotas de expresión, es decir, se emplea el método antes descrito que requiere mucha dedicación de trabajo.

10 Aparte del trabajo experimental requerido, puede suceder que se obtenga una mala expresión, porque en el sistema bacteriano hay otros codones que pueden ser más preferidos que en los sistemas eucariotas. Otro inconveniente deriva de las propiedades de los anticuerpos de "cadena simple" (scFv) que se

15 emplean con mayor frecuencia: por lo general son relativamente inestable y se agregan con facilidad. Además, parece que muchos dominios variables son atacados por las proteasas de la *E. coli*. Por consiguiente, deberán considerarse con precaución las complejidades publicadas de las bibliotecas de

20 anticuerpos scFv (hasta 10^{11}). Aparte de los problemas recién descritos, en estas bibliotecas existen además muchos artefactos de clonación. Esto significa a su vez que, a más tardar después de 4 rondas de selección, los clones seleccionados acaban representando casi exclusivamente artefactos. Otro

25 inconveniente es el hecho de que por lo general se requiere más de una ronda de selección para obtener los anticuerpos deseados. Esto se debe a que por fago solamente se presentan 0,1 anticuerpos scFv en la superficie del fago. Es muy proba-

ble que este valor varíe mucho en función del anticuerpo presentado. Otro inconveniente es que la identidad del clon concreto (es decir, ¿el clon seleccionado produce realmente un anticuerpo?) tiene que comprobarse por métodos relativamente
5 costosos.

Presentación de anticuerpos en la superficie de las células de hibridoma. Este método se basa en la técnica de hibridoma recién descrita. Pero, a diferencia de ella, se emplea (y se produce) una línea celular de mieloma estable,
10 que ancla en grandes cantidades una proteína de unión de anticuerpo (p.ej. la proteína G) sobre la superficie de las células (Breitling y col., Selección de anticuerpos monoclonales, 1999; DE 199 00 635 A1; solicitud PCT que lleva el número PCT DE 00/00079). Con ello se evita buena parte del
15 trabajo que requieren la clonación y la subclonación de los hibridomas monoclonales. En su lugar, las especificidades de anticuerpo deseadas pueden aislarse en el clasificador FACS o en las esferillas magnéticas de un conjunto (pool) de hibridomas, porque los anticuerpos producidos se anclan sobre la
20 superficie de las células gracias a la unión con la proteína descrita de fijación de anticuerpos.

Inconvenientes. Esta técnica evita solamente una parte del costoso trabajo de selección de las especificidades de los anticuerpos individuales. Sigue siendo necesaria la inmunización de ratones y la fusión posterior de los linfocitos B
25 de ratón con una línea celular de mieloma. Esto se realiza con una eficacia relativamente mala: por lo general por fusión y ratón se generan solamente 100-500 hibridomas distin-

tos. Las células de hibridoma así formadas presentan una gran variabilidad, que no se desea, en el número de anticuerpos presentados, lo cual merma en gran manera la selección realizada en el clasificador FACS. Por otro lado, debido al anclaje no covalente de los anticuerpos sobre la superficie, surge una interferencia (cross talk) de las especificidades de los distintos anticuerpos. Por ello, las distintas células de hibridoma presentan en la superficie no solo "sus" anticuerpos correspondientes, sino también otras especificidades de anticuerpo, que otras células de hibridoma han entregado al medio. Este procedimiento requiere también mucha dedicación de trabajo, de modo que a fin de cuentas se pueden generar como máximo algunas decenas de millares de hibridomas distintos (y después comprobar si poseen la especificidad deseada). Por consiguiente, con esta técnica existe solamente una posibilidad limitada de construcción y de exploración de una biblioteca de hibridomas. Esto se aplica también a la automatización de este procedimiento. Esta técnica tampoco permite la producción de anticuerpos humanos.

20 Intercambio de cassettes por recombinación específica.

Existe actualmente una serie de procedimientos, que permiten una recombinación específica de lugar (locus) de DNA dentro de una célula eucariota (véase p.ej. Sauer, patente US-4959317: Site-specific recombination of DNA in eukaryotic cells; Leboulch y col., patente US-5928914: "Methods and compositions for transforming cells; Feng y col., Site-specific chromosomal integration in mammalian cells: highly efficient CRE recombinase-mediated cassette exchange; J. Mol. Biol.

292, 779-785, 1999). Todos estos procedimientos emplean una recombinasa (p.ej. Flp, Cre, Int, etc.), que reconoce secuencias específicas de DNA y las recombina con otras secuencias de DNA. Son características de este procedimiento las eficacias a menudo relativamente elevadas de los acontecimientos de recombinación específica, que pueden conseguirse con este procedimiento "in vitro", pero también "in vivo". Este procedimiento se emplea p.ej. como auxiliar de clonación (intercambio de los cassettes de DNA "in vitro"), pero también para recombinación "in vivo" en bacterias vivas, en células eucariotas vivas o incluso en ratones transgénicos.

Inconvenientes. Hasta ahora no se ha descrito el intercambio de cassettes de genes de anticuerpos en células eucariotas en combinación con la expresión en la superficie y la posterior selección de anticuerpos monoclonales.

El problema técnico que subyace en la presente invención es, pues, el desarrollo de un procedimiento para la producción de una biblioteca de proteínas, con preferencia de una biblioteca de anticuerpos, o bien la selección de proteínas, con preferencia anticuerpos, que tengan las especificidades deseadas, que no tenga los inconvenientes los procedimientos convencionales descritos en páginas anteriores. Este procedimiento debería poder aplicarse también p.ej. a la generación de una biblioteca de diferentes receptores de células T. Este procedimiento deberá combinar entre sí en especial las ventajas de la técnica de los anticuerpos recombinantes con la de los anticuerpos de hibridoma:

- la selección sencilla de reactividades específicas a partir de un gran número de anticuerpos distintos (más en general: de proteínas distintas), a ser posible en combinación con una gran intensidad de señal durante el proceso de
5 selección (p.ej. cada una de las células presenta anticuerpos iguales);

- la modificación relativamente sencilla de los genes expresados, p.ej. la fusión de cadenas cortas de anticuerpos con un anticuerpo de cadena única (anticuerpos biespecífico)
10 o la fusión con otra porción de proteína (véase también: Bisppecific Antibodies, de Michael W. Fanger, editorial Springer, 1995, ISBN 3-540-58885-X);

- la producción de grandes cantidades de anticuerpos (proteínas) seleccionados que tienen una buena calidad para
15 fines de diagnóstico o de terapia, en especial con una variante que se entrega al medio de cultivo y

- con la verificación y caracterización sencillas de la línea celular o sub-biblioteca seleccionada.

La solución de este problema técnico se consigue con el
20 desarrollo de las formas de ejecución definidas en las reivindicaciones. Con la presente invención puede acelerarse la selección de las células, que producen proteínas específicas (p.ej. anticuerpos monoclonales). El número de células, que se pueden analizar para determinar si tienen una especifici-
25 dad predeterminada, puede incrementarse en varios órdenes de magnitud con el procedimiento de la invención. La selección de proteínas (anticuerpos) se realiza en una sola ronda. Esto es posible gracias al gran número de proteínas (anticuerpos)

presentadas en la superficie de las células y además gracias al número relativamente homogéneo de proteínas (anticuerpos) presentadas por las células correspondientes. Mediante la biblioteca de anticuerpos producidos con arreglo al procedimiento de la invención puede realizarse fácilmente la búsqueda de las especificidades de los diferentes anticuerpos. Esta automatización permite además la búsqueda de anticuerpos expresados de modo monoclonal, con lo cual puede aprovecharse mejor la gigantesca anchura de banda de la aplicación de los anticuerpos monoclonales. Con ello a su vez se puede aprovechar mejor el potencial obviamente grande de los anticuerpos humanos o humanizados en la terapia de enfermedades. Con la selección simplificada de anticuerpos monoclonales de hibridoma recién nombrada se obtienen clones de células, que producen anticuerpos monoclonales en grandes cantidades y, si se comparan con los anticuerpos recombinantes, también en una calidad superior. Por otro lado, la selección de las células puede realizarse sin la incorporación de marcadores de resistencia, lo cual es ventajoso, porque estos en muchos casos merman manifiestamente la expresión del producto genético modificado y al mismo tiempo la estabilidad de las líneas celulares obtenidas. De este modo, p.ej. la integración del marcador de resistencia entre el exón CH3 (eventualmente el exón CH4) y el exón M1 impide que una variante de empalme fijada sobre la membrana pueda anclar los anticuerpos sobre la superficie de las células que los presentan, con lo cual se impide una expresión especialmente simple basada en la expresión superficial de los anticuerpos específicos de anti-

genos (figura 2). Además, una forma de ejecución de la presente invención permite la humanización sencilla de los hibridomas murinos y de este modo p.ej. también el establecimiento de un amplio abanico de anticuerpos monoclonales de la misma especificidad de antígeno pero distintas porciones Fc. Gracias a este aspecto puede sacarse provecho del gran trabajo previo en el ámbito de los anticuerpos murinos monoclonales para la producción relativamente sencilla de agentes terapéuticos humanos.

El procedimiento de la invención se basa en que un número grande y muy uniforme de anticuerpos, si se compara de una célula a otra, se une mediante enlace covalente a superficie de una célula eucariota y por ello pueden esperarse señales comparables entre una célula y otra. De este modo pueden seleccionarse de modo simple los anticuerpos específicos junto con las células, que los presentan, entre un gran número de células. Como resultado de esta selección se obtiene un anticuerpo monoclonal. Se obtiene el grupo de células que presentan a los anticuerpos por reestructuración de una célula eucariota. Esto se realiza en especial mediante varios acontecimientos sucesivos de recombinación homóloga (figuras 3, 4, 7 y 8) y específica (figuras 5, 6 y 9). Son especialmente idóneas para ellos las células de hibridoma murino (figura 3). Como alternativa puede utilizarse también p.ej. una línea celular de mieloma humano como punto de partida para las recombinaciones homólogas sucesivas (figura 4). Esto tiene la ventaja adicional de que se evita la glucosilación ligeramente diferente de los anticuerpos producidos en células

murinas, si se comparan con los producidos en células humanas. Pueden utilizarse también otras líneas celulares estables, en especial aquellas líneas celulares que generan un determina producto genético en grandes cantidades, p.ej. un
5 linfoma de células T.

Con el procedimiento de la invención se genera una gran variedad de anticuerpos (figuras 5, 6, 9). Otro elemento de esta invención permite la selección de células individuales entre la gran variedad generada previamente. Esto es posible
10 por la presentación de los anticuerpos en la superficie (figuras 2, 9, 10). A diferencia de la técnica aplicada hasta el presente, esto se realiza (a) con preferencia por la unión covalente de los anticuerpos a la superficie de las células y (b) mediante células eucariotas, con preferencia células de
15 mamíferos, con lo cual se evitan los inconvenientes antes descritos de algunas de las técnicas aplicadas hasta el presente.

En una forma de ejecución especial, el procedimiento de la invención conlleva una hipermutación somática de los anti-
20 cueros (y genes) presentados, en especial para seleccionar anticuerpos que puedan unirse a un antígeno con mayor afinidad. Para ello pueden emplearse p.ej. en el contexto de los lugares (loci) de gen de anticuerpo dos vectores de expresión para el RAD54, RecQ4 y para la DNA-polimerasa polX-mu (figura
25 11), en especial en combinación con un vector, que expresa el RNA anti-sentido o siRNA (Martínez y col., Cell 110, 563 y sig, 2002; Elbashir y col., Nature 411, 494-498, 2001) contra XRCC2, XRCC3 o RAD51B. Como alternativa p.ej.:

- con una PCR susceptible de error se introduce un gran número de mutaciones no dirigidas, en especial en genes de anticuerpos variables ya preseleccionados;

- se recombina un gran número de estos genes de anticuerpos variables mutados mediante señales de recombinación específicas y se introducen en el locus de anticuerpo (figuras 5, 6); y

- a continuación se seleccionan las células p.ej. con un clasificador FACS, que presentan en la superficie un anticuerpo de mayor afinidad (figura 10).

Dichas mutaciones no dirigidas pueden combinarse entre sí p.ej. con arreglo al procedimiento desarrollado por Stemmer (Nature 370, 389-391, 1994). También es posible mediante las señales de recombinación específicas intercambiar en una célula productora de anticuerpos preseleccionados sencillamente el dominio variable de una cadena de anticuerpos por un gran número de otros dominios variables (figuras 5, 6, 9) y a continuación buscar las variantes más afines. De este modo, el procedimiento de la invención apunta hacia nuevas vías que permiten "in vitro" la hipermutación somática y la posterior selección de los anticuerpos más afines (figuras 10, 11).

Resumiendo, el procedimiento de la invención presenta las ventajas siguientes: permite la producción de una biblioteca muy compleja p.ej. como fuente de anticuerpos monoclonales (figuras 6, 9) y también la selección sencilla, en especial de anticuerpos monoclonales humanos muy afines (figura 10, 11). Al mismo tiempo pueden ampliarse las perspectivas de éxito de dicha selección. Gracias al número grande y relati-

vamente uniforme de anticuerpos presentados de igual especificidad puede aumentarse la intensidad de señal durante la búsqueda de anticuerpos monoclonales específicos. Los anticuerpos monoclonales humanos de alta afinidad que pueden obtenerse con buen rendimiento por el procedimiento de la invención pueden utilizarse p.ej. como agentes para el diagnóstico y la terapia de tumores. Además, en lugar de anticuerpos pueden presentarse también otras proteínas o dominios individuales de proteínas, en especial exones, sobre la superficie en cada caso de "su" célula, con lo cual es posible una búsqueda especialmente simple de componentes de unión para estos fragmentos proteicos presentados.

Breve descripción de las figuras

Figura 1

Representación esquemática de la producción de células de hibridoma. Los linfoblastos B se fusionan con una línea celular de mieloma (p.ej. Ag8.653) por lo general añadiendo una mezcla de polietilenglicol (PEG) con DMSO. A continuación se propagan los distintos clones de las células por dilución limitada y después de aprox. 14 días se analiza el líquido sobrenadante de su cultivo celular para determinar la reactividad de los anticuerpos específicos buscados. La célula de hibridoma resultante hereda las propiedades de las dos células progenitoras: la célula de mieloma controla la inmortalidad de una línea de células tumorales y algunas señales de regulación para la producción eficaz de anticuerpos, mientras que el linfoblasto B aporta una reactividad de anticuerpo específica de los fragmentos de anticuerpo recombinados genó-

micamente. Inicialmente, la célula de hibridoma resultante es genéticamente inestable, de modo que por lo menos en una ronda posterior de selección tiene que establecerse una variante genéticamente más estable.

5 Figura 2

A. Secuencias genómicas de un gen de anticuerpo IgG1 recombinado genómicamente. Se representa la estructura genómica de la cadenas corta con el promotor (P), el intensificador (e), el exón líder (L), los dominios vL (vL) con el segmento J genómicamente recombinado (J) y el exón de los dominios constantes de la cadena corta (cL). Se representa también la estructura genómica de la cadena larga con el promotor (P), el intensificador (e), el exón líder (L), los dominios vH (vH) con los segmentos D y J genómicamente recombinados (DJ) y el exón de los dominios constante CH1, bisagra (H), CH2 y CH3 de la cadena larga. En el extremo 3' del gen IgG1 se encuentran dos exones, que codifican un ancla de membrana (M1 y M2).

10

15

B. mRNAs empalmados de un anticuerpo IgG1. Se representa el mRNA empalmado de la cadena corta y de dos mRNAs empalmados de modo diferencial de la cadena larga, que codifican una variante secretoria (sIgG1) o una variante unida a la membrana (mIgG1) de una IgG1.

20

C. Proteína de anticuerpo IgG1. Se representa la cadena corta de anticuerpo con los dominios vL y CL. Se ha desprendido el péptido líder. La cadena larga de anticuerpo existe en 2 variantes,

25

- con los dominios vH, CH1, H, CH2, CH3 (forma secretada; sIgG1) o

- con los dominios vH, CH1, H, CH2, CH3, M1 y M2 (forma unida a membrana; mIgG1).

5 Figura 3

Recombinación homóloga. Mediante la recombinación homóloga se pueden modificar las secuencias de DNA de lugares (loci) de gen definidos. Esta técnica se aplica actualmente sobre todo para la producción de líneas celulares ES modificadas o de ratones transgénicos. El experimentador prescribe en primer lugar una primera secuencia definida de DNA, que está flanqueada por ambos lados por otras secuencias de DNA. Estas secuencias adicionales de DNA deberían contener por lo general regiones homólogas de una longitud >700 pares de bases (bp), que tienen su correspondencia en los cromosomas: los lugares (loci) de gen definidos con ellas. Dentro de estas secuencias adicionales de DNA tienen que producirse acontecimientos de recombinación (representados mediante líneas en forma de aspa), para que las regiones cromosómicas situadas entre las secuencias adicionales de DNA puedan intercambiarse entre DNA quimérico y cromosómico. Después de la transfección del DNA quimérico apropiado, en especial linealizado (representado por encima del DNA cromosómico), este acontecimiento muy singular tiene lugar en aprox. 1 de cada 25 10⁷ células. En la figura se representan lugares (loci) de gen de la línea celular de hibridoma murino HEA125 apropiada para ello en el sentido de esta invención (véase también la figura 2). Si en virtud de una recombinación homóloga se mo-

difica el anticuerpo presentado en la superficie, entonces la célula en cuestión podrá aislarse mediante un clasificador FACS. En función de la elección de las secuencias adicionales de DNA mencionadas, el experimentador decidirá si además de la introducción de dicha primera secuencia de DNA se suprimen regiones más o menos grandes después de la recombinación homóloga. En la figura se representan:

I. El intercambio del exón del dominio kappa constante murino por un exón, que codifica al dominio kappa constante humano;

II. El intercambio del exón CH1, CH2 y CH3 de los dominios constantes de IgG1 murina por un exón correspondiente de los dominios constantes de la IgG1 humana (el exón bisagra no se representa);

III. Igual que en el apartado II., pero en este caso se suprimen además las secuencias de DNA del intrón entre el dominio CH3 y el dominio M1 de la IgG1 codificada;

IV. El intercambio del exón del dominio variable vL1 activo por un exón que codifica p.ej. el dominio vL2 seleccionable en el clasificador FACS, con lo cual se introducen al mismo tiempo las señales específicas de recombinación (FRT0 y FRT3), que la recombinasa Flp reconoce; y

V. El intercambio del exón del dominio vH1 variable activo, que codifica p.ej. al dominio vH2 seleccionable en el clasificador FACS, con lo cual se introducen simultáneamente dos señales específicas de recombinación (loxP1 y loxP2), que la recombinasa Cre reconoce.

Si se realizan sucesivamente los acontecimientos de recombinación homólogos I, III, IV y V representados en la figura y se aíslan las líneas celulares correspondientes, entonces se forma una línea celular de hibridoma, que presenta en su superficie un anticuerpo monoclonal definido en un número relativamente grande. Gracias a las señales de recombinación específicas introducidas, los dominios variables de este anticuerpo monoclonal pueden intercambiarse de modo relativamente simple por los dominios correspondientes de otros anticuerpos o de grupos de anticuerpos.

Figura 4

Reestructuración de una línea celular humana por recombinación homóloga. A diferencia de los acontecimientos de recombinación homóloga representados en la figura 3, en la figura 4 se representa la modificación de una línea celular humana (p.ej. IM-9 o U266) mediante diversos acontecimientos de recombinación homólogos. En la figura se representan:

I. (b.) El intercambio de los exones CH1, CH2 y CH3 p.ej. de los dominios constantes de la IgA humana por los exones correspondientes de los dominios constantes de la IgG1 humana, con lo cual pueden suprimirse adicionalmente secuencias de DNA del intrón entre el dominio CH3 y el dominio M1 del IgG1/IgA codificado;

II. El intercambio del exón del dominio vL1 variable activo por un exón, que codifica p.ej. un dominio vL2 seleccionable en el clasificador FACS, con lo cual se introducen simultáneamente dos señales de combinación específicas (FRT0

y FRT3), que la recombinasa Flp reconoce (como en la figura 3); y

III. El intercambio del exón del dominio vH1 variable activo por un exón, que codifica p.ej. un dominio vH2 seleccionable en el FACS, con lo cual se introducen simultáneamente dos señales específicas de recombinación (loxP1 y loxP2), que la recombinasa Cre reconoce (igual que en la figura 3).

Figura 5

Recombinación específica. Con la recombinación específica pueden alterarse secuencias cromosómicas de DNA o lugares (loci) de gen definidos con una eficacia relativamente grande. Para ello, por influencia de una recombinasa como la Cre o la Flp, los DNAs recombinan entre sí en señales de recombinación específicas, con lo cual se intercambian las secuencias de DNA que están flanqueadas por estas señales. En este tipo de intercambio de cassettes, el DNA a intercambiar está flanqueado en cada caso por dos señales de recombinación distintas, que no reaccionan entre sí. En la figura se representa el intercambio de cassettes de las secuencias de DNA gracias a la Cre o Flp. Después de la transfección del DNA quimérico idóneo, es especial circular (representado por encima del DNA cromosómico), el DNA circular se integra en primer lugar por recombinación con una de las dos señales específicas de recombinación en el cromosoma (representado por líneas cruzadas). A continuación, un DNA también circular se corta por acción de la recombinasa (no se representa). Esto sucede por azar, ya sea en las mismas señales de recombinación que para la integración, ya sea en las dos señales de

recombinación restantes. Con ello se produce un equilibrio entre las secuencias de DNA originales y las resultantes del intercambio. A continuación se presenta un anticuerpo modificado sobre la superficie (ver también la figura 2), de modo
5 que la célula en cuestión puede aislarse mediante el clasificador FACS. En la figura se representan:

VI. El intercambio del exón de un dominio vkappa definido por un exón de un grupo de exones distintos, que codifican en cada caso a otros dominios vkappa;

10 VII. El intercambio del exón de un dominio vlamba definido por un exón de un grupo de exones distintos, que codifican en cada caso a otros dominios vlamba; y

VIII. El intercambio del exón de un dominio vH definido por un exón de un grupo de distintos exones, que codifican en
15 cada caso a otros dominios vH.

Si se ejecutan sucesivamente los acontecimientos de recombinación específica VI y VIII o bien VII y VIII representados en la figura y resulta enriquecido el grupo de células correspondiente, entonces se genera una biblioteca de anticuerpos de hibridoma, cuyos representantes individuales (células) presentan en cada caso un anticuerpo monoclonal definido en un número relativamente grande. Las células de hibridoma que se aíslan de este modo producen anticuerpos monoclonales, en especial humanos, en un rendimiento y calidad elevados.
25

Figura 6

Introducción de señales de recombinación específica en lugares (loci) de gen activos. En la figura se representa:

I. La transfección de una línea celular con DNA-vector, que codifica a un gen de resistencia (p.ej. resistencia a G418), que está flanqueado por 2 sitios FRT diferentes, y la selección (p.ej. con G418) de una línea celular, que lleva
5 integrado en el cromosoma el gen de resistencia junto con los sitios FRT en un lugar (locus) activo del gen.

II. El intercambio de cassettes del gen de resistencia mediante la recombinación específica con la Flp por las secuencias de DNA, que se codifican a los exones bisagra (no
10 representado), CH2, CH3, M1 y eventualmente M2 de un anticuerpo IgG fusionado con un primer gen de un primer anticuerpo scFv (véase también la figura 2). El gen del primer anticuerpo scFv está flanqueado por dos lugar loxP distintos. La selección de este acontecimiento de recombinación se realiza
15 p.ej. en el clasificador FACS por la presentación de la proteína de fusión del anticuerpo scFv en la superficie celular.

III. El intercambio del primer gen de un primer anticuerpo scFv por otro gen de un grupo de más genes de más anticuerpos scFV mediante la Cre.

20 IV. Si se realizan sucesivamente los acontecimientos de recombinación I, II y III representados en la figura y se enriquece el grupo correspondiente de células, entonces se genera una biblioteca de anticuerpos scFv, cuyos representantes individuales (células) presentan en su superficie en cada
25 caso un anticuerpo scFv monoclonal definido en un número relativamente grande. Las células aisladas de este modo producen anticuerpos monoclonales scFv-CH2-CH3, en especial humanos, en un rendimiento y calidad buenos.

La secuencia circular de DNA de un primer gen de anticuerpo scFv representada en la figura 6, II., puede contener eventualmente otros genes de anticuerpos scFv, que están flanqueados en cada caso por un sitio loxP y un sitio loxP511 (p.ej. loxP scFv1 loxP511 loxP scFv2 loxP511...loxP scFvN loxP511). De este modo, una secuencia de DNA integrada por recombinación por la actividad de la Cre dentro de esta célula produce muchas células que presentan anticuerpos distintos. Con la combinación de un gran número de exones vH y vL puede potenciarse el número grande mencionado.

Figura 7

Humanización de

Humanización de una línea celular de hibridoma murino (2) por recombinación homóloga. Se representa el fenotipo de diversas células de hibridoma modificadas (2kh, 2h, 2H), después de haberse realizado los acontecimientos de recombinación homóloga descritos en la figura 3, en los apartados I. y II. o III. Los acontecimientos de recombinación muy poco frecuentes se realizan en aprox. 1 de cada 10^7 células. Las células modificadas tienen que seleccionarse a continuación, p.ej. en el clasificador FACS. En el centro de la figura se representa a título de ejemplo una célula de hibridoma recombinada homóloga (2H), en la que ha tenido lugar en primer lugar el acontecimiento de recombinación homóloga descrito en el apartado I. de la figura 3 y después el descrito en el apartado III. En la figura se representa:

I. El intercambio del exón del dominio kappa constante murino por un exón, que lleva codificado un dominio kappa

constante humano conduce a la presentación en superficie de un dominio kappa constante humano, permaneciendo constante la especificidad de antígeno que tiene el anticuerpo presentado (2kh);

5 II. El intercambio de los exones CH1, CH2 y CH3 del dominio constante de la IgG1 murina por los exones correspondientes de los dominios constantes de la IgG1 humana conduce a la presentación en superficie de los dominios constantes de la IgG1 humana, permaneciendo constante la especificidad de
10 antígeno que tiene el anticuerpo presentado (2h) y

 III. Igual que en II., pero se suprimen además secuencias de DNA del intrón entre el dominio CH3 y el dominio M1 de la IgG1 codificada (véase la figura 2) de modo que se presentan muchos más anticuerpos sobre la superficie de la célula de hibridoma (2H).

Si se realizan sucesivamente los acontecimientos de recombinación I y II o I y III representados en la figura y se aíslan las líneas celulares correspondientes, entonces se genera una línea celular de hibridoma, que produce un anticuerpo monoclonal humanizado que tienen la especificidad de
20 antígeno original (2H).

Figura 8

La introducción de señales de recombinación específica y modificación simultánea de la especificidad de anticuerpo de una línea celular de hibridoma (2H) por recombinación
25 homóloga.

Se representa el fenotipo de las células de hibridoma modificadas (3aH, 3H), después de haberse realizado los acontecimientos.

tecimientos de recombinación homóloga descritos en los apartados IV. y V. de la figura 3. A continuación se seleccionan las células modificadas p.ej. en el clasificador FACS. La línea celular de partida (2H) se describe en la figura 7. En el centro de la figura se representa a título de ejemplo una célula de hibridoma de recombinación homóloga (3H), en la que en primer lugar se ha realizado el acontecimiento de recombinación homóloga descrito en el apartado IV. de la figura 3 y después el acontecimiento del apartado V. En la figura se representan:

IV. El intercambio del exón por el dominio vL1 variable activo por un exón, que codifica p.ej. el dominio vL2 seleccionable en el FACS, conduce a la presentación en superficie de un dominio vL alterado, con lo cual se altera la especificidad de antígeno del anticuerpo presentado (3aH), pero al mismo tiempo se introducen 2 sitios FRT y

V. El posterior intercambio del exón del dominio activo variable vH1 por un exón, que codifica p.ej. un dominio vH2 seleccionable en el FACS, conduce a la presentación en superficie de un dominio vH alterado, con lo cual se altera la especificidad de antígeno del anticuerpo presentado (3H), pero al mismo tiempo se introducen 2 sitios loxP.

Si se efectúan sucesivamente los acontecimientos de recombinación homóloga IV y V representados (también en la figura 3) y se aíslan las células en cuestión, entonces se genera una línea celular de hibridoma alterada, que presenta en su superficie un anticuerpo monoclonal humanizado alterado.

La especificidad de antígeno que tiene este anticuerpo dependerá de los dominios variables recombinantes que incorpore.

Figura 9

Producción de una biblioteca de anticuerpos de híbrido-
5 ma (2H, 3H, 4H, 5H, 6H) por recombinación específica. Se representa el fenotipo de las células de hibridoma modificadas (2H, 3H, 4H, 5H, 6H), después de haberse realizado en primer lugar los acontecimientos de recombinación homóloga descritos en los apartados I., III., IV. y V. de la figura 3 y después
10 los acontecimientos de recombinación específica descritos en los apartados VI. & VIII. o bien VII. & VIII. de la figura 5. La línea celular de partida (3H) se describe en la figura 8. La línea celular de hibridoma (3H) representada en la figura 9 se transfecta en cada caso con un grupo de distintas secuencias y después de los acontecimientos de recombinación
15 específica se selecciona un grupo de fenotipos en el clasificador FACS. En la figura se representan:

IV. El intercambio del exón del dominio vL3 variable activo por un grupo de exones conduce a la presentación en
20 superficie de un grupo de dominio vL alterados de distintas maneras y

V. El posterior cambio del exón del dominio vH3 variable activo por un grupo de exones conduce a la presentación en superficie de un grupo de dominios vH modificados de distintas
25 tintas maneras, con lo cual se altera la especificidad de antígeno que tienen los anticuerpos presentados (2H, 3H, 4H, 5H, 6H).

