



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 315 612**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04076718 .8**

96 Fecha de presentación : **10.04.1992**

97 Número de publicación de la solicitud: **1471142**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.10.2004**

54

Título: **Genotecas de receptores heterodiméricos usando fagémidos.**

30

Prioridad: **10.04.1991 US 683602**
27.01.1992 US 826623

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2009

73

Titular/es: **THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE**
10666 North Torrey Pines Road
La Jolla, California 92037, US

72

Inventor/es: **Kang, Angray;**
Barbas, Carlos y
Lerner, Richard A.

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 315 612 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Genotecas de receptores heterodiméricos usando fagémidos.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a vectores de clonación y a procedimientos para producir una genoteca de moléculas de ADN capaz de expresar un polipéptido de fusión sobre la superficie de una partícula de fago filamentoso.

10 **Antecedentes**

Los bacteriófagos filamentosos son un grupo de virus relacionados que infectan bacterias. Se denominan filamentosos porque son partículas largas y finas compuestas de una cápsula alargada que envuelve el ácido desoxirribonucleico (ADN) que forma el genoma del bacteriófago. El bacteriófago filamentoso con pilis F (fago Ff) sólo infecta bacterias gram-negativas absorbiéndolas específicamente hacia la punta del pili F, e incluye fd, f1 y M13.

La cápsula madura del fago Ff está compuesta de una cubierta de cinco productos génicos codificados por el fago: cpVIII, el principal producto de cubierta proteínica del gen VIII que forma el grueso de la cápsula; y cuatro cubiertas proteínicas secundarias, cpIII y cpIV en un extremo de la cápsula y cpVII y cpIX en el otro extremo de la cápsula. La longitud de la cápsula está formada por de 2.500 a 3.000 copias de cpVIII en una distribución de hélices ordenadas que forma la característica estructura filamentosa. Hay aproximadamente cinco copias de cada una de las cubiertas proteínicas secundarias presentes en los extremos de la cápsula. La proteína codificada por el gen III (cpIII) está comúnmente presente en de 4 a 6 copias en un extremo de la cápsula y sirve como receptor para la unión del fago a su huésped bacteriano en la fase inicial de la infección. Para obtener un resumen detallado de la estructura del fago Ff, véase Rasched *et al.*, *Microbiol. Rev.* 50: 401-427 (1986); y Model *et al.*, in "The Bacteriophages", volumen 2, R. Calendar, Ed., Plenum Press, pp. 375-456 (1988).

El ensamblaje de una partícula de fago Ff implica mecanismos muy complejos. Ninguna partícula de fago se ensambla dentro de una célula huésped, sino que se ensamblan durante la extrusión del genoma vírico a través de la membrana de la célula huésped. Antes de la extrusión, la principal cubierta proteínica cpVIII y la cubierta proteínica secundaria cpIII son sintetizadas y transportadas a la membrana de la célula huésped. Tanto cpVIII como cpIII son ancladas a la membrana de la célula huésped antes de su incorporación a la partícula madura. Además, el genoma vírico se produce y se reviste de proteína cpV. Durante el procedimiento de extrusión, el ADN genómico revestido de cpV es despojado de la cubierta cpV, volviendo a ser simultáneamente revestido de cubiertas proteínicas maduras. Los mecanismos de ensamblaje que controlan la transferencia de estas proteínas de la membrana a la partícula no se conocen actualmente.

Tanto las proteínas cpIII como cpVIII incluyen dos dominios que proporcionan señales para el ensamblaje de la partícula de fago madura. El primer dominio es una señal de secreción que dirige la proteína recién sintetizada hacia la membrana de la célula huésped. La señal de secreción se localiza en el terminal amino del polipéptido y dirige el polipéptido al menos a la membrana celular. El segundo dominio es un dominio de anclaje a la membrana que proporciona señales para la asociación con la membrana de la célula huésped y para la asociación con la partícula de fago durante el ensamblaje. Esta segunda señal tanto para cpVIII como para cpIII comprende al menos una región hidrófoba para cruzar la membrana.

La cpVIII ha sido ampliamente estudiada como una proteína de la membrana modelo, porque puede integrarse dentro de las bicapas lipídicas tales como la membrana celular en una orientación asimétrica con el terminal amino ácido hacia fuera y el terminal carboxilo ácido hacia el interior de la membrana. La proteína madura es de una longitud de aproximadamente 50 residuos de aminoácido, de los cuales 11 residuos proporcionan el terminal carboxilo, 19 residuos proporcionan la región transmembrana hidrófoba y el resto de residuos comprende el terminal amino. Se ha investigado considerablemente sobre la región de las señales de secreción de cpVIII para avanzar en el estudio de la síntesis de proteínas de la membrana y su dirección hacia las membranas. Sin embargo, poco se sabe acerca de los cambios que son tolerados en la estructura de la región de anclaje a la membrana de cpVIII que permitirían el ensamblaje de las partículas de fago.

La manipulación de la secuencia de cpIII muestra que el tramo de 23 residuos de aminoácido C-terminales de los aminoácidos hidrófobos normalmente responsables de una función de anclaje a la membrana puede ser alterado en una variedad de formas sin que pierda la capacidad de asociarse con las membranas. Sin embargo, estas proteínas cpIII con el anclaje modificado perdieron su capacidad de complementar genéticamente mutantes del gen III, lo que indica que las necesidades de un anclaje de membrana para ensamblarse funcionalmente no han sido dilucidadas.

Se han descrito vectores de expresión basados en el fago Ff en los que toda la secuencia de residuos de aminoácido de cpIII fue modificada mediante la inserción de "epítomos" de polipéptido cortos [Parmely *et al.*, *Gene*, 73:305-318 (1988); y Cwirla *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 87:6378-6382 (1990)] o una secuencia de residuos de aminoácido que define un dominio de anticuerpo monocatenario. McCafferty *et al.*, *Science*. 348:552-554 (1990). Estas proteínas híbridas fueron sintetizadas y ensambladas sobre partículas de fago en cantidades de aproximadamente 5 copias por partícula, una densidad a la que habitualmente se encuentra la cpIII normal. Sin embargo, estas proteínas

ES 2 315 612 T3

de fusión expresadas incluyen toda la secuencia de residuos de aminoácido de cpIII y no sugiere proteínas de fusión que sólo utilicen el dominio de anclaje a la membrana carboxi-terminal de cpIII.

5 Varios documentos han descrito una proteína de fusión en la que se fusionó un polipéptido de interés con una cubierta proteínica de fago de longitud completa (McCatherty *et al.* (1990), *Nature*, 348 (6), 552-554; Huse *et al.* (1989), *Science*, 246, 1275-1281; Ilchev *et al.*, (1990), *Molekuliarnaia Biologiia*, 24 (2), 530-535; WO92/06204; de la Cruz *et al.*, (1988), *J. Biol. Chem.*, 263 (9), 4318-4322; Smith *et al.*, (1985), *Science*, 228, 1315-1317).

10 Además, no se ha descrito ningún sistema de expresión en el que se haya diseñado genéticamente una cubierta proteínica de fago para permitir el ensamblaje de una molécula heterodimérica que sea funcional y capaz de incorporarse dentro de la cubierta de una partícula de fago.

Breve resumen de la invención

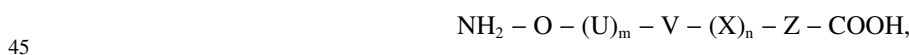
15 La invención proporciona un fago filamentoso que encapsula un genoma codificante de un primer y un segundo polipéptido capaz de formar un receptor heterodimérico de unión a un ligando, en el que dicho primer polipéptido está flanqueado por un dominio de señal de secreción procariota amino-terminal y un dominio de anclaje a la membrana de un fago filamentoso carboxi-terminal, y estando dicho segundo polipéptido fusionado con un dominio de señal de secreción procariota amino-terminal, y en el que dicho primer polipéptido tiene una secuencia de residuos de aminoácido representada por la fórmula mostrada en el sentido del terminal amino al terminal carboxilo:



en la que O representa una secuencia de residuos de aminoácido que define un dominio de señal de secreción procariota amino-terminal; U representa un primer polipéptido espaciador; V representa una secuencia de residuos de aminoácido que define el dominio de unión a un ligando de una cadena de un polipéptido receptor heterodimérico; X representa un segundo espaciador; y Z representa una secuencia de residuos de aminoácido que define un dominio de anclaje a la membrana de una cubierta proteínica de fago filamentoso, con la condición de que m sea el número entero 0 ó 1, tal que cuando m sea 0, U no esté presente, y cuando m sea 1, U esté presente; y n sea 0 ó 1, tal que cuando n sea 0, X no esté presente y cuando n sea 1, X esté presente,

35 y en la que los espaciadores polipeptídicos U y X, cuando están presentes, pueden tener cada uno cualquier secuencia de residuos de aminoácido de una longitud de 1 a 6 residuos de aminoácido.

La invención también proporciona un polipéptido que comprende un polipéptido receptor de unión a un ligando unido operativamente por el terminal amino a un dominio de señal de secreción procariota y unido operativamente por el terminal carboxilo a un dominio de anclaje a la membrana de fago filamentoso, teniendo dicho polipéptido una secuencia de residuos de aminoácido representada por la fórmula, mostrada en el sentido del terminal amino al terminal carboxilo:



en la que O representa una secuencia de residuos de aminoácido que define un dominio de señal de secreción procariota amino-terminal; U representa un primer polipéptido espaciador; V representa una secuencia de residuos de aminoácido que define el dominio de unión a un ligando de una cadena de un polipéptido receptor heterodimérico; X representa un segundo espaciador; y Z representa una secuencia de residuos de aminoácido que define un dominio de anclaje a la membrana de una cubierta proteínica de fago filamentoso, con la condición de que m sea el número entero 0 ó 1, tal que cuando m sea 0, U no esté presente, y cuando m sea 1, U esté presente; y n sea 0 ó 1, tal que cuando n sea 0, X no esté presente y cuando n sea 1, X esté presente,

55 y en la que los espaciadores polipeptídicos U y X, cuando están presentes, pueden tener cada uno cualquier secuencia de residuos de aminoácido de una longitud de 1 a 6 residuos de aminoácido.

La invención también proporciona una genoteca de partículas de fago filamentoso en la que cada partícula de fago es un fago filamentoso según lo definido anteriormente.