Si se llevan a cabo sucesivamente los acontecimientos de recombinación específicos IV y V representados en la figura con un grupo de células o con un grupo distintas secuencias de DNA y se enriquecen los correspondientes grupos de células distintas, entonces se genera una biblioteca de anticuerpos de hibridoma, cuyos representantes individuales se presentan en cada caso en la superficie de los distintos anticuerpos monoclonales humanizados. Con este procedimiento se empobrecen las células de partida (3H) y las células recombinadas de modo defectuoso o de modo improductivo (0H).

Figura 10

Comparación de afinidades "on-line" de los anticuerpos presentados. La afinidad de un anticuerpo por su antígeno es un índice de la proporción entre los antígenos unidos a anticuerpos y los anticuerpos libres y los antígenos libres en solución (en general: proporción entre receptor y ligando). Esto permite al mismo tiempo seleccionar con el clasificador FACS y comparar directamente las afinidades de los distintos anticuerpos presentados en superficie o proteínas (o bien las correspondientes células de hibridoma) presentadas en superficie con antígenos marcados con fluorescencia (triángulos rojos). Para normalizar el número de los anticuerpos presentados en cada caso por cada célula, estos pueden teñirse p.ej. como contraste con la proteína G marcada con FITC (círculos verdes). En el ejemplo representado, el anticuerpo presentado por la célula de hibridoma B se fija con mucha mayor afinidad sobre el antígeno, si se compara con el anticuerpo presentado por la célula A. El índice de afinidad es en este

caso el cociente de la fluorescencia roja y la verde de las células seleccionadas en el clasificador FACS.

Figura 11

Hipermutación somática. En primer lugar, del modo descrito en la figura 9, se reemplazan por recombinación específica los exones del dominio vL2 variable activo por un grupo de exones, que codifican en cada caso un dominio vL2 mutado de distinta manera (véanse también las figuras 5 y 6). De este modo se generan mutaciones improductivas (2d), anticuerpos menos afines (2c y 2e) y en casos raros se forman anticuerpos más afines (2b). Estos pueden clasificarse en el FACS, del modo descrito en la figura 10. Como alternativa, la expresión de RAD54, RecQ4 y al mismo de polX mu dentro de la línea celular de hibridoma (2) conducen a la introducción de mutaciones no dirigidas dentro de aprox. 1,5 kb en dirección a 3' (downstream) de los promotores en cuestión de las cadenas anticuerpo corta y larga activas. Con preferencia, el RNA anti-sentido se expresa al mismo tiempo contra XRCC2, XRCC3 o RAD51B. El requisito para esta vía alternativa de introducción de hipermutaciones somáticas es el contexto del locus de gen de anticuerpo activo.

Figura 12

DNA quimérico murino-humano para la humanización de la línea celular de hibridoma HEA125.

25 A. Humanización del dominio constante kappa mediante el vector-DNA pBS-Mh-kappa-M. Se representa el vector pBS Mh-kappa-M con las secuencias de DNA quimérico para la humanización del dominio constante kappa de la línea celular de

hibridoma HEA125. El vector de clonación es el pBSIISK+ de Stratagene. Se subrayan los sitios de restricción. Se representan en azul los cebadores de secuenciación. Los cebadores de PCR HK1 y HK2 representados en azul y subrayado sirven para la multiplicación del exón humano, que codifica la cadena kappa constante. El DNA molde para ello es el DNA genómico humano. La secuencia que codifica el exón de dominio kappa constante humano se representa de color verde y escrito en minúsculas. Los cebadores de PCR MK1 y MK2 o bien MK3 y MK4, representados de rojo y escritos en minúsculas, sirven para la multiplicación de los sitios homólogos que flanquean al genoma de ratón de HEA125. Para ello, el DNA molde es el DNA genómico del HEA125. El límite entre las secuencias murinas y humanas se marca con los sitios de restricción NotI o BstB1. Antes de la electroporación en las células HEA125 se linealiza el DNA-vector con la enzima de restricción BglI. Los cebadores de PCR HK3 y HK4 representados de color azul subrayados (en combinación con la presentación en superficie de los anticuerpos humanizados) sirven para la secuenciación y verificación de los subclones de la célula de hibridoma HEA125 alterados por recombinación homóloga.

B. Humanización de los dominios constantes IgG1-CH1, CH2 y CH3 con el vector-DNA pBS-MhIgG1M. Se representa el vector pBS-MhIgG1M con las secuencias de DNA quimérico para la humanización de los dominios constantes IgG1-CH1, CH2 y CH3 de la línea celular de hibridoma HEA125. El vector de clonación es el pBSIISK+ de Stratagene. Se subrayan los sitios de restricción. Los cebadores de PCR HG1 y HG2, repre-

sentados en color azul y subrayados, sirven para la multiplicación de los exones humanos que codifican a los dominios constantes de la IgG1. El DNA molde para ello es el DNA genómico humano. Los cebadores de PCR MG1 y MG2 o bien MG3 y MG4, 5 representados de color rojo y en minúsculas, sirven para la multiplicación de los sitios homólogos que flanquean del genoma de ratón de HEA125. Para ello, el DNA molde es el DNA genómico de HEA125. El límite entre las secuencias murinas y humanas se marca con dos sitios de restricción HindIII. Las 10 secuencias humanas que codifican y los exones M1 murino y M2 murino se representan con letras minúsculas verdes. Antes de la electroporación de las células HEA125 se linealiza el DNA vector con la enzima de restricción SspI. Los cebadores de PCR HG3 y HG4 representados en color azul y subrayados (en 15 combinación con la presentación en superficie de los anticuerpos humanizados) sirven para la secuenciación y verificación de los subclones de la célula de hibridoma HEA125 modificada por recombinación homóloga.

Se representan con letra cursiva azul subrayada 5 cebadores distintos (cebadores de delta-1 a delta-5), con ellos 20 se pueden suprimir secuencias de DNA de una longitud entre aprox. 350 bp y aprox. 900 bp situadas entre la zona HindIII contigua y los cebadores correspondientes. Para ello se realiza una PCR con el cebador MG4 y los correspondientes cebadores de delta-1 a delta-5. Estos poseen un exceso adicional 25 que sobresale HindIII no representado. De este modo pueden incorporarse por ligación 5 bandas de PCR en el vector pBS-MhIgG1M cortado con HindIII (digestión parcial) y EagI. Las

deleciones resultantes del intrón entre los dominios CH3 y M1 conducen a una expresión más intensa en superficie. El vector pBS-MhIgG1M-delta-350 es idéntico al vector pBS-MhIgG1M, pero le faltan las secuencias entre los cebadores MG3 (incluidas las secuencias del cebador MG3) y delta-1 (excluyendo las secuencias del cebador delta-1).

Figura 13

DNA de resistencia G418 murino quimérico para la introducción de señales de recombinación específicas en el lugar (locus) de gen vH y vkappa de la línea celular de hibridoma HEA125.

A. Introducción de sitios FRT en el lugar de gen vkappa de la línea celular de hibridoma HEA125 mediante el vector de DNA pBS-M-kappa-G418M. Se representa el vector pBS-M-kappa-G418M con las secuencias de DNA quimérico para la introducción de sitios FRT en el lugar (locus) de gen activo vkappa de la línea celular de hibridoma HEA125. El vector de clonación es el pBSIISK+ de Stratagene. Se subrayan los sitios de restricción. Se multiplica el gen de resistencia PGKneo con los cebadores de PCR Neo1 y Neo2 (se representa de color rojo en minúsculas y subrayado) y después se incorpora por clonación en el AatII. Como fuente o molde del gen de resistencia PGKneo se emplea el vector ploxPfrtPGKneofrtloxP (Dr. Erich Greiner, DKFZ, Departamento de Biología Molecular de las Células I). La secuencia que codifica al gen de la neofosforiltransferasa II y al exón líder vkappa murino se representa de color verde y en minúsculas. El gen de la neofosforiltransferasa II está controlado por el promotor de la fosfoglicerina-

quinasa (PGK; representado en color azul y en minúsculas). Los cebadores de PCR MVK1 y MVK2 o bien MVK3 y MVK4 representados de color rojo y en minúsculas sirven para la multiplicación de las regiones homólogas que flanquean los dominios vkappa del genoma murino de HEA125. Para ello el DNA molde es el DNA genómico de HEA125. En una PCR posterior, los cebadores mencionados aportan además las secuencias de la correspondiente zona FRT que flanquea y la mitad de la zona AatII. El límite entre las secuencias murina y PGKneo se marca con las sitios FRT0 o FRT3 representadas de color azul y en cursiva. Antes de la electroporación en las células HEA125 se linealiza el DNA del vector. Los cebadores de PCR KG418-3 y KG418-4 representados en color azul y subrayado (así como los cebadores fuera de las regiones representadas) sirven para la secuenciación y verificación de los subclones de la célula de hibridoma HEA125 modificada por recombinación homóloga.

B. Introducción de sitios loxP en el locus vH del gen de la línea celular de hibridoma HEA125 con el vector de DNA pBS-MvHG418M. Se representa el vector pBS-MvHG418M con las secuencias de DNA quimérico para la introducción de sitios loxP en el locus de gen vH activo de la línea celular de hibridoma HEA125. El vector de clonación es el pBSIISK+ de Stratagene. Los sitios de restricción se subrayan. Se incorpora por clonación el gen de resistencia PGKneo en AatII, la fuente del DNA es la misma que se ha representado en el apartado A. La secuencia que codifica al gen de neofosforiltransferasa II se representa de color verde y en minúsculas. El promotor PGK se representa en color azul y en cursiva. Al

vector pBS-MvHG418M-delta-PGK le faltan las secuencias del promotor PGK representadas en color azul y en cursiva, por lo demás este vector es idéntico al pBS-MvHG418M. Para generar este vector se multiplica el gen de neofosforiltransferasa II con los cebadores de PCR Neo2 y Neo3 (representados de color rojo, minúsculas y subrayado). Los cebadores aportan con ello sitios AatII que sobresalen en cada caso del extremo 5'. El molde es en este caso el vector ploxPfirtPGKneofrtloxP. Los cebadores de PCR MvH1 y MvH2 o bien MvH3 y MvH4 representados en rojo y minúsculas sirven para la multiplicación de las regiones homólogas que flanquean a los dominios vH del genoma de ratón de HEA125. Para ello, el DNA molde es el DNA genómico de HEA125. Dichos cebadores aportan además, en una PCR posterior, las secuencias de los sitios loxP que flanquean en cada caso y la mitad del sitio AatII. El límite entre las secuencias genómicas de ratón y las PGKneo se marca con los sitios loxP- o loxP511 que se representan en azul y en cursiva. Antes de la electroporación se linealiza el DNA-vector en las células HEA125. Los cebadores de PCR vHG418-3 y vHG418-4 representados de color azul y subrayados (así como los cebadores fuera de las regiones representadas) sirven para la secuenciación y verificación de los subclones de la célula de hibridoma HEA125 modificada por recombinación homóloga.

Figura 14

Cebadores para la multiplicación de una gran variedad de genes de anticuerpos humanos recombinados genómicos. Se representan los cebadores, con los que se puede multiplicar el DNA genómica de los genes variables correspondientes. Como

cebadores de la contrahebra se emplean los correspondientes
 cebadores del segmento J. Las secuencias de genes humanos se
 identifican con arreglo al manual Immunoglobulin Facts Book
 (Lefranc y Lefranc, 2001, Academic Press, ISBN 0-12-441351-
 5 X). Las secuencias de DNA de los genes variables de anticuer-
 pos que allí se describen se importan en base a los números
 de registro del Genbank, un banco de datos de acceso público,
 y a continuación se proponen cebadores específicos del gen
 vH. Estos se hibridan en cada caso aprox. a una distancia de
 10 182 bp del extremo 5' del codón de inicio ATG del exón líder.
 Con los cebadores de PCR específicos de vkappa y vlamba se
 procede de modo similar. Estos se hibridan dentro del intrón
 entre el exón líder y el exón vL. Los extremos 5' de estos
 cebadores se hibridan en cada caso aprox. a una distancia de
 15 130 bp del extremo 5' del exón vL. Los extremos 5' del ceba-
 dor de contrahebra específico del segmento J_H se hibridan
 aprox. a una distancia de 83 bp del extremo 3' de los segmen-
 tos J_H, contada en dirección a 3'. Los extremos 5' de los
 cebadores de contrahebra específicos del segmento J_{kappa} y
 20 J_{lambda} se hibridan aprox. a una distancia de 89 bp del extremo
 3' de los segmentos J_L, calculada en dirección a 3'. Con los
 cebadores de PCR descritos y el DNA genómico de linfocitos
 periféricos humanos como moldes se realizan las siguientes
 PCRs a 65°C (±5°C):
 25 - 4 segmentos J_{lambda} x 24 genes vlamba = 96 PCRs espe-
 cíficas de vlamba;
 - 5 segmentos J_{kappa} x 34 genes vkappa = 170 PCRs espe-
 cíficas de vkappa; y

- 6 segmentos J_H x 44 genes vH = 264 PCRs específicas de vH .

A. cebador $v\lambda$ humano y cebador J_{λ}

B. cebador $v\kappa$ humano y cebador J_{κ}

5 C. cebador vH humano y J_H .

Figura 15

Vectores para la introducción de exones variables en los lugares (locus) de gen vH y $v\kappa$ de la línea celular de hibridoma HEA125 mediante recombinación específica.

10 A. Se representa el vector pBS-FRT $v\kappa$, con el que mediante la Flp se puede volver a recombinar e integrar el antiguo dominio $v\kappa$ de HEA125 en el locus de gen $v\kappa$ de la línea celular de hibridoma HEA125. Los sitios de restricción se han subrayado. Las secuencias codificadoras del exón

15 $v\kappa$ se representan en verde y minúsculas. Los cebadores de PCR $vKHEA1$ y $vKHEA2$, representados en rojo y minúsculas, sirven para la multiplicación del DNA genómico del gen $v\kappa$ activo de HEA125. Para ello, el DNA molde es el DNA genómico de HEA125. Los cebadores mencionados aportan además en una

20 PCR posterior las secuencias del correspondiente sitio FRT flanqueante y un sitio BssHII. Mediante el BssHII se clona el fragmento de PCR en pBSIISK+. El límite de las secuencias $v\kappa$ genómicas se marca con los sitios FRT0 o FRT3 que se representan de color azul y en cursiva. Los cebadores de PCR

25 KG418-3 y KG418-4 representados en la figura 13A de color azul y subrayados sirven para la secuenciación y verificación de los subclones modificados por recombinación específica de la célula de hibridoma HEA125.

La secuencia del locus de gen HEA125-vkappa activo resulta de las figuras 15A (exón vkappa recombinado genómico activo) y 13A (regiones que flanqueantes 5' y 3'), por ello en las figuras se representan dos sitios FRT adicionales, que
5 no existen en el genoma de HEA-125.

B. Se representa el vector pBS-loxPvHmyc, con el que mediante la Cre se puede volver a recombinar e integrar el antiguo dominio vH de HEA125 (+ myc-tag) en el locus de gen vH de la línea celular de hibridoma HEA125. Se subrayan los
10 sitios de restricción. Las secuencias que codifican al exón líder y al exón vH se representan de verde y minúsculas. Los cebadores de PCR vHEA1 y vHEA2 representados de rojo y minúsculas sirven para la multiplicación del DNA genómico del gen activo vH de HEA125. Para ello, el DNA molde es el DNA genó-
15 mico de HEA125. En una PCR posterior, los cebadores mencionados aportan además las secuencias de los sitios flanqueantes loxP y un sitio BssHII. Mediante el BssHII se clona el fragmento de PCR en pBSIISK+. El límite de las secuencias vH genómicas se marca con los sitios loxP o loxP511 representadas
20 en azul y cursiva. Además de las secuencias de origen natural de HEA125 se introduce en la región del CDR3 un myc-tag representado en color magenta y subrayado. Para ello se sintetiza la secuencia de DNA representada y se clona mediante los sitios de restricción BsmB1 y BglII que la flanquean. Pres-
25 cindiendo de este myc-tag, el vector pBS loxPvH es idéntico al vector pBS-loxPvHmyc.

Los cebadores de PCR vHG418-3 y vHG418-4 representados en la figura 13B de azul y subrayados sirven para la secuen-

ciación y verificación de los subclones modificados por recombinación específica de la célula de hibridoma HEA125. La secuencia del lugar de gen vH de HEA125 activo resulta de las figuras 15B (exón vH recombinado genómico activo) y 13B (regiones flanqueantes 5' y 3'), con lo cual en las figuras se representan dos sitios loxP adicionales, que no existen en el genoma de HEA125. En la figura 15B se representa además en el CDR3 del dominio vH un myc-tag, que tampoco existe en el genoma original del HEA125.

10 C. Se representa el vector de clonación pBS-FRTklon.

D. Se representa el vector de clonación pBS-loxPklon.

Figura 16

Vector para la introducción de señales de recombinación específica en lugares (loci) de gen preseleccionados. Se representa el vector pBS loxP-IgG1, con el que mediante la Flp se recombinan e integran los dominios constantes, incluidos los dominios de membrana M1 y M2, de una IgG1 p.ej. en una cassette de FRT preseleccionada. Este vector aporta además una cassette loxP, en la que mediante la Cre pueden recombinarse e integrarse p.ej. los dominios variables. El vector de clonación es inicialmente el vector pBS FRTvKappa (figura 15A) cortado con AatII. En este se colocan secuencia de oligonucleótido sintético, que codifican al sitio loxP y al loxP511 con un sitio BamH1 adicional. El vector resultante se corta con BamH1. Los cebadores de PCR hIgG1-1 y hIgG1-2 representados de azul y subrayado sirven para la multiplicación de un gen de IgG1 genómico quimérico. En una reacción PCR posterior, estos cebadores aportan en cada caso un sitio

BamH1. Para ello, el DNA molde es el vector pBS-MhIgG1M descrito en la figura 12B (como alternativa, el pBS-MhIgG1Mdelta350). Después del ligado de esta banda de PCR digerida también con BamH1 surge el vector pBS-loxP-IgG1, o
 5 como alternativa el vector pBS-loxP-IgG1delta350. Se han subrayado los sitios de restricción. El límite entre las secuencias murinas y humanas se marca con el sitio de restricción HindIII. Las secuencias humanas codificadoras y los exones murino M1 y murino M2 se representan de verde y con minúsculas. El aceptor de empalme del extremo 5' del exón bisagra se
 10 representa en rojo y subrayado.

A partir del vector pBS-loxP-IgG1 se obtiene el vector pBS-loxP-IgG1deltaCH1. Ambos vectores son idénticos, pero al vector pBS-loxP-IgG1deltaCH1 le faltan las secuencias de DNA
 15 entre el sitio Pfm1 y el sitio BamH1. Para ello se corta el vector pBS-loxP-IgG1 con BamH1 y se clona e integra un fragmento obtenido mediante los cebadores de PCR deltaCH1-1 y hIgG1-2. Como molde de DNA se emplea el vector pBS-loxP-IgG1.

Figura 17

20 Anticuerpos biespecíficos y bifuncionales presentados por las células de hibridoma.

(A) Anticuerpos biespecíficos. Se representa el vector pBS-FRT-kappaHEAscFv215, gracias al cual mediante la Flp puede recombinarse e integrarse un gen quimérico en el locus de
 25 gen vkappa activo de la línea celular de hibridoma HEA125-mhloxPmycFRTG418 (ejemplo 12). Bajo el control del promotor kappa (con exón líder endógeno) y del intensificador kappa

situado en el intrón contiguo (antes del exón κ endógeno), este gen quimérico codifica:

- el dominio κ de HEA125 (verde y minúsculas);
- fusionado al dominio murino κ de HEA125 (azul y
5 mayúsculas);
- fusionado a una secuencia de engarce (linker) (azul y cursiva);
- fusionado al dominio VH del anticuerpo scFv 215 (azul y minúsculas);
- 10 - fusionado a un engarce GlySer (azul y cursiva);
- fusionado al dominio κ del anticuerpo scFv 215 (verde y minúsculas); y
- finalmente fusionado a un myc-tag y a un His-tag (en cada caso azul y cursiva). Se subrayan los sitios de restric-
- 15 ción. El sitio de restricción PvuII / MscI entre paréntesis contiene secuencias residuales surgidas de la clonación. Los cebadores de PCR vHEAcDNA1 y vHEAcDNA2, representados en rojo y minúsculas, sirven para la multiplicación del cDNA del gen κ activo de HEA125. Para ello, el DNA molde es el cDNA de
- 20 HEA125. En una PCR posterior, el cebador vHEAcDNA2 aporta las secuencias del engarce flanqueante representado hasta el sitio PvuII inclusive. Este fragmento de PCR se liga en el vector de clonación pBS-FRT κ cortado con MscI (véase la figura 15A). A continuación se corta con PvuII el vector re-
- 25 sultante pBS-FRT- κ HEAPvuII. Los cebadores de PCR scFv1 y scFv2 representados de rojo y minúsculas sirven para la multiplicación del DNA que codifica al anticuerpo scFv. El DNA molde es en este caso el plásmido pOPE101-215. Después de la

clonación de este fragmento de PCR se obtiene el vector pBS-FRT-kappaHEAscFv215.

B. Anticuerpo bifuncionales. Se representa el vector pBS-FRT-kappaHEAbla, con el que mediante la Flp puede recombinarse e integrarse un gen quimérico bifuncional en el locus de gen vkappa activo de la línea celular de hibridoma HEA125-mhloxPmycFRTG418 (ejemplo 13). Bajo el control del promotor kappa (con exón líder endógeno) y del intensificador kappa situado en el intrón contiguo (antes del exón ckappa endógeno), este gen quimérico codifica:

- el dominio vkappa de HEA125 (verde y minúsculas);
- fusionado al dominio murino ckappa de HEA125 (azul y mayúsculas);
- fusionado a una secuencia de engarce (linker) (magenta y cursiva); y
- fusionado a la secuencia codificadora de la beta-lactamasa (verde y minúsculas).

Se subrayan los sitios de restricción. Los sitios de restricción PvuII o PvuII / MscI entre paréntesis contienen secuencias residuales surgidas a raíz de la clonación. El punto de partida es el vector pBS-FRT-kappaHEAPvuII cortado con PvuII y descrito en la figura 17A. Los cebadores de PCR bla1 y bla2, representados de rojo y minúsculas, sirven para la multiplicación del DNA que codifica a la beta-lactamasa. Para ello, el DNA molde es el plásmido pBSIISK+. Después de la clonación de este fragmento de PCR se obtiene el vector pBS-FRT-kappaHEAbla.

Figura 18

Otros ejemplos de anticuerpos modificados presentados por células de hibridoma.

A. Alteración de la especificidad de anticuerpos mediante la recombinación específica. Se representa el vector pBS-FRT-vkappa215, con el que mediante la Flp se puede recombinar un exón vkappa modificado en el locus de gen vkappa activo de la línea celular de hibridoma HEA125-mhloxPmycFRTG418 (ejemplo 14). Bajo el control del promotor kappa (con exón líder endógeno) y del intensificador kappa situado en el intrón contiguo (antes del exón ckappa endógeno), este exón codifica el dominio vkappa del anticuerpo 215 (Kontermann y col., Characterization of the epitope recognised by a monoclonal antibody directed against the largest subunit of *Drosophila* RNA polymerase II; Biol. Chem. Hoppe-Seiler 376, 473-481, 1995; verde y minúsculas). Este dominio vkappa se empalma con el dominio ckappa codificado endógeno del HEA125. Se subrayan los sitios de restricción. Los cebadores de PCR K215-1 y K215-2 representados en rojo y minúsculas sirven para la multiplicación del dominio vkappa(215). El cebador de PCR K215-1 aporta una mutación puntual silenciosa, que sirve para la introducción de un sitio EcoRV. Para ello, el DNA molde es el plásmido pOPE101-215 (véase la figura 17A). Este fragmento de PCR se liga en el vector pBS-FRTvkappa (véase la figura 15A), cortado con EarI y AvaII. De este modo se obtiene el vector pBS-FRT-vkappa215.

B. Anticuerpos Fab por recombinación específica. Se representa el vector pBS-loxP-FdHEA, con el que mediante la Cre

se puede recombinar un exón vH modificado en el locus de gen vH activo de la línea celular de hibridoma HEA125-mhRek (ejemplo 15). Bajo el control del promotor vH y del intensificador IgG1 situado en el intrón contiguo (antes del exón CH1 endógeno), este exón codifica el dominio vH del anticuerpo HEA125 (verde y minúsculas). Este dominio vH se empalma con el dominio contiguo IgG1-CH1 (verde y minúsculas). Se subrayan los sitios de restricción. Los cebadores de PCR Fd1 y Fd2 representados en rojo y minúsculas sirven para la multiplicación del dominio IgG1-CH1. El cebador Fd2 de PCR aporta un codón de paro y un sitio SalI. Para ello, el DNA molde es el DNA genómico de HEA125. Este fragmento de PCR se liga en el vector pBS-loxPvH (véase la figura 15B), que se corta con el SalI. De este modo se obtiene el vector pBS-loxP-FdHEA.

Abreviaturas

Ag8	línea celular de mieloma X63AG8.653
banco de anticuerpos	un gran número (>100) de células productoras de anticuerpos o de los correspondientes genes o proteínas de anticuerpos
biblioteca de anticuerpos	véase banco de anticuerpos
bla	beta-lactamasa, gen de la misma
bp	pares de bases
antígeno	ligando que se une específicamente a un anticuerpo; en el sentido de esta invención también un ligando que se une específicamente a un receptor;
anticuerpo	proteína que se une específicamente a un antígeno; en el sentido de esta invención se entiende

		también más en general aquella proteína, que se une específicamente a un ligando;
	cH	dominios constantes de la cadena larga de anticuerpo, gen de los mismos
5	CH1	primer dominio constante de una inmunoglobulina (IgG, IgA, IgE, IgD, IgM), exón del mismo
	CH2	segundo dominio constante de una inmunoglobulina (IgG, IgA, IgE, IgD, IgM), exón del mismo
	CH3	tercer dominio constante de una inmunoglobulina (IgG, IgA, IgE, IgD, IgM), exón del mismo
10		
	CH4	cuarto dominio constante de una inmunoglobulina (IgE, IgM), exón del mismo
	cL	dominio constante de la cadena corta de anticuerpo, gen del mismo
15	D	segmento D del dominio vH
	DMSO	sulfóxido de dimetilo
	downstream	partiendo del extremo 5' de una secuencia de DNA en dirección al extremo 3'
	e	intensificador (enhancer)
20	Fab	porción de anticuerpo que consta de cadena corta, dominios vH y CH1, gen de la misma
	clasificador FACS	seleccionador de células activado por fluorescencia
	FRT	dianas de reconocimiento de Flp
25	FRT0	<u>GAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTC</u>
	FRT3	<u>GAAGTTCCTATTCTTCAAATAGTATAGGAACTTC</u>
	G418	véase Neo
	H	bisagra (hinge), exón de bisagra

	His-tag	una sucesión de 5 ó 6 histidinas idóneas para la purificación por afinidad con un quelato de níquel; secuencias de DNA de la misma
	JH	segmento de unión del dominio vH, segmento de gen del mismo
5	J _{lambda}	segmento de unión del dominio vlamba, segmento de gen del mismo
	J _{kappa}	segmento de unión del dominio vkappa, segmento de gen del mismo
10	L	líder, péptido de señal, exón del mismo; los exones líderes de los genes de anticuerpos codifican solamente la porción del extremo N del péptido líder
	loxP	secuencias de DNA, que la recombinasa Cre reconoce
15		
	sitio lox66	<u>TACCGTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT</u>
	sitio lox71	<u>ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAACGGTA</u>
	sitio loxP	<u>ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT</u>
	sitio loxP511	<u>ATAACTTCGTATAATGTATACTATACGAAGTTAT</u>
20	sitio loxG	<u>ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTGC</u>
	M	dominio de membrana de una inmunoglobulina (IgA1, IgA2), exón del mismo
	M1	primer dominio de membrana de una inmunoglobulina (IgG, IgE, IgD, IgM), exón del mismo
25	M2	segundo dominio de membrana de una inmunoglobulina (IgG, IgE, IgD, IgM), exón del mismo
	mIgG1	IgG1 situada sobre membrana; mRNA de la misma

	myc-tag	secuencia de péptido, que el anticuerpo monoclonal 1-9E10 reconoce; secuencia de DNA del mismo
	mieloma	componente de fusión para la producción de un hibridoma; descendiente de una línea celular de
5		plasmacitomas
	Neo	el gen de neofosforiltransferasa II transmite resistencia a la neomicina o al G418, gen del mismo
	P	promotor
10	pBS185	vector de expresión Cre de Life Technologies (Gibco-BRL) n° 10347-011
	PEG	polietilenglicol
	pGH-1	gen de Neo y gen de HSV-tk flanqueado por un sitio loxP; Gu y Rajewsky, Cell <u>73</u> , 1155-1164,
15		1993;
	PGK	fosfoglicerina-quinasa
	PGKneo	gen de resistencia al neo (G418), controlado por el promotor PGK
	pMC-Cre	vector de expresión Cre; Gu y Rajewsky, Cell <u>73</u> ,
20		1155-1164, 1993; véase también animal transgénico en web: www.med.umich.edu/tamc/mta.html
	pIC-Cre	Cre vector de expresión Cre; Gu y Rajewsky, Cell <u>73</u> , 1155-1164, 1993
	pOG44	vector de expresión Flp de Invitrogen; n° de producto: V6005-20 o del kit Flp-In™ pcDNA5/FRT Core
25		con n° de producto K6010-02

	polX mu	número de registro del banco de datos EMBL: AJ251804 (ratón), AJ131891 (<i>Homo sapiens</i>); mRNA completo
5	pOPE101-215	número de registro del banco de datos EMBL: ASY14585; gen sintético de un anticuerpo scFv(215); véase también Kontermann y col., Biol. Chem. Hoppe-Seiler <u>376</u> , 473-481, 1995
10	pREP4	Invitrogen V004-50; plásmido replicable episómico en células de mamíferos, seleccionable por higro- micina
	pSH47	número de registro del banco de datos EMBL: AF298782; vector de expresión Cre para levaduras
15	pSVlacZT	vector de sustrato de recombinación Cre para la detección de la actividad de la Cre; Torres y Kühn, en: Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting, 1997, Oxford University Press, ISBN 0-19-963677-X
	proteína G	proteína de unión a anticuerpo para la detección de dominios constantes de anticuerpo
20	RAD 54	número de registro del banco de datos EMBL: BC001965; mRNA completo
	RAD51B	número de registro del banco de datos EMBL: U84138; mRNA completo
25	RecQ4	número de registro del banco de datos EMBL: AB006532; mRNA completo
	scFv, scFvn	anticuerpo Fv de cadena simple
	sIgG1	IgG1 secretada; mRNA de la misma
	Stop	codón de paro

upstream partiendo del extremo 3' de una secuencia de DNA
 en dirección al extremo 5'

vH, vH1, vHn dominio variable de la cadena larga de anti-
 cuerpo

5 vL, vL1, vLn dominio variable de la cadena corta de anti-
 cuerpo

vlambda dominio variable de la cadena corta lambda del
 anticuerpo

vkappa dominio variable de la cadena corta kappa del
 10 anticuerpo

XRCC2 número de registro del banco de datos EMBL:
 AF035587; mRNA completo

XRCC3 número de registro del banco de datos EMBL:
 AF035586; mRNA completo.

15 Un primer aspecto de la presente invención es, pues, un
 procedimiento para la producción de una biblioteca de proteí-
 nas, en especial de una biblioteca de anticuerpos humanos
 (figuras 5, 6, 9), dicho procedimiento se caracteriza porque:

 - en uno o dos lugares (loci) activos de gen, en espe-
 20 cial en los genes vH y vL expresados de una línea celular B
 se introducen señales específicas de recombinación (es decir,
 se generan aceptores de secuencias de DNA; figuras 3, 4, 6),
 en especial por recombinación homóloga (figuras 3, 4);

 - se expande la línea celular resultante;
 25 - con relativamente pocos cebadores de PCR específicos
 de segmentos de gen, en especial con cebadores específicos de
 vH, vkappa y vlamba, y con contracebadores específicos de

los segmentos JH, Jkappa y Jlambda se multiplica un gran número de diferentes fragmentos de genes (figura 14);

- el gran número los fragmentos de genes multiplicados están en cada caso flanqueados por señales específicas de recombinação (es decir, se generan secuencias de DNA dador, 5 figuras 5, 6);

- dicho gran número de fragmentos de gen multiplicados se transfiere a la línea celular mencionada y en ella, por influencia de una recombinasa específica, en especial de Cre 10 o de la Flp, tiene lugar un gran número de acontecimientos de recombinação específica (figura 5, 6) dentro de los lugares (loci) de gen activos mencionados y

- debido a los acontecimientos de recombinação específica se generan distintas células que en cada caso presentan 15 sobre la superficie de las células correspondientes distintas proteínas, modificadas con respecto a las células de partida, en especial anticuerpos (figura 9).

La presente invención se refiere, pues, a un procedimiento, con el que se alteran de modo sencillo y ventajoso 20 las células de hibridoma de ratón ya existentes, en especial con el que se pueden humanizar dichas células (figuras 3, 7). Este procedimiento se caracteriza porque:

- dichas células de hibridoma pueden alterarse con una recombinação homóloga del locus de anticuerpo activo, sin 25 que se utilice un marcado de resistencia que pueda interferir;

- dicha recombinação homóloga conduce a un producto genético alterado, en especial a un anticuerpo humanizado;

- dicho producto genético alterado, en especial el antiecuerpo humanizado se presenta sobre la superficie de dicha célula de hibridoma modificada por recombinación homóloga y

- esta presentación en la superficie se aprovecha para
5 la selección de la célula alterada.

Para la ejecución de este procedimiento y de las formas de ejecución específicas descritas a continuación, los expertos podrán proceder con arreglo a procedimientos ya conocidos en general o con arreglo a los métodos descritos a continuación y en los ejemplos.
10

Introducción de sitios de reconocimiento de recombinasas por recombinación homóloga

Un elemento fundamental de la presente invención es la introducción de secuencias alteradas de DNA, en especial de
15 sitios de reconocimiento de recombinasas en el genoma de las líneas celulares mediante recombinación homóloga (figuras 3, 4, 8). De este modo pueden reemplazarse secuencias de DNA en un lugar (locus) de gen definido. Esto se consigue flanqueando las secuencias de DNA recién introducidas por regiones
20 homólogas al locus de gen definido, que tienen por lo general una longitud >700 bp y en esta forma (en su mayor parte en forma de DNA linealizado; véase Hasty y col., Mol. Cell. Biol. 12, 2464-2474, 1992) se transfectan en las células. En algunos casos (aprox. 1 de cada 10^7 células) tiene lugar a
25 continuación la deseada recombinación homóloga. Estos acontecimientos poco frecuentes o células recombinadas homólogas tienen que aislarse seguidamente p.ej. mediante un marcador de resistencia o mediante un clasificador FACS (véase a con-

tinuación) o mediante un ensayo ELISA. Los expertos ya conocen los procedimientos requeridos para ello (entre otros procedimientos de clonación, PCR, secuenciación, cultivo celular de células de hibridoma, recombinación homóloga, selección
5 mediante G418, FACS) y que se han descrito en un gran número de manuales de laboratorio (entre otros el de Sambrook y Russell: *Molecular Cloning, a laboratory manual*; 3ª edición, 2001, ISBN 0-87969-577-3). Se emplea actualmente una combinación de estos procedimientos o de otros similares con el elemento
10 fundamental de la recombinación homóloga de secuencias alteradas de DNA en el genoma de una línea celular sobre todo para la generación de ratones transgénicos o de las líneas celulares ES necesarias para ello (Thomas y Capecchi, *Cell* 51, 503-512, 1987; Thompson y col., *Cell* 56, 313-321, 1989; Johnson y col., *Science* 245, 1234-1236, 1989; Doetschman y col., *Nature* 330, 576-578, 1987; "Transgene Tiere" (animales transgénicos) de J. Schenkel, 1995, editorial Spektrum, ISBN 3860252690; Vasquez y col., *Manipulating the mammalian genome by homologous recombination*; en: *PNAS* 98, 8403-8410, 2001;
15 Torres y Kühn, *Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting*, 1997, Oxford University Press, ISBN 0-19-963677-X). Los sitios específicos de reconocimiento de recombinasas se emplean entre otros para suprimir exones individuales de genes definidos en tejidos definidos con las recombinasas inducidas
20 específicas de dichos tejidos. En la presente invención se adaptan estas técnicas a otras líneas celulares apropiadas, en especial líneas celulares de hibridoma. También dentro de las líneas celulares de hibridoma se han realizado ya

recombinaciones homólogas (Zou y col., *Current Biology* 4, 1099-1103, 1994; Shulman y col., *Mol. and Cell. Biology* 10, 4466-4472, 1990; Sun y col., *J. of Immunology* 152, 695-704, 1994; Baker y col., *J. Immunological Methods* 168, 25-32, 1994; Wood y col., *PNAS* 88, 8006-8010, 1991; Fell y col., *PNAS* 86, 8507-8511, 1989).

Recombinación específica

Los expertos conocen además sitios de reconocimiento idóneos y las correspondientes recombinasas (entre otros, Stricklett y col., *The Cre/loxP system and gene targeting in the kidney*; *Am. J. Physiol.* 276, F651-F657, 1999, revisado; Stricklett y col., *Site-specific recombination using an epitope tagged bacteriophage P1 Cre recombinase*; *Gene.* 215, 415-23, 1998; Van Duyne, *A structural view of cre-loxp site-specific recombination*; *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30, 87-104, 2001, revisado; Theodosiou y Xu, *Use of FLP/FRT system to study *Drosophila* development*; *Methods* 4, 355-65, 1998, revisado; Sadowski, *The Flp recombinase of the 2-microns plasmid of *Saccharomyces cerevisiae**; *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 51, 53-91, 1995, revisado). Son ejemplos de sistemas apropiados:

- el sistema Cre-lox (recombinasa Cre, sitios de reconocimiento específico loxP; véase entre otros el kit Creator™ de Clontech; patente US-4959317; Griffiths y col., *EMBO Journal* 13, 3245-3260, 1994);

- el sistema Flp (recombinasa Flp, sitios de reconocimiento específico FRT; O'Gorman y col., *Science* 251, 1351-

1355, 1991; kit completo Flp-In™ pcDNA5/FRT de Invitrogen n° K60101-01) y

- el sistema Gateway (lambda-integrasa Int e Integration Host Factor IHF, sitios de reconocimiento específico attB x attP y attL x attR; véase entre otros Gateway™ de Gibco BRL/Invitrogen); son preferidos el sistema Cre-lox y el sistema Flp.

El uso de varios sistemas dentro de una célula deberá preferirse cuando las señales específicas de recombinación tengan que introducirse en más de un lugar (locus) de gen, es decir, cuando tengan que generarse distintos aceptores de las secuencias de DNA. Son ejemplos de ello los loci de gen vH y vkappa de una línea celular de hibridoma, que en cada caso tendrán que estar flanqueados por sitios de reconocimiento específico de las recombinasas (figura 5). Si todos ellos fueran reconocidos por la misma recombinasa, entonces se producirían interferencia entre los diversos lugares (loci) de gen o entre los vectores de intercambio empleados. Esto no se aplica cuando se dispone de 4 sitios de reconocimiento distintos, no (o poco) recombinantes entre sí, p.ej. los sitios loxP siguientes: loxP, loxP511, loxG, lox66 y lox71. Entonces un tipo de recombinasa puede utilizarse para dos lugares (loci) de gen.

Los sitios loxP (los sitios FRT tienen una estructura muy similar) constan de dos repeticiones inversas de 13 bp de longitud, separadas por un espaciador de 8 bp de longitud. Este espaciador determina la direccionalidad de los DNA recombinados flanqueados por sitios loxP, es decir, con un si-

tio loxP (genómico) o FRT, el experimentador podrá determinar el lugar de gen cromosómico exacto y al mismo tiempo la orientación del DNA recombinado en él. Normalmente, las frecuencias más elevadas de recombinación que en el caso de la
5 recombinación homóloga se consiguen con el reemplazo de las cassettes de gen. Para ello, las secuencias de DNA a reemplazar tanto en el genoma como en los vectores de reemplazo están flanqueadas por dos sitios loxP o FRT ligeramente distintos, que por las diferencias de secuencia pueden recombinarse
10 con un componente adecuado, pero no entre sí (figura 5). Esta técnica se ha descrito en la patente US-5928914 y en la publicación de Feng y col., (J. Mol. Biol. 292, 779-785, 1999) sobre el sistema Cre-lox y en las publicaciones de Seibler y Bode (Biochemistry 36, 1740-1747, 1997; Biochemistry 33,
15 12746-12751, 1994) sobre el sistema Flp. El reemplazo de cassettes tiene lugar también en los genes entre dos sitios de reconocimiento de igual identidad invertidos (p.ej. loxP-gen-Pxol). En este caso, el producto de una recombinación específica puede tener tres formas: 1. el gen entre los sitios loxP
20 puede invertirse. Además, el gen entre los sitios loxP puede sustituirse por otro recombinando, que 2. se integra en la orientación correcta y 3. se integra en una orientación errónea entre los sitios de reconocimiento. Incluso cuando antes del reemplazo no exista entre los sitios de reconocimiento
25 ningún marcador seleccionable negativamente, tendrá lugar una recombinación específica en aprox. un 1 % de las células, que hayan sobrevivido a la transfección (Feng y col., J. Mol. Biol. 292, 779-785, 1999).

Son también conocidos los procedimientos y vectores de expresión que permiten que dichas recombinasas se expresen de modo transitorio en células eucariotas (Taniguchi y col., Efficient production of Cre-mediated site-directed recombinants through the utilization of the puromycin resistance gene, *pac*: a transient gene-integration marker for ES cells. *Nucleic Acids Res.* 26, 679-680, 1998; Araki y col., Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: comparison of various promoters; *J. Biochem. (Tokyo)* 122, 977-82, 1997; Ludwig y col., FLP-mediated sitespecific recombination in microinjected murine zygotes; *Transgenic Res.* 5, 385-395, 1996; vector de expresión Flp pOG44 de Invitrogen, n° V6005-20), de modo integrado estable o episómico en líneas celulares (Seibler y Bode, *Biochemistry* 36, 1740-1747, 1997) en animales transgénicos (Nelson y col., Expression of an AQP2 Cre recombinase transgene in kidney and male reproductive system of transgenic mice; *Am. J. Physiol.* 275, C216-226, 1998) o incluso de modo específico de tejidos ("Transgene Tiere" (animales transgénicos) de J. Schenkel, 1995, editorial Spektrum, ISBN 3860252690). Las recombinasas propiamente dichas pueden adquirirse en forma de proteínas purificadas (p.ej. el kit Creator™ de Clontech) y pueden eventualmente en esta forma transfectarse incluso al interior de las células.

25 Secuencias de DNA y lugares (loci) de gen apropiados

Son también conocidas las secuencias de DNA de genes apropiados, de fragmentos de gen (en especial vH, vlambda, vkappa y los correspondientes segmentos J) y lugares (loci)

de gen del hombre (<http://genome.ucsc.edu/goldenPath/hg-Tracks.html>; www.gdb.org; www.gdb.org/hugo; www.ncbi.nlm.nih.gov; www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink) o del ratón (www.informatics.jax.org), en especial los loci de gen
 5 de anticuerpo activos y la gran variedad de genes de anticuerpos (Immunoglobulin Facts Book, Lefranc y Lefranc, 2001, Academic Press, ISBN 0-12-441351-X; <http://imgt.cines.fr>; banco de datos de Kabat: <http://immuno.bme.nwe.edu>) y los lugares (loci) de gen del receptor de células T (T-Cell Re-
 10 ceptor Facts Book, Lefranc y Lefranc, 2001, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8; <http://imgt.cines.fr>). En el sentido de esta invención son especialmente preferidos los loci de gen de anticuerpo activo, en especial la línea celular de hibridoma murino HEA125, que expresan genes de anticuerpos genómi-
 15 camente recombinados.

También es posible emplear en un principio lugares de gen desconocidos, p.ej. por selección de células que tengan una relación de expresión lo más elevada posible de una resistencia a los antibióticos (figura 6). Vanin y col., (De-
 20 velopment of hightiter retroviral producer cell lines by using Cre-mediated recombination; J. Virol. 71, 7820-7826, 1997) describen un procedimiento idóneo para ello, que es muy parecido al primer paso de procedimiento representado en la figura 6 (integración en lugar de reemplazo de cassettes).
 25 Para ello, el gen de resistencia seleccionado por la alta relación de expresión está flanqueado por señales específicas de recombinación. Un sistema parecido es el que vende Invitrogen (kit completo Flp-In™ pCDNA5/FRT, n° K6010-01; paten-

tes US-5654182 y 5677177). Esto permite el reemplazo relativamente sencillo del gen de resistencia preseleccionado por ejemplo por un grupo de distintos genes de anticuerpos. Con preferencia, como paso intermedio se introducen antes otras
5 señales adicionales de recombinación, que flanquean a una porción variable, es decir, reemplazable de gen, en especial por el hecho de estas junto con una porción constante del gen pueden recombinarse e integrarse en el locus de gen preseleccionado (figura 6). En este caso además:

10 1. con la expresión de gen de resistencia se selecciona la integración de señales específicas de recombinación en un primer locus de gen activo (o bien en la correspondiente línea celular resistente),

 2. debido a las señales específicas de recombinación se
15 recombina una porción constante de proteína, en especial los dominios de empalme diferencial (opcionalmente con CH1) CH2, CH3, M1 y M2 de un gen de la IgG1 humana,

 3. de este modo se recombinan al mismo tiempo los genes de porciones variables de proteína, en especial un gen vH o
20 un gen scFv de un anticuerpo, que está flanqueado además por 2 señales de recombinación específicas adicionales,

 4. se selecciona el acontecimiento de recombinación deseado en base a la presentación en superficie del anticuerpo expresado,

25 5. a continuación se procede eventualmente de modo similar con los genes de la cadena corta del anticuerpo y

6. por recombinación específica se recombina una gran variedad de anticuerpos distintos en los loci de gen mencionados.

Producción de secuencias de DNA complejas

5 Otro elemento fundamental de la presente invención es la producción de un gran número de secuencias de DNA distintas, en especial del mayor número posible de genes de anticuerpos distintos. En cada caso flanqueadas por los mencionados sitios de reconocimiento de la recombinasa, estas secuen-
10 cias de DNA sirven como dadores de muchas secuencias de DNA distintas, que por influencia de las recombinasas se recombinan con una eficacia relativamente alta en los loci de gen mencionados con los aceptores mencionados de las secuencias de DNA. Los expertos ya conocen las técnicas requeridas para
15 ello, en especial las técnicas PCR (véase entre otros Sambrook y Russell: Molecular Cloning, a laboratory manual, 3ª edición, 2001, ISBN 0-87969-577-3; en especial el capítulo 8 en el que se describen las técnicas PCR) y las secuencias de DNA (véanse las páginas anteriores), que se han descrito en
20 un gran número de publicaciones, sobre todo para la producción de bibliotecas de anticuerpos recombinantes (véase entre otros "Rekombinante Antikörper" (anticuerpos recombinantes), capítulo 2.2, de Breitling y Dübel, 1997, editorial Spektrum, ISBN 3-8274-0029-5). En especial el libro Immunoglobulin
25 Facts Book (Lefranc y Lefranc, 2001, Academic Press, ISBN 0-12-441351-X) es, junto con los números de registro para los bancos de datos que contiene, una excelente fuente de las aprox. 200 secuencias variables (y constantes) de anticuerpos

humanos. La multiplicación de la gran variedad de genes de anticuerpos humanos recombinantes genómicos puede realizarse en el sentido de la presente invención p.ej. de modo relativamente sencillo por combinación de unos pocos (en cualquier caso menos de 50) cebadores de PCR específicos vH , $vkappa$ y $vlambda$ con (en cada caso menos de 6) contracebadores específicos de los segmentos J_H , J_{kappa} y J_{lambda} (figura 14), para ello los cebadores se hibridan con preferencia con regiones genómicas evolutivamente poco conservadas. Lo mismo se diga de los genes de anticuerpos murinos. Como moldes de las menos de 1.000 reacciones PCR requeridas para ello se emplea el DNA genómico de un gran número de linfocitos B obtenidos en especial de la sangre humana. El DNA genómico de estos linfocitos B contiene muchos genes de anticuerpos recombinados genómicos distintos (vH , $vkappa$, $vlambda$), que pueden multiplicarse de modo muy simple por el procedimiento descrito hasta alcanzar una gran variedad. De manera muy similar, también la gran variedad de receptores de células T recombinados genómicos puede convertirse en un grupo de secuencias de DNA apropiadas con relativamente pocos reacciones PCR.

Para flanquear esta gran variedad de secuencias de DNA distintas con los sitios de reconocimiento mencionados de las recombinasas, estos pueden clonarse con un vector de clonación predeterminado, que ya contenga estos sitios de reconocimiento, o bien realizando una segunda PCR posterior que aporte con los cebadores PCR empleados estos sitios de reconocimiento. El grupo de los distintos productos de la PCR se clona seguidamente con preferencia en un plásmido (p.ej. el

pUC19 de Biolabs, el pBluescript de Stratagene, los pCR-TOPO, pCR-XL-TOPO, pCR-Vector, pZerO-1, pCR-Blunt, pSinRep5 de Invitrogen). Opcionalmente, un origen de replicación puede conducir bajo la presión de selección a una replicación episómica estable (p.ej. los vectores pCEP4, pREP7, pREP10, pEBVHis o pREP4 de Invitrogen replicantes episómicos seleccionables con higromicina). De este modo puede prolongarse de modo muy sencillo el tiempo, dentro del cual puede realizarse una recombinación específica con los loci de gen mencionados. Para ello es necesaria, obviamente, la presencia de las recombinasas correspondientes o de los vectores de expresión correspondientes. En una forma de ejecución especialmente preferida, las cassettes de expresión de las recombinasas mencionadas se incorporan al vector de clonación recién mencionado.

Un grupo de plásmido distintos puede generarse en caso necesario también "in vitro" con una complejidad extremadamente elevada ($>10^{12}$), evitando multiplicarlos previamente en bacterias (actualmente pueden lograrse de modo rutinario por electroporación complejidades de aprox. 10^9 clones bacterianos independientes por cada μg de DNA empleado; véase p.ej. Clontech n° C2023-1 330, la cepa KC8 de *E. coli* $>10^9$ cfu/ μg de pUC). Para ello se circularizan con preferencia en primer lugar con una ligasa los distintos productos de PCR descritos, que están flanqueados por los sitios de reconocimiento de recombinasas mencionados, que son dadores de secuencias de DNA, y se mezclan con un vector de clonación que contiene los mismos sitios de reconocimiento (aceptores de secuencias de DNA). Por influencia de las proteínas de recombinasa purifi-

cadass se genera "in vitro" una mezcla muy compleja de vectores de clonación que tienen distintas secuencias de DNA recombinadas. Los expertos también conocen este procedimiento, que ya es un producto comercial (véase entre otros el kit
5 Creator™ de Clontech; Gateway™ de GibcoBRL /Invitrogen).

Aparte existen otros procedimientos que los expertos ya conocen, con los que puede producirse un gran número de secuencias de DNA distintas (p.ej. el barajado de DNA (DNA-shuffling) "in vitro", Stemmer, Nature 370, 389-391, 1994; o
10 la multiplicación de la gran variedad de cDNA de anticuerpos o de DNA genómico recortado pequeño y no dirigido). Cabe mencionar aquí en especial la producción de genes de anticuerpos muy diferentes por síntesis combinatoria de secuencias de DNA, en especial de diferentes secuencias de CDR-DNA (Brei-
15 tling y col., 1990, "Bibliotecas de anticuerpos humanos sintéticos", patente alemana n° P 40 02 897; véase también la biblioteca de anticuerpos HuCal de la empresa Morphosys).

Líneas celulares

La línea celular HEA125 de hibridoma murino preferida
20 para el procedimiento de la invención produce un anticuerpo IgG1 de ratón con una cadena kappa de ratón. Este anticuerpo monoclonal reconoce al antígeno Ep-CAM asociado con tumores humanos con una afinidad y especificidad elevadas (Moldenhauer y col., Br. J. Cancer 56, 714-722, 1987; Momburg y
25 col., Cancer Research 47, 2883-2891, 1987). Una subpoblación derivada de los mismos presenta relativamente muchos anticuerpos unidos a membrana en la superficie. Son también idóneas para el procedimiento de la invención otras líneas celu-

lares, en especial otras células de hibridoma o líneas celular linfoides, p.ej. las líneas humanas:

- la U266, que produce una cadena lambda y una IgE (Ikeyama y col., Purification and characterization of IgE produced by human myeloma cell line U266; Mol. Immunol. 23, 159-167, 1986);

- la IM-9 (Lesniak y Roth, Regulation of receptor concentration by homologous hormone. Effect of human growth hormone on its receptor in IM-9 lymphocytes; J. Biol. Chem. 251, 3720-3729, 1976) y

- la línea Jurkat de células T (Gillis y Watson, Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules; V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line; J. Exp. Med. 152, 1709-1719, 1980) o

- la línea DT40 de células B de pollo (Buerstedde y Takeda, Cell 67, 179-188, 1991).

Las líneas celulares humanas tienen la ventaja adicional de que con ellas se evita la glucosilación algo diferente de las células murinas (Borrebaeck, Nat. Biotechnol. 17, 621, 1999).

Las líneas de células T como la Jurkat deberán preferirse cuando tenga que producirse una biblioteca de receptores de células T, o bien cuando tenga que emplearse el locus de gen activo de receptor de células T. En cambio, la línea DT40 de células de pollo posee una eficacia relativamente muy elevada para la recombinación homóloga de DNA transfectado.

Transfección

También la transfección de las células eucariotas se realiza por procedimientos estándar ya conocidos por los expertos (Sambrook y Russell: Molecular Cloning, a laboratory manual, 3ª edición, 2001, ISBN 0-87969-577-3; capítulo 16) p.ej. por electroporación (empresa AGS / Hybaid o bien BioRad, Manual de los electroporadores BTX o bien BioRad GenePulser) o por transfección p.ej. con el reactivo LipofectAMINE™ 2000 (Invitrogen, nº 1668-027), con el reactivo DMRIE-C (Invitrogen, nº 10459-014), o con el reactivo LipofectAMINE™ (Invitrogen, nº 18324-012), con el reactivo de transfección FuGENE 6 (Roche, nº 1815091), con el reactivo de transfección liposómica DOTAP (Roche, nº 1811177) o con el reactivo de transfección liposómica DOSPER (Roche, nº 1811169). La porción de los hibridomas electroporados con éxito se sitúa por lo general entre el 30 y el 40 % de las células empleadas. Para las transfecciones destinadas a una recombinación homóloga de las secuencias de DNA transfectadas, con preferencia se linealizan las secuencias de DNA mencionadas. Si se desea la recombinación específica de las secuencias de DNA transfectadas, entonces se emplearán con preferencia secuencias de DNA circulares, son idóneas para ello en especial los vectores replicantes episómicos en células de hibridoma (véanse las páginas anteriores). La porción de recombinaciones específicas realizadas con éxito por reemplazo de cassettes dentro de una célula eucariota se sitúa aprox. en el 1% de las células electroporadas con éxito (Feng y col., Site-specific chromosomal integration in mammalian cells: highly efficient CRE recombinase-mediated cassette exchange; J. Mol. Biol.

292, 779-785, 1999), de modo que empleando 3×10^9 células se obtienen aprox. 10^7 acontecimientos distintos de recombinación específica.

5 Expresión en superficie / procedimiento de enriquecimiento

Otro elemento fundamental de la presente invención es el aislamiento o el enriquecimiento de aquellas células (a ser posible después de cada paso del procedimiento), en las que se ha realizado el acontecimiento de recombinación deseado (figuras 7, 8, 9). La invención lo permite con la detección de las proteínas alteradas sobre la superficie de las células vivas que las producen. También esto puede realizarse por procedimientos convencionales, que los expertos ya conocen, como el uso de esferillas magnéticas (empresa Dynal, 15 Oslo, Noruega; manual técnico: "Cell Separation and Protein Purification" de Dynal; Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Nueva York, ISBN 0-471-52276-7 y el sistema MACS de la empresa MiltenyiBiotec (www.miltenyibiotec.com)) o de un clasificador FACS (Shapiro, H.M., Practical Flow Cytometry, 3ª edición, 1995, Wiley-Liss., Nueva York, ISBN 0-471-20 30376-3; Darzynkiewicz y col., Flow Cytometry, 2ª edición, 1994, Academic Press, ISBN 0-12-564142-7; Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Nueva York, ISBN 0-471-52276-7) o con un ensayo ELISA y subclonación reiterada. Los 25 acontecimientos de recombinación homóloga muy raros (aprox. 1 de cada 10^7 células) pueden identificarse p.ej. con un aparato FACS Vantage SE equipado con un turboclasificador o con un aparato FACSDiva (Becton-Dickinson) o con un MoFlow (Cytoma-

tion), en los que con la introducción señales de recombinación específica en loci de gen definidos puede realizarse además una preselección basada en un gen de resistencia recombinado (p.ej. a la geneticina (G418) de Sigma; Chauhan y
5 Gottesman, Construction of a new universal vector for insertional mutagenesis by homologous recombination; Gene 120, 281, 1992). Este tipo de preselección no es esencial para la presente invención y se evitará en especial cuando el gen de resistencia integrado en el cromosoma impida la expresión en
10 superficie de la proteína alterada por la recombinación homóloga. Un ejemplo de tal obstaculización de la expresión en superficie es la humanización de células de hibridoma por recombinación homóloga descrita por Yarnold y Fell (Cancer Research 54, 506-512, 1994). En este caso, el gen de resis-
15 tencia se integra en el intrón, situado entre CH3 y M1, esencial para el empalme diferencial.

Pueden enriquecerse también los acontecimientos de recombinación específica más frecuentes (aprox. 1 entre 10^2 y 10^3 células en caso de intercambio de cassettes) por procedi-
20 mientos estándar de detección de proteínas alteradas sobre la superficie de las células con un clasificador FACS o con esferillas magnéticas (figura 9), que se describen en los ejemplos posteriores.

Para ello, las proteínas alteradas se tiñen con preferencia antes de la clasificación en el FACS con anticuerpos
25 mono- o policlonales marcados con fluorescencia (o con proteína G o similares), que son productos comerciales suministrados por muchas empresas (p.ej. Jackson ImmunoResearch,

West Grove, PA, EE.UU. o Dianova, Alemania o Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, EE.UU. o BIOZOL, Alemania). Las señales claras se obtienen en especial con una tinción doble, en la que dos marcadores fluorescentes distintos detectan las proteínas codificadas por las secuencias de DNA intercambiadas (o su ausencia). Los expertos ya conocen los procedimientos requeridos para ello, que se han descrito en un gran número de publicaciones detalladas (p.ej. Scheffold y Kern, Recent developments in flow cytometry; J. Clin. Immunol. 20, 400-7, 2000; revisión; Thiel, A., Scheffold, A., Radbruch, Immunomagnetic cell sorting-pushing the limits; Immunotechnology 2, 89-96, 1998; revisión; así como los manuales de citometría antes citados). Por ejemplo, el intercambio de un dominio kappa de origen murino por uno humano (por recombinación homóloga o específica) puede detectarse por tinción con un anticuerpo kappa de cabra anti-humano marcado con FITC y después clasificarse, tiñiéndose al mismo tiempo con un anticuerpo kappa de cabra anti-murino marcado con PE. Se puede incluso detectar la ausencia de una señal, p.ej. por recombinación homóloga reemplazando el dominio VH de un anticuerpo IgG presentado sobre la superficie de un hibridoma por un gen de resistencia G418. Después de la pre-selección con G418, la tinción con un anticuerpo IgG de cabra anti-ratón marcado con FITC proporciona otro enriquecimiento de los resultados de la recombinación homóloga con el clasificador FACS: las células de fluorescencia verde no han adquirido en este caso la resistencia G418 por la recombinación homóloga y por ello se empobrecen en el FACS. Puede ser útil

también el uso de anticuerpos monoclonales específicos de epítopes, p.ej. un anticuerpo específico del epítoto Mycl-9E10 (Evan y col., Mol. Cell. Biol. 5, 3610-3616, 1985), con el que pueden detectarse p.ej. dominios vH alterados. Las

5 secuencias de DNA intercambiadas pueden detectarse también directamente, sin tinción adicional, en el FACS, en el caso de que p.ej. se haya recombinado el gen de una EGFP (proteína fluorescente verde intensificado; Clontech) y se haya expresado.