60 La invención también proporciona un procedimiento para producir una genoteca de moléculas de ADN, comprendiendo cada molécula de ADN un cistrón para expresar un polipéptido receptor sobre la superficie de una partícula de fago filamentoso, procedimiento que comprende:

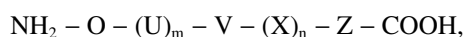
- 65 (a) formar una mezcla de unión combinando en un tampón de unión:
- (i) un repertorio de genes de polipéptido receptor en forma de ADNbc, teniendo cada vector terminales cohesivos adaptados a una unión direccional y

ES 2 315 612 T3

(ii) una pluralidad de vectores de expresión de ADN en forma lineal, teniendo cada vector secuencia arriba y secuencia abajo terminales cohesivos (a) adaptados a recibir direccionalmente dichos genes de polipéptido receptor en un marco de lectura común y (b) unidos operativamente a las respectivas secuencias de ADN traducibles secuencia arriba y secuencia abajo, codificando dicha secuencia de ADN traducible secuencia arriba una señal de secreción procariota, codificando dicha secuencia de ADN traducible secuencia abajo un dominio de anclaje a membrana de fago filamentoso carboxi-terminal, y estando dichas secuencias de ADN traducibles unidas operativamente a las respectivas secuencias de control de la expresión del ADN secuencia arriba y secuencia abajo; y

(b) someter dicha mezcla a condiciones de unión durante un período de tiempo suficiente para unir operativamente dichos genes de polipéptido receptor con dichos vectores, formando así dicha genoteca,

en la que cada molécula de ADN comprende un cistrón para expresar un polipéptido que tiene una secuencia de residuos de aminoácido representada por la fórmula mostrada en el sentido del terminal amino al terminal carboxilo:



en la que O representa una secuencia de residuos de aminoácido que define un dominio de señal de secreción procariota amino-terminal; U representa un primer polipéptido espaciador; V representa una secuencia de residuos de aminoácido que define el dominio de unión a un ligando de una cadena de un polipéptido receptor heterodimérico; X representa un segundo espaciador; y Z representa una secuencia de residuos de aminoácido que define un dominio de anclaje a la membrana de una cubierta proteínica de fago filamentoso, con la condición de que m sea el número entero 0 ó 1, tal que cuando m sea 0, U no esté presente, y cuando m sea 1, U esté presente; y n sea 0 ó 1, tal que cuando n sea 0, X no esté presente y cuando n sea 1, X esté presente,

y en la que los espaciadores polipeptídicos U y X, cuando están presentes, pueden tener cada uno cualquier secuencia de residuos de aminoácido de una longitud de 1 a 6 residuos de aminoácido.

Se ha descubierto una nueva tecnología de integración superficial para la expresión de un producto génico recombinante heterodimérico sobre la superficie de un fago filamentoso que contiene el gen recombinante. La invención usa un dominio de anclaje a la membrana de cubierta proteínica de fago filamentoso como un medio para la unión del producto génico y el gen durante la etapa de ensamblaje de la replicación del fago filamentoso.

Es decir, durante la replicación del fago filamentoso, las cubiertas proteínicas se ensamblan en una matriz que encapsula el genoma del fago. Actualmente, se ha descubierto que (1) el ensamblaje del fago no se ve interrumpido cuando hay presentes cubiertas proteínicas de fago filamentoso recombinantes, (2) las cubiertas proteínicas de fago filamentoso recombinantes se pueden integrar en la matriz de ensamblaje y (3) la integración en la matriz puede ser dirigida para que tenga lugar en un sentido accesible por la superficie.

La presente invención se puede aplicar ventajosamente a la producción de receptores heterodiméricos de una especificidad predeterminada, i.e., se puede usar para producir anticuerpos, receptores de células T y similares que se unan a un ligando preseleccionado.

De este modo, la presente invención proporciona la unión de las funciones de reconocimiento de receptores heterodiméricos y de replicación de fagos filamentosos en un procedimiento para aislar un receptor heterodimérico y el gen que codifica ese receptor. El procedimiento produce un fago filamentoso compuesto de una matriz de proteínas codificadas por el gen VIII que encapsula un genoma recombinante. El genoma recombinante contiene genes codificantes de los polipéptidos receptores heterodiméricos. El receptor heterodimérico es integrado superficialmente en la matriz encapsulante por un dominio de anclaje a la membrana de cubierta proteínica de fago filamentoso que es fusionado mediante un enlace peptídico durante la traducción con uno de los polipéptidos receptores heterodiméricos. Los polipéptidos receptores heterodiméricos y los genes que codifican los polipéptidos son físicamente unidos durante la etapa de ensamblaje del ciclo de replicación del fago. La unión específica del fago revestido de receptor con un soporte sólido proporciona ventajosamente un medio para el aislamiento de un genoma recombinante que codifica un receptor heterodimérico deseado procedente de una genoteca distinta de genomas recombinantes.

En un aspecto, la presente revelación contempla una molécula de anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena ligera y pesada, comprendiendo dicho polipéptido de cadena pesada un dominio V_H flanqueado por un dominio de señal de secreción procariota amino-terminal y un dominio de anclaje a la membrana de fago filamentoso carboxi-terminal, comprendiendo dicho polipéptido de cadena ligera un dominio V_L fusionado con un dominio de señal de secreción procariota amino-terminal.

En otro aspecto, la presente revelación contempla un vector para la expresión de un polipéptido de fusión, comprendiendo dicho vector secuencias de ADN traducibles secuencia arriba y secuencia abajo unidas operativamente por una secuencia de nucleótidos adaptada a la unión direccional de un inserto de ADN, codificando dicha secuencia arriba una señal de secreción procariota, codificando dicha secuencia abajo un anclaje de membrana de fago filamentoso, estando dichas secuencias de ADN traducibles unidas operativamente a un conjunto de señales de expresión de ADN para la expresión de dichas secuencias de ADN traducibles como partes de dicho polipéptido de fusión.

Breve descripción de las figuras

Los aspectos de las figuras que no están específicamente relacionados con la invención reivindicada se incluyen únicamente a modo de ilustración y comparación. En las figuras que forman parte de esta revelación:

5

La figura 1 ilustra un diagrama esquemático de la molécula de inmunoglobulina que presenta las características estructurales principales. El área rodeada con un círculo de la cadena pesada representa la región variable (V_H), un polipéptido que contiene una parte biológicamente activa (de unión a un ligando) de esa región y un gen codificante de ese polipéptido que son producidos mediante los procedimientos de la presente invención.

10

La figura 2A es un esquema de una cadena pesada (H) de la IgG humana (subclase IgG1). La numeración va del terminal N de la izquierda hacia el terminal C de la derecha. Obsérvese la presencia de cuatro dominios, conteniendo cada uno un enlace de tipo disulfuro entre las cadenas (S-S) que abarca aproximadamente 60 residuos de aminoácido. El símbolo CHO representa carbohidrato. La región V de la cadena pesada (H) (V_H) se asemeja a V_L en que tiene tres CDR hipervariables (no mostradas).

15

La figura 2B es un esquema de una cadena ligera humana (Kappa) (Panel 1). La numeración va del terminal N de la izquierda hacia el terminal C de la derecha. Obsérvese el enlace de tipo disulfuro entre cadenas (S-S) que abarca aproximadamente el mismo número de residuos de aminoácido en los dominios V_L y C_L . El panel 2 muestra las ubicaciones de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del dominio V_L . Los segmentos exteriores a la CDR son segmentos marco (FR).

20

La figura 3 ilustra la secuencia del ADN sintético bicatenario insertado en Lambda Zap para producir un vector de expresión Lambda Hc2. La preparación del inserto de ADN sintético bicatenario se describe en el ejemplo 1a(ii). Las diversas características requeridas por este vector para expresar los homólogos de ADN codificante de V_H incluyen el sitio de unión al ribosoma de Shine-Dalgarno, una secuencia líder para dirigir la proteína expresada hacia el periplasma según lo descrito por Mouva *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 255:27, 1980, y diversos sitios de enzimas de restricción usados para unir operativamente los homólogos de V_H con el vector de expresión. La secuencia del vector de expresión de V_H también contiene una secuencia corta de ácidos nucleicos que codifica aminoácidos comúnmente encontrados en la cadena pesada de regiones variables (esqueleto de V_H). La estructura de V_H está justo secuencia arriba y en el marco de lectura apropiado como los homólogos de ADN de V_H que están unidos operativamente en los sitios de clonación de Xho I y Spe I. Las secuencias de las cadenas superior e inferior del inserto de ADN sintético bicatenario figuran respectivamente como SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2. El inserto de ADN sintético es unido direccionalmente en Lambda Zap II digerido con las enzimas de restricción Not I y Xho I para formar el vector de expresión Lambda Hc2.

25

30

35

La figura 4 ilustra las características principales del vector de expresión bacteriano Lambda Hc2 (vector de expresión de V_H). La secuencia de ADN sintética de la figura 3 se muestra en la parte superior junto con el promotor polimerasa de T_3 de Lambda Zap II. Se muestra la orientación del inserto en Lambda Zap II. Los homólogos de ADN de V_H están insertados en los sitios de clonación de Xho I y Spe I. La lectura a través de la transcripción produce el epítipo decapeptídico (tag) que está localizado justo en 3' del sitio de clonación.

40

La figura 5 ilustra la secuencia del ADN sintético bicatenario insertado en Lambda Zap para producir un vector de expresión Lambda Lc2. Las diversas características requeridas por este vector para expresar los homólogos de ADN codificantes de V_L se describen en la figura 3. Los homólogos de ADN codificantes de V_L están unidos operativamente en la secuencia de Lc2 en los sitios de restricción de Sac I y Xho I. Las secuencias de las cadenas superior e inferior del inserto de ADN sintético bicatenario figuran respectivamente como SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 4. El inserto de ADN sintético es unido direccionalmente en Lambda Zap II digerido con las enzimas de restricción Sac I y Not I para formar el vector de expresión Lambda Lc2.

45

La figura 6 ilustra las características principales del vector de expresión bacteriano Lc2 (vector de expresión de V_L). La secuencia de ADN sintética de la figura 5 se muestra en la parte superior junto con el promotor de la polimerasa de T_3 de Lambda Zap II. Se muestra la orientación del inserto en Lambda Zap II. Los homólogos de ADN de V_L están insertados en los sitios de clonación de Sac I y Xho I.

50

La figura 7 ilustra el vector de expresión dicistrónico, pComb, en forma de un vector de expresión de fagémido. Para producir pComb, primero se separaron los fagémidos de los vectores de expresión Lambda Hc2 y Lambda Lc2 usando un protocolo de separación *in vivo* según las instrucciones de los fabricantes (Stratagene, La Jolla, California). El vector de expresión pComb se prepara a partir de Lambda Hc2 y Lambda Lc2 que no contienen homólogos de ADN codificantes de V_H ni codificantes de V_L . El protocolo de separación *in vivo* movió el inserto clonado de los vectores Lambda Hc2 y Lc2 a un vector de fagémido. Los fagémidos resultantes contenían las mismas secuencias de nucleótidos para la clonación y la expresión de los fragmentos de anticuerpo que los vectores precursores. Se digirieron por restricción los vectores de expresión de fagémido Hc2 y Lc2 por separado con Sea I y EcoRI. Se unieron los fagémidos linealizados por los terminales cohesivos de Sea I y EcoR I para formar el vector dicistrónico (combinatorio), pComb.

55

60

65

La figura 8 ilustra un esquema de la composición del vector de fagémido pCBAK8, la ruta para el ensamblaje de Fab y la incorporación a la cubierta de fago. El vector porta el gen marcador de cloranfenicol acetil transferasa (CAT) además de las secuencias de residuos de nucleótido codificantes del polipéptido de fusión Fd-cpVIII y la cadena Kappa.

ES 2 315 612 T3

El origen de replicación del fago f1 facilita la generación de fagémidos monocatenarios. La expresión inducida por el isopropil-tiogalactopiranosido (IPTG) de un mensaje dicistrónico codificante de la fusión de Fd-cpVIII (V_H , C_{H1} , cpVIII) y la cadena ligera (V_L , C_L) conduce a la formación de las cadenas pesada y ligera. Cada cadena es enviada al espacio periplásmico por la secuencia diana *peIB*, que posteriormente es escindida. La cadena pesada se ancla a la membrana mediante la fusión con cpVIII, mientras que la cadena ligera es secretada en el periplasma. La cadena pesada en presencia de la cadena ligera parece formar moléculas Fab. Las Fab se incorporan a las partículas de fago por cpVIII (puntos negros).