10 La presentación en la superficie de anticuerpos se consigue en la presente invención con preferencia por el empalme diferencial del mRNA de la cadena larga de anticuerpo (o de los correspondientes mRNAs quiméricos) (figura 2; Inmunología de Janeway y Travers, capítulos 3-24, 4ª edición, 1999, editorial Spektrum, ISBN 443062757). Esto conlleva la ventaja de

15 que aparte de una variante unida a la membrana por enlace covalente se dispone también de grandes cantidades de la forma secretada al medio de cultivo para la caracterización rápida y simple de un clon de célula o de una biblioteca de

20 células. La porción de anticuerpos unidos a la membrana y, por tanto, la intensidad de señal esperada puede aumentarse acortando el intrón situado entre el dominio CH3 y el dominio M1 de una IgG o IgA (o bien entre el dominio CH4 y el dominio M1 de una IgM), en especial en una longitud comprendida entre

25 300 bp y 1.000 bp (Peterson y Perry, PNAS 83, 8883-8887, 1986; Tsurushita y Korn, Molec. Cell. Biol. 7, 2602-2605, 1987; Galli y col., Genes Dev. 1, 471-481, 1987; Seipelt y Peterson, Molecular Immunology 32, 277-285, 1995; figura 3,

III.). Como alternativa pueden emplearse también otras anclas de membrana, p.ej. el receptor de células T-alfa (número de registro EMBL = X02883, las secuencias del exón 3) o una molécula MHC, con lo cual pueden presentarse todavía más proteínas sobre la superficie. También es posible la unión no covalente de los anticuerpos sobre la superficie de las células por la proteína G situada sobre la membrana (Breitling y col., 1999, PCT DE 00/00079), pero esto conlleva el inconveniente de la interferencia (crosstalk): en este caso no todos los anticuerpos se codifican necesariamente con las células que los presentan.

La presentación en la superficie es de gran utilidad en especial cuando tienen que investigarse muchas ($>10^2$) células distintas entre sí por las proteínas expresadas, con arreglo a una actividad determinada de las proteínas. Según la presente invención, esto se consigue de modo muy similar a la técnica de los anticuerpos recombinantes, en la que esto se consigue en especial por la presentación de los anticuerpos en un fago (Breitling y col., Gene 104, 147-153, 1991) o en una bacteria (Fuchs y col., Bio/Technology 9, 1369-1372, 1991). Tal como allí se describe, pueden investigarse de este modo bibliotecas de proteínas esencialmente más complejas. La presente invención tiene la ventaja adicional de una intensidad de señales relativamente muy elevada gracias al gran número de proteínas similares presentadas en cada caso, en especial de anticuerpos. Un clasificador FACS trabaja actualmente con velocidades de clasificación de aprox. 10^8 células por hora (p.ej. FACSVantage SE, ver páginas anteriores), te-

niendo en cuenta que una biblioteca de proteínas todavía más compleja puede además enriquecerse previamente con esferillas magnéticas. La técnica de la clasificación FACS requerida para esta invención se ha descrito en Kern y col., (Nature
5 Medicine 4, 975-978, 1998) y Maecker y col., (J. Immunol. Methods 255, 27-40, 2001), que con ella consiguieron identificar células T específicas de epítopes.

Biblioteca de anticuerpos de hibridoma

En una forma preferida de ejecución del procedimiento
10 de la invención, después de un paso de transfección con un grupo de secuencias de DNA distintas y posterior recombinación específica (figuras 5, 6) se realiza un enriquecimiento de células productoras de anticuerpos unidos a la superficie de una diversidad de anticuerpos lo más elevada posible (fi-
15 gura 9). Esto puede realizarse del modo antes descrito, es decir, el grupo de las células de hibridoma se tiñe del modo descrito con 2 reactivos distintos y después se clasifican en el FACS el mayor número posible de células. Con ello se empobrecen las células, que poseen una muestra de color típica de
20 la célula inicial. Esto sucede p.ej. por detección de un epítotope myc en el dominio vH de la célula inicial. Como alternativa puede sacarse provecho p.ej. de que la célula inicial antes de la recombinación específica no presente anticuerpos sobre la superficie, sino que en su lugar se haya insertado
25 en el locus de gen de la línea celular monoespecífica un gen de resistencia G418. En cambio se enriquecen las células que presentan una cadena IgG en especial humana o una cadena kap-

pa o lambda. Tales son las células que han pasado por una recombinación específica productiva.

El resultado de este proceder es una biblioteca compleja de hibridomas ($>10^6$ especificidades distintas de hibridomas) (figuras 5, 6, 9), cuyos componentes individuales presentan grandes cantidades de un anticuerpo humano sobre la superficie (aprox. de 10^4 a 10^6 moléculas de anticuerpo por célula). El número de los anticuerpos presentados por célula se sitúa en un marco relativamente estrecho, ya que todas las células proceden del mismo hibridoma parental. Es, pues, también objeto de la presente invención una biblioteca de anticuerpos, que puede obtenerse por el procedimiento de la invención. Esta biblioteca contiene con preferencia un grupo de por lo menos 100 células distintas, con mayor preferencia un grupo de por lo menos 1000 células.

El procedimiento descrito para la producción de una biblioteca de anticuerpos de hibridoma se describe también en las figuras 3, 5 y 9:

- el grupo antes descrito, lo más complejo posible de plásmidos de gen vL se electropora en el mayor número posible de células (aprox. 3×10^9 células) de una línea celular mono-específica, al mismo tiempo se electropora en las células p.ej. un vector de expresión de la Flp;

- la porción de los hibridomas electroporados con éxito se sitúa normalmente entre el 30 y el 40 % de las células empleadas. De este modo se genera un grupo de células de hibridoma, que presentan una frecuencia de aprox. 1 a 300 dominios vL distintos sobre la superficie, de modo que se

genera una biblioteca de hibridomas de una complejidad de aprox. 10^7 hibridomas distintos (cantidad total: 3×10^9 células), es decir, de anticuerpos distintos;

- este grupo de células de hibridoma se expande opcionalmente y después se tiñe con dos reactivos distintos, del modo ya descrito;

- a continuación se clasifica el mayor número posible de células en el FACS o con esferillas magnéticas. Se empobrecen con ellos las células de la línea celular monoespecífica y las células recombinadas improproductivas; se enriquecen las células que presentan una cadena kappa o lambda humanas;

- el grupo de plásmidos de gen vH lo más complejo posible, recién descrito, se electropora en el mayor número posible de las células de hibridoma del grupo recién descrito. Al mismo tiempo se electropora un vector de expresión de la Cre en las células;

- de este modo se genera un grupo de células de hibridoma, que presentan sobre la superficie una frecuencia de aprox. 1 a 300 dominios vH distintos;

- se tiñe de nuevo este grupo de células de hibridoma del modo descrito con 2 reactivos de tinción distintos y

- a continuación se clasifica el mayor número posible de células en el FACS o con esferillas magnéticas. Con ello se empobrecen las células de la línea celular monoespecífica del locus de gen vH y las células recombinadas improproductivas; se enriquecen las células que presentan una cadena IgG humana (figura 9).

Es especialmente preferido un procedimiento, en el que los lugares (loci) de gen son los loci de anticuerpo y contienen al gen vH, al gen vlambda o al gen vkappa activos.

Es especialmente preferida una forma de ejecución, en la que los anticuerpos monoclonales humanos expresados en la célula en cuestión están unidos a la superficie de la célula, que los expresa, mediante un enlace covalente gracial al empalme diferencia de los dominios constantes de una IgG, IgM, IgA, IgD o IgE.

10 Con el procedimiento de la invención se obtienen con preferencia por cada célula expandida más de 10^2 células distintas, que en cada caso expresan proteínas distintas.

En otra forma preferida de ejecución del procedimiento de la invención, las regiones homólogas del DNA transfectado en los correspondientes loci de gen de anticuerpo de la célula, que flanquean las señales específicas de recombinación, se extienden a lo largo por lo menos de 400 pares de bases.

En otra forma de ejecución todavía más preferida del procedimiento de la invención, el intrón se acorta en dirección al extremo 5' antes del exón M1 del gen de una IgG, IgM, IgA, IgD o IgE en más de 50 pares de bases.

En otra forma preferida de ejecución del procedimiento de la invención, después de la transfección con un gran número de secuencias diferentes de DNA, a partir del gran número de células distintas resultantes se efectúa un enriquecimiento de aquellas células, que presentan anticuerpos unidos a la superficie de las correspondientes células que los expresan,

de modo que se genera una población de células con una diversidad de anticuerpos lo más elevada posible.

Es especialmente preferida una forma de ejecución del procedimiento de la invención, en la que durante los pasos de transfección con un gran número de secuencias diferentes de DNA en los loci de gen, que en cada caso están flanqueados por sitios de reconocimiento de una recombinasa, se transfectan y/o activan además secuencias de DNA que tienen secuencias expresables, que codifican a la recombinasa en cuestión.

10 Selección de anticuerpos

La presente invención se refiere también a un procedimiento para el aislamiento de un anticuerpo monoclonal que tiene la especificidad deseada (véase la figura 9), dicho procedimiento está caracterizado porque se incuba un banco de anticuerpos generado con arreglo al procedimiento de la invención junto con el antígeno correspondiente y a continuación se aísla o se enriquece la línea celular, que tiene unido el antígeno sobre su superficie.

Los expertos ya conocen los procedimientos relativos a la puesta en contacto del antígeno con una biblioteca de anticuerpos y relativos a la selección del anticuerpo deseado (Liddell y Weeks, 1996, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", editorial Spektrum, ISBN 3827400481; Goding, J.W., 1996, "Production and Application of Monoclonale Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology, tercera edición; publicado por la editorial Academic Press Limited, 24-28 Oval Road, Londres NW1 7DX; ISBN 0-12-287023-9). Estos procedimientos se han descrito también con detalle para la

selección de anticuerpo recombinantes presentados en superficie a partir de bibliotecas de fagos (véase entre otro de Kruif y col., PNAS 92, 3938-3942, 1995) y a partir de bibliotecas bacterianas (Fuchs y col., J. of Immunotechnology 2, 5 97-102, 1996). En la presente invención, estos procedimientos se adaptan en especial a la exploración de poblaciones de células eucariotas mediante esferillas magnéticas o un clasificador FACS. Los expertos conocen también estos procedimientos: son idénticos a la tinción de células vivas para el FACS 10 (clasificador celular activado por fluorescencia) y se han descrito con detalle en un gran número de manuales especiales de laboratorio (véanse las páginas anteriores).

Las células de la biblioteca de anticuerpo obtenidas con arreglo al procedimiento de la invención se tiñen con 15 preferencia con un antígeno biotinilado y después marcado con estreptavidina-FITC (o directamente con un antígeno marcado con FITC) y se seleccionan los acontecimientos de tinción más intensa. Si se desea, la biblioteca de anticuerpos puede también teñirse con una mezcla de anticuerpos marcados opcional- 20 mente de distintas maneras y se seleccionan de nuevo los acontecimientos de tinción más intensa. Después se expanden las células individuales en el cultivo celular y producen en cada caso el anticuerpo monoclonal deseado, en especial humano. Por lo general para la selección específica de antígeno 25 se requiere solamente una sola ronda de selección, ya que el número muy elevado de anticuerpos presentados produce señales muy claras. Existe también en especial la posibilidad de recurrir a los anticuerpos de una biblioteca de anticuerpos de

hibridoma secretados en una variante de empalme al líquido sobrenadante del cultivo, a la subbiblioteca formada a partir de ellos o a clones individuales para la caracterización de una actividad buscada. En la biblioteca de anticuerpos tendrían que estar también representadas las especificidades de anticuerpos contra antígenos humanos, gracias a la nueva combinación de los dominios vH y vL.

Selección de anticuerpos más afines

En una forma especialmente preferida de ejecución, el procedimiento de la invención está caracterizado además porque con él se generan anticuerpos muy afines. Para ello, los expertos podrán proceder con arreglo a los procedimientos descritos a continuación.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales más afines pueden seleccionarse en el clasificador FACS. Para ello, tal como se ha descrito anteriormente, se tiñe la biblioteca de anticuerpos o un grupo de células de hibridoma específicas de distintos antígenos, derivado de la biblioteca anterior, con el antígeno marcado con ficoeritrita (PE). Estas células se tiñen con la proteína G marcada con FITC. Después, en el clasificador FACS, se seleccionan los acontecimientos de tinción con el mayor cociente entre tinción-PE y tinción-FITC. Se expanden las células individuales en el cultivo celular y producen en cada caso un anticuerpo monoclonal humano de afinidad relativamente elevada para con el antígeno empleado para la selección. Esto constituye un método muy sencillo para encontrar los anticuerpos monoclonales muy afines. De este modo, la normalización fácil de efectuar del número de

anticuerpos presentados permite una comparación de afinidad "on line" de las especificidades de anticuerpo encontradas, ya que la relación entre antígenos unidos a anticuerpo y no unidos es un índice directo de la afinidad del anticuerpo para con su antígeno (figura 10).

En una forma preferida de ejecución, el procedimiento presente se caracteriza porque el aislamiento de anticuerpos de gran afinidad se realiza antes que la introducción de mutaciones dentro de los genes de anticuerpos variables. Esto puede realizarse p.ej. mediante la ejecución de una hipermutación somática o de una conversión de los genes de anticuerpos, que tal como se ha descrito se realiza antes que la selección de anticuerpos alterados, en especial más afines, presentados sobre la superficie de las células (figura 11).

Puede realizarse por ejemplo un barajado de cadenas (chain-shuffling) y después la sección de los anticuerpos monoclonales muy afines. Para ello en primer lugar, tal como se ha descrito, p.ej. a partir de la biblioteca de anticuerpos generados se selecciona un grupo de células de hibridoma específicas de antígeno, derivadas de dicha biblioteca, estando el antígeno marcado con FITC. Se expande en el cultivo celular este grupo de células de hibridoma seleccionadas. A continuación se intercambia uno de los dominios variables, tal como se ha descrito previamente, gracias a un acontecimiento específico de recombinación por un grupo de distintas secuencias de DNA, en especial por otros dominios variables (conversión genética). Se expande en el cultivo celular el grupo resultante de células de hibridoma. A continuación, a

partir de este grupo, tal como se ha descrito previamente, se seleccionan los anticuerpos monoclonales humanos relativamente muy afines (figura 10) mediante un clasificador FACS. Este es también un método muy sencillo para generar un grupo de 5 hibridomas, a partir del cual pueden aislarse anticuerpos monoclonales muy afines.

Como alternativa puede introducirse en un DNA molde, en especial en dominios variables preseleccionados, un gran número de mutaciones no dirigidas por una PCR susceptible de 10 error (Stemmer, *Nature* 370, 389-391, 1994). A continuación, tal como se ha descrito antes, se recombina el mayor número posible de estos genes variables mutados de anticuerpos mediante señales de recombinación específicas en el locus de anticuerpo y después se seleccionan las células, p.ej. en el 15 clasificador FACS, que presentan sobre la superficie el anticuerpo de mayor afinidad. Las mutaciones no dirigidas pueden también combinarse entre sí con arreglo al procedimiento desarrollado por Stemmer (conversión genética/hipermutación somática).

20 Otra vía de la invención para la generación de mutaciones no dirigidas recurre a vectores eucariotas de expresión, que expresan los genes RAD54, RecQ4, y/o el DNA del gen PolX-mu en células linfoides, en especial en combinación con el RNA antisentido contra XRCC2, XRCC3 o RAD51B (Kitao y col., 25 Cloning of two new human helicase genes of the RecQ family: biological significance of multiple species in higher eukaryotes; *Genomics* 54, 443-452, 1998; Aoufouchi y col., Two novel human and mouse DNA polymerases of the polX family; Nu-

cleic Acids Res. 28, 3684-3693, 2000; Sale y col., Ablation of XRCC2/3 transforms immunoglobulin v gene conversion into somatic hypermutation; Nature 412, 921-926, 2001; vectores de expresión p.ej. pCEP4, pREP7, pREP10, pEBVHis o pREP4 de In-
5 vitrogen). Los productos genéticos RAD54, RecQ4 y DNA PolX mu-
forman parte del complejo de mutadores causantes de la intro-
ducción de hipermutaciones somáticas en los genes activos de
anticuerpos, mientras que la represión de la expresión de
XRCC2, XRCC3 o RAD51B mediante múltiples roturas de la hebra
10 individual inicia al parecer las hipermutaciones somáticas.
Para ello, en especial en el proceso de formación de células
de memoria del organismo se mutan de modo no dirigido aprox.
1,5 kb de secuencias de DNA en dirección al extremo 3'
(downstream) después del promotor activo vH, vkappa o vlamb-
15 da, prescindiendo del tipo de secuencias de DNA que están
presentes en este tramo. Para la generación de una hipermuta-
ción somática puede procederse por ejemplo de manera que a
partir de la biblioteca de anticuerpos de la invención se
seleccione un grupo de células de hibridoma derivadas de la
20 misma, específicas de antígeno, estando el antígeno marcado
con FITC, tal como se ha descrito previamente. Este grupo de
células de hibridoma seleccionadas se expande en el cultivo
celular y después se electropora en estas células una mezcla
de los vectores de expresión descritos previamente. Se expan-
25 de en el cultivo celular el grupo resultante de células de
hibridoma. A continuación se seleccionan de este grupo, tal
como se ha descrito antes, los anticuerpos monoclonales huma-
nos muy afines con el clasificador FACS.

Es especialmente preferida una forma de ejecución del presente procedimiento, en el que la célula se transfecta con un gran número de secuencias de DNA, que en cada caso están flanqueadas por señales específicas de recombinación y de este modo se obtiene un gran número de secuencias de DNA mediante una PCR "proclive al error".

Humanización de hibridomas ya existentes

La presente invención se refiere también a procedimientos para la humanización de hibridomas murinos ya existentes por recombinación homóloga (figura 3, 7). Para ello puede transformarse por ejemplo cualquier célula de hibridoma de IgG1 murino elegible de modo discrecional con un vector de DNA predeterminado siempre igual en una célula de hibridoma de IgG1 humano (figura 3, 7) con otros vectores de DNA en IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE o IgM humanas. A su vez, otros vectores de DNA permiten la reestructuración de un hibridoma de IgM murino, etc. Este procedimiento especialmente sencillo y ventajoso puede ejecutarse sin emplear un marcador de resistencia que pudiera interferir (véase también Baker y col., J. Immunological Methods 168, 25-32, 1994), porque se aprovecha la alteración debida a la presentación en superficie del producto genético alterado para la selección de la célula alterada (figura 7). Este procedimiento se ha hecho posible últimamente gracias a que se dispone de clasificadores FACS muy rápidos (p.ej. el FACSVantage SE, de Becton-Dickinson), que actualmente pueden clasificar aprox. 10^8 células por hora, con lo cual pueden hallarse incluso los acontecimientos muy infrecuentes de recombinación homóloga.

Por lo demás se emplean aquí técnicas estándar ya conocidas de los técnicos.

Por tanto, la presente invención se refiere también a un procedimiento para la humanización de una célula de hibridoma, caracterizado porque:

(a) se transfecta a una línea celular de hibridoma una secuencia de DNA que codifica a uno o más dominios constantes de las IgG, IgM, IgA, IgD o IgE humanas;

(b) la secuencia de DNA de los dominios constantes de las IgG, IgM, IgA, IgD o IgE humanas se flanquea con secuencias de DNA, que son homólogas con las regiones genéticas cromosómicas, que flanquean los dominios constantes del locus de gen activo de dichas células de hibridoma, que codifica la cadena larga del anticuerpo;

(c) se expande una o pocas células, que gracias a la recombinación homóloga expresan una cadena larga de IgG, IgM, IgA, IgD o IgE con una porción constante humanizada;

(d) se transfecta a la línea celular de hibridoma una secuencia de DNA que codifica a un dominio constante kappa o lambda humano, dicha secuencia de DNA está flanqueada por secuencias de DNA que son homólogas con las regiones genéticas cromosómicas, que flanquean el dominio constante kappa o lambda del locus de gen kappa o lambda activo de la célula de hibridoma;

(e) a continuación se expanden una o pocas células, que por una recombinación homóloga expresan una cadena kappa o lambda con una porción constante humanizada;

con lo cual los anticuerpos expresados por la unión covalente de a variante de empalme situada en la membrana de la cadena larga de anticuerpo están unidos a la superficie de las células correspondientes que los han expresado, lo cual permite
5 la detección y la selección de las células en cuestión, que presentan dominios constantes de anticuerpo humanizados.

En una forma preferida de ejecución de este procedimiento se humanizan en primer lugar los dominios constantes de la cadena corta de anticuerpo y después los dominios cons-
10 tantes de la cadena larga de anticuerpo, para ello es todavía más preferido el procedimiento en el que se humanizan solamente los dominios constantes de la cadena larga del anticuerpo o solamente los dominios constantes de la cadena corta del anticuerpo.

15 En otra forma preferida de ejecución del procedimiento presente se acorta el intrón en dirección al extremo 5' antes del exón M1 del gen activo de la IgG, IgM, IgA, IgD o IgE en más de 50 pares de bases.

En otra forma preferida de ejecución del presente pro-
20 cedimiento se fusionan a los dominios constantes humanizados secuencias adicionales de DNA que codifican a proteínas, con preferencia que codifican una secuencia de engarce y un anticuerpo de cadena única, que está fusionado por su extremo C con el dominio constante de la cadena corta de anticuerpo.

25 En otra forma preferida de ejecución del presente procedimiento, las regiones homólogas de las secuencias de DNA transfectadas se extienden hacia los loci de gen de anticuer-

po correspondientes de la célula de hibridoma a lo largo por lo menos de 400 pares de bases.

En otra forma preferida de ejecución del presente procedimiento, en las recombinaciones homólogas no se introducen en las células marcadores de resistencia, que se emplean para la selección de los acontecimientos de recombinación homóloga.

La invención se ilustra con los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1

10 Humanización de un anticuerpo de hibridoma

Como ejemplo de anticuerpo monoclonal a humanizar se toma la línea celular de hibridoma HEA125.

Esta línea celular de hibridoma murino produce un anticuerpo IgG1 murino junto con una cadena kappa murina. Este anticuerpo monoclonal reconoce al antígeno Ep-CAM asociado a tumores humanos con una afinidad y especificidad relativamente altas (Moldenhauer y col., Br. J. Cancer 56, 714-722, 1987).

a. Condiciones de cultivo

20 Se cultiva la línea celular HEA125 y se expande. Como medio de cultivo se emplea el RPMI 1640 (Gibco BRL n° 31870-025) al que se añade un 10% de FCS, piruvato 1 mM y glutamina 2 mM. Los expertos ya conocen el resto de condiciones de cultivo (recipientes de plástico de tipo Falcon 25 cm³; estufa a 25 37°C; gaseado con 5-7,5% de CO₂, como máximo 10⁶ células por ml, etc.).

b. Selección de una subpoblación de HEA125

En primer lugar se lavan las células expandidas 2x con Dulbeccos PBS (DPBS) enfriado con hielo y se tiñen aprox. 10^7 células por 400 μ l con anticuerpo IgG de cabra anti-ratón marcado con FITC (Dianova). Como contratinción para identificar las células muertas se emplea el yoduro de propidio (1 μ g/ml).

Se lava de nuevo con DPBS enfriado con hielo, se clasifica el 5 % de la población de las células con un clasificador FACS (FACSVantage SE, Becton-Dickinson), que emiten la fluorescencia verde más intensa. Como resultado se encuentra una subpoblación de células HEA125, que se expande en las condiciones de cultivo recién indicadas y que presenta relativamente muchos anticuerpos unidos a la membrana.

c. Secuencias de DNA murino-humano quimérico

Con varios fragmentos de gen individuales se hace una composición en el vector de clonación pBSIISK+ (Stratagene) para formar secuencias de DNA murino-humano quiméricas. Los distintos fragmentos se generan por PCR (Roche Diagnostics; Expand Long Template PCR System; véase también las condiciones de la PCR). Como molde para las secuencias genéticas murinas genómicas se emplea el DNA genómico de la línea celular de hibridoma murino HEA125, como molde para las secuencias genéticas humanas genómicas se emplea el DNA genómico de glóbulos sanguíneos humanos. El aislamiento del DNA genómico y las técnicas de clonación requeridas se han descrito en diversos manuales de laboratorio (véase p.ej. Sambrook y Russell: Molecular Cloning, a laboratory manual, 3ª edición, 2001, ISBN 0-87969-577-3). En la figura 12 se representan las

secuencias de DNA quiméricas resultantes, cuya secuencia se verifica. Los cebadores empleados para la clonación en el pBSIISK+ se describen en la figura 12. En la figura 12A se representan la secuencia de DNA quimérico del vector pBS-
 5 MhkappaM, que se emplea para la humanización de la cadena kappa constante de HEA125. En la figura 12B se representa la secuencia de DNA quimérico del vector pBS-MhIgG1M, que se emplea para la humanización de los dominios constantes IgG1 CH1, CH2 y CH3 de HEA125.

10 d. Condiciones óptimas para la electroporación de
 HEA125

Las condiciones óptimas de electroporación para la transfección de HEA125 con DNA se evalúan del modo siguiente:

- se cultivan las células en medio RPMI + 10 de FCS;
- 15 - después se lavan 2x con DPBS enfriado con hielo;
- se recogen aprox. 10^7 células por cada 400 μ l de tampón DPBS;
- a las células de 400 μ l células se les añaden en cada caso 10 μ g de DNA plásmido "supercoiled" pEGFP N3 MCS (Clon-
 20 tech);
- se mezclan en una cubeta de electroporación de 4 mm de anchura;
- se incuba la cubeta con las células sobre hielo durante 10 min;
- 25 - a continuación con el electroporador BTX (AGS) se dan en cada caso 1 ó 2 impulsos de corriente de 500 V de una duración en cada caso de 2 ms;
- se incuba de nuevo sobre hielo durante 10 min;

- se cultivan en cada caso 10^7 células en 10 ml de RPMI + 10 % de FCS + 20 % de medio acondicionado para ello en frascos de 50 cm³;

- 2 días más tarde se lavan 2x con DPBS enfriado con
5 hielo y

- en el clasificador FACS se mide la fluorescencia verde provocada por el EGFP.

Como resultado, del 30 al 50 % de las células de hibridoma transfectadas, analizadas en el clasificador FACS, presentan una fluorescencia verde relativamente acusada (control: electroporación con un DNA de vector irrelevante).

e. Humanización de los dominios C-kappa de HEA125

Se linealiza el vector de humanización pBS-MhkappaM de dominio constante kappa murino quimérico, descrito en el ejemplo 1c y la figura 12A, con la enzima de restricción BglI y en cada caso 10 µg del DNA plásmido linealizado se tratan con la subpoblación expandida de células HEA125, descrita en el ejemplo 1b. Estas células se transfectan en las condiciones de electroporación optimizada descritas en el ejemplo 1d.
20 Después de 2-4 días en cultivo (descrito en el ejemplo 1a) se lavan las células 2x con DPBS enfriado con hielo y se tiñen aprox. 10^8 células por cada 4 ml con anticuerpo kappa de cabra anti-murino marcado con FITC y al mismo tiempo con anticuerpo kappa de cabra anti-humano conjugado con PE (Southern
25 Biotechnology Associates). Como contratincción para la identificación de las células muertas se emplea el yoduro de propidio. Se lavan de nuevo las células con DPBS enfriado con hie-

lo y se seleccionan en el clasificador FACS, que permite clasificar aprox. 10^8 células en 2 horas.

Como resultado se clasifican 2-5 células distintas por cada 10^8 células HEA125, que presentan una fluorescencia roja acusada, específica de la ficoeritrita (PE). Se expanden las células individuales en las condiciones de cultivo descritas en el ejemplo 1a durante 2-3 semanas. A continuación se lavan de nuevo los clones resultantes del modo descrito, se tiñen con el anticuerpo kappa de cabra anti-murino marcado con FITC y al mismo tiempo con anticuerpo kappa de cabra anti-humano conjugado con PE y se analizan en el FACS. Se siguen propagando dos clones que tienen una señal de fluorescencia roja acusada. Se multiplica el dominio kappa constante genómico de estos clones por PCR y empleando los cebadores HK3 y HK4 (cebadores: véase la figura 12A) y se secuencian. Como resultado se sigue propagando el clon hkappa de HEA125 con el dominio kappa humano constante codificado genómico. La secuencia de la transición del DNA kappa murino genómico al DNA kappa humano genómico de este clon se representa en la figura 12 A.

Como alternativa se clasifican las células en placas de 96 hoyos en grupos (pools) de hasta 1×10^4 células, se mantienen en cultivo hasta conseguir 2×10^5 células y se exploran en el ensayo ELISA para determinar los grupos positivos que contienen células que expresan a los anticuerpos humanizados. Para la detección se emplea el anticuerpo kappa de cabra anti-humano conjugado con POX. Los grupos positivos se subclonan y se repite el procedimiento hasta que se identifican los clones individuales HEA125-hkappa.

f. Humanización de los dominios constantes CH1, CH2 y CH3 de IgG1

Se linealiza el vector de humanización pBS-MhIgG1M de la IgG1 murina quimérica, descrito en el ejemplo 1c y en la figura 12B, con la enzima de restricción SspI y cada 10 µg de DNA plásmido linealizado se trata con células del subclon hkappa de HEA125 parcialmente humanizado, descrito en el ejemplo 1e. El cultivo celular, la selección en el FACS, la tinción de las células son idénticos a los descritos en el ejemplo 1e, excepto que en lugar del anticuerpo kappa de cabra anti-humano conjugado con PE se emplea un anticuerpo IgG de cabra anti-humano conjugado con PE. Como resultado se clasifican inicialmente 1-3 células individuales por cada 10⁸ células HEA125-hkappa, que presentan una fluorescencia roja claramente marcada, específica de la ficoeritrina (PE). Después de la secuenciación de control de las regiones recombinantes homólogas mediante los cebadores de PCR HG3 y HG4 (véase la figura 12B) se sigue propagando la línea celular HEA125-hIgG1hkappa, que además de un dominio kappa humano constante codificada genómicamente a los dominios constantes CH1, CH2 y CH3 de la IgG1. La secuencia de la transición del DNA de IgG1 murino genómico al DNA de IgG1 humano genómico de este clon se representa en la figura 12B.

De este modo se han humanizado los dominios constantes de una célula de hibridoma murino productora de IgG1, que en principio puede elegirse a discreción, para convertirlos en IgG1 humana. Las células de hibridoma murino, que producen las IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgE o IgM, pueden humanizarse de

modo muy similar con otras secuencias de DNA quiméricas. En función del vector de humanización empleado pueden también transformarse o alterarse los distintos grupos de anticuerpos, con lo cual por ejemplo una IgM murina puede transformarse en una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 o IgE humana. Lo mismo se diga de la transformación de un dominio constante kappa murino en un dominio constante lambda humano.

Ejemplo 2

Logro de una expresión superficial más intensa de anticuerpos

En lugar del vector de humanización pBS-MhIgG1M de IgG1 murina quimérico, descrito en el ejemplo 1f, se emplea el vector pBS-MhIgG1Mdelta350, que tiene la delección descrita en la figura 12B de aprox. 350 bp en el intrón entre el dominio CH3 y el M1, pero por lo demás es idéntico al vector pBS-MhIgG1M descrito en el ejemplo 1f y en la figura 12B. El procedimiento es el mismo que el descrito en el ejemplo 1f. También en este caso se encuentran 1-2 entre aprox. 10^8 células que tienen una recombinación homóloga en la región del locus de gen de la cadena larga.

Como resultado de este ejemplo se propaga la línea celular HEA125-mhIgG1hkappa, que, comparada con la línea celular HEA125-hIgG1hkappa descrita en el ejemplo 1f, debido al intrón acortado entre el dominio CH3 y el dominio M1 de la IgG1 tiene un número claramente mayor de anticuerpos humanizados unidos a la membrana (véase también la figura 7, célula de hibridoma 2H).

Ejemplo 3

Introducción de señales de recombinación específica en el locus de gen vH de HEA125

a. Secuencias de DNA quimérico

Se combinan varios fragmentos individuales de gen en el
5 vector de clonación pBSIISK+ para formar secuencias de DNA quimérico. Los distintos fragmentos de gen se generan por PCR (Roche Diagnostics; Expand Long Template PCR System; véanse también las condiciones de la PCR). Los cebadores de PCR empleados se representan en la figura 13B. Como molde de las
10 secuencias genéticas murinas genómicas se emplea el DNA genómico de la línea celular de hibridoma murino HEA125. Como molde del gen de resistencia PGKneo se emplea el vector ploxPfrtPGKneofrtloxP (Erich Greiner, DKFZ, Departamento de Biología Molecular de las Células I). En la figura 13B se
15 representa el vector pBS-MvHG418M resultante, cuya secuencia se verifica a continuación.

b. Preselección con G418

La línea celular HEA125-hIgG1hkappa obtenida en el ejemplo 2 se transfecta con el vector linealizado pBS-
20 MvHG418M descrito en la figura 13B, para ello se aplican las condiciones de electroporación descritas en el ejemplo 1d. Dos días después de la electroporación se someten las células transfectadas de DNA a una preselección con G418 (según el lote: 400-800 µg de G418 pro ml durante 14 días; el resto de
25 condiciones del cultivo celular es igual al ejemplo 1). A continuación se tiñen las células resistentes a G418 expandidas del modo descrito en el ejemplo 1b con anticuerpos IgG de cabra anti-humanos marcados con FITC y se seleccionan en

el clasificador FACS. Como resultado se clasifican del modo antes descrito aprox. 2.000 células individuales, que no presentan tinción específica de anticuerpo (es decir, una fluorescencia verde lo más pequeña posible). Estas células concretas se expanden en las condiciones de cultivo descritas en el ejemplo 1a durante 2-3 semanas.

c. Introducción de sitio loxP en el locus de gen vH

De los clones obtenidos en el ejemplo 3b se aísla el DNA, que en cada caso se emplea como molde para una PCR (Roche Diagnostics; Expand Long Template PCR System; véanse también las condiciones de la PCR). Los cebadores de PCR vHG418-3 y vHG418-4 empleados para ello se describen en la figura 13B. Se separan por tamaños las correspondientes bandas PCR en un gel de TAE-agarosa del 0,8 % y se comparan con el resultado esperado. Como resultado, 8 de los 2.000 clones analizados presentan una banda PCR del tamaño esperado de aprox. 1,85 kb. Después de la secuenciación de control del DNA genómico (o de la banda PCR descrita) PCR-Bande) se sigue propagando como resultado el clon HEA125-mhIgGlhkappa-loxPG418 con señales de recombinación específicas codificadas genómicamente (loxP y loxP511) en la región del locus de gen vH activo.

d. Recombinación específica

Se reúnen las células de los aprox. 2.000 clones descritos en el ejemplo 3b, como alternativa se emplea el clon expandido HEA125-mhIgGlhKappa-loxPG418 descrito en el ejemplo 3c. En estas células se electropora el vector pBS-loxPvHmyc representado en la figura 15B. Este vector codifica al gen vH de HEA125 recombinado genómicamente, que está flanqueado por

un sitio loxP y una sitio loxP511. Además del gen vH de HEA125 se inserta en la región CDR3 del dominio vH un myc-tag. Al mismo tiempo se electropora en las células un vector de expresión pMC-Cre (véanse las condiciones en el ejemplo 5 1d). Después de 2-4 días de cultivo (descrito en el ejemplo 1a) se lavan las células 2x con DPBS enfriado con hielo y se tiñen aprox. 10^8 células por ml con el anticuerpo IgG de cabra anti-humano conjugado con FITC (Dianova). Como alternativa se tiñen con el anticuerpo 1-9E10 anti-myc marcado con 10 FITC. Como contratincción para la identificación de células muertas se emplea el yoduro de propidio. Después de un nuevo lavado con DPBS enfriado con hielo se seleccionan en el clasificador FACS las células individuales de fluorescencia FITC más intensa.

15 Como alternativa, después de 2-4 días de cultivo (del modo descrito en el ejemplo 1a) se clasifican las células en cada caso 1×10^4 * células/hoyo en placas de 96 hoyos y después de otros 5 días más de cultivo se detecta en un ensayo ELISA la nueva presencia de anticuerpos, que las células han secre- 20 tado al medio, con un anticuerpo GAM-IG61Fc conjugado con POX. Los cultivos que presentan señales positivas se subclonan hasta obtener clones de células individuales.

Se obtienen:

- el clon de partida HEA125-mhIgG μ hKappa-loxPG418 des- 25 crito en el ejemplo 3c aprox. el 1% de las células con fluorescencia FITC relativamente intensa;

- el conjunto de células reunidas descrito en el ejemplo 3b aprox. 15 células con fluorescencia FITC relativamente intensa por cada 10^8 células clasificadas.

Un total de 20 células individuales clasificadas se expanden en las condiciones de cultivo descritas en el ejemplo 1a durante 2-3 semanas. A continuación se comprueba la resistencia de los clones individuales al G418 del modo descrito en el ejemplo 3b. Como resultado, 17 de los 20 clones verificados fueron sensibles al G418. Después de la PCR y la secuenciación del locus de gen vH con los cebadores de PCR vHG418-3 y vHG418-4 (véase la figura 13B), se sigue expandiendo la línea celular HEA125-mhloxPmyc sensible al G418. Se lavan las células de este clon 2x con DPBS enfriado con hielo y se tiñen aprox. 10^8 células por ml con anticuerpo anti-myc marcados con FITC (epítipo Myc1-9E10; Evan y col., Mol. Cell. Biol. 5, 3610-3616, 1985). Como contratincción para la identificación de las células muertas se emplea el yoduro de propidio. En el clasificador FACS se detecta la fluorescencia verde intensa de la línea celular HEA125-mhloxPmyc.

La línea celular HEA125-mhloxPmyc sensible al G418 resultante produce un anticuerpo IgG1 de hibridoma monoclonal de una especificidad definida (en este ejemplo, los dominios vH de HEA125 con un c-myc-tag adicional en la CDR3 del dominio vH) con dominios constantes humanizados. Además, el exón vH dentro del locus de gen vH está flanqueado por 2 sitios loxP distintos. Una gran parte de los anticuerpos producidos (del orden de 10^4 a 10^6 moléculas de anticuerpo) se halla

unida mediante enlace covalente a un anclaje de membrana sobre la superficie de las células de hibridoma.

Ejemplo 4

Introducción de señales de recombinación específica en
5 el locus de gen vkappa de HEA125

a. Secuencias de DNA quimérico

Tal como se ha descrito en el ejemplo 3 se combinan varios fragmentos de gen individuales en el vector de clonación pBS para formar secuencias de DNA quimérico. En la figura 13A
10 se representan el vector de DNA resultante, el pBS-MkappaG418M, cuya secuencia se verifica a continuación.

b. Preselección con G418

La línea celular HEA125-mhloxPmyc obtenida en el ejemplo 3d se electropora con el vector con el vector pBS-MkappaG418M linealizado descrito en el ejemplo 4a del modo
15 descrito en el ejemplo 3b, a continuación se realiza la selección con G418 del modo descrito y se seleccionan en el clasificador FACS las células sin cada kappa expresada. Pero para la tinción, a diferencia del ejemplo 3b, se tiñe con
20 anticuerpo kappa de cabra anti-humano marcado con FITC. Como resultado se clasifican del modo descrito en el ejemplo 3b aprox. 2.000 células individuales, que no presentan tinción kappa específica (es decir, fluorescencia verde lo más pequeña posible). Se expanden estas células en las condiciones de
25 cultivo descritas en el ejemplo 1a durante 2-3 semanas.

c. Introducción de sitios FRT en el locus de gen vkappa

De los clones descritos en el ejemplo 4b se aísla el DNA genómico del modo ya descrito, se realiza una PCR y se

verifica el tamaño esperado de la banda PCR. Los cebadores de PCR KG418-3 y KG418-4 empleados para ello se describen en la figura 13A. Como resultado, 14 de los 2.000 clones analizados presentan una banda PCR del tamaño esperado, es decir de
5 aprox. 1,9 kb. Después de la secuenciación de control del DNA genómico (o de la banda PCR descrita) se sigue propagando como resultado el clon HEA125-mhloxPmycFRTG418 con señales de recombinación específicas codificadas genómicamente (FRT0 y FRT3) en la región del locus de gen vkappa activo. La línea
10 celular resultante HEA125-mhloxPmycFRTG418 produce un anticuerpo IgG1 de hibridoma monoclonal de una especificidad definida (en este ejemplo: el dominio vH de HEA125 con un c-myc-tag adicional en el CDR3 del dominio vH) con dominios constantes humanizados. Además, el exón vH dentro del locus
15 de gen vH está flanqueado por 2 sitios loxP distintos. En lugar del dominio vkappa se halla un gen de resistencia G418, que está flanqueado por 2 sitios FRT distintos.

d. Recombinación específica

Se reúnen las células de los aprox. 2.000 clones des-
20 critos en el ejemplo 4b, como alternativa se emplea el clon HEA125-mhloxPmycFRTG418 expandido descrito en el ejemplo 4c. Se electropora en estas células el vector pBS-FRTvkappa representado en la figura 15A. Este vector codifica al gen vkappa recombinado genómico de HEA125 (sin exón líder), que
25 está flanqueado por un sitio FRT0 y un sitio FRT3. Al mismo tiempo se electropora el vector de expresión de Flp pOG44 en las células (véanse las condiciones en el ejemplo 1d). Después de 2-4 días de cultivo (descrito en el ejemplo 1a) se

lavan las células 2x con DPBS enfriado con hielo y se tiñen aprox. 10^8 células por ml con anticuerpo kappa de cabra anti-humano conjugado con PE (Dianova). Como contratinción para la identificación de células muertas se emplea el yoduro de propidio. Después de un nuevo lavado con DPBS enfriado con hielo se seleccionan en un clasificador FACS las células individuales que tienen fluorescencia PE intensa.

Se obtienen:

- El clon inicial descrito en el ejemplo 4c HEA125-mhloxPmycFRTG418 aprox. 1% de células con fluorescencia PE relativamente intensa;

- El grupo de células descrito en el ejemplo 4b aprox. 20 células con fluorescencia PE relativamente intensa por cada 10^8 células clasificadas.

En total aprox. 20 células individuales clasificadas se expanden en las condiciones de cultivo descritas en el ejemplo 1a durante 2-3 semanas. A continuación se verifica la resistencia de los clones individuales al G418 del modo descrito en el ejemplo 4b. Como resultado, 18 de los 20 clones verificados son sensibles al G418, entre ellos todos los subclones derivados del clon HEA125-mhloxPmycFRTG418. Después de la PCR y secuenciación del locus de gen vkappa con los cebadores de PCR KG418-3 y KG418-4 (véase la figura 13A) se sigue expandiendo la línea celular HEA125-mhRek sensible al G418.

La línea celular resultante HEA125-mhRek produce un anticuerpo IgG1 de hibridoma monoclonal de una especificidad definida con dominios constantes humanizados. En este ejemplo, el dominio vH de HEA125 codifica a un c-myc-tag adicio-

nal en la CDR3 del dominio vH, que puede detectarse con el anticuerpo monoclonal 1-9E10 en un clasificador FACS. Además, el exón vH activo dentro del locus de gen vH está flanqueado por 2 sitios loxP distintos. El exón vkappa activo dentro del locus de gen vkappa está flanqueado por 2 sitios FRT distintos. Una gran parte de los anticuerpos producidos se halla unido con enlace covalentes a un anclaje de membrana sobre la superficie de las células de hibridoma.

Ejemplo 5

10 Producción de una biblioteca de genes vlambda

a. Análisis computerizado de genes vlambda humanos

Ya se conocen las secuencias genómicas del locus de gen vlambda humano ("One-megabase sequence analysis of the human immunoglobulin lambda gene locus"; Genome Res. 7, 250-261, 15 1997; número de registro: D87000; D87007; D87009; D87010; D87014; D87015; D87016; D87017; D87018; D87021; D87022; D87023; D87024; X51755; X51754; véase también el libro Immunoglobulin Facts Book, Lefranc y Lefranc, en el que se describen 33 genes vlambda funcionales). El análisis computeri- 20 zado de 24 genes vlambda humanos conocidos no indica ningún sitio de restricción BstBI, BssHII, ClaI, DraI, HpaI, MluI, NotI, NruI, SacII, SalI, SnaBI, XhoI, EagI ni SwaI dentro de una región de aprox. 300 bp en dirección al extremo 5' (upstream) del codón de inicio del exón líder de los genes anali- 25 zados hasta la correspondiente señal de recombinación genómica del final del CDR3. Se analiza además la región de los segmentos J, en cada caso contados a partir del extremo 5' de los 4 segmentos de gen J_{lambda} activos, hasta aprox. 200 bp en

dirección a 3' (downstream) del extremo 3' de los segmentos J (véase D87018 y D87023). Como resultado, en especial los sitios de restricción BssHII, MluI, NotI, SalI, XhoI y EagI son idóneos para la clonación del gran abanico de genes vlambda humanos.

b. Cebadores de PCR específicos de los genes vlambda

Se generan cebadores de PCR específicos de los genes vlambda, que en cada caso se hibridan en el intrón entre el exón líder y el correspondiente exón vlambda (figura 14A). La región equiparable del locus vkappa activo del gen de HEA125 está situada aproximadamente en el sitio de corte SwaI del intrón entre el exón líder y el exón vkappa. Los cebadores se hibridan en las regiones, que están situados en cada caso aprox. 130-170 bp en dirección a 5' (upstream) del extremo 5' del correspondiente exón vlambda. La temperatura de hibridación de los cebadores se calcula en cada caso en aprox. 65°C. Para el cálculo de la temperatura de hibridación se aplica la fórmula:

$$\text{temperatura de hibridación} = (2^{\circ}\text{C} \times \text{número de AT bp} + 4^{\circ}\text{C} \times \text{número de GC bp}) - 5^{\circ}\text{C}$$

c. Cebadores de PCR específicos de segmentos de gen J_{lambda}

Se separan los en total 4 segmentos de gen J_{lambda} humano activos en cada caso por un intrón de los exones clambda constantes contiguos. En cada caso a aprox. 89 bp (en la región del sitio de corte BsaI en el caso del HEA125) en dirección al extremo 3' (downstream) contados a partir de los extremos 3' de los segmentos J_{lambda}, se generan en total 4 ceba-

dores de PCR específicos de segmentos de genes J_{lambda} con una temperatura de hibridación calculada en cada caso de aprox. 65°C (figura 14A).

d. Multiplicación de genes vlamba humanos por PCR

5 Como DNA molde se emplea el DNA genómico de los linfocitos B humanos. El aislamiento del DNA genómico se ha descrito en diversos manuales de laboratorio (véase p.ej. Sambrook y Russell: Molecular Cloning, a laboratory manual, 3ª edición, capítulo 6, 2001, ISBN 0-87969-577-3). Los cebadores
10 PCR se han descrito en los ejemplos 5b y 5c. Se obtiene una gran abanico de genes vlamba humanos recombinados genómicos por combinación de los 4 cebadores distintos de segmentos de gen J_{lambda} con 24 cebadores distintos específicos de genes vlamba, es decir, se realizan 96 reacciones PCR distintas.
15 Las condiciones para la PCR se han descrito en el Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics). A continuación se seleccionan por tamaños las bandas de PCR de una longitud aprox. de 560 bp y se purifican (Qiagen, kit de purificación a través de gel). Estas en total 96 bandas de PCR sirven en
20 cada caso como molde para otra PCR en las condiciones descritas, pero esta vez en lugar del cebador descrito en el ejemplo 5b se emplea el cebador PCR cuyas secuencias se prolonga por el extremo 5' con las bases siguientes:

 - 5' attataACGCGT... (aquí siguen en cada caso las se-
25 cuencias de los cebadores de PCR específicos de genes vlamba descritos en el ejemplo 5b (de este modo se introduce en el producto de la PCR un sitio de restricción MluI necesario para la clonación);

- 5' ttcGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTC... (aquí siguen en cada caso las secuencias de los cebadores de PCR específicos de genes $\nu\lambda$ descritos en el ejemplo 5b (de este modo se introduce en el producto de la PCR un sitio FRT0
5 necesario para una estrategia de clonación alternativa);

- 5' attataGCGGCCGC... (aquí siguen en cada caso las secuencias de los cebadores PCR específicos del segmento de gen J_{λ} descritos en el ejemplo 5c (de este modo se introduce en el producto de la PCR un sitio de restricción NotI
10 necesario para la clonación) y

- 5' ttcGAAGTTCCTATACTATTTGAAGAATAGGAACTTC... (aquí siguen en cada caso las secuencias de los cebadores de PCR específicos del segmento de gen J_{λ} descritos en el ejemplo 5c (de este modo se introduce en el producto de la PCR un
15 sitio FRT3 necesario para una estrategia alternativa de clonación).

Tal como se ha descrito se seleccionan por tamaños las bandas de la PCR y se purifican, de modo que como resultado surgen 96 bandas de PCR, en cada caso flanqueadas por secuen-
20 cias FRT0 y FRT3. Se obtienen otras 96 bandas de PCR, en cada caso flanqueadas por los sitios de restricción MluI y NotI.

e. Clonación de genes $\nu\lambda$ humanos

En el vector de clonación pBS-FRT ν kappa, 2 sitios FRT distintos flanquean al das exón ν kappa activo de HEA125 (fi-
25 gura 15A). En presencia de la recombinasa Flp específica de FRT, esto permite el intercambio "in vitro" de las secuencias de DNA flanqueadas por los sitios FRT descritos. En primer lugar se clona en el vector de clonación pBS-FRT ν kappa corta-

do con AatII la siguiente secuencia de DNA también cortada con AatII:

attataGACGTCACGCGTAATGTCGACTATGCGGCCGCGACGTCaatata

Después de la transfección del DNA recombinado resultante en
5 *E. coli* se aíslan los clones individuales y se verifican sus
secuencias. Para ello se obtiene el vector de clonación pBS-
FRTklon (figura 15C), cuyos sitios FRT en lugar del exón
vkappa representado en la figura 15A flanquean a los sitios
de restricción MluI, SalI y NotI descritos antes o bien en la
10 figura 15C.

Después de la digestión del DNA de vector aislado (kit
de purificación de plásmidos, Qiagen) con las enzimas de res-
tricción MluI y NotI se ligan las 96 bandas de PCR distintas,
digeridas del modo correspondiente, descritas en el ejemplo
15 5d, se transfieren los productos de ligación resultantes a la
E. coli y después se aísla una mezcla muy compleja de DNA
vector ($>10^6$ transformandos distintos) (pBS-FRTklonvlambda)
(Qiagen, kit de purificación de plásmidos).

Como alternativa se incuban las 96 bandas distintas de
20 PCR, circularizadas con la T4-DNA-ligasa, descritas en el
ejemplo 5d, flanqueadas por sitios FRT, junto con la recombi-
nasa de Flp y con el vector pBS-FRTklon, se cortan los pro-
ductos resultantes de la recombinación con la enzima de res-
tricción SalI y del modo recién descrito se transfectan a *E.*
25 *coli* y finalmente se aísla una mezcla muy compleja de DNA
vector (pBS-FRTklon-vlambda).

f. Recombinación específica de genes vlambda humanos en
HEA125

Se electroporan las mezclas muy complejas descritas en el ejemplo 5e de DNA de vector vlambda humana (pBS-FRTklon-
5 vlambda) junto con el vector de expresión de Flp pOG44 a las células del clon expandido HEA125-mhloxPmycFRTG418 (véase el ejemplo 4c), se tiñen las células después de 3 días con anticuerpo kappa de cabra anti-humano marcado con FITC del modo ya descrito se aíslan las células en el clasificador FACS.
10 Como resultado se obtienen de este modo aprox. un 0,7 % de las células clasificadas (o aprox. 10^6 células), que se reúnen entre sí, ya que en el FACS presentan una acusada fluorescencia verde. Esta biblioteca de células vlambda se expande en cultivo celular.

15 El resultado de este procedimiento es una biblioteca de hibridomas compleja ($>10^6$ especificidades de hibridoma distintas) (figura 9), cuyos distintos componentes presentan sobre la superficie grandes cantidades de cadenas vlambda humanas en cada caso distintas, que en cada caso están fusio-
20 nadas con un dominio kappa constante humano.

No se representa una forma preferida de ejecución con la que puede obtenerse una mezcla muy compleja, como la descrita para el pBS-FRTklon-vlambda. Para ello, en lugar del vector de clonación pBSIISK+ se emplea un vector episómico
25 que se replica en células eucariotas (basado p.ej. en pCEP4, pREP7, pREP10, pEBVHis o pREP4 de Invitrogen). La recombinasa Flp se codifica para ello con una cassette de expresión regulable, que es estable cromosómicamente. Entre otras, la em-

presa Invitrogen suministra sistema de este tipo (GeneSwitch™ System K1060-01; T-Rex™ System K1020-01).

Ejemplo 6

Producción de una biblioteca de genes vkappa

5 a. Análisis computerizado de genes vkappa humanos

Ya son conocidas las secuencias genómicas del locus de gen vkappa humano (Immunoglobulin Facts Book, Lefranc y Lefranc, 2001, Academic Press, ISBN 0-12-441351-X). El análisis computerizado de 34 genes vkappa humanos funcionales conocidos no indica ningún sitio de restricción BglI, BssHII, BstBI, ClaI, EagI, HindIII, MluI, NotI, NruI, PvuI, SacII, SfiI, SnaBI, SpeI ni StuI dentro de una región de aprox. 200-300 bp en dirección a 5' (upstream) del exón líder de los genes analizados hasta la correspondiente señal de recombinación genómica del final del CDR3. Se analiza además la región de los segmentos J, partiendo del extremo 5' del segmento genético J1_{kappa} activo hasta aprox. 200 bp en dirección a 3' (downstream) contando desde el extremo 3' del segmento genético J5_{kappa} activo (ver número de registro J00242). Como resultado son, pues, idóneos los sitios de restricción BssHII, EagI, HindIII, MluI, NotI, SfiI y SpeI para la clonación de la gran variedad de genes vkappa humanos. El sitio de restricción SalI corta solamente una vez fuera del gen IGKV1D-43.

25 b. Cebadores de PCR específicos del gen vkappa

Se generan cebadores de PCR específicos del gen vkappa, que en cada caso se hibridan con el intrón entre el exón líder y el correspondiente exón vkappa (figura 14B). La región

equiparable del locus vkappa activo de gen de HEA125 se sitúa aprox. en el sitio de corte SwaI del intrón entre el exón líder y el exón vkappa. Los cebadores se hibridan con regiones, que en cada caso están situadas aprox. 130-170 bp en
 5 dirección a 5' (upstream) después del inicio del exón vkappa en cuestión. La temperatura de hibridación de los cebadores se calcula en cada caso aprox. en 65°C.

c. Cebadores de PCR específicos del segmento genético

J_{kappa}

10 Los en total 5 segmentos de gen J_{kappa} humanos activos están aglomerados a diferencia de los segmentos de gen J_{lambda}, por lo cual siempre se emplea el mismo exón ckappa constante, que está separado por un intrón de los segmentos J_{kappa} aglo-
 15 merados. En cada caso aprox. a 89 bp (la región equiparable está situada en el caso del HEA125 en el sitio de corte BsaI) en dirección al extremo 3' (downstream) contando a partir de los extremos 3' de los distintos segmentos J_{kappa}, se generan en total 5 cebadores de PCR específicos del segmento de gen J_{kappa} con una temperatura de hibridación calculada en cada
 20 caso de aprox. 65°C (figura 14B).

d. Multiplicación de genes vkappa humanos por PCR

Tal como se ha descrito en el ejemplo 5d para vlamba, se obtiene una gran variedad de genes vkappa humanos recombinados genómicos por combinación de 5 cebadores distintos de
 25 segmentos genéticos Jkappa con 34 cebadores distintos específicos de gen vkappa funcionales, es decir, se realizan 170 reacciones PCR distintas. Estas en total 170 bandas de PCR sirven en cada caso como moldes para reacciones PCR ulterio-

res, para ello en este caso del modo descrito en el ejemplo 5d se prolongan los cebadores empleados por su extremo 5' con un sitio de restricción o con FRT0 o FRT3. Tal como se ha descrito se seleccionan las bandas PCR por tamaños y se purifican, de modo que como resultado se obtienen 170 bandas de PCR (aprox. 600 bp), flanqueadas en cada caso por secuencias FRT0 y FRT3. Se obtienen otras 170 bandas de PCR (aprox. 550 bp), flanqueadas en cada caso por sitios de restricción MluI y NotI.

10 e. Clonación de genes vkappa humanos

Después de la digestión del DNA de vector pBS-FRTklon (figura 15C) aislado, descrito en el ejemplo 5e, con las enzimas de restricción MluI y NotI se ligan las 170 bandas de PCR distintas flanqueadas por los sitios MluI y NotI, descritas en el ejemplo 6d y digeridas del modo correspondiente, se transfectan los productos de ligación resultantes a *E. coli* y después, del modo descrito en el ejemplo 5e, se aísla una mezcla compleja ($>10^6$ transformandos distintos) de DNA de vector (pBS-FRTklon-vkappa).

20 Como alternativa se incuban las 170 bandas de PCR distintas, en cada caso circularizadas, descritas en el ejemplo 6d, flanqueadas por sitios FRT, junto con la recombinasa de Flp con el vector pBS-FRTvkappa, se cortan los productos de recombinación resultantes con la enzima de restricción SalI, se transfectan del modo descrito en el ejemplo 5e a la *E. coli* y a continuación se aísla una mezcla muy compleja de DNA de vector (pBS-FRTklon-vkappa).

f. Recombinación específica de genes vkappa humanos en HEA125

Tal como se ha descrito en el ejemplo 5f para vlambda, se electroporan las mezclas muy complejas descritas en el ejemplo 6e del DNA de vector vkappa humano (pBS-FRTklon-vkappa) junto con el vector de expresión Flp pOG44 a las células de la línea celular expandida HEA125-mhloxPmycFRTG418; se tiñen con el anticuerpo kappa de cabra anti-humano marcado con FITC y del modo descrito se aíslan las células en el clasificador FACS. Como resultado se obtiene aprox. un 0,8% de las células clasificadas (o aprox. 10^6 células) y se reúnen entre sí, que en el FACS presentan una acusada fluorescencia verde. Se expande en cultivo celular esta biblioteca de células vkappa.

El resultado de este procedimiento es una compleja biblioteca de hibridomas ($>10^6$ especificidades distintas de hibridoma) (figura 9), cuyos componentes individuales presentan sobre la superficie grandes cantidades en cada caso de distintas cadenas vkappa humanas, fusionadas en cada caso con un dominio kappa humano constante.