La figura 9 ilustra la localización micrográfica electrónica de partículas de oro coloidales de 5-7 nm revestidas de conjugado NPN-BSA a lo largo de la superficie del fago filamentoso y desde fago que surge de una célula bacteriana. El panel 9A muestra un fago filamentoso que surge de la superficie de la célula bacteriana marcada específicamente con las partículas de oro coloidales revestidas de antígeno de BSA-NPN. El panel 9B muestra una parte de un fago filamentoso maduro a lo largo del cual se presenta el marcaje de los sitios de unión antigénica.

La figura 10 ilustra los resultados de un análisis ELISA en dos puntos para analizar la presencia y la función del anticuerpo Fab unido a la superficie de partículas de bacteriófago según lo descrito en el ejemplo 4b. Para la expresión del anticuerpo Fab sobre las superficies del fago, se transformaron células XL1-Blue con el vector de expresión de fagémido, pCBAK8-2b. Se añadió el inductor, isopropil-tiogalactopiranosido (IPTG), a la suspensión bacteriana a una concentración final de 1 mM durante una hora. Entonces se añadió el fago auxiliar a la suspensión bacteriana para inicial la generación de copias de la cadena sentido del ADN de fagémido. Tras un período de mantenimiento de dos horas, se recogieron los sobrenadantes bacterianos que contenían partículas de bacteriófago para analizarlos mediante un ELISA.

Se observó una unión valorable específica de las partículas de bacteriófago que expresaban NPN-Fab a placas revestidas de NPN. No se detectó unión sólo con el fago auxiliar.

La figura 11 ilustra la inhibición de la unión del bacteriófago de expresión de NPN-Fab a placas revestidas con antígeno de NPN con la adición de cantidades crecientes de hapteno libre. Los análisis se realizaron según lo descrito en la figura 10. Se observó la completa inhibición de la unión con 5 ng de hapteno NPN libre.

La figura 12 ilustra esquemáticamente el procedimiento de mutagénesis de la región CDR3 de un fragmento de cadena pesada resultante en una alteración de la especificidad de unión. Los cebadores de oligonucleótido se indican con barras negras. El procedimiento se describe en el ejemplo 6.

La figura 13 ilustra las secuencias de aminoácidos y la correspondiente SEC ID N° de la cadena pesada de la región CDR3 de los clones iniciales y seleccionados, y las afinidades de los clones por fluoresceína libre y FI-BSA. El asterisco indica la Kd aproximada determinada mediante un ELISA de competición.

La figura 14 ilustra las secuencias de aminoácidos y la correspondiente SEC ID N° de la cadena ligera de la región CDR3 de los clones iniciales y seleccionados, y las afinidades de los clones por fluoresceína libre y FI-BSA. El asterisco indica la Kd aproximada determinada mediante un ELISA de competición.

Descripción detallada de la invención

A. Definiciones

Residuo de aminoácido: Aminoácido formado tras la digestión química (hidrólisis) de un polipéptido en sus enlaces peptídicos. Los residuos de aminoácido descritos en la presente memoria están preferiblemente en la forma isomérica "L". Sin embargo, es posible sustituir los residuos en forma isomérica "D" por cualquier residuo de aminoácido en forma "L", siempre y cuando el polipéptido conserve la propiedad funcional deseada. NH_2 se refiere al grupo amino libre presente en el terminal amino de un polipéptido. $COOH$ se refiere al grupo carboxilo libre presente en el terminal carboxilo de un polipéptido. En la siguiente tabla de correspondencia, y conforme a la nomenclatura estándar de polipéptidos (descrita en *J. Biol. Chem.*, 243:3552-59 (1969) y adoptada en 37 C.F.R. 1.822(b)(2)), se muestran las abreviaturas de los residuos de aminoácido:

ES 2 315 612 T3

TABLA DE CORRESPONDENCIA

	SÍMBOLO		AMINOÁCIDO
	1 letra	3 letras	
5	Y	Tyr	tirosina
	G	Gly	glicina
10	F	Phe	fenilalanina
	M	Met	metionina
15	A	Ala	alanina
	S	Ser	serina
	I	Ile	isoleucina
20	L	Leu	leucina
	T	Thr	treonina
	V	Val	valina
25	P	Pro	prolina
	K	Lys	lisina
	H	His	histidina
30	Q	Gln	glutamina
	E	Glu	ácido glutámico
35	Z	Glx	Glu y/o Gln
	W	Trp	triptófano
	R	Arg	arginina
40	D	Asp	ácido aspártico
	N	Asn	asparagina
	B	Asx	Asn y/o Asp
45	C	Cys	cisteína
	J	Xaa	Desconocido u otro

50 Debería observarse que todas las secuencias de residuos de aminoácido representadas en la presente memoria por fórmulas tienen una orientación de izquierda a derecha en el sentido convencional del terminal amino al terminal carboxilo. Además, el término “residuo de aminoácido” se define en general para incluir los aminoácidos que figuran en la tabla de correspondencia y los aminoácidos modificados y habituales, tales como aquéllos que figuran en 37 CFR 1.822(b) (4). Además, debería observarse que un guión al principio o al final de una secuencia de residuos de aminoácido indica un enlace peptídico a otra secuencia de uno o más residuos de aminoácido o un enlace covalente a un grupo amino-terminal tal como NH₂ o acetilo, o a un grupo terminal carboxilo tal como COOH.

60 *Nucleótido*: Unidad monomérica de ADN o ARN constituida por un resto de azúcar (pentosa), un fosfato y una base heterocíclica de nitrógeno. La base está unida al resto de azúcar mediante el carbono glicosídico (carbono 1' de la pentosa) y esa combinación de base y azúcar es un nucleósido. Cuando el nucleósido contiene un grupo fosfato unido a la posición 3' ó 5' de la pentosa, se denomina nucleótido. Una secuencia de nucleótidos unidos operativamente se denomina comúnmente en la presente memoria “secuencia de bases” o “secuencia de nucleótidos” y sus equivalentes gramaticales, y se representa en la presente memoria con una fórmula cuya orientación de izquierda a derecha está en el sentido convencional del terminal 5' al terminal 3'.

65 *Par de bases (pb)*: Pareja de adenina (A) con timina (T) o de citosina (C) con guanina (G) de una molécula de ADN bicatenario. En el ARN, el uracilo (U) está sustituido por timina.

ES 2 315 612 T3

Ácido nucleico: Polímero de nucleótidos bien monocatenario o bicatenario.

5 *Polinucleótido:* Polímero de nucleótidos monocatenario o bicatenario. Como se usa en la presente memoria, “polinucleótido” y sus equivalentes gramaticales incluirán el abanico completo de ácidos nucleicos. Un polinucleótido se referirá comúnmente a una molécula de ácido nucleico compuesta por una cadena lineal de dos o más desoxirribonucleótidos y/o ribonucleótidos. El tamaño exacto dependerá de muchos factores, que a su vez dependen de las condiciones finales de uso, como es sabido en la técnica. Los polinucleótidos de la presente invención incluyen cebadores, sondas, segmentos de ARN/ADN, oligonucleótidos o “oligos” (polinucleótidos relativamente cortos), genes, vectores, plásmidos y similares.

10 *Gen:* Ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos codifica un ARN o un polipéptido. Un gen puede ser bien ARN o ADN.

15 *ADN dúplex:* Molécula de ácido nucleico bicatenario que comprende dos cadenas de polinucleótidos sustancialmente complementarios que se mantienen juntos mediante uno o más enlaces de hidrógeno entre cada base complementaria presente en un par de bases del dúplex. Como los nucleótidos que forman un par de bases pueden ser bien una base de ribonucleótido o una base de desoxirribonucleótido, el término “ADN dúplex” se refiere bien a un dúplex de ADN-ADN que comprende dos cadenas de ADN (ADNbc) o un dúplex de ARN-ADN que comprende una cadena de ADN y una cadena de ARN.

20 *Bases complementarias:* Nucleótidos que normalmente se emparejan cuando el ADN o el ARN adopta una configuración bicatenaria.

25 *Secuencia de nucleótidos complementaria:* Una secuencia de nucleótidos de una molécula monocatenaria de ADN o ARN que es suficientemente complementaria a la de otra cadena para hibridarse específicamente a ella con el consecuente enlace de hidrógeno.

30 *Conservado/a:* Una secuencia de nucleótidos está conservada con respecto a una secuencia preseleccionada (de referencia) si se hibrida no aleatoriamente con un complemento exacto de la secuencia preseleccionada.

35 *Hibridación:* Apareamiento de secuencias de nucleótidos sustancialmente complementarias (cadenas de ácido nucleico) para formar un dúplex o un heterodúplex mediante el establecimiento de enlaces de hidrógeno entre los pares de bases complementarios. Es una interacción específica, i.e., no aleatoria, entre dos polinucleótidos complementarios que puede ser inhibida competitivamente.

Análogo de nucleótido: Nucleótido de purina o pirimidina que difiere estructuralmente de A, T, G, C o U, pero que es suficientemente similar al sustituto del nucleótido normal de una molécula de ácido nucleico.

40 *Homólogo de ADN:* Es un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos conservada preseleccionada y una secuencia codificante de un receptor capaz de unirse a un ligando preseleccionado.

45 *Molécula de ADN recombinante (ADNr):* Molécula de ADN producida mediante la unión operativa de dos segmentos de ADN. De este modo, una molécula de ADN recombinante es una molécula de ADN híbrido que comprende al menos dos secuencias de nucleótidos que no se encuentran normalmente juntas en la naturaleza. Los ADNr que no tienen un origen biológico común, i.e., que son evolutivamente distintos, son denominados “heterólogos”.

50 *Vector:* Molécula de ADNr capaz de replicarse de manera autónoma en una célula y a la que se puede unir operativamente un segmento de ADN, p.ej., un gen o un polinucleótido, para llevar a cabo la replicación del segmento unido. Los vectores capaces de dirigir la expresión de genes codificantes de uno o más polipéptidos son denominados en la presente memoria “vectores de expresión”. Los vectores particularmente importantes permiten la clonación de ADNc (ADN complementario) a partir de ARNm producidos usando transcriptasa inversa.

55 *Receptor:* Un receptor es una molécula, tal como una proteína, glicoproteína y similares, que se puede unir específicamente (no aleatoriamente) a otra molécula.

60 *Anticuerpo:* El término anticuerpo en sus diversas formas gramaticales se usa en la presente memoria para referirse a moléculas de inmunoglobulina y a partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, i.e., moléculas que contienen un sitio de combinación del anticuerpo o paratope. Las moléculas de anticuerpo ejemplares son moléculas de inmunoglobulina intactas, moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intactas y partes de una molécula de inmunoglobulina, incluyendo aquellas partes conocidas en la técnica como Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v).

65 *Sitio de combinación del anticuerpo:* Un sitio de combinación del anticuerpo es esa parte estructural de una molécula de anticuerpo compuesta por una región variable y una región hipervariable de cadena pesada y ligera que se une específicamente (inmunorreacciona) con un antígeno. El término inmunorreaccionar en sus diversas formas significa unión específica entre una molécula que contiene un determinante antigénico y una molécula que contiene un sitio de combinación del anticuerpo tal como una molécula de anticuerpo entera o una parte de la misma.

ES 2 315 612 T3

Anticuerpo monoclonal: El término “anticuerpo monoclonal” en sus diversas formas gramaticales se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contiene sólo una especie de sitio de combinación del anticuerpo capaz de inmunorreaccionar con un determinado antígeno. Un anticuerpo monoclonal presenta, por tanto, comúnmente una única afinidad de unión por cualquier antígeno con el que inmunorreacciona. Un anticuerpo monoclonal puede contener, por tanto, una molécula de anticuerpo que tenga una pluralidad de sitios de combinación del anticuerpo, cada uno inmunoespecífico de un antígeno diferente, p. ej., un anticuerpo monoclonal biespecífico.

Polipéptido de fusión: un polipéptido compuesto por al menos dos polipéptidos y una secuencia de unión para unir operativamente los dos polipéptidos en un polipéptido continuo. Los dos polipéptidos unidos en un polipéptido de fusión son comúnmente derivados de dos fuentes independientes y, por tanto, un polipéptido de fusión comprende dos polipéptidos unidos que no se encuentran normalmente en la naturaleza.

Secuencia arriba: En el sentido opuesto al sentido de la transcripción del ADN y, por tanto, que va de 5' a 3' en la cadena no codificante o de 3' a 5' en el ARNm.

Secuencia abajo: Más adelante, una secuencia de ADN en el sentido de la transcripción o la lectura de la secuencia, que se mueve en un sentido de 3' a 5' a lo largo de la cadena no codificante del ADN o en sentido de 5' a 3' a lo largo del transcrito de ARN.

Cistrón: Secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN codificante de una secuencia de residuos de aminoácido, e incluyendo elementos de control de la expresión del ADN secuencia arriba y secuencia abajo.

Codón de terminación: Cualquiera de los tres codones que no codifican un aminoácido, sino que causan la terminación de la síntesis de proteínas. Son UAG, UAA y UGA, y también se denominan codón sin sentido o de terminación.

Polipéptido líder: Una longitud corta de secuencia de aminoácidos en el extremo amino de un polipéptido que porta el o dirige al polipéptido a través de la membrana interior, garantizando así finalmente su secreción en el espacio periplásmico y quizás más allá del mismo. El péptido de secuencia líder es comúnmente retirado antes de que el polipéptido se active.

Marco de lectura: Secuencia concreta de tripletes de nucleótidos contiguos (codones) empleada en la traducción. El marco de lectura depende de la ubicación del codón de iniciación de la traducción.

B. Fago filamentoso

La presente revelación contempla un fago filamentoso que comprende una matriz de proteínas que encapsula un genoma codificante de un primer y un segundo polipéptido capaces de formar un receptor heterodimérico. El fago contiene además un receptor heterodimérico compuesto por el primer y el segundo polipéptido integrados superficialmente en la matriz por un dominio de anclaje a la membrana de fago filamentoso fusionado con al menos uno entre el primer o el segundo polipéptido. El receptor heterodimérico tiene la capacidad de unirse a un ligando y, por tanto, se denomina receptor heterodimérico de unión a un ligando.

El receptor heterodimérico, en un aspecto preferido, es un complejo de unión de un epítipo. Es decir, un complejo del primer y el segundo polipéptido capaz de unir un epítipo. Preferiblemente, el primer y el segundo polipéptido son polipéptidos de cadena pesada y de cadena ligera de anticuerpos.

El primer y el segundo polipéptido son capaces de ensamblarse de manera autógena en un complejo de unión de un epítipo funcional (receptor heterodimérico) que luego es expresado sobre la superficie exterior del fago de una manera accesible para el ligando, i.e., están integrados superficialmente en el fago. De este modo, el complejo de unión de un epítipo se presenta comúnmente sobre la superficie de un fago de esta invención. Comúnmente, el complejo de unión de un epítipo está compuesto por un polipéptido de unión que contiene un dominio de anclaje a la membrana de fago filamentoso, tal como un polipéptido descrito en el apartado C y uno o varios polipéptidos no ligador(es). Se prefieren los fagos que tienen un dominio de anclaje a la membrana de cpIII o cpVIII fusionado con un polipéptido del complejo heterodimérico según lo descrito más detalladamente en la presente memoria.

Como el receptor se une al fago de un modo accesible superficialmente, el fago puede ser usado ventajosamente como sorbente de afinidad en fase sólida. En algunos aspectos, el fago está unido, preferiblemente unido con posibilidad de retirarse, a una matriz sólida (insoluble acuosa) tal como agarosa, celulosa, resinas sintéticas, polisacáridos y similares. Por ejemplo, los transformantes que se liberan del fago se pueden aplicar en y retenerse en una columna, y mantenerse en condiciones que apoyen la liberación del fago. Entonces se pasa a través de la columna una composición acuosa que contiene un ligando que se une al receptor expresado por el fago a una velocidad predeterminada y en condiciones de unión al receptor para formar un complejo de receptor-ligando en fase sólida. Luego se lava la columna para retirar el material no unido, dejando el ligando unido al fago en fase sólida. Entonces se puede retirar y recuperar el ligando lavando la columna con un tampón que promueva la disociación del complejo de receptor-ligando.

Alternativamente, se puede mezclar fago purificado con una solución acuosa que contenga el ligando para ser purificado por afinidad. Se mantiene la mezcla de reacción de unión de receptor/ligando así formada durante un período de tiempo y en condiciones de unión suficientes para formar un complejo de receptor-ligando unido al fago.

ES 2 315 612 T3

El ligando unido al fago (fago que porta el ligando) es entonces separado y recuperado de entre los materiales no unidos, tal como mediante centrifugación, electroforesis, precipitación y similares.

Es posible marcar el fago de esta invención cuando se use en un procedimiento de diagnóstico de esta invención. Los marcadores preferidos incluyen ácidos nucleicos marcados radiactivamente incorporados en el genoma del fago, o aminoácidos marcados radiactivamente incorporados en componentes proteínicos de la partícula de fago. La preparación del fago marcado se puede realizar de la manera habitual cultivando fago según lo descrito en la presente memoria, pero incluyendo nucleótidos radiomarcados o aminoácidos radiomarcados en el medio de cultivo para su incorporación en los ácidos nucleicos o los polipéptidos del fago, respectivamente. Los ejemplos de marcadores son ³H-timidina o ³⁵S-metionina. Hay otros marcadores isotópicos y otros precursores de nucleótidos o aminoácidos fácilmente disponibles para cualquier experto en la técnica. El fago marcado contiene preferiblemente suficiente marcador para que sea detectable en un ensayo de unión a un ligando de esta invención, i.e., el fago está marcado detectablemente.

C. Vectores de expresión de ADN

Un vector de la presente revelación es una molécula de ADN recombinante (ADNr) adaptada para recibir y expresar secuencias de ADN traducibles en forma de un polipéptido de fusión que contiene un dominio de anclaje a la membrana de fago filamentoso y un dominio de señal de secreción procariota. El vector comprende un casete que incluye secuencias de ADN traducibles secuencia arriba y secuencia abajo unidas operativamente mediante una secuencia de nucleótidos adaptada para su unión direccional a un inserto de ADN. La secuencia traducible secuencia arriba codifica la señal de secreción según lo definido en la presente memoria. La secuencia traducible secuencia abajo codifica el anclaje a la membrana de fago filamentoso según lo definido en la presente memoria. El casete incluye preferiblemente secuencias de control de la expresión del ADN para la expresión del polipéptido de fusión que es producido cuando se inserta direccionalmente una secuencia de inserto de ADN traducible (inserto de ADN) en el casete por la secuencia de nucleótidos adaptada a la unión direccional. El anclaje a la membrana de fago filamentoso es preferiblemente un dominio de la cubierta proteínica cpIII o cpVIII capaz de unirse a la matriz de una partícula de fago filamentoso, incorporando así el polipéptido de fusión a la superficie del fago.

Un vector de expresión se caracteriza por ser capaz de expresar, en un huésped compatible, un producto génico estructural tal como un polipéptido de fusión de la presente invención.

Como se usa en la presente memoria, el término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar entre diferentes entornos genéticos otro ácido nucleico al que ha sido unida operativamente. Los vectores preferidos son aquellos capaces de realizar una replicación autónoma y una expresión de los productos génicos estructurales en los segmentos de ADN a los que están unidos operativamente.

Como se usa en la presente memoria, con respecto a las secuencias o los segmentos de ADN, el término “unido/a operativamente” significa que las secuencias o los segmentos han sido unidos mediante enlace covalente, preferiblemente, mediante enlaces tipo fosfodiéster convencionales, en una cadena de ADN, bien en forma mono- o bicatenaria.

La elección del vector al que un casete de esta revelación está operativamente unido depende directamente, como se sabe en la técnica, de las propiedades funcionales deseadas, p. ej., de la replicación del vector y la expresión proteínica, y de la célula huésped por ser transformada, siendo éstas limitaciones inherentes a la técnica de construcción de moléculas de ADN recombinante.

En un aspecto, el vector utilizado incluye un replicón procariota, i.e., una secuencia de ADN que tiene la capacidad de dirigir la replicación autónoma y el mantenimiento de la molécula de ADN recombinante extra-cromosómicamente en una célula huésped procariota, tal como una célula huésped bacteriana, transformada con la misma. Tales replicones son conocidos en la técnica. Además, los aspectos que incluyen un replicón procariota también incluyen un gen cuya expresión confiere una ventaja de selección, tal como resistencia a fármacos, a un huésped bacteriano transformado con el mismo. Los genes de resistencia a fármacos bacterianos son aquellos que confieren resistencia a la ampicilina o a la tetraciclina. Los vectores comúnmente también contienen sitios de restricción convenientes para la inserción de secuencias de ADN traducibles. Los vectores ejemplares son los pasmidos pUC8, pUC9, pBR322 y pBR329 disponibles en BioRad Laboratories, (Richmond, CA), y pPL y pKK223 disponibles en Pharmacia, (Piscataway, NJ).

Una secuencia de nucleótidos adaptada a la unión direccional, i.e., un poliligador, es una región del vector de expresión de ADN que (1) se une operativamente para la replicación y el transporte a las secuencias de ADN traducibles secuencia arriba y secuencia abajo, y (2) proporciona un sitio o un medio para la unión direccional de una secuencia de ADN en el vector. Comúnmente, un poliligador direccional es una secuencia de nucleótidos que define dos o más secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción o sitios de restricción. Tras la escisión por restricción, los dos sitios producen terminales cohesivos por donde se puede unir una secuencia de ADN traducible al vector de expresión de ADN. Preferiblemente, los dos sitios de restricción proporcionan, tras la escisión por restricción, terminales cohesivos que no son complementarios, permitiendo así la inserción direccional de una secuencia de ADN traducible en el casete. En un aspecto, la unión direccional se refiere a la proporcionada mediante los nucleótidos presentes en la secuencia de ADN traducible secuencia arriba, la secuencia de ADN traducible secuencia abajo o ambas. En otro aspecto, la secuencia de nucleótidos adaptada a la unión direccional comprende una secuencia de nucleótidos que define múltiples medios de clonación direccional. Cuando la secuencia de nucleótidos adaptada a la unión direccional define numerosos sitios de restricción, se denomina sitio de clonación múltiple.