Ejemplo 7

Producción de una biblioteca de anticuerpos

a. Análisis computerizado de genes vH humanos

Ya son conocidas las secuencias genómicas del locus de gen vH humano (números de registro del banco de datos EMBL: X97051; S64822; AB019437; AB019438; AB019439; AB019440; AB019441; véase también el libro Immunoglobulin Facts Book, Lefranc y Lefranc, 2001, Academic Press, ISBN 0-12-441351-X).

El análisis computerizado de los 44 genes vH funcionales humanos relacionados en los números de registro X97051; S64822; AB019437; AB019438; AB019439; AB019440 y AB019441 no indica ningún sitio de restricción BssHII, ClaI, MluI, NheI, 5 NotI, NruI, PvuI, SalI, SfiI, SwaI ni XhoI dentro de una región de 300 bp en dirección al extremo 5' (upstream) contados a partida del extremo 5' del exón líder de los genes analizados hacia las señales de recombinación genómica que en cada caso flanquean al gen vH. Se analiza además la región de los 10 segmentos J_H, partiendo del extremo 5' del segmento genético J1_H activo hasta aprox. 200 bp en dirección al extremo 3' (downstream) contando a partir del extremo 3' del segmento de gen J6_H activo (véanse los números de acceso X97051; S64822). Como resultado son, pues, idóneos en especial los sitios de 15 restricción BssHII, MluI, NheI, NotI, SalI, SfiI y XhoI para la clonación de la gran variedad de genes vH humanos. Los sitios de restricción BssHII, MluI, NotI y SalI (exceptuando el gen IGKV1D-43) tampoco aparecen en las regiones genéticas vlambda y vkappa analizadas.

20 b. Cebadores de PCR específicos del gen vH

Se generan cebadores de PC específicos del gen vH, que en cada caso se hibridan aprox. a 182 bp en dirección al extremo 5' (upstream) contando a partir del extremo 5' del correspondiente exón líder de vH con los genes vH correspondientes (figura 14C). La temperatura de hibridación de los 25 cebadores se calcula en cada caso aprox. en 65°C.

c. Cebadores de PCR específicos del segmento genético

J_H

Se aglomeran los en total 6 segmentos de gen J_H humano activos igual que los segmentos de gen J_{kappa} , para ello se emplean siempre los mismos exones CH constantes (de todos modos en función de la eventual realización de un cambio de
 5 clase, class switch). El exón CH1 se separa con un intrón de los segmentos de gen J_H aglomerados. En cada caso, aprox. a 83 bp (la región equiparable del HEA125 está situada en el sitio de corte Bsu36I) en dirección al extremo 3' (downstream) contando a partir del extremo 3' de los correspondien-
 10 tes segmentos genéticos J_H , se generan en total 6 cebadores de PCR específicos del segmento genético J_H con una temperatura de hibridación calculada en cada caso en torno a 65°C (figura 14C).

d. Multiplicación de genes vH humanos por PCR

15 Tal como se ha descrito en el ejemplo 5d para el vlambda se obtiene la gran variedad de genes vH humanos recombinantes genómicos por la combinación de los 6 cebadores distintos de segmentos genéticos J_H con los 44 cebadores distintos específicos del gen vH, es decir, se realizan $6 \times 44 = 264$
 20 reacciones PCR distintas. 5 de los 6 cebadores de PCR específicos del segmento genético J_H presentan bandas adicionales de PCR de peso molecular más elevado, que se separan en gel de TAE-agarosa de la banda de la banda correspondiente de tamaño aprox. de 790 bp. Esto se debe a que p.ej. el cebador
 25 J_{2H} de PCR multiplica no solo las fusiones vHJ_{2H} recombinadas genómicas, sino también las fusiones vHJ_{1H} .

Tal como se ha descrito en el ejemplo 5d, estas en total 264 bandas de PCR de un tamaño aprox. de 790 bp sirven en

cada caso como moldes para una PCR posterior en las condiciones descritas, pero esta vez en lugar de los cebadores descritos en el ejemplo 7b, se emplean cebadores de PC cuyas secuencias del extremo 5' se han prolongado con las bases
5 siguientes:

- 5' attataACGCGT... (aquí siguen en cada caso las secuencias de los cebadores de PCR específicos del gen vH, descritas en el ejemplo 7b, de este modo se introduce en el producto de la PCR un sitio de restricción MluI necesario para
10 la clonación);

- 5' ttcATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT... (aquí siguen en cada caso las secuencias de los cebadores de PCR específicos del gen vH descritas en el ejemplo 7b, de este modo se introduce en el producto de la PCR un sitio loxP necesario
15 para una estrategia de clonación alternativa);

- 5' attataGCGGCCGC... (aquí siguen en cada caso las secuencias de los cebadores de PCR específicos del segmento de gen JH descritas en el ejemplo 7c, de este modo se introduce en el producto de la PCR un sitio de restricción NotI
20 necesario para la clonación); y

- 5' cctATAACTTCGTATAATGTATACTATACGAAGTTAT... (aquí siguen en cada caso las secuencias de los cebadores de PCR específicos de segmentos de gen J_H descritas en el ejemplo 7c, de este modo se introduce en el producto de la PCR un sitio
25 loxP511 requerido para una estrategia alternativa de clonación).

Tal como se ha descrito se seleccionan las bandas de la PCR por tamaños y se purifican, de modo que como resultando

se obtienen 264 bandas de PCR de un tamaño aprox. de 860 bp, blanqueadas en cada caso por secuencias loxP y loxP511. Se obtienen otras 264 bandas de PCR, en cada caso flanqueadas por sitios de restricción MluI y NotI.

5 e. Clonación de genes vH humanos

Después de la digestión del DNA de vector pBS-loxPklon aislado, descrito en la figura 15D (Qiagen, kit de purificación de plásmidos) con las enzimas de restricción MluI y NotI se ligan las 264 bandas de PCR distintas, oportunamente dige-
10 ridas, descritas en el ejemplo 7d, se transfectan los productos de ligación resultantes a *E. coli* y después se aísla del modo descrito en el ejemplo 5e una mezcla muy compleja ($>10^6$ transformandos distintos) de DNA de vector (pBS-loxPklon-vH).

Como alternativa se incuban las 264 bandas de PCR dis-
15 tintas flanqueadas por sitios loxP, descritas en el ejemplo 7d, junto con la recombinasa de la Cre con el vector pBS-loxPklon, se cortan los productos resultantes de la recombinación con la enzima de restricción SalI, se transfectan a la *E. coli* del modo recién descrito y a continuación se aísla
20 una mezcla muy compleja de DNA de vector (pBS-loxPklon-vH).

f. Recombinación específica de genes vH humanos en HEA125

Tal como se ha descrito en el ejemplo 5f para el vlamb-
da se electroporan a las células las mezclas muy complejas,
25 descritas en el ejemplo 7e, de DNA de vector vH humano (pBS-loxPklon-vH) junto con el vector de expresión de Cre pMC-Cre. Para ello se emplean las bibliotecas de células vlambda y vkappa descritas en el ejemplo 5f y 6f.

Se tiñen las células con anticuerpo IgG de cabra anti-humano conjugado con PE y al mismo tiempo con anticuerpo monoclonal anti-mycl-9E10 marcado con FITC. Las células se aíslan del modo descrito en el clasificador FACS. Como resultado
5 se obtiene con ello aprox. un 0,8% de las células clasificadas (o aprox. 10^7 células) y se reúnen entre sí las que presentan en el FACS una fluorescencia roja intensa junto con una fluorescencia verde lo más débil posible. Esta biblioteca de células de anticuerpo se expande en el cultivo celular y
10 se congelan en nitrógeno líquido partes alícuotas de la misma.

El resultado de este procedimiento es una biblioteca compleja de anticuerpos ($>10^7$ especificidades distintas de hibridoma) (figura 9), cuyos diversos componentes presentan
15 sobre la superficie grandes cantidades de distintos anticuerpos IgG1 humanos, fusionados con dominios humanos constantes. Al mismo tiempo, las células de hibridoma secretan la mayor parte de los anticuerpos producidos al medio circundante. Los distintos pasos del procedimiento se orientan principalmente
20 por el estado ya conocido de la técnica.

Los dominios vlambda de esta biblioteca de anticuerpos están fusionados en este ejemplo con el dominio kappa constante. En otra forma preferida de ejecución, no representada, se altera por tanto el ejemplo 1e, de modo que en lugar del
25 vector pBS-MhkappaM, representado en la figura 12A, se emplea ahora un vector que, después de la recombinación homóloga, codifica a un dominio constante lambda humano.

Ejemplo 8

Selección de anticuerpos monoclonales con el FACS/esferillas magnéticas

Se cultiva del modo descrito en el ejemplo 1a la biblioteca de anticuerpos descrita en el ejemplo 7f. Se lavan
5 las células expandidas 2x con DPBS enfriado con hielo y se
tiñen aprox. 10^7 células por cada 400 μ l con BSA conjugado
con FITC. Como contratinción para la identificación de las
células muertas se emplea el yoduro de propidio (1 μ g/ml).
Después de un nuevo lavado con DPBS enfriado con hielo se
10 seleccionan las células en un clasificador FACS. Como resul-
tado se encuentran aprox. 15 de cada 10^7 células de híbrido-
ma, que poseen una fluorescencia verde relativamente intensa.
Se expanden las células individuales clasificadas del modo
descrito en el ejemplo 1a (eventualmente junto con células
15 irradiadas del "feeder") y se analiza la especificidad de
antígeno que tiene el líquido sobrenadante y los anticuerpos
secretados que contiene en un ensayo Western Blot. Como re-
sultado de ello, el líquido sobrenadante de 2 clones reaccio-
na con BSA (PM aprox. 68 kd), otros 5 clones presentan una
20 coloración específica de FITC-BSA (PM aprox. 72 kd).

Paralelamente aprox. 10^8 células de la biblioteca de
anticuerpos descrita en el ejemplo 7f se lavan 2x con DPBS
enfriado con hielo y después se incuban en 5 ml de tampón
DPBS durante 5 minutos con esferillas magnéticas recubiertas
25 de BSA o de ovalbúmina. Se eliminan por lavado con interven-
ción de un imán las células no fijadas y las demás células
fijadas sobre las esferillas magnéticas se cultivan del modo
descrito en el ejemplo 1a. Como resultado, en un ensayo Wes-

tern Blot el líquido sobrenadante de las células enriquecidas de las esferillas magnéticas recubiertas con BSA reacciona con BSA (PM aprox. 68 kd), pero no con la ovalbúmina, mientras que el líquido sobrenadante de las células enriquecidas de las esferillas magnéticas recubiertas con ovalbúmina no presenta coloración alguna con BSA.

Ejemplo 9

Selección de anticuerpos monoclonales más afines en el clasificador FACS

10 Se purifican con proteína G-sefarosa los anticuerpos anti-FITC secretados por los cinco clones específicos de FITC-BSA descritos en el ejemplo 8 y en cada caso una parte de los mismos se conjuga con peroxidasa de rábano rusticano (anticuerpos anti-FITC-POX). Se ajusta en cada caso la con-
15 centración de los distintos anticuerpos purificados a 1 mg/ml en PBS.

Se recubre una placa ELISA con FITC-BSA (en cada caso 0,1 µg en 100 µl de PBS), se bloquea (con un 1% leche en polvo en 200 µl de PBS) y se hacen competir los 5 anticuerpos
20 distintos conjugados con peroxidasa (diluidos en cada caso 1:2000 en 100 µl de PBS-Tween 20) con cantidades crecientes de los anticuerpos no conjugados con peroxidasa. Los anticuerpos no conjugados con peroxidasa se preincuban en cada caso durante 10 minutos con el antígeno FITC recubierto. Des-
25 pués de los pasos de lavado intercalados se detectan la peroxidasa residual fijada con el sustrato OPD / H₂O₂.

En estos ensayos de competición, el anticuerpo anti-FITC2 producido por el clon anti-FITC2 demostró ser el anti-

cuerpo relativamente más afín. Si se parte en cada caso de anticuerpos anti-FITC1, 2, 3, 4 ó 5 conjugados con peroxidasa y diluidos 1:2000, entonces se obtiene una inhibición semi-máxima de la señal de ELISA del:

- 5 - anticuerpo POX anti-FITC1 en el anticuerpo anti-FITC2 diluido 1:1000;
- anticuerpo POX anti-FITC2 en el anticuerpo anti-FITC2 diluido 1:500;
- anticuerpo POX anti-FITC3 en el anticuerpo anti-FITC2
- 10 diluido 1:2000;
- anticuerpo POX anti-FITC4 en el anticuerpo anti-FITC2 diluido 1:2000;
- anticuerpo POX anti-FITC5 en el anticuerpo anti-FITC2 diluido 1:5000.

15 Después se mezclan 10^6 células del clon anti-FITC2 con aprox. 10^7 células del clon anti-FITC5, se lavan 2x con DPBS enfriado con hielo y se tiñen con FITC-BSA (10 $\mu\text{g/ml}$) y al mismo tiempo con proteína G conjugada con PE (10 $\mu\text{g/ml}$). Para detectar las células muertas se utiliza el yoduro de propi-

20 dio, del modo ya descrito. Después de un nuevo lavado con DPBS se analizan las células en el clasificador FACS (figura 10). Aprox. el 10% de las células vivas presenta una relación entre la fluorescencia verde y roja de aprox. 0,8 ($\pm 0,2$), mientras que aprox. el 90% de las células vivas presenta una

25 relación entre la fluorescencia verde y roja de aprox. 0,08 ($\pm 0,03$).

Tal como se ha descrito antes se clasifican en cada caso por separado aprox. 10^6 células de estas poblaciones, se

aísala de ellos el DNA genómico y se emplea como molde para una PCR con los cebadores vHG418-3 y -4 (figura 13B). Se procede exactamente igual con las células de los clones anti-FITC2 y anti-FITC5. Se separan por tamaños las bandas de PCR en un gel de TAE-agarosa al 1 %, con lo cual la banda de PCR ligera y diferenciablemente mayor de la población de células clasificadas con una proporción entre la fluorescencia verde y la roja de aprox. 0,8 corresponde al clon anti-FITC2 (aprox. 1,95 kb), mientras que la banda de PCR ligeramente menor también correspondiente de la población de células clasificadas que tienen una proporción entre la fluorescencia verde y la roja de aprox. 0,08 corresponde al clon anti-FITC5.

En este ejemplo se presenta un método muy sencillo para encontrar los anticuerpos monoclonales muy afines. Una normalización fácil de realizar del número de los anticuerpos presentados permite la comparación de afinidad "on line" de las especificidades de los anticuerpos hallados (figura 10).

Ejemplo 10

Barajado de cadenas (chain-shuffling) y selección de anticuerpo monoclonales muy afines

Se recombina en la línea celular anti-FITC5 expandida, descrita en el ejemplo 9, se recombina e integra la gran variedad de genes vH descrita en el ejemplo 7e del modo descrito en el ejemplo 7f con intervención de un vector de expresión de Cre. La biblioteca resultante de anticuerpos anti-FITC se tiñe del modo descrito en el ejemplo 9 con FITC-BSA y al mismo tiempo con proteína G conjugada con PE.

Como resultado, aprox. el 70 % de las células vivas presenta una proporción entre la fluorescencia verde y la roja de aprox. 0,08 ($\pm 0,03$), mientras que aprox. el 0,02% de las células vivas presenta una proporción entre la fluorescencia verde y la roja de 0,2 a 0,7 ($\pm 0,1$).

En este ejemplo se pone de manifiesto un método muy sencillo para producir un grupo de hibridomas, a partir de la cual se pueden aislar anticuerpos monoclonales relativamente muy afines.

10 Ejemplo 11

Realización de una hipermutación somática para obtener anticuerpos muy afines

Ya son conocidas las secuencias de cDNA de los genes RAD 54, RecQ4, polX mu, RAD51B, XRCC2 y XRCC3. En primer lugar se clonan las secuencias de cDNA de los genes RAD54, RecQ4 o polX mu bajo el control de un promotor RSV en el vector de expresión eucariota pREP4 (Invitrogen) y se verifica la secuencia correcta. De este modo se obtienen los vectores de expresión pREP4-RAD54, pREP4-RecQ4 y pREP4-polXmu y los vectores de expresión de RNA antisentido pREP4-RAD51B, pREP4-XRCC2 y pREP4-XRCC3.

Se mezcla el DNA circular de los vectores pREP4-XRCC2, pREP4-RAD54, pREP4-RecQ4 y pREP4-polXmu en proporción 1:1:1:1 y se electropora en las condiciones optimizadas descritas en el ejemplo 1d en la línea celular anti-FITC5 expandida descrita en el ejemplo 9. A continuación se cultivan las células del modo descrito en el ejemplo 1a durante 2-3 días. Opcionalmente pueden seleccionarse a continuación con higromicina

las células que han recibido los vectores pREP4 replicantes episómicos. Seguidamente se tiñen las células del modo descrito en el ejemplo con FITC-BSA y al mismo tiempo con la proteína G conjugada con PE. Como resultado, aprox. un 90% de las células vivas presenta una proporción entre la fluorescencia verde y la roja de aprox. 0,08 ($\pm$ 0,03), mientras que aprox. un 0,002% de las células vivas presenta una proporción entre la fluorescencia verde y la roja de aprox. de 0,2 a 0,7 ($\pm$ 0,2).

En este ejemplo se pone de manifiesto otro método muy simple de producir un grupo de hibridomas, a partir del cual se pueden aislar anticuerpos monoclonales relativamente muy afines.

Ejemplo 12

Producción de un anticuerpo biespecífico

a. Secuencias de DNA quimérico

Se combinan varios fragmentos diferentes de gen con un vector de clonación pBSIISK+ para formar secuencias de DNA quimérico. Para ello se generan los distintos fragmentos de gen por PCR (Roche Diagnostics; Expand Long Template PCR System; véanse también las condiciones de la PCR).

Como molde para las secuencias de gen se emplea un cDNA de la línea celular de hibridoma murino HEA125 así como un vector de expresión para el anticuerpo scFv 215 (Kontermann y col., Characterization of the epitope recognised by a monoclonal antibody directed against the largest subunit of *Drosophila* RNA polymerase II; Biol. Chem. Hoppe-Seiler 376, 473-481, 1995). Se sintetiza la región de la secuencia de engarce

entre el ckappa (HEA) y anticuerpo scFv(215) con un oligonucleótido de PCR sobresaliente sintético. Como resultado se obtiene el vector pBS-FRT-kappaHEAascFv215. En la figura 17A se representa la secuencia de DNA quimérico resultante, dicha
5 secuencia se verifica seguidamente.

b. Recombinación específica en el locus de gen vkappa

Se electropora en la línea celular HEA125-mhloxPmyc-FRTG418 el vector pBS-FRT-kappaHEAascFv215 descrito. Al mismo tiempo se electropora el vector de expresión de Flp pOG44 en
10 las células (véanse las condiciones en el ejemplo 1d). Después de un cultivo de 2-4 días (véanse las condiciones en el ejemplo 1a) se lavan las células 2x con DPBS enfriado con hielo y se tiñen aprox. 10^8 células por ml con un anticuerpo kappa de cabra anti-murino conjugado con PE (Southern Bio-
15 technology Associates). Como contratinción para la identificación de células muertas se emplea el yoduro de propidio. Después de un nuevo lavado con DPBS enfriado con hielo se seleccionan en un clasificador FACS las células individuales que tienen una fluorescencia PE intensa. De este modo, a par-
20 tir del clon HEA125-mhloxPmycFRTG418 descrito en el ejemplo 12a se obtiene aprox. un 0,1% de células con fluorescencia PE relativamente intensa. A continuación se expanden 5 células individuales clasificadas en las condiciones de cultivo descritas en el ejemplo 1a durante 2-3 semanas. Seguidamente se
25 tiñen de nuevo los clones resultantes con anticuerpo kappa de cabra anti-murino marcado con PE y se analizan en el FACS. Se siguen propagando dos clones con señal acusa de fluorescencia roja. El DNA genómico de estos clones se multiplica por PCR

con los cebadores KG418-3 y KG418-4 (véanse los cebadores en la figura 13A; véase también la figura 17A) y se secuencian.

La línea celular HEA125-mhloxPmycFRTscFv215 obtenida como resultado produce un anticuerpo IgG1 de hibridoma monoclonal biespecífico, que tiene una especificidad definida (en este ejemplo, el dominio vH de HEA125 con un c-myc-tag adicional en el CDR3 del dominio vH) para con los dominios IgG1 constantes humanizados. Además, el exón vH dentro del locus de gen vH está flanqueado por 2 sitios loxP distintos. En la región del locus de gen vkappa murino activo flanqueado por los sitios FRT se codifica el dominio vkappa de HEA125, que está fusionado con el dominio ckappa murino, una secuencia de engarce y el anticuerpo scFv215.

Ejemplo 13

15 Producción de un anticuerpo bifuncional

Tal como se ha descrito en el ejemplo 12 se electropora la línea celular HEA125-mhloxPmycFRTG418 con DNA quimérico, se tiñe con anticuerpo kappa de cabra anti-murino conjugado con PE, se clasifican las células individuales que tienen una fluorescencia PE relativamente intensa, se expanden los clones individuales y se verifica la secuencia genómica. A diferencia del ejemplo 12, en lugar del vector pBS-FRT-kappaHEAscFv215 descrito, se emplea el vector pBS-FRT-kappaHEAbla (figura 17B). De este modo, a partir del clon HEA125-mhloxPmycFRTG418 de partida se obtiene aprox. un 0,1% de células con fluorescencia PE relativamente intensa.

Como resultado se obtiene la línea celular HEA125-mhloxPmycFRTbla que produce un anticuerpo IgG1 monoclonal de

hibridoma que tiene una especificidad definida (en este ejemplo, el dominio vH de HEA125 con un c-myc-tag adicional en el CDR3 del dominio vH) con dominios IgG1 constantes humanizados. Además, el exón vH dentro del locus de gen vH está flan-

5 queado por 2 sitios loxP distintos. En la región del locus de gen vkappa murino activo, flanqueado por los sitios FRT, se codifica el dominio vkappa de HEA125, que está fusionado con el dominio ckappa murino, una secuencia de engarce y el gen de la beta-lactamasa.

10 Ejemplo 14

Modificación de la especificidad de anticuerpo por recombinación específica

Tal como se describe en el ejemplo 12 se electropora la línea celular HEA125-mhloxPmycFRTG418 con DNA quimérico, se

15 tiñe con anticuerpo kappa de cabra anti-humano conjugado con PE, se clasifican las células individuales de fluorescencia PE relativamente intensa, se expanden los clones individuales y se verifica la secuencia genómica. A diferencia de ejemplo 12 en lugar del vector pBS-FRT-kappaHEAscFv215 descrito se

20 emplea ahora el vector pBS-FRT-kappa215 (figura 18A). De este modo, a partir del clon HEA125-mhloxPmycFRTG418 descrito se obtiene aprox. un 0,1% de células con fluorescencia PE relativamente intensa.

Como resultado se obtiene la línea celular HEA125-

25 mhloxPmycFRT215 que produce un anticuerpo IgG1 de hibridoma monoclonal de una especificidad definida (en este ejemplo, el dominio vH de HEA125 tiene un c-myc-tag adicional en el CDR3 del dominio vH) con dominios constantes humanizados. Además,

el exón vH dentro del locus de gen vH está flanqueado por 2 sitios loxP distintos. En la región del locus de gen vkappa murino activo, flanqueado por sitios FRT, se codifica el dominio vkappa del anticuerpo 215. Con un procedimiento similar
5 se obtiene un dominio vH alterado.

Ejemplo 15

Producción de un anticuerpo Fab por recombinación específica

a. Secuencias de DNA quimérico

10 Se combinan varios fragmentos individuales de gen en el vector de clonación pBSIISK+ para formar secuencias de DNA quimérico. Se producen los distintos fragmentos de gen por PCR (Roche Diagnostics; Expand Long Template PCR System; véanse también las condiciones de la PCR). Como molde de las
15 secuencias de gen se emplea el cDNA de la línea celular de hibridoma murino HEA125. Como resultado se obtiene el vector pBS-loxP-FdHEA. Este vector codifica al dominio vH de HEA125 fusionado con el domino CH1 de la IgG1 murina. En la figura 18B se representa la secuencia de DNA quimérico resultante,
20 cuya secuencia se verifica seguidamente.

b. Recombinación específica en el locus de gen vH

Se electropora el vector pBS-loxP-FdHEA descrito en el ejemplo 15a junto con el vector de expresión de Cre pMC-Cre del modo descrito en el ejemplo 1d en la línea celular
25 HEA125-mhRek descrita en el ejemplo 4d y después por dilución limitada de las aprox. 10^7 células empleadas se propagan por separado aprox. 2.000 clones. Se recubre una placa ELISA en cada caso con 100 µl del correspondiente líquido sobrenadante

del cultivo celular de los 2.000 clones descritos, se bloquea (con un 1 % de leche en polvo en 200 µl de PBS) y después se tiñe con anticuerpo 1-9E10 anti-myc conjugado con peroxidasa o con anticuerpo IgG de cabra anti-ratón combinado con peroxidasa (Dianova) (diluido en cada caso 1:2000 en 100 µl de PBS). Después de los pasos de lavado intercalados se detecta la peroxidasa residual fijada con el sustrato OPD.

Como resultado, 3 de los clones analizados presentan una señal elevada cuando se tiñen con el anticuerpo IgG de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa, mientras que al mismo tiempo no se detecta señal alguna cuando se tiñen con un anticuerpo 1-9E10 anti-myc conjugado con peroxidasa. Se verifica la secuencia genómica del clon y finalmente se propaga el clon HEA125-Fab.

La línea celular resultante HEA125-Fab secreta un fragmento de anticuerpo Fab monoclonal de una especificidad definida (en este ejemplo: los dominios vH y vkappa de HEA125) con un dominio kappa constante humanizado. Además, el exón vH-CH1 dentro del locus de gen vH está flanqueado por 2 sitios loxP distintos. El exón vkappa está flanqueado por 2 sitios FRT distintos.

Ejemplo 16

Recombinación específica en lugares (loci) de gen apropiados

a. Línea celular con señales de recombinación específicas en un locus de gen activo

En la línea celular Jurkat se electropora el vector linealizado pBS-MvHG418MdeltaPGK (figura 13B) y del modo des-

crito en el ejemplo 3b se seleccionan las células resistentes al G418. Por dilución limitada se obtiene el clon de la célula Jurkat G418.

b. DNA quimérico

5 En la línea celular Jurkat G418 se electropora el vector pBS-loxP-IgG1 descrito en la figura 16 junto con el vector de expresión pOG44 de la Flp del modo descrito en el ejemplo 1d y a continuación por dilución limitada se propagan por separado aprox. 500 clones entre aprox. las 10^7 células
10 empleadas. De estos 500 clones, 4 clones resultaron sensibles al G418. Por secuenciación del DNA genómico con un cebador de PCR específico de FRT se obtiene la línea celular Jurkat loxP-IgG1.

c. Recombinación específica

15 A continuación en las células de la línea celular Jurkat loxP-IgG1 expandida, descrita en el ejemplo 18b, se electropora el vector pBS loxPvH (figura 15B) junto con el vector de expresión de la Cre pMC-Cre, se tiñen las células después de 3 días con el anticuerpo IgG1 de cabra anti-humano marcado
20 con FITC y del modo ya descrito se aíslan las células en el clasificador FACS. Como resultado se clasifican 425 de las aprox. 10^6 células y de ellas se propagan por separado 10 clones, que en el FACS poseen una acusada fluorescencia verde. Después de la secuenciación del DNA genómico amplificado
25 por PCR se obtiene como resultado de este procedimiento la línea celular Jurkat loxPvHEAIgG1. Esta línea celular codifica el dominio vH de HEA125 fusionado con los dominios constantes CH1, CH2 y CH3 humanos. Una porción de esta cadena

larga de anticuerpo se presenta sobre la superficie de las células de la línea celular Jurkat loxPvHEAIG1.

En la figura 6 se representa esquemáticamente una variante de este procedimiento. Se recombina en la línea celular preseleccionada Jurkat G418 un gen de anticuerpo scFv
5 flanqueado por loxP, fusionado con dominios bisagra, CH2, CH3, M1 y M2 como cassette de gen. Este acontecimiento de recombinación puede seleccionarse directamente en base a la expresión en superficie del anticuerpo scFv recombinado. Lo
10 mismo se diga de la recombinación específica eventualmente posterior de un gran número de diferentes cassettes de gen de anticuerpo scFv.

Como alternativo pueden utilizarse como materiales de partida las líneas celulares ya existentes, que se obtienen
15 de modo similar al procedimiento descrito en el ejemplo 18a. Son ejemplos de ello las líneas celulares comercializadas por Invitrogen: Flp-In™ 293 (R750-07), Flp-In™ CV-1 (R752-07) y Flp-In™ CHO (R758-07).

En otra ejecución experimental preferida, una selección
20 sencilla de los acontecimientos de recombinación deseados permite tanto la integración del gen de resistencia en la cassette de la recombinasa (véase el ejemplo 18a, selección con G418), como también la segregación del gen de resistencia con la Flp o la Cre (véase el ejemplo 18b). Un ejemplo de
25 ello es la fusión del gen de la neofosforiltransferasa II con el gen de la timidina-quinasa del herpes simple. Para la selección de células, que han perdido el gen quimérico integrado se utiliza entonces el ganciclovir (Syntex n° 115561), que

en presencia de la timidina-quinasa (TK) se convierte en un tóxico para las células (Masour y col., Nature 336, 348-352, 1988). Previamente pueden generarse líneas celulares, cuya TK endógena haya dejado de funcionar, de modo muy sencillo por
5 selección con el ganciclovir.