ES 2 315 612 T3

Una secuencia de ADN traducible es una serie lineal de nucleótidos que proporcionan una serie ininterrumpida de al menos 8 codones que codifican un polipéptido en un marco de lectura.

5 Una secuencia de ADN traducible secuencia arriba codifica una señal de secreción procariota. La señal de secreción es un dominio de péptido líder de la proteína que dirige a la proteína hacia la membrana periplásmica de las bacterias gram-negativas.

10 Una señal de secreción preferida es una señal de secreción peIB. En la tabla 1, se muestran las secuencias de residuos de aminoácidos predichas del dominio de señal de secreción procedente de dos variantes del producto génico peIB de *Erwinia carotova* según lo descrito por Lei, *et al.*, *Nature*. 331:543-546 (1988). En la tabla 1, también se muestra una señal de secreción peIB particularmente preferida.

15 La secuencia líder de la proteína peIB se ha usado previamente como una señal de secreción para proteínas de fusión. Better *et al.*, *Science*, 240:1041-1043 (1988); Sastry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86:5728-5732 (1989); y Mullinax *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 87:8095-8099 (1990).

20 También figuran en la tabla 1 las secuencias de residuos de aminoácido para otros dominios de polipéptido de señal de secreción procedentes de *E. coli* útiles en esta invención. Oliver, en Neidhard, F.C. (ed.), "*Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*". Sociedad Americana de Microbiología, Washington, D.C., 1:56-69 (1987).

Una secuencia de ADN preferida para su inclusión en un vector de expresión de ADN de esta invención es una secuencia de ADN traducible codificante de la señal de secreción peIB que tiene la secuencia de residuos de aminoácido mostrada en SEC ID N°: 5.

25 Una secuencia de ADN traducible secuencia abajo codifica un anclaje a la membrana de fago filamentoso. Los anclajes a la membrana preferidos se obtienen de los fagos filamentosos M13, f1, fd y fagos filamentoso equivalentes similar. De este modo, una secuencia de ADN traducible secuencia abajo codifica una secuencia de residuos de aminoácido que se corresponde con el, y preferiblemente es idéntica al, dominio de anclaje a la membrana del polipéptido de la cubierta de bien el gen III o el gen VIII de fago filamentoso.

30 El dominio de anclaje a la membrana de una cubierta proteínica de fago filamentoso es una parte de la región carboxi-terminal de la cubierta proteínica e incluye una región de residuos de aminoácido hidrófobos para abarcar una membrana de dos capas lipídicas y una región de aminoácido cargado.

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

ES 2 315 612 T3

TABLA 1
Secuencias líder

SEC ID N°:	Tipo	Secuencia de residuos de aminoácido
(5)	pelB ¹	MetLysTyrLeuLeuProThrAlaAlaAlaGlyLeuLeu LeuLeuAlaAlaGlnProAlaMet
(6)	pelB ²	MetLysTyrLeuLeuProThrAlaAlaAlaGlyLeuLeu LeuLeuAlaAlaGlnProAlaGlnProAlaMetAla
(7)	pelB ³	MetLysSerLeulleThrProlleAlaAlaGlyLeuLeu LeuAlaPheSerGlnTyrSerLeuAla
(8)	MalE ⁴	MetLysIleLysThrGlyAlaArglleLeuAlaLeuSer AlaLeuThrThrMetMetPheSerAlaSerAlaLeuAla Lyslle
(9)	OmpF ⁴	MetMetLysArgAsnilleLeuAlaVallleValProAla LeuLeuValAlaGlyThrAlaAsnAlaAlaGlu
(10)	PhoA ⁴	MetLysGlnSerThrilleAlaLeuAlaLeuLeuProLeu LeuPheThrProValThrLysAlaArgThr
(11)	Bla ⁴	MetSerlleGlnHisPheArgValAlaLeulleProPhe PheAlaAlaPheCysLeuProValPheAlaHisPro
(12)	LamB ⁴	MetMetlleThrLeuArgLysLeuProLeuAlaValAla ValAlaAlaGlyValMetSerAlaGlnAlaMetAlaVal Asp
(13)	Lpp ⁴	MetLysAlaThrLysLeuValLeuGlyAlaVallleLeu GlySerThrLeuLeuAlaGlyCysSer
(14)	cpVIII ⁵	MetLysLysSerLeuValLeuLysAlaSerValAlaVal AlaThrLeuValProMetLeuSerPheAla
(15)	cpIII ⁶	MetLysLysLeuLeuPheAlalleProLeuValValPro PheTyrSerHisSer
		¹ pelB usada en esta invención
		² pelB de gen de <i>Erwinia carotovora</i>
		³ pelB del gen EC 16 de <i>Erwinia carotovora</i>
		⁴ secuencias líder de <i>E. coli</i>
		⁵ secuencia líder para cpVIII
		⁶ secuencia líder para cpIII

residuos encontrados normalmente en el lado citoplasmático de la membrana y que se extienden fuera de la membrana.

ES 2 315 612 T3

En el fago f1 la región que abarca la membrana de la cubierta proteínica del gen VIII comprende el tramo del residuo Trp-16 a Lys-40, y la región citoplasmática comprende 11 residuos carboxi-terminales del 41 al 52. Ohkawa *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 256:9951-9958 (1981). Un ejemplo de anclaje de membrana consistiría en los residuos 26 a 40 de cpVIII.

5 De este modo, la secuencia de residuos de aminoácido de un dominio de anclaje a la membrana preferido deriva de la cubierta proteínica del gen III del fago filamentosos M13 (también denominada cpIII). Un anclaje a la membrana derivado de cpIII preferido tiene una secuencia mostrada en SEC ID N°: 16 del residuo 1 al residuo 211. La cubierta proteínica del gen III está presente en un fago filamentosos maduro en un extremo de la partícula de fago con comúnmente aproximadamente de 4 a 6 copias de la cubierta proteínica.

10 La secuencia de residuos de aminoácido de otro dominio de anclaje a la membrana preferido deriva de la cubierta proteínica del gen VIII del fago filamentosos M13 (también denominada cpVIII). Un anclaje a la membrana derivado de cpVIII preferido tiene una secuencia mostrada en SEC ID N°: 17 del residuo 1 al residuo 50. La cubierta proteínica del gen VIII está presente en un fago filamentosos maduro sobre la mayoría de la partícula de fago con comúnmente de aproximadamente 2.500 a 3.000 copias de cubierta proteínica.

15 Para acceder a descripciones detalladas de la estructura de las partículas de fago filamentosos, sus cubiertas proteínicas y el ensamblaje de partículas, véanse los resúmenes realizados por Rached *et al.*, *Microbiol. Rev.*, 50:401-427 (1986); y Model *et al.*, en "The Bacteriophages: Vol. 2", R. Calendar, ed. Plenum Publishing Co., pp. 375-456, (1988).

20 Un casete de un vector de expresión de ADN de esta revelación es la región del vector que forma, tras la inserción de una secuencia de ADN traducible (inserto de ADN), una secuencia de nucleótidos capaz de expresar, en un huésped adecuado, un polipéptido de fusión según lo revelado en la presente memoria. La secuencia de nucleótidos competente en la expresión se denomina cistrón. De este modo, el casete comprende elementos de control de la expresión del ADN unidos operativamente a las secuencias de ADN traducibles secuencia arriba y secuencia abajo. Un cistrón se forma cuando una secuencia de ADN traducible es insertada direccionalmente (unida direccionalmente) entre la secuencia arriba y la secuencia abajo por la secuencia de nucleótidos adaptada a tal efecto. Las tres secuencias de ADN traducibles resultantes, concretamente, la secuencia arriba, la secuencia insertada y la secuencia abajo, están unidas operativamente en el mismo marco de lectura.

25 Las secuencias de control de la expresión del ADN comprenden un conjunto de señales de expresión de ADN para expresar un producto génico estructural e incluyen elementos tanto 5' como 3', como se sabe, unidos operativamente al cistrón tal que el cistrón es capaz de expresar un producto génico estructural. Las secuencias control de 5' definen un promotor para iniciar la transcripción y un sitio de unión al ribosoma unido operativamente en el terminal 5' de la secuencia de ADN traducible secuencia arriba.

30 Para conseguir niveles altos de expresión génica en *E. coli*, es necesario usar no sólo promotores fuertes que generan grandes cantidades de ARNm, sino además sitios de unión al ribosoma que garanticen que el ARNm es traducido eficazmente. En *E. coli*, el sitio de unión al ribosoma incluye un codón de iniciación (AUG) y una secuencia de 3-9 nucleótidos de longitud localizada 3-11 nucleótidos secuencia arriba del codón de iniciación [Shine *et al.*, *Nature*, 254:34 (1975)]. La secuencia, AGGAGGU, que es denominada secuencia de Shine-Dalgarno (SD) es complementaria al extremo 3' del ARNm 16S de *E. coli*. La unión del ribosoma al ARNm y a la secuencia por el extremo 3' del ARNm se puede ver afectada por diversos factores:

- 45
- (i) el grado de complementariedad entre la secuencia SD y el extremo 3' del ARNt 16S.
 - (ii) El espaciado y, posiblemente, la secuencia de ADN que se extiende entre la secuencia de SD y AUG [Roberts *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 76:760 (1979a); Roberts *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 76:5596 (1979b); Guarente *et al.*, *Science*, 209:1428 (1980); y Guarente *et al.*, *Cell*, 20:543 (1980)]. Se consigue una optimización midiendo el nivel de expresión de los genes en plásmidos en los que este espaciado es alterado sistemáticamente. La comparación de diferentes ARNm muestra que hay secuencias estadísticamente preferidas desde la posición -20 a +13 (en la que A del AUG es la posición 0) [Gold *et al.*, *Annu. Rev. Microbiol.*, 35:365 (1981)]. Se ha observado que las secuencias líder influyen de manera espectacular en la traducción (Roberts *et al.*, 1979 a, b *supra*).
 - (iii) La secuencia de nucleótidos que sigue al AUG, que afecta a la unión al ribosoma [Taniguchi *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 118:533 (1978)].

60 En la tabla 2 que se presenta a continuación, se muestran sitios de unión al ribosoma útiles.

65

ES 2 315 612 T3

TABLA 2

Sitios de unión al ribosoma*

SEC ID Nº:		
1.	(18)	5'AAUCU <u>UGGAGG</u> CUUUUUUAUGGUUCGUUCU
2.	(19)	5'UAACUAAGGAUGAAAUGCAUGUCUAAGACA
3.	(20)	5'UCCUAGGAGGUUUGACCUAUGCGAGCUUUU
4.	(21)	5'AUGUACUAAGGAGGUUGUAUGGAACAACGC

*Las secuencias de las regiones de iniciación para la síntesis de proteínas en cuatro moléculas de ARNm de fago están subrayadas.
 AUG = codón de iniciación (doblemente subrayado)

1. = proteína A de los genes del fago Φ X174
2. = replicasa del fago Q β
3. = proteína A de los genes del fago R17
4. = proteína cro de los genes del fago lambda

Las secuencias control de 3' definen al menos un codón de terminación (terminación) en marco con y unido operativamente a la secuencia de ADN traducible secuencia abajo.

De este modo, un vector de expresión de ADN como el revelado en la presente memoria proporciona un sistema para la clonación de secuencias de ADN traducibles en la parte del casete del vector para producir un cistrón capaz de expresar un polipéptido de fusión según lo revelado en la presente memoria.

En algunos aspectos, un vector de expresión de ADN proporciona un sistema para clonar independientemente (insertar) dos secuencias de ADN traducibles en dos casetes separados presentes en el vector, para formar dos cistrones separados para la expresión de ambos polipéptidos del receptor heterodimérico o de las partes de unión al ligando de los polipéptidos que comprenden un receptor heterodimérico. El vector de expresión de ADN para expresar dos cistrones se denomina vector de expresión dicistrónico.

De este modo, un vector de expresión de ADN preferido de esta revelación comprende, además del casete anteriormente descrito en detalle, un segundo casete para la expresión de un segundo polipéptido de fusión. El segundo casete incluye una segunda secuencia de ADN traducible que codifica una señal de secreción, según lo definido en la presente memoria anteriormente, unida operativamente a su terminal 3' por una secuencia de nucleótidos adaptada a una unión direccional con una secuencia de ADN secuencia abajo del vector que define comúnmente al menos un codón de terminación en el marco de lectura del casete. La segunda secuencia de ADN traducible está unida operativamente en su terminal 5' con las secuencias de control de la expresión del ADN que forman los elementos de 5' definidos anteriormente. El segundo casete es capaz, tras la inserción de una secuencia de ADN traducible (inserto de ADN) de expresar el segundo polipéptido de fusión que comprende una fusión de la señal de secreción con un polipéptido codificado por el inserto de ADN.

En un aspecto, se diseña un vector de expresión de ADN para su conveniente manipulación en forma de una partícula de fago filamentoso que encapsula un genoma según las enseñanzas de la presente invención. En este aspecto, un vector de expresión de ADN contiene además una secuencia de nucleótidos que define un origen de replicación del fago filamentoso tal que el vector, tras la presentación de la complementación genética apropiada, pueda replicarse como un fago filamentoso de una forma replicativa monocatenaria y sea empaquetado en partículas de fago filamentoso. Esta característica proporciona la capacidad del vector de expresión de ADN de ser empaquetado en partículas de fago para la posterior segregación de la partícula y el vector contenido en la misma fuera de otras partículas que comprenden una población de partículas de fago.

Un origen de replicación de fago filamentoso es una región del genoma del fago, como se sabe, que define sitios de iniciación de la replicación, de terminación de la replicación y de empaquetado de la forma replicativa producida mediante la replicación. Véase, por ejemplo, Rasched *et al.*, *Microbiol. Rev.*, 50:401-427 (1986); y Horiuchi, *J. Mol. Biol.*, 188:215-223 (1986).

ES 2 315 612 T3

Un origen de replicación de fago filamentoso preferido para su uso en la presente invención es el origen de replicación del fago M13, f1 o fd. Se prefiere particularmente un origen de replicación de fago filamentoso que tenga una secuencia mostrada en SEC ID N°: 117 y descrita por Short *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 16:7583-7600 (1988). Los vectores de expresión de ADN preferidos son los vectores de expresión dicistrónicos pCOMB8, pCKAB8, pCOMB2-8, pCOMB3, pCKAB3, pCOMB2-3 y pCOMB2-3' descritos en el ejemplo 1.

En la medida en que un vector de esta revelación puede ser manipulado para que contenga un inserto de ADN, teniendo así la capacidad de expresar un polipéptido de fusión, un aspecto contempla los vectores anteriormente descritos que contienen un inserto de ADN. Los vectores particularmente preferidos que contienen genes de anticuerpo se describen en los ejemplos.

D. Polipéptidos

En otra realización, la presente revelación contempla un polipéptido que comprende un dominio de inserto flanqueado por un dominio de señal de secreción amino-terminal y un dominio de anclaje a la membrana de la cubierta proteínica de fago filamentoso carboxi-terminal.

El polipéptido es un polipéptido de fusión que tiene un dominio receptor compuesto por una secuencia de residuos de aminoácido que define el dominio de unión a un ligando (epítipo) de una proteína receptora localizada entre un dominio de señal de secreción procarionota y un dominio de anclaje a la membrana de fago filamentoso. Es decir, el dominio del inserto del polipéptido de fusión es el dominio de unión a un ligando de un receptor y también es denominado polipéptido receptor de unión a un ligando.

En la medida en que el polipéptido tiene un dominio receptor, también se denomina en la presente memoria receptor. En otros aspectos preferidos, el dominio de señal de secreción es una señal de secreción peIB según lo descrito en la presente memoria. Además, es preferible que el dominio de anclaje a la membrana derive de las proteínas cpIII o cpVIII de fago filamentoso según lo descrito en la presente memoria.

En aspectos preferidos, la proteína receptora es una cadena de polipéptido de un receptor heterodimérico de unión a un ligando. Más preferiblemente, el receptor heterodimérico es un complejo de unión de un epítipo.

Los receptores heterodiméricos preferidos incluyen inmunoglobulinas, antígenos de histocompatibilidad de clase I o II, receptores de linfocitos, integrinas y receptores heterodiméricos similares. Las inmunoglobulinas (moléculas de anticuerpo) pueden estar en forma de fragmentos Fab o Fv, u otras partes de una molécula de anticuerpo que contengan regiones del dominio variable de las cadenas pesadas y ligeras.

Como ya se ha indicado, un polipéptido de esta invención tiene una secuencia de residuos de aminoácido que puede ser representada por la fórmula, mostrada en sentido del terminal amino al carboxilo:



en la que O representa una secuencia de residuos de aminoácido que define una señal de secreción; U representa un primer polipéptido espaciador; V representa una secuencia de residuos de aminoácido que define el dominio receptor (un polipéptido receptor de unión a un ligando); X representa un segundo polipéptido espaciador; y Z representa una secuencia de residuos de aminoácido que define un dominio de anclaje a la membrana de una cubierta proteínica de fago filamentoso, con la condición de que m sea el número entero 0 ó, tal como cuando m sea 0, U no esté presente, y cuando m sea 1, U esté presente; y n sea 0 ó 1, tal que cuando n sea 0, X no esté presente y cuando n sea 1, X esté presente.

En la fórmula (F1), la señal de secreción y el anclaje a la membrana de cubierta proteínica de fago filamentoso son según lo definido en la presente memoria anteriormente. De este modo, un polipéptido preferido comprende un polipéptido derivado de un dominio de cadena variable de anticuerpo unido operativamente por su terminal amino con la señal de secreción y unido operativamente por su terminal carboxilo con el anclaje a la membrana.

Un polipéptido preferido de esta realización está esencialmente constituido por un polipéptido de cadena pesada de anticuerpo como el dominio variable. A este respecto, "estar esencialmente constituido" significa que el polipéptido no contiene ningún polipéptido de cadena ligera de anticuerpo ni ninguna porción del mismo. Se prefiere particularmente un polipéptido según la fórmula (F1) en la que Z define el anclaje a la membrana de cpIII o cpVIII según lo descrito en la presente memoria. En otra realización preferida, la señal de secreción es una señal de secreción peIB.

Como se usa en la presente memoria con respecto a los polipéptidos, el término "unido operativamente" significa que los fragmentos de polipéptido o los dominios proteínicos representados por los polipéptidos han sido unidos mediante enlace covalente en un solo polímero polipeptídico, preferiblemente, mediante enlaces de tipo amida convencionales entre los aminoácidos adyacentes que están unidos en el polipéptido.

En una realización, V es una secuencia de residuos de aminoácido que define el dominio de unión a un ligando de una cadena de una molécula de receptor heterodimérico y, preferiblemente, es un polipéptido de la región variable

ES 2 315 612 T3

de inmunoglobulina. En un polipéptido particularmente preferido, V es un polipéptido V_H o V_L . Se prefiere más un polipéptido en el que V sea un polipéptido V_H de inmunoglobulina (polipéptido de cadena pesada de anticuerpo), y m y n sean ambos cero.

5 En otra realización, U o X pueden definir un sitio de escisión proteolítica, tal como la secuencia de aminoácidos encontrada en una proteína precursora, tal como protrombina, factor X y similares, que defina el sitio de escisión del polipéptido. Un polipéptido de fusión que tenga un sitio de escisión proporciona un medio de purificación del polipéptido lejos de la partícula de fago a la que está unido.

10 Los espaciadores polipeptídicos U y X pueden tener cada uno cualquier secuencia de residuos de aminoácido de una longitud aproximada de 1 a 6 residuos de aminoácido. Comúnmente, los residuos de espaciador están presentes en un polipéptido para alojar el marco de lectura continuo que se necesita cuando se produce un polipéptido mediante los procedimientos revelados en la presente memoria usando un vector de expresión de ADN de esta invención.

15 Un receptor de la presente invención adquiere una configuración que tiene un sitio de unión específico de, según lo evidenciado por su capacidad para ser inhibido competitivamente, un ligando preseleccionado o predeterminado tal como un antígeno, un hapteno, un sustrato enzimático y similares. En una realización, un receptor de esta invención es un polipéptido de unión a un ligando que forma un sitio de unión antigénica que se une específicamente a un antígeno preseleccionado para formar un complejo que tiene una unión lo suficientemente fuerte entre el antígeno y el sitio de unión para que el complejo pueda ser aislado. Cuando el receptor es un polipéptido de unión antigénica, su afinidad o avidez es generalmente mayor de $10^5 M^{-1}$, más habitualmente, mayor de $10^6 M^{-1}$ y, preferiblemente, mayor de $10^8 M^{-1}$.

25 En otro aspecto, un receptor según lo revelado en la presente memoria se une a un sustrato y cataliza la formación de un producto desde el sustrato. Aunque la topología del sitio de unión a un ligando de un receptor catalítico es probablemente más importante para su actividad preseleccionada que su afinidad (constante de asociación o pKa) por el sustrato, los presentes receptores catalíticos tienen una constante de asociación para el sustrato preseleccionado generalmente mayor de $10^3 M^{-1}$, más habitualmente, mayor de $10^5 M^{-1}$ o $10^6 M^{-1}$, y preferiblemente, mayor de $10^7 M^{-1}$.

30 Preferiblemente, el receptor producido por la presente invención es heterodimérico y por tanto, está normalmente compuesto por dos cadenas polipeptídicas, que juntas adquieren una configuración que tiene afinidad de unión o constante de asociación por el ligando preseleccionado que es diferente, preferiblemente mayor, que la afinidad o la constante de asociación de cualquiera de los polipéptidos por separado, i.e., como monómeros. El receptor heterodimérico es denominado receptor heterodimérico de unión a un ligando para connotar su capacidad por unirse al ligando.

35 De este modo, una realización preferida contempla un receptor heterodimérico de unión a un ligando que comprende un primer y un segundo polipéptido. El primer polipéptido está flanqueado por un dominio de señal de secreción procariota amino-terminal y un dominio de anclaje a la membrana de fago filamentoso carboxi-terminal. El segundo polipéptido está fusionado con un dominio de señal de secreción procariota amino-terminal. Un receptor heterodimérico de unión a un ligando particularmente preferido utiliza una señal de secreción procariota según lo descrito en la presente memoria. Además, un receptor heterodimérico de unión a un ligando preferido contiene un anclaje a la membrana derivado de cpIII o cpVIII según lo descrito en la presente memoria.

45 Un receptor heterodimérico de unión a un ligando se denomina complejo de unión de un epítipo para connotar que el complejo tiene una capacidad de unir un epítipo presente sobre un ligando, y para connotar que el receptor heterodimérico está formado por la asociación (formación de un complejo) de dos polipéptidos según lo descrito en la presente memoria.

50 Una o las dos cadenas polipeptídicas diferentes derivan preferiblemente de la región variable de la cadena pesada y ligera de una inmunoglobulina. Comúnmente, los polipéptidos que comprende la región variable ligera (V_L) y pesada (V_H) se emplean juntos para unirse al ligando preseleccionado.

55 De este modo, una realización contempla un receptor heterodimérico de unión a un ligando en el que el primer polipéptido es un polipéptido de cadena pesada de anticuerpo y el segundo polipéptido es un polipéptido de cadena ligera. Una realización alternativa contempla un receptor heterodimérico de unión a un ligando en el que el primer polipéptido es un polipéptido de cadena ligera de anticuerpo y el segundo polipéptido es un polipéptido de cadena pesada de anticuerpo.

60 Un receptor producido por la presente invención puede ser activo tanto en forma monomérica como multimérica, bien homomérica o heteromérica, preferiblemente, heterodimérica. Por ejemplo, el polipéptido de unión a un ligando de V_H y V_L producido por la presente invención se puede combinar ventajosamente en el heterodímero para modular la actividad de cualquiera o para producir una actividad única para el heterodímero.

65 Cuando los polipéptidos de ligandos individuales se denominan V_H y V_L , el heterodímero puede ser denominado Fv. Sin embargo, debería entenderse que un V_H puede contener además de la V_H , sustancialmente toda o una parte de la región constante de cadena pesada. De manera similar, un V_L puede contener, además de la V_L , sustancialmente

ES 2 315 612 T3

toda o parte de la región constante de la cadena ligera. Un heterodímero compuesto por una V_H que contiene una parte de la región constante de la cadena pesada y una V_L que contiene sustancialmente toda la región constante de la cadena ligera se denomina fragmento Fab. La producción de Fab puede ser ventajosa en algunas situaciones, porque las otras secuencias de la región constante contenidas en un Fab en comparación con un Fv pueden estabilizar la interacción entre V_H y V_L . Tal estabilización puede hacer que el Fab tenga una mayor afinidad por el antígeno. Además, el Fab se usa más comúnmente en la técnica y hay por tanto más anticuerpos comerciales disponibles para reconocer específicamente un Fab en procedimientos de rastreo.

Los polipéptidos V_H y V_L individuales se pueden producir en longitudes iguales o sustancialmente iguales a sus longitudes naturales. Sin embargo, en realizaciones preferidas, los polipéptidos V_H y V_L tendrán generalmente menos de 125 residuos de aminoácido, más habitualmente, menos de aproximadamente 120 residuos de aminoácido, aunque normalmente tienen más de 60 residuos de aminoácido, habitualmente, más de aproximadamente 95 residuos de aminoácido, más habitualmente más de aproximadamente 100 residuos de aminoácido. Preferiblemente, V_H tendrá una longitud de aproximadamente 110 a aproximadamente 230 residuos de aminoácido, mientras que V_L tendrá una longitud de aproximadamente 95 a aproximadamente 214 residuos de aminoácido. Se prefieren las cadenas de V_H y V_L suficientemente largas como para formar Fab.

Las secuencias de residuos de aminoácido variarán ampliamente en función del idiotipo concreto implicado. Habitualmente, habrá al menos dos cisteínas separadas por de aproximadamente 60 a 75 residuos de aminoácido y unidas por un enlace de tipo disulfuro. Los polipéptidos producidos por la presente invención serán normalmente copias sustanciales de idiotipos de las regiones variables de la cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulinas, pero en algunos casos, un polipéptido puede contener mutaciones aleatorias en secuencias de residuos de aminoácido para mejorar ventajosamente la actividad deseada.

En algunos casos, es deseable proporcionar entrecruzamiento covalente de los polipéptidos V_H y V_L , lo que se puede conseguir proporcionando residuos de cisteína en el terminal carboxilo. El polipéptido normalmente se preparará libre de las regiones constantes de inmunoglobulinas, sin embargo, se puede incluir una pequeña parte de la región J como resultado de la selección ventajosa de cebadores de síntesis de ADN. La región D estará normalmente incluida en el transcrito de V_H .

Comúnmente, la región del terminal C de los polipéptidos V_H y V_L tendrá una mayor variedad de secuencias que el terminal N y, en base a la presente estrategia, puede modificarse más para permitir una variación de las cadenas de V_H y V_L que tienen lugar normalmente. Se puede emplear un polinucleótido sintético para variar uno o más aminoácidos de una región hipervariable.

E. Procedimientos de la producción de una genoteca

1. Razones generales

En una realización, la presente revelación describe un sistema para la clonación y el rastreo simultáneo de especificidades de unión a ligandos preseleccionados de repertorios de genes usando un sistema de un solo vector. Este sistema proporciona la unión de metodologías de clonación y de rastreo, y tiene dos requisitos. En primer lugar, que la expresión de las cadenas polipeptídicas de un receptor heterodimérico de un huésped de expresión *in vitro* tal como *E. coli* requiere la coexpresión de dos cadenas polipeptídicas con el fin de poder ensamblar un receptor heterodimérico funcional para producir un receptor que se una al ligando. En segundo lugar, que el rastreo de los miembros aislados de la genoteca en cuanto a una capacidad de unión a un ligando preseleccionado requiere un procedimiento para correlacionar la capacidad de unión (un enlace) de una molécula de receptor expresado con un procedimiento conveniente para aislar el gen que codifique el miembro procedente de la genoteca.

La unión de la expresión y el rastreo se consigue mediante la combinación de dirigirse a un polipéptido de fusión del periplasma de una célula bacteriana para permitir el ensamblaje de un receptor funcional y dirigirse a un polipéptido de fusión sobre la cubierta de una partícula de fago filamentoso durante el ensamblaje del fago para permitir el rastreo conveniente del miembro de interés de la genoteca. La dirección hacia el periplasma se proporciona mediante la presencia de un dominio de señal de secreción en un polipéptido de fusión de esta invención. La dirección hacia una partícula de fago se proporciona mediante la presencia de un dominio de anclaje a la membrana de cubierta proteínica de fago filamentoso (i.e., un dominio de anclaje a la membrana derivado de cpIII o cpVIII) de un polipéptido de fusión de esta invención.

Se describe en la presente memoria, en un aspecto, un procedimiento para producir una genoteca de moléculas de ADN, comprendiendo cada molécula de ADN un cistrón para expresar un polipéptido de fusión sobre la superficie de una partícula de fago filamentoso. El procedimiento comprende las etapas de (a) formar una mezcla de unión mediante la combinación en un tampón de unión de (i) un repertorio de genes codificante de polipéptido e (ii) una pluralidad de vectores de expresión de ADN en forma lineal adaptados para formar un polipéptido de fusión que exprese el cistrón, y (b) someter la mezcla a condiciones de unión durante un período de tiempo suficiente para que el repertorio de genes se una operativamente a la pluralidad de vectores para formar la genoteca.

En este aspecto, el repertorio de genes codificantes de polipéptido están en forma de ADN bicatenario (bc) y cada miembro del repertorio tiene terminales cohesivos adaptados a una unión direccional. Además, la pluralidad de

ES 2 315 612 T3

5 vectores de expresión de ADN son cada molécula de ADN lineal que tiene terminales cohesivos secuencia arriba y secuencia abajo que están (a) adaptados a recibir direccionalmente los genes de polipéptido en un marco de lectura común y (b) unidos operativamente a las respectivas secuencias de ADN traducibles secuencia arriba y secuencia abajo. La secuencia de ADN traducible secuencia arriba codifica una señal de secreción, preferiblemente, una señal de secreción peIB, y la secuencia de ADN traducible secuencia abajo codifica un anclaje a la membrana de cubierta proteínica de fago filamentoso según lo descrito en la presente memoria. Las secuencias de ADN traducibles también están unidas operativamente a las respectivas secuencias de control de la expresión del ADN secuencia arriba y secuencia abajo según lo definido para un vector de expresión de ADN descrito en la presente memoria.

10 La genoteca así producida puede ser utilizada para la expresión y el rastreo de los polipéptidos de fusión codificados por la genoteca resultante de cistrones representados en la genoteca por los procedimientos de expresión y rastreo descritos en la presente memoria.

15 2. Producción de repertorios de genes

Un repertorio de genes es una colección de diferentes genes, preferiblemente, genes codificantes de polipéptidos (genes polipeptídicos) y puede ser aislado de fuentes naturales o puede ser generado artificialmente. Los repertorios de genes preferidos están compuestos por genes conservados. Los repertorios de genes particularmente preferidos comprenden cualquiera o ambos genes que codifiquen los miembros de una molécula de receptor dimérico.

20 Un repertorio de genes útil en la práctica de la presente invención contiene al menos 10^3 , preferiblemente, al menos 10^4 , más preferiblemente, al menos 10^5 y lo más preferible, al menos 10^7 genes distintos. Los procedimientos para evaluar la diversidad de un repertorio de genes son conocidos por los expertos en la técnica.

25 De este modo, la presente revelación contempla un procedimiento para aislar un par de genes codificantes de un receptor dimérico que tiene una actividad preseleccionada de un repertorio de genes conservados. Además, también se describe la expresión del par de genes clonado y el aislamiento de la proteína de receptor dimérico expresada resultante. Preferiblemente, el receptor será un polipéptido heterodimérico capaz de unirse a un ligando, tal como, una molécula de anticuerpo o una parte inmunológicamente activa de la misma, un receptor celular, o una proteína de adhesión celular codificada por uno de los miembros de una familia de genes conservados, i.e., genes que contienen una secuencia de nucleótidos conservada de al menos aproximadamente 10 nucleótidos de longitud.

30 Las familias de genes conservados ejemplares codificantes de diferentes cadenas polipeptídicas de un receptor dimérico son aquéllas codificantes de inmunoglobulinas, antígenos del complejo de histocompatibilidad de clase I o II, receptores de linfocitos, integrinas y similares.

35 Es posible identificar un gen como perteneciente a un repertorio de genes conservados usando varios procedimientos. Por ejemplo, se puede usar un gen aislado como sonda de hibridación en condiciones poco restrictivas para detectar otros miembros del repertorio de genes conservados presentes en el ADN genómico usando los procedimientos descritos por Southern, *J. Mol. Biol.*, 98:503 (1975). Si el gen usado como sonda de hibridación se hibrida con múltiples fragmentos de endonucleasa de restricción del genoma, ese gen es un miembro de un repertorio de genes conservados.