Ejemplo 17

"Trampa de exones" (exon trap) y presentación en superficie

a. Línea celular de trampa de exón (exon trap)

10 Se electropora en las células de la línea celular expandida Jurkat G418 descrita en el ejemplo 18a el vector pBS-loxPIgGdeltaCH1 (figura 16) junto con el vector de expresión pOG44 de la Flp, del modo descrito en el ejemplo 1d y después por dilución limitada de las aprox. 10^7 células empleadas se
15 propagan por separado aprox. 500 clones. De estos 500 clones, 5 resultaron positivos al G418. Por secuenciación del DNA genómico con el cebador de PCR específico de la FRT se obtiene la línea celular Jurkat loxP-IgGdeltaCH1. Esta línea celular codifica los dominios constantes de bisagra, CH2, CH3,
20 M1 y M2 de un anticuerpo IgG1 bajo el control de un promotor Jurkat endógeno. En la región de los dominios variables se halla una cassette de intercambio loxP. El aceptor de empalme del extremo 5' del exón bisagra se representa en la figura 16 junto con el marco abierto de lectura.

25 b. DNA genómico

Se purifican los linfocitos humanos por métodos estándar a través de gradientes de Ficoll y obtenerse de este modo el DNA genómico (véase p.ej. Sambrook y Russell: Molecular

Cloning, a laboratory manual, 3^a edición, 2001, ISBN 0-87969-577-3). Se corta este DNA con AatII, NotI, MluI o SalI y en cada caso se selecciona por tamaños en un TAE-gel de agarosa del 0,8 % (1-5 kb). El DNA seleccionado por tamaños se clona a continuación en el vector pBS-loxPklon descrito en la figura 15D y finalmente se aísla una mezcla muy compleja ($>10^6$ transformandos distintos) del DNA de vector (Qiagen, kit de purificación de plásmidos).

c. Recombinación específica

La mezcla muy compleja de DNA de vector descrita en el ejemplo 19b se electropora junto con el vector de expresión de la Cre pMC-Cre en las células del clon expandido Jurkat loxP-IgG1deltaCH1, se tiñen las células después de 3 días con el anticuerpo IgG de cabra anti-humano marcado con FITC y del modo ya descrito se aíslan las células en el clasificador FACS. Como resultado se clasifican 125 de las aprox. 10^8 células y se reúnen entre sí las que poseen una acuosa fluorescencia verde en el FACS. Esta biblioteca de trampa de exones (exon-trap) se expande por cultivo celular.

El resultado de este procedimiento es una biblioteca de trampa de exones, cuyos distintos componentes presentan sobre la superficie de las células en cada caso distintos dominios codificados por exón humanos, fusionados en cada caso con un dominio constante CH2 y CH3.

Ejemplo 18

Búsqueda de diferencias entre 2 mezclas complejas; búsqueda de antígenos asociados a tumores

Se mezclan aprox. 10^8 linfocitos T humanos remarcados normales, purificados a través de un gradiente de Ficoll, con aprox. 10^7 células de la biblioteca de anticuerpos descrita en el ejemplo 7 en 5 ml de tampón DPBS y se preincuban sobre
5 hielo durante 10 min. Se tiñen las células de la biblioteca de anticuerpos descrita en el ejemplo 7 con proteína G marcada con PE del modo antes descrito. A continuación se tiñen aprox. 10^6 células de la línea de linfoma Jurkat con un anticuerpo anti-CD5 marcado con FITC y se agregan. Además, inmediatamente antes se irradian las células Jurkat con 400 rad. Pasados 20 min más sobre hielo, en el clasificador FACS se seleccionan dobletes, que poseen una doble fluorescencia roja-verde. Como resultado se clasifican 5 células individuales y se expanden. El líquido sobrenadante del cultivo celular de
15 una de estas 5 líneas celulares emite en el FACS una señal específica de las células Jurkat, si se compara con la coloración de los linfocitos obtenidos de la sangre. La detección de los anticuerpos secretados al medio se realiza con el anticuerpo IgG de cabra anti-humano marcado con FITC (Dianova).

20 Los expertos podrán variar o combinar entre sí de múltiples maneras los procedimientos descritos en los ejemplos anteriores, p.ej.:

- un dominio constante kappa murino puede reemplazarse también por un dominio constante lambda humano (ejemplo 1e);
- 25 - uno de los en total 9 vectores de trampa de exones distintos con sitios desplazados de dador de empalme o de aceptor de empalme permite obtener en cada caso un producto genético en el marco de lectura correcto, para ello puede

estar predeterminado un exón líder o no (en el último caso se necesitan solamente 3 vectores distintos de trampa de exones; ejemplo 19);

- en principio es apropiado cualquier locus de gen activo, para, partiendo de una línea celular, generar por recombinación específica una gran variedad de células distintas o de productos genéticos asociados con ellas (ejemplos 3, 4, 17, 18, 19);

- también las señales específicas de recombinación iguales pueden flanquear a las secuencias variables (ejemplos 3, 4, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19);

- o las señales de recombinación inversas iguales pueden flanquear a las secuencias variables;

- o se recombinan varias (muchas) secuencias variables dispuestas una detrás de otra, que en cada caso están flanqueadas por señales de recombinación (figura 6);

- en lugar de un vector de expresión de recombinasa puede emplearse también la proteína de recombinasa propiamente dicha;

- la proteína de recombinasa puede fusionarse con un dominio represor Tet, para aumentar de este modo la eficacia de recombinación de los plásmidos con los sitios del operador Tet;

- se puede generar una línea celular, que produzca las recombinasas específicas requeridas, en especial inducibles (ejemplos 3d, 4d), de este modo puede p.ej. comprobarse de modo muy sencillo la actividad de la Cre con el vector pSVlacZT;

- la gran variedad de genes de anticuerpos (ejemplos 5, 6, 7, 18) puede obtenerse también por síntesis química de muchos CDRs distintos dentro de una o de pocas estructuras de genes de anticuerpos predeterminados;
- 5 - o por multiplicación de cDNA o de bibliotecas de anticuerpos scFv (ejemplo 18) mediante una PCR;
- se puede seleccionar la gran variedad de los genes de anticuerpos variables recombinados por selección negativa con ganciclovir (ejemplo 18);
- 10 - pueden insertarse también otros segmentos de gen seleccionables (p.ej. el EGFP) en lugar de un gen de resistencia al G418 o de un epítipo de myc (ejemplos 3, 4, 18);
- es posible la aplicación tanto de una cassette de recombinación seleccionable positivamente (p.ej. G418) como
- 15 negativamente (p.ej. con ganciclovir) (ejemplo 18);
- pueden combinarse bibliotecas (ejemplos 7, 16, 17, 18, 19) con arreglos (arrays) de todo tipo para conseguir una exploración masiva paralela;
- pueden obtenerse de modo muy sencillo múltiples for-
- 20 mes de anticuerpos biespecíficos, bifuncionales o alterados en general (ejemplos 12, 13, 14, 15, 18);
- puede utilizarse la variante de empalme de un anticuerpo secretada al medio de cultivo (en general: de una proteína de fusión correspondiente; ejemplos 12, 13, 16, 18, 19)
- 25 para la caracterización rápida y sencilla de una línea celular seleccionada (ejemplo 9) o incluso para la caracterización de una subbiblioteca (ejemplo 8) o incluso para la caracterización de una biblioteca generada;

- puede utilizarse la variante de empalme secretada, en especial de un anticuerpo humano si fuera necesario directamente como sustancia farmacológicamente activa;

- pueden combinarse las bibliotecas de células T (ejemplos 16, 17) con bibliotecas de células de antígenos unidos a MHC para la búsqueda de epítopes específicos de células T.

Reivindicaciones

1. Procedimiento para la humanización de una célula de hibridoma, caracterizado porque

(a) se transfecta una secuencia de DNA, que codifica a uno o más dominios constantes humanos de IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, a la línea celular de hibridoma;

(b) la secuencia de DNA de los dominios constantes humanos de la IgG, IgM, IgA, IgD o IgE se flanquea con secuencias de DNA, que son homólogas de las regiones genéticas cromosómicas que flanquean a los dominios constantes del locus de gen de la mencionada célula de hibridoma que codifican a la cadena larga del anticuerpo;

(c) se expanden una o más células, que en base a una recombinación homóloga, expresan una cadena larga de IgG, IgM, IgA, IgD o IgE con una porción constante humanizada;

(d) se transfecta una secuencia de DNA, que codifica a un dominio constante kappa o lambda humano, a la línea celular de hibridoma, con lo cual esta secuencia de DNA se flanquea con secuencias de DNA, que son homólogas de las regiones genéticas cromosómicas, que flanquean al dominio constante kappa o lambda del locus de gen activo kappa o lambda de la célula de hibridoma;

(e) a continuación se expande una o pocas células que, en virtud de una recombinación homóloga expresan una cadena kappa o lambda con una porción constante humanizada, uniéndose los anticuerpos expresados, mediante el enlace covalente resultante de la variante de empalme de la cadena larga de anticuerpo situada sobre membrana, a la superficie de las

células correspondientes que los expresan, lo cual permite la detección y la selección de aquellas células, que presentan dominios de anticuerpo constantes humanizados.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que
5 en primer lugar se humanizan los dominios constantes de la cadena corta de anticuerpo y después los dominios constantes de la cadena larga de anticuerpo.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que solamente se humanizan los dominios constantes de la cadena
10 larga de anticuerpo o solamente los dominios constantes de la cadena corta de anticuerpo.

4. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 1 a 3, en el que el intrón en dirección al extremo 5' antes del exón M1 del gen activo de IgG, IgM, IgA, IgD o IgE se acorta
15 en más de 50 pares de bases.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 1 a 4, en el que los dominios constantes humanizados están fusionados con secuencias adicionales de DNA que codifican a proteínas.

20 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que las secuencias adicionales de DNA que codifican a proteínas codifican a una secuencia de engarce y a un anticuerpo de cadena simple, que está fusionado por el extremo C con el dominio constante de la cadena corta del anticuerpo.

25 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 1 a 6, en el que las regiones homólogas de las secuencias de DNA transfectado a los correspondientes loci de gen de anti-

cuerpo de la célula de hibridoma se extienden a lo largo por lo menos de 400 pares de bases.

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 1 a 7, en el que para las recombinaciones homólogas no se introduce en las células ningún marcador de resistencia, que se emplean para la selección de los acontecimientos de recombinación homóloga.

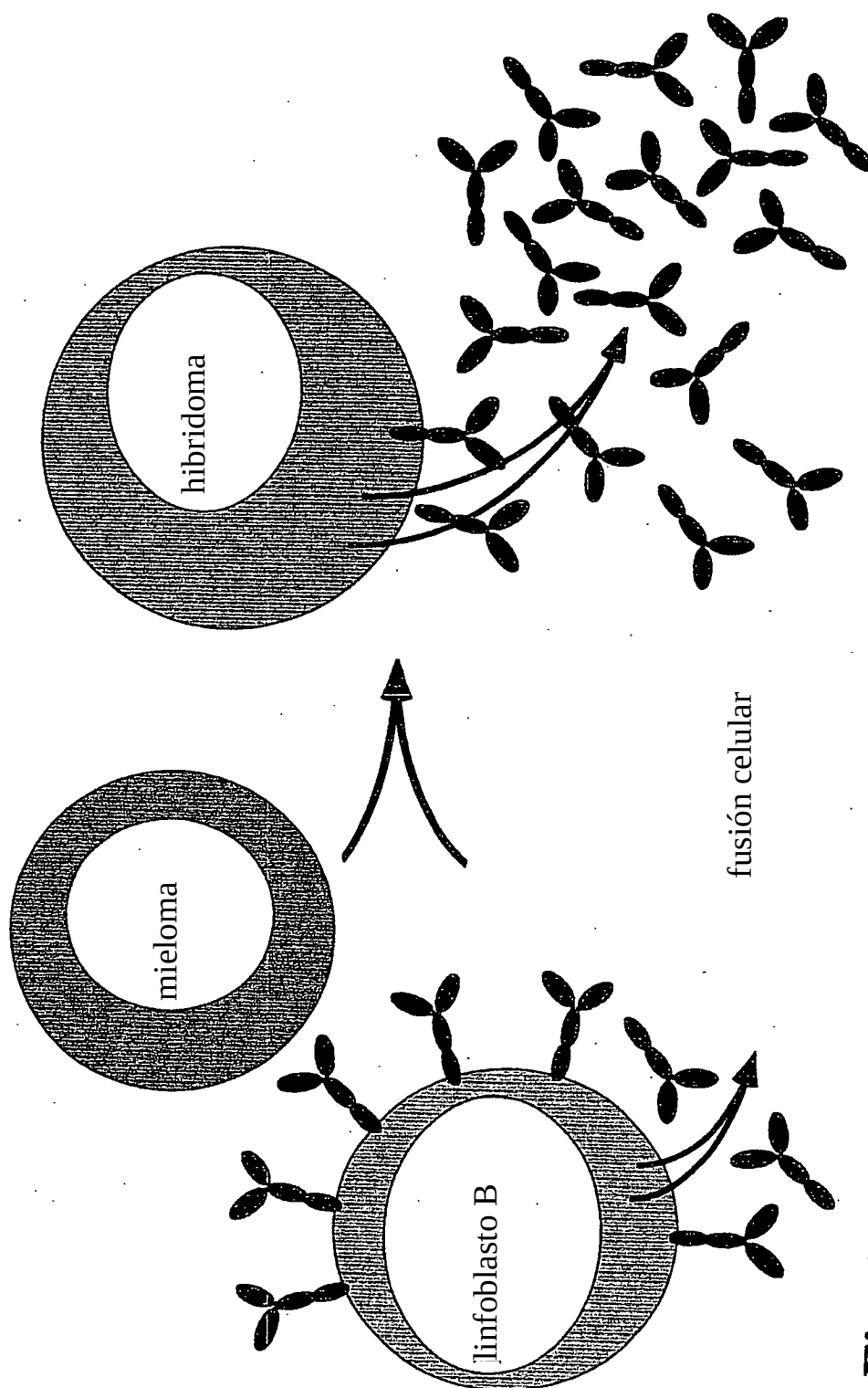


Fig. 1

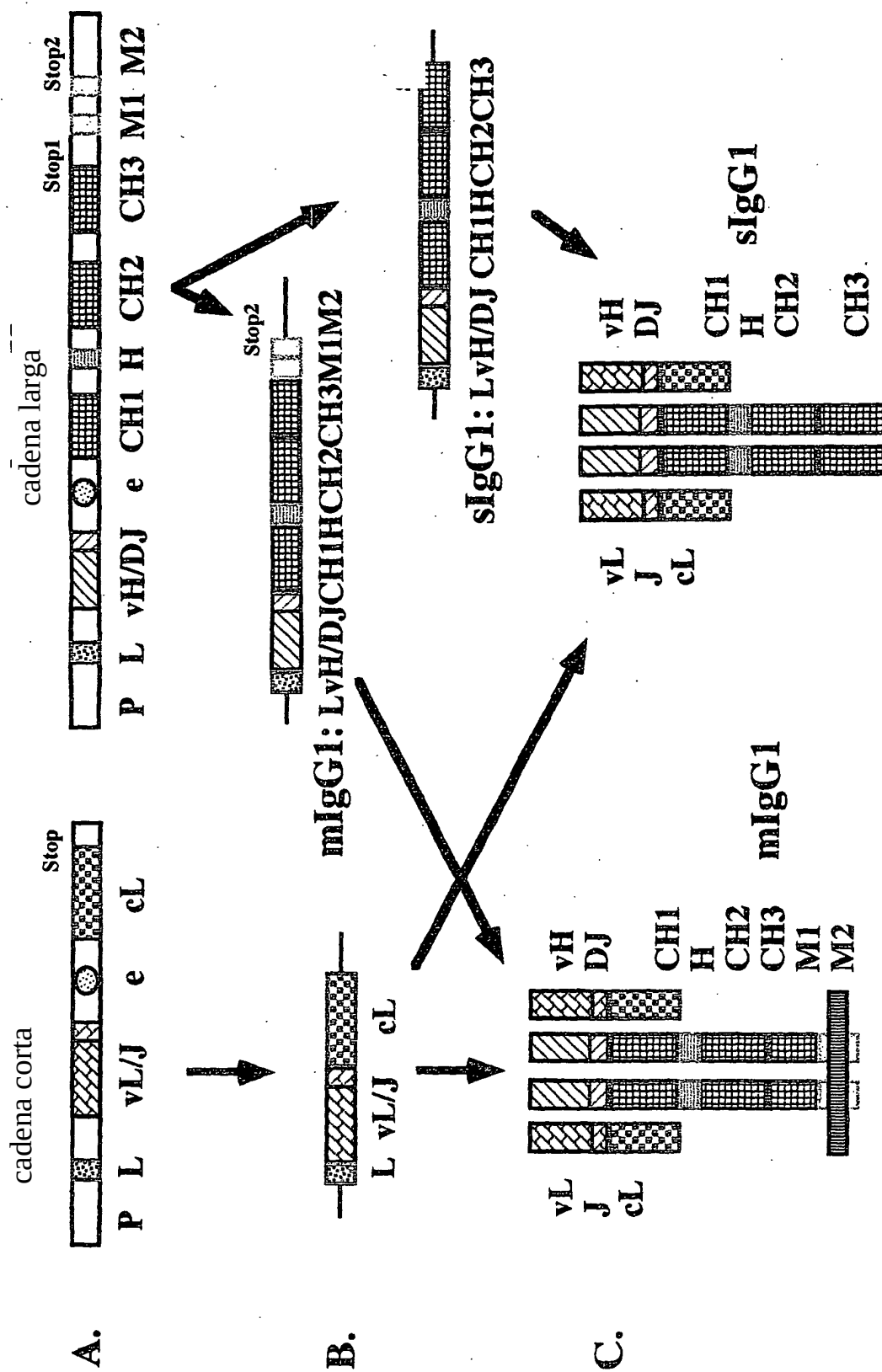


Fig. 2

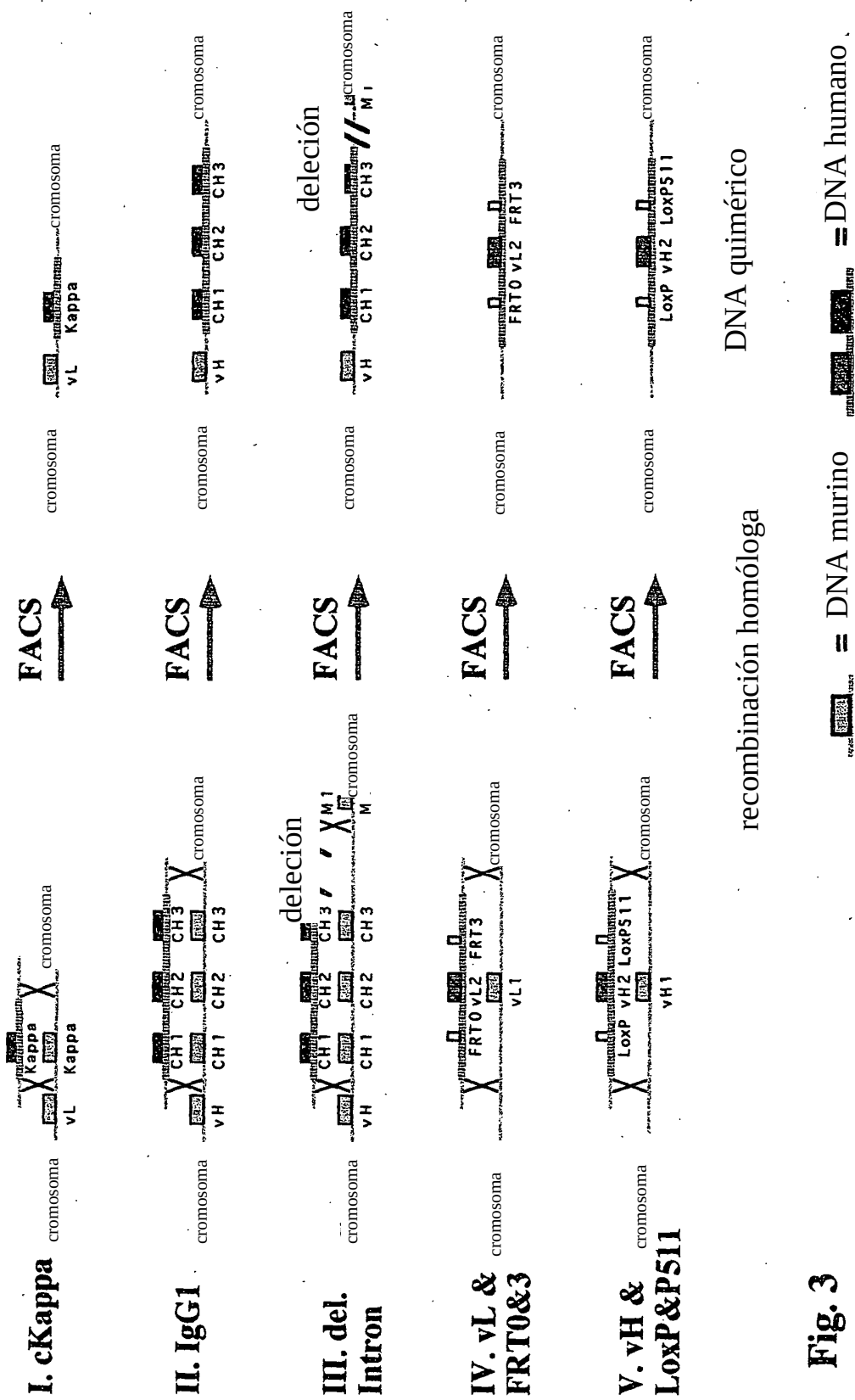


Fig. 3



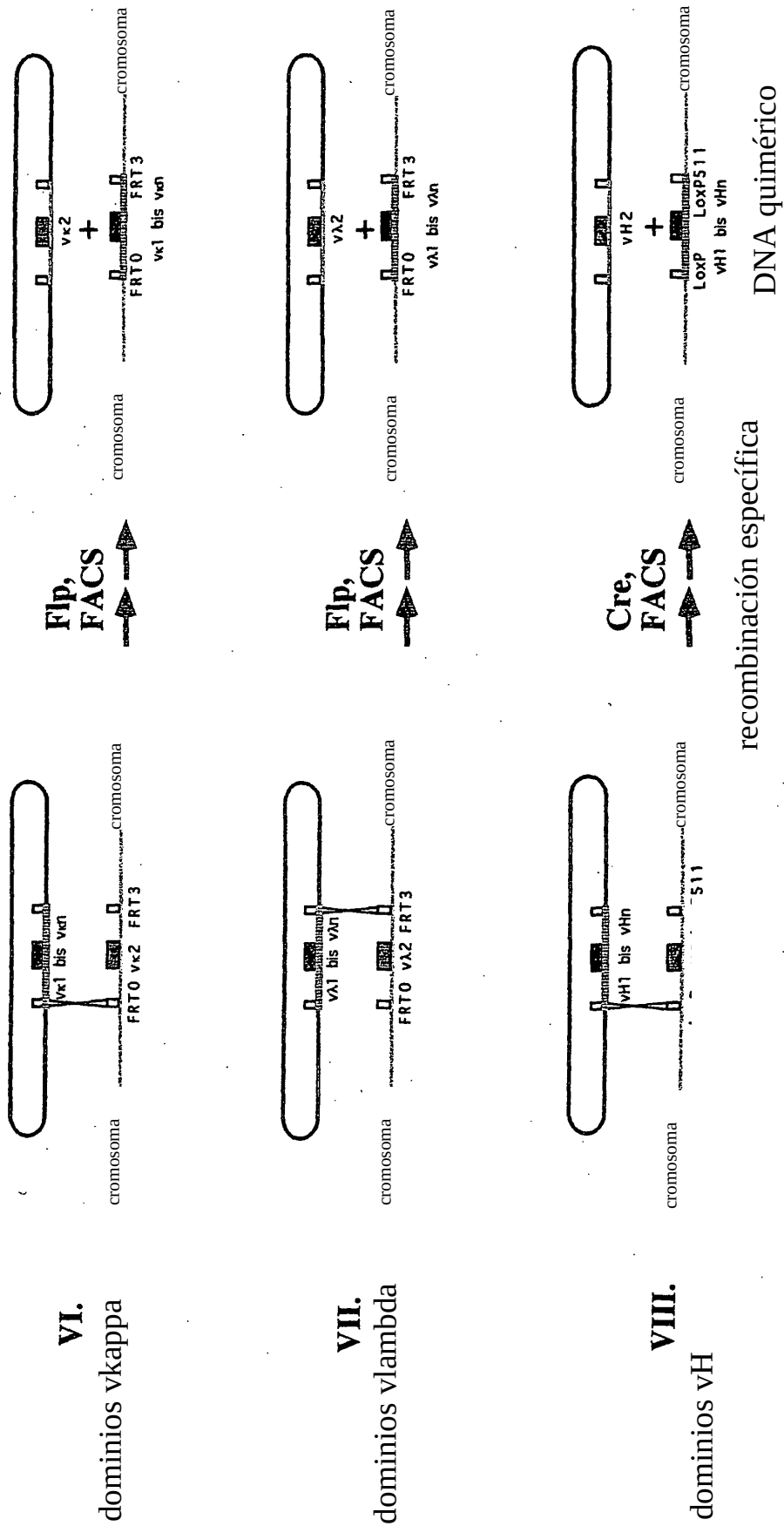
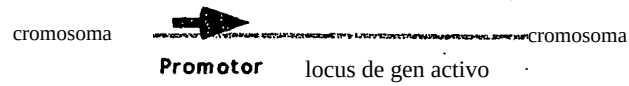


Fig. 5

■ = DNA murino □ = DNA humano

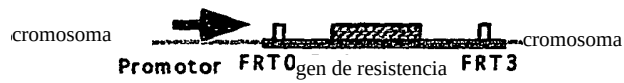
I. locus de gen activo



transfección,
recombinación,
selección



II. señales FRT

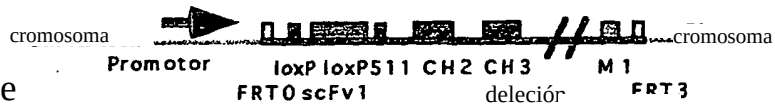


**Flp,
FACS**

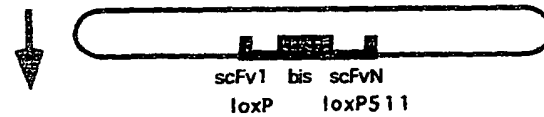


III.

visualización de
anticuerpos



**Cre
FACS**



IV.