40 *Inmunoglobulinas*

45 Las inmunoglobulinas, o las moléculas de anticuerpo, son una gran familia de moléculas que incluye varios tipos de moléculas, tales como IgD, IgG, IgA, IgM e IgE. La molécula de anticuerpo está comúnmente compuesta por dos cadenas, una pesada (H) y una ligera (L) con tanto una región variable (V) como una constante (C) presentes en cada cadena como se muestra en la figura 1. Los diagramas esquemáticos de la cadena pesada de la IgG humana y de la cadena ligera Kappa humana se muestran en las figuras 2A y 2B, respectivamente. Varias regiones diferentes de una inmunoglobulina contienen secuencias conservadas útiles para el aislamiento de un repertorio de inmunoglobulinas. Kabat *et al.*, en "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Institutos Nacionales de Sanidad, Bethesda, MD, 1987, recogieron numerosos datos sobre secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos que muestran ejemplos de secuencias conservadas.

50 La región C de la cadena H define el tipo de inmunoglobulina en concreto. Por lo tanto, la selección de las secuencias conservadas según lo definido en la presente memoria de la región C de la cadena H resulta en la preparación de un repertorio de genes de inmunoglobulina que tienen miembros del tipo de inmunoglobulina de la región C seleccionada.

55 La región V de la cadena H o L comprende comúnmente cuatro regiones marco (FR), conteniendo cada una grados relativamente bajos de variabilidad que incluyen longitudes de secuencias conservadas. El uso de secuencias conservadas de las regiones marco FR1 y FR4 (región J) de la cadena V_H es una realización ejemplar preferida y se describe en la presente memoria en el apartado de ejemplos. Las regiones marco están comúnmente conservadas en varios o todos los tipos de inmunoglobulina y, por tanto, las secuencias conservadas contenidas en ellas están particularmente adaptadas para la preparación de repertorios que tienen varios tipos de inmunoglobulinas.

ES 2 315 612 T3

Complejo principal de histocompatibilidad

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC) es un gran locus genético que codifica una extensa familia de proteínas que incluye varias clases de moléculas denominadas moléculas del MHC de clase I, clase II o clase III. Paul *et al.*, en “Fundamental Immunology”. Raven Press, NY, pp. 303-378 (1984).

Las moléculas del MHC de clase I son un grupo polimórfico de antígenos de transplantes que representa una familia conservada en la que el antígeno está compuesto por una cadena pesada y una cadena ligera no codificada por el MHC. La cadena pesada incluye varias regiones, denominadas regiones N, C1, C2, membrana y citoplasmática. Las secuencias conservadas útiles en la presente invención se encuentran principalmente en las regiones N, C1 y C2, y se identifican como secuencias continuas de “residuos invariables” en Kabat *et al.*, *supra*.

Las moléculas del MHC de clase II comprenden una familia conservada de antígenos polimórficos que participan en la sensibilidad inmunológica y están compuestos por una cadena alfa y una cadena beta. Los genes codificantes de la cadena alfa y beta incluyen cada uno varias regiones que contienen secuencias conservadas adecuadas para la producción de repertorios de la cadena alfa o beta del MHC de clase II. Las secuencias de nucleótidos conservadas ejemplares incluyen aquéllas codificantes de los residuos de aminoácido 26-30 de la región A1, los residuos 161-170 de la región A2 y los residuos 195-206 de la región membrana, todos los de la cadena alfa. Las secuencias conservadas también están presentes en las regiones B1, B2 y membrana de la cadena beta en las secuencias de nucleótidos codificantes de los residuos de aminoácido 41-45, 150-162 y 200-209, respectivamente.

Receptores de linfocitos y antígenos de la superficie celular

Los linfocitos contienen varias familias de proteínas en sus superficies celulares incluyendo el receptor de las células T, al antígeno Thy-1 y numerosos antígenos de la superficie de las células T, incluyendo los antígenos definidos por los anticuerpos monoclonales OKT4 (leu3), OKT5/8 (leu2), OKT3, OKT1 (leu1), OKT 11 (leu5), OKT6 y OKT9. Paul, *supra* en las pp. 458-479.

“Receptor de células T” es un término usado para una familia de moléculas de unión antigénica encontradas en la superficie de células T. El receptor de células T como familia presenta una especificidad de unión polimórfica similar a la de las inmunoglobulinas en su diversidad. El receptor de células T maduro está compuesto por las cadenas alfa y beta, cada una con una región variable (V) y una constante (C). Las similitudes que tiene el receptor de células T con las inmunoglobulinas en cuanto a la organización genética y la función muestran que el receptor de células T contiene regiones de secuencia conservada. Lai *et al.*, *Nature*, 331:543-546 (1988).

Las secuencias conservadas ejemplares incluyen aquéllas codificantes de los residuos de aminoácido 84-90 de la cadena alfa, los residuos de aminoácido 107-115 de la cadena beta y los residuos de aminoácido 91-95 y 111-116 de la cadena gamma. Kabat *et al.*, *supra*. p. 279.

Integrinas y adhesiones

Las proteínas adhesivas implicadas en la unión celular son miembros de una gran familia de proteínas relacionadas denominadas integrinas. Las integrinas son heterodímeros compuestos por una subunidad beta y una subunidad alfa. Los miembros de la familia de las integrinas incluyen el receptor plaquetario de las glicoproteínas de la superficie celular GpIIb-IIIa, el receptor de vitronectina (VnR), el receptor de fibronectina (FnR) y los receptores de la adhesión de leucocitos LFA-1, Mac-1, Mo-1 y 60.3. Rouslahti *et al.*, *Science*. 238:491-497 (1987). Los datos de las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas demuestran que existen regiones de secuencias conservadas en los miembros de estas familias, particularmente entre la cadena beta de GpIIb-IIIa, VnR y FnR, y entre la subunidad alfa de VnR, Mac-1, LFA-1, FnR y GPIIb-IIIa. Suzuki *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 83:8614-8618, 1986; Ginsberg *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 262:5437-5440, 1987.

Se pueden emplear diversos procedimientos conocidos para producir un repertorio útil de genes. Por ejemplo, se pueden producir repertorios de genes V_H y V_L aislando ARNm codificante de V_H y V_L de una población heterogénea de células productoras de anticuerpos, i.e., linfocitos B (células B), preferiblemente, células B reorganizadas tales como aquéllas encontradas en la circulación o el bazo de un vertebrado. Las células B reorganizadas son aquéllas en las que se ha producido una translocación de genes de inmunoglobulina, i.e., una reorganización, como queda probado mediante la presencia en la célula de ARNm con los transcritos de la región V, D y J de genes de inmunoglobulina localizados adyacentemente. Comúnmente, las células B se recogen en una muestra de 1-100 ml de sangre que habitualmente contiene 10^6 células B/ml.

En algunos casos, es deseable influir en un repertorio en cuanto a una actividad preseleccionada, tal como mediante el uso de una fuente de células de ácido nucleico (células de partida) procedente de vertebrados en una cualquiera de las diversas etapas de edad, salud y respuesta inmunológica. Por ejemplo, la inmunización repetida de un animal sano antes de la recogida de las células B reorganizadas resulta en la obtención de un repertorio enriquecido en material genético productor de un receptor de elevada afinidad. Mullinax *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 87:8095-8099 (1990). Por el contrario, la recogida de células B reorganizadas de un animal sano cuyo sistema inmunológico no haya sido desafiado recientemente (i.e., un sistema inmunológico *naive*) resulta en la producción de un repertorio que no se ha visto afectado hacia la producción de polipéptidos V_H y/o V_L de alta afinidad.

Debería observarse que cuanto mayor es la heterogeneidad genética de la población de células para la que se obtienen los ácidos nucleicos, mayor será la diversidad del repertorio inmunológico (que comprende genes codificantes de V_H y V_L) que se hará disponible para el rastreo según el procedimiento de la presente invención. De este modo, es posible combinar ventajosamente células de diferentes individuos, particularmente, aquéllas que tienen una diferencia de edad inmunológicamente significativa, con células de individuos de diferentes cepas, razas y especies para aumentar la heterogeneidad (diversidad) de un repertorio.

De este modo, en una realización preferida, las células de partida se obtienen de un vertebrado, preferiblemente un mamífero, que ha sido inmunizado o parcialmente inmunizado con un ligando antigénico (antígeno) frente cuya actividad es buscado, i.e., un antígeno preseleccionado. La inmunización se puede llevar a cabo convencionalmente. Es posible controlar el título del anticuerpo en el animal para determinar la etapa de inmunización deseada, correspondiéndose tal etapa con la cantidad de enriquecimiento o activación del repertorio deseado. Los animales parcialmente inmunizados reciben comúnmente sólo una inmunización, y las células se recogen de esos animales poco después de detectarse una respuesta. Los animales completamente inmunizados muestran un título máximo, que se alcanza con una o más inyecciones repetidas del antígeno en el mamífero huésped, normalmente en intervalos de 2 a 3 semanas. Habitualmente, de tres a cinco días después del último desafío, se extirpa el bazo y se aísla el repertorio genético de los esplenocitos, aproximadamente el 90% del cual son células B reorganizadas, usando procedimientos estándar. Véase, "Current Protocols in Molecular Biology". Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, NY. Los ácidos nucleicos codificantes de los polipéptidos V_H y V_L pueden derivar de células productoras de IgA, IgD, IgE, IgG o IgM, lo más preferible, de células productoras de de IgM e IgG.

Los procedimientos para la preparación de fragmentos de ADN genómico a partir del cual se puedan clonar genes de la región variable de inmunoglobulinas como una población diversa son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo Herrmann *et al.*, "Methods In Enzymol.", 152:180-183, (1987); Frischauf, "Methods In Enzymol.", 152:183-190 (1987); Frischauf, "Methods In Enzymol.", 152:190-199 (1987); y DiLella *et al.*, "Methods In Enzymol.", 152:199-212 (1987).

Es posible aislar el repertorio de genes deseado a partir de bien material genómico que contiene el gen que expresa la región variable o del ARN mensajero (ARNm) que representa un transcrito de la región variable. La dificultad de usar el ADN genómico de otra fuente distinta a la de linfocitos B sin reorganizar está en la yuxtaposición de las secuencias codificantes de la región variable, cuando las secuencias están separadas por intrones. El(los) fragmento(s) de ADN que contienen los exones apropiados deben ser aislados, los intrones eliminados, y los exones luego cortados y empalmados en el orden y el sentido correctos. Para la mayoría, esto resultará difícil, por lo que la técnica alternativa que emplea células B reorganizadas será el procedimiento seleccionado, porque las regiones de los genes de inmunoglobulina V, D y J se han translocado para volverse adyacentes, de manera que la secuencia sea continua (libre de intrones) para todas las regiones variables.

Cuando se emplea ARNm, las células serán lisadas en condiciones de inhibición de la Rnasa. En un aspecto, la primera etapa consiste en aislar el ARNm celular total. Entonces se puede seleccionar ARNm de Poly A+ mediante la hibridación con una columna de oligo-dT celulosa. La presencia de ARNm codificantes de polipéptidos de cadena pesada y/o cadena ligera puede analizarse mediante la hibridación con cadenas simples de ADN de los genes apropiados. Lo conveniente es poder usar las secuencias codificantes de la parte constante de V_H y V_L como sondas de polinucleótido, pudiéndose obtener tales secuencias de fuentes disponibles. Véase, por ejemplo, Early y Hood, "