biblioteca scFv

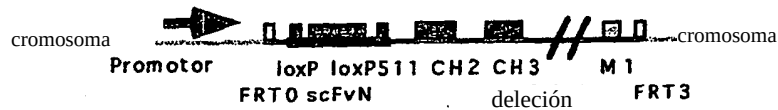


Fig. 6

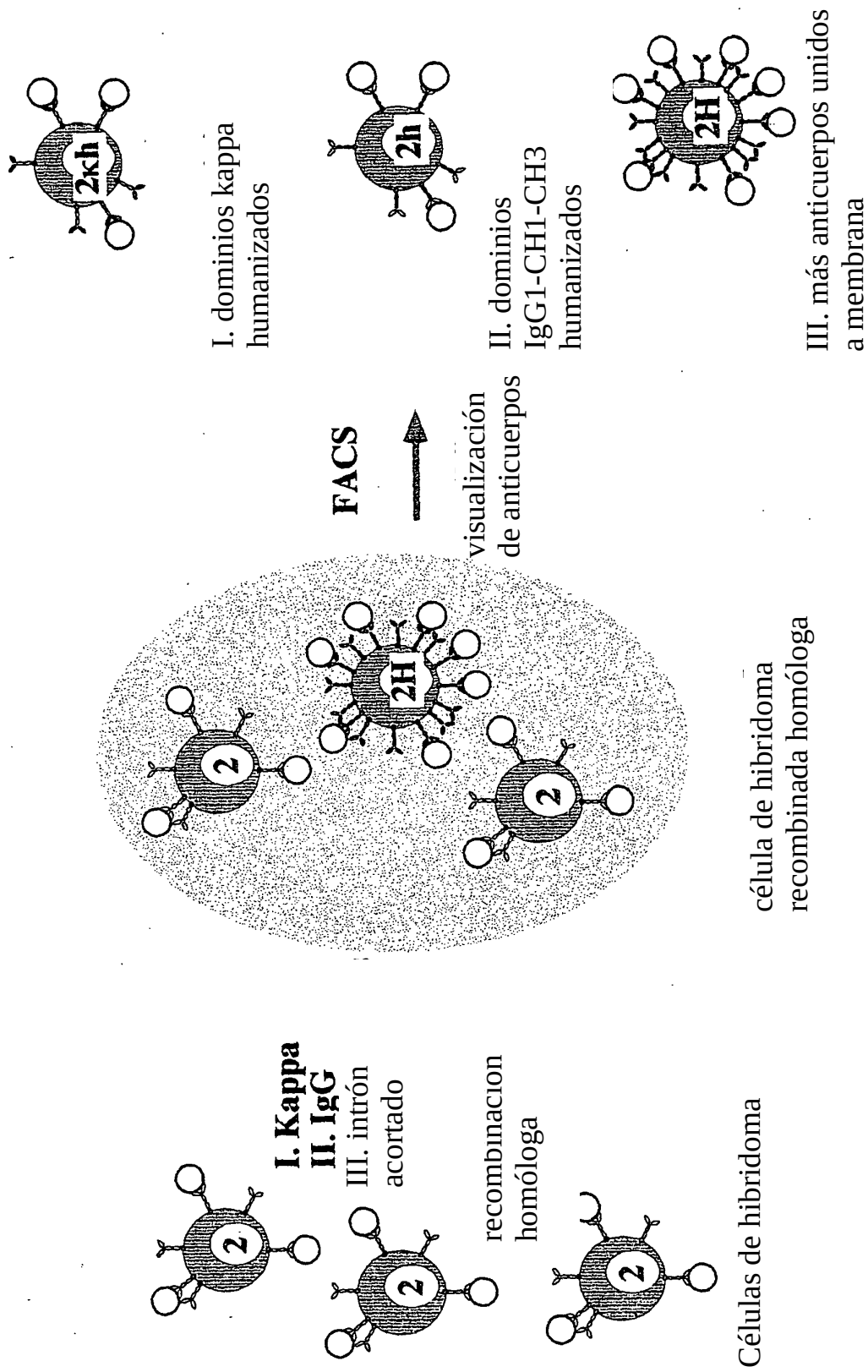


Fig. 7

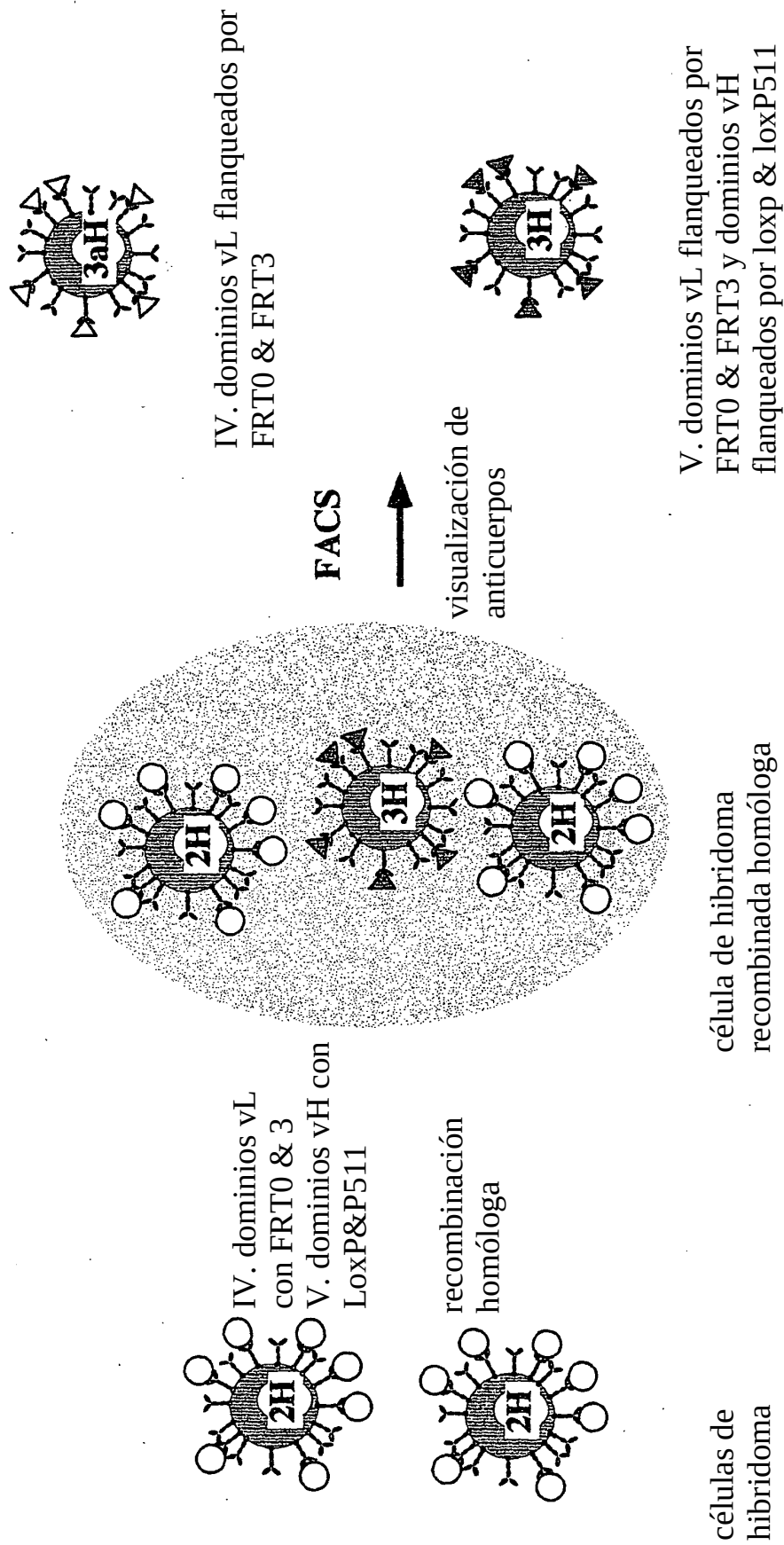


Fig. 8

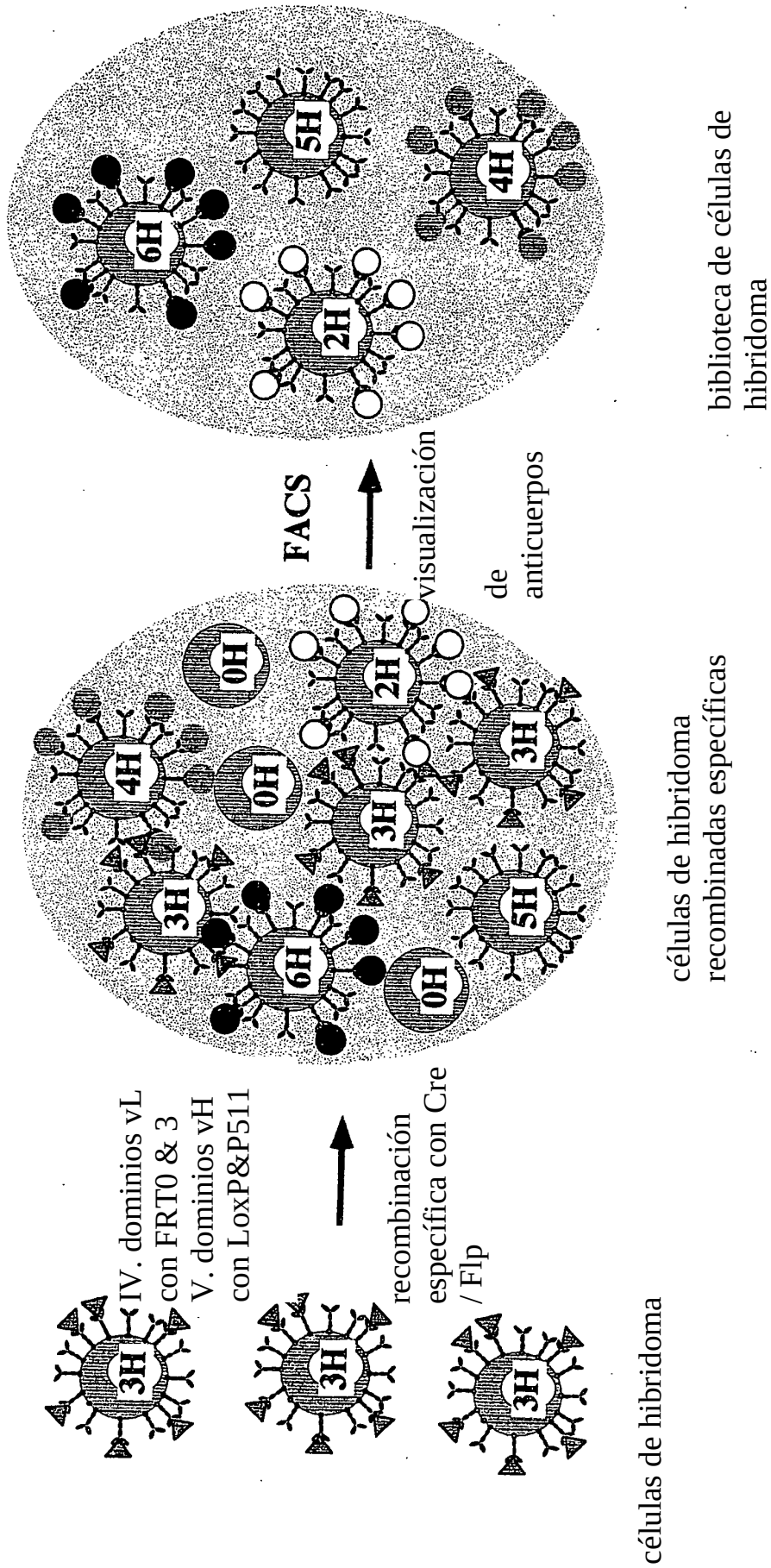


Fig. 9

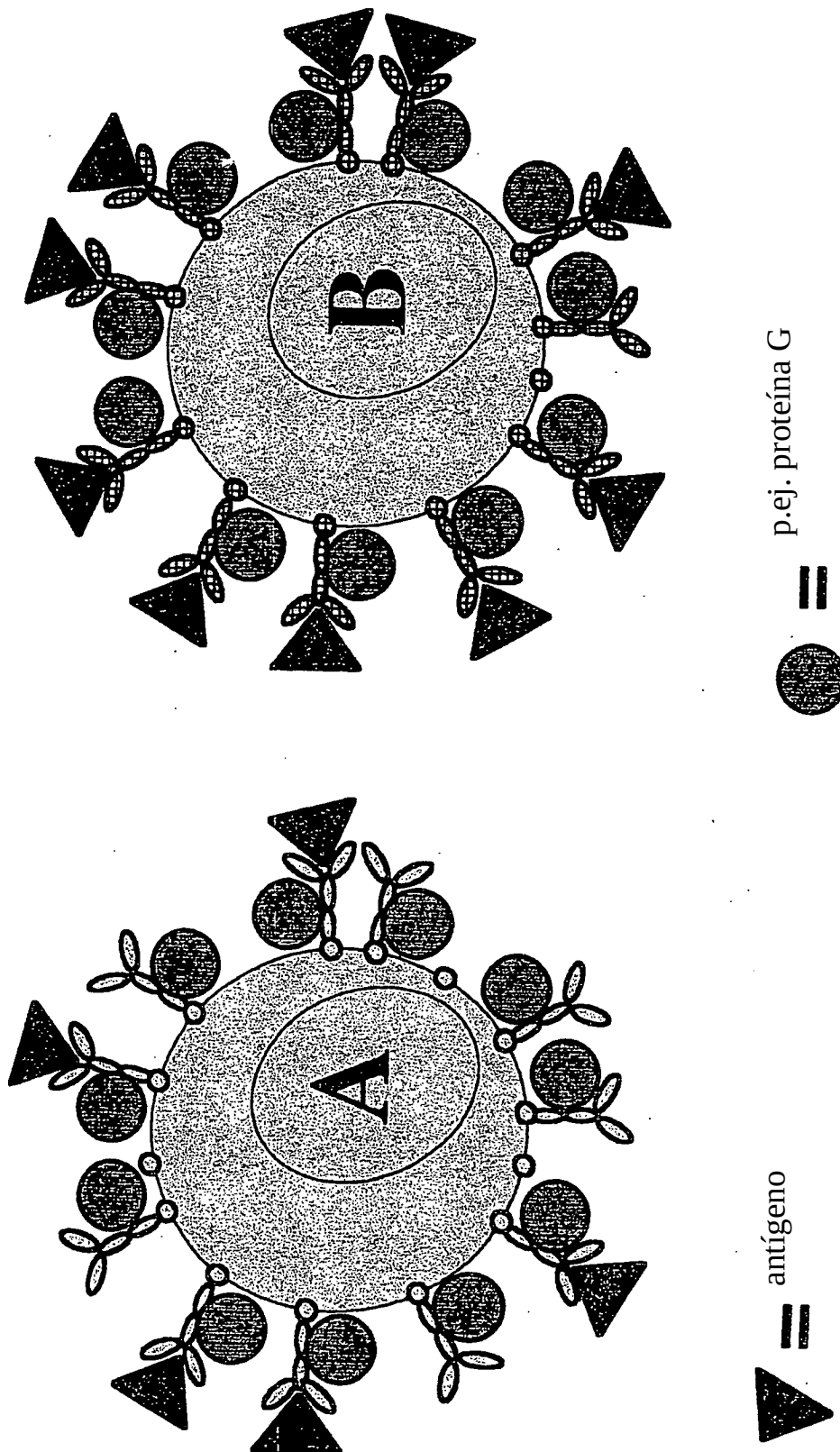


Fig. 10

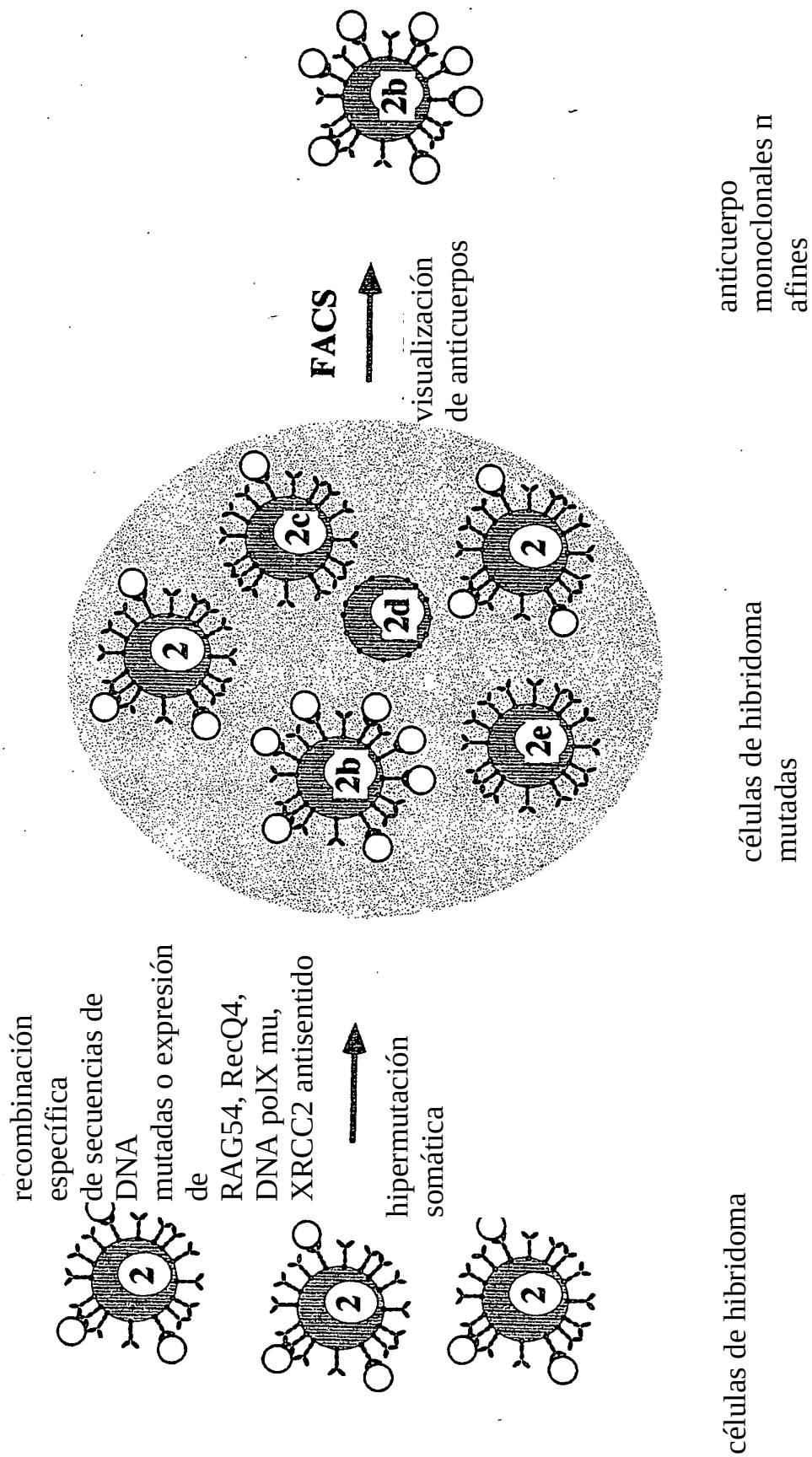


Fig. 11

Fig 12A (pBS MhKappam)

Fig 12B (pBS MhIgG1M; pBS MhIgG1Mdelta350)

Fig. 13A (pBS MKappaG418M)

Fig. 13B (PBS MvHG418M; pBS MvHG418MdeltaP_{gk})

nombre de cebadador y gen	secuencia	Número de registro del banco de datos EMBL	nombre de cebadador y gen	secuencia	Número de registro del banco de datos EMBL
v1-2L	ccacagggacctctgggctga	D87021	v3-4L	actctatccctgggggaccaca	D87022
v1-4L	ggcttcagggacctctgggct	D87015			
v1-5L	ggcttcagggacctctgggct	D87007	v4-1L	cctcagagatcagggccagcc	D87009
v1-9L	ggaaatggccttggggacctct	D87014	v4-3L	gggtcagccacacagcctgatt	D87016
v1-11L	agagagggccttgggaagccca	D87009	v4-4L	gagtctcagtgtccaacctacac	D87018
v1-13L	ggccctgggaagcctatggatt	D87010	v5-1L	cccagggaaatcagggaaatgttt	D87024
v1-17L	ccctggggaagcccatggggc	D87016	v5-2L	cccaaagggaacccccacctc	D87016
v1-18L	gatcagaggggaggggtccctg	D87018	v5-4L	gaccctcagcatcctcatgcc	D87000
v1-19L	gaggggtccaggaagcccatg	D87018			
			U266L	ccacagggacctctgggctga	X51754
v2-1L	tggatgggctcggcggggct	D87023			
v2-6L	gcaggggggaggggctgctg	D87021	J1L	cagaggggaggaagccccaga	D87023
v2-7L	tgccccagggctcagtgcccat	D87021	J2L	gctgaccacaagttgagacaagat	D87023
v2-11L	ccagggctcagtgccacagatt	D87015	J3L	gctgaccacaagttgagacaagat	D87023
v2-13L	ctcaacccccatattatcatgtag	D87007	J7L	gcttagaccttagccttcgaca	D87017
v2-14L	gctggggctgattgcaggggata	D87007			
v2-15L	ccagaccctgccccaggctc	D87007			

Figur 14A

nombre de cebadador IGKV y gen	secuencia	número de registro del banco de datos EMBL	nombre de cebadador IGKV y gen	secuencia	número de registro del banco de datos EMBL
1-5	cactaggaatttactcagccagtg	Z00001	2D-24	gaggggaatgtagaggaaacttct	X63401
1-6	gcagtttactcagccagggtg	M64858	2D-28	aaaatataaaggctcttatactttacaa	X12691
1-9	ggaatttactcagccagtg	Z00013	2D-29	gcagtgtctgaataatatcttgag	M31952
1-12	ctaggattatactcggctcagtg	V01577	2D-30	tggtgtggggctcttctggagac	X63402
1-16	gcagtttactcagccagggtg	J00248	2D-40	atgaccagtgtcttgattaagAAC	X59311
1-17	ctcagccagagtgctcagtg	X72808			
1-27	attcagccagtgtagccactaatg	X63398	3-11	ctcttgccacctctgtcagca	X01668
1-33	cactaggaattttctcagccagtg	M64856	3-15	ctcttgccacctctgtcagc	M23090
			3-20	agtctgttacctggcaactctg	X12686
1D-8	ctcagccaatgtgctcagtg	Z00008			
1D-12	tactcggctcagtgctgagtg	X17263	3D-7	actccatcaggagttttctctgct	X72820
1D-16	actcagcccagggtgctcagtg	K01323	3D-11	ctcttgccacctctgtcagc	X17264
1D-17	cactaacagtttactcagccaga	X63392	3D-15	ctcttgccacctctgtcagc	X72815
1D-33	ctcagccagtggggtcagtg	M64855	3D-20	caagtctgttacctggcaactc	X12687
1D-39	ggaatttactcagccagtgctc	X59312			
1D-43	agcagtttactcagccagtg	X72817	4-1	cagagtaatatctgtgtgaaataaaa	Z00023
2-24	gaaagaggggaatgtagaggaaac	X12684	5-2	tcctctgtgccaccaagtc	X02485
2-28	gaaatatgacgtctgtgctctga	X63397			
2-29	aaaactcctaaaagcagtgctctga	X63396	JK1	gattgcagagtcaccttatagatc	J00242
2-30	ctgggggaagactgacacagaaag	X63403	JK2	ccctggcatccgactaatgaaaat	J00242
2-40	ggaacgatgaccagtgctctgat	X59314	JK3	gggtgaccaggtttatcaaccaa	J00242
			JK4	ggtactctttggaattgacctgag	J00242
			JK5	ccaactttaccaaactcctatttga	J00242

Figur 14B

Nombre de cebador y gen	secuencia	Número de registro del banco de datos EMBL	Nombre de cebador y gen	secuencia	Número de registro del banco de datos EMBL
vH1-2	aattatgtgtgttctcttctcatctt	AB019441	vH3-49	gtcctctctcaggtgtccca	AB019438
vH1-3	catcctcctgttgggtaatccat	AB019441	vH3-53	cccggcctctctcagatgtc	AB019438
vH1-8	gtggcatctgtgtttcttctcat	AB019440	vH3-64	tgccctctctcagggcatctca	AB019437
vH1-18	tgtgtcgtccatgtgtcatgtattt	AB019440	vH3-66	cggcctctctcagatgtccc	AB019437
vH1-24	ggccacatgtcacatctctct	AB019439	vH3-72	gccttctctcagggcgtccca	AB019437
vH1-45	gtgtcgttgtcttcccttcttat	AB019438	vH3-73	ccttctcgtcagggcgtccag	AB019437
vH1-46	atgggacatctatcttcttctcaa	AB019438	vH3-74	ccctgggtcctgtcttcttc	AB019437
vH1-58	gtcatcttacccttcccttcttatc	AB019438			
vH1-69	gtggcatctgtgttcttctcat	AB019437	vH4-4	ccagggtgagcctaaaagactgg	AB019441
			vH4-28	tccaggagagcctaaaagactg	AB019439
vH2-5	actgatcatgttactatcactggtc	AB019440	vH4-31	cccaggagaggtctaaaagactg	AB019439
vH2-26	acgcccacacctgagggtctca	AB019439	vH4-34	ccagggtgagcccaaaagactg	AB019439
vH2-70	acccccacacctgagggtctca	AB019437	vH4-39	tcccagggtgagctcaaaagact	AB019439
vH3-7	tacagcctattcctccagcatcc	AB019440	vH4-49	ccagggtgagcccaaaagact	AB019438
vH3-9	cagccactcagaggcatccc	AB019440	vH4-61	cccagggtgagcccaaaagact	AB019437
vH3-11	ctgccctctctccagcgtcc	AB019440			
vH3-13	gccttcacctcagatgtccca	AB019440	vH5-51	gccttttctgcatttgaggttc	AB019438
vH3-15	tgccctctgttcaggcatccca	AB019440			
vH3-16	gggtcagtcctctcctcagg	AB019440	vH6-1	ttgtagacctgagggtcccg	AB019441
vH3-20	cacagcctactctgaggcatcc	AB019440			
vH3-21	agcctattcctccagcgtccca	AB019439	vH7-81	aattgtgtcgtccgtgtgtcatg	AB019437
vH3-23	cactatctccaaaggcctctcac	AB019439			
vH3-30	ccagcctctcctcagatgtccc	AB019439	JH1	gagcacctgtcccaagtctga	X97051
vH3-33	ccagcctctcctcagatgtccc	AB019439	JH2	ccagaccagggccggtgca	X97051
vH3-35	ggctcagtcctctcctcaggt	AB019439	JH3b	caaggagcccccgacattatc	X97051
vH3-38	gcactataacatcagaaagctggaa	AB019439	JH4b	caggagaccagcacccttattt	X97051
vH3-43	cagccactctgaggcatctgt	AB019438	JH5b	aatgcctccaagactctgacct	X97051
vH3-48	agcctactctcaagggtccca	AB019438	JH6b	aacatgccccgaggaccaacct	X97051

Figur 14C

BsHII **FRTO** **AatII** **cebador** **VKHEAL**
pBSIISK+ **TACGCCAAGCGCGGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACCTTCAGCGTCAaatacaaaaattttctgtctttatttgaaGCCAATGTCATCGGAATTCGACTTTCAGTTTAAAGA**
ACTGTATACAAAPAAAAGCATTTATTTTCTAAGTCTGTTAGAGTCACITTCATATTTCAGTCTGTGATCTACTCATGCTCTCTCTCTTTTCCAGctccagagtgacattctgtcactcagctccagc
aaLeuSerValSerProGlyGluArgValSerPheSerCysArgAlaSerGlnSerGlyLeuHisTrpTyrGlnGlnArgProSerAspSerProArgLeuLeuLysTyrAlaSerGln
BamHI **Exon** **HEAL25** **MscI**
caatctctgggaagcttccaggttttagtggcagtgatcagggacagattttactcttagcatcacaagctgtggagctcgaagatatatgcagattattactctcaaaaagaataatctatggcgaaccacagcttc
erleSerGlyIleProSerArgPheSerGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuSerIleAsnValGluSerGluAlaAspTyrTrpCysGlnGlnSerAsnIleTrpProThrThrPhe
GlyAlaGlyThrLysLeuGluLeuLysArg **cebador** **VKHEAL** **AatII**
ggctgctgggacaaagctggagctgaaacgtAAGTACACACTTTTCTCATCTTTTTTTATGCTTAAGACACACAGGTTTTCATGTTAGGGGTTAAAGTCAGttccgaaaaattcttgagaaaaatggagcAGCTCGAAGTT
FR3 **BsHII**
CCATTCTCTTCAAATAGTATAGCAACTTCGCCGCGCTCAC **pBSIISK+**

Fig. 15A (pBS FRTvKappa)

[illegible]

Fig. 15B (PBS loxPvHmyc; PBS loxPvH)

BssHII FRT0 AatII MluI SalI NotI AatII FRT3 BssHII
 pBSIIISK+ TACGCCAAGCGCGCGAAGTTCCATTCTAGAAAGPATAGGAACCTTCACGTCACGGGTAAATGTGACATATGCCGCCGCGACGTCGAAGTTCCTATTCTTCAAAATAGTATAGGAACCTTCGCCGCG
 TCAC pBSIIISK+

Fig. 15C (pBS FRTklon)

BSSHII loxP AatII MluI Sali NotI AatII loxP511 BssHII
 pBSIIK+ TACGCCAAGCGGCATAACTTCGTATATGCTATACGAAGTATGCGCGC
 TCAC pBSIIK+

Fig. 15D (PBS 1oxPKlon)

Fig 16 (PBS loxp-IgG1; PBS loxp-IgGdelta350; PBS loxp-IgGdeltaCH1)

Fig. 17A (PBS FRT KappaHAscFv215)

Fig. 17B (PBS FRT KappaHAb1a)

Fig. 18A (pBS FRT vKappa215)

BsshII loxP AatII
 TACGCCAAGCGCGCATAACTTCGTATAATGTATGCTATATCAAGACTTATAGCTGCTAGCTAGAGGTTGTGTCATCTCTAGCGCTCTCTAGCTAGAGGTAATAGCAGGGAACAATGCA
 BsrI
 AATAAAGCCCTCTCTCTCTATCATGAACACGAGTCTGAACTAACTTGAATCTGAACAAAGGGGATACGCCCGAGATTCATTCAGTGAATCAACACATCAACACATCCCTGATGgattgatt
 exon leader
 tttttttattgctcttttaaaagGTRATTCATGGAAAAGAGATACTAGCTGCTCTTACTGGTCATGAGCAAGATAGTGGTGACGCTGTATGGCAGTTTGGTCACAGAAATCTCTCTGTTTATCAAGgggtccag
 PhepheIleValAlaLeuLeuLys
 HIndIII BamHI
 tgtgaagtgaagctctctgagctctgagctgtgcaagctgaggaactctctgcaagctcaggattcctgttttagtagattctggatgacttgggtccggcaggctccagggaaag
 CysGluValLysLeuLeuGluSerGlyGlyLeuValGlnProGlyGlySerLeuSerCysAlaAlaSerGlyPheAspPheSerArgPheTrpValArgGlnAlaProGlyLysGln
 VH-HEA125
 gctagaatggattggagaataatctatgatacagcagcagataaactcattcattcctcagggagcaagcagcaaaatacgcgtgttctctgcaaatgagcaaatgagatctg
 yLeuGluTrpIleGlyGluLeuLeuAsnLysSerSerThrIleAsnTrpThrProSerLeuLysAspLysPheIleLeuSerArgAspAsnAlaLysAsnThrLeuLeuGlnMetSerLysValArgSerG
 aggaacagacgctcttattcctgtccaagaaacaaagctctcagaaagagctatgagactgggtcagggagcaactcagctcctctcctcaggtTAAGAATGGCGCTCTCCAGGCTCTTTATTTTAAAC
 LAspThrAlaLeuTyTyCysSerArgGluGluLysLeuLeuAspLysPheTrpGlyGlnGlyThrSerValThrValSerSerGly
 Sali
 TTTTGTATGGAAATTTTCAGCATGCGACATCAATCTAAATGTTTCTCGGACATTAAGAACCAGCGGCTCTGCGCCCTGGCGACAGCTCTGTCCACACCGCGCTCACATGGCACACCCCTC
 TCTGTGCACCTCCaccagggccatcagctctccccctggcaccctctccaaagacactctggggagacactctggggctgggctgggtcagggctgagcgtgctcgtggaaact
 >SerThrLysdlyProSerValPheProLeuAlaProSerSerLysSerThrSerGlyGlyThrAlaLeuLeuGlyCysLeuValLysAspTrpPheProGluProValThrValSerTrpAsnS
 ApatI
 caggcgccctgaccagcgccgctgacacactcccgctgtcctacagctcagcactctacccctcagcagcgtggtgacgtgacctccacagacttggcacccacagcactacactgcaacgtggaatcac
 erGlyAlaLeuThrSerGlyValHisThrPheProAlaValLeuGlnSerSerGlyLeuLysSerValValThrValProSerSerSerLeuGlyThrGlnThrTyrlcysAsnValAsnHis
 CH1 de lqG1 murina
 Sali AatII loxP511 BsshII
 aaagccacagcaacacaaaggtggacaagaagtgtgaggtgagggccagtcagacGTCATAACTTCGTATAATGTATATCTATACGAAGTTATGCGCGCTCAC
 LysProSerAsnThrLysValAlaLysLysVal...

Fig. 18B (PBS loxP-FdHEA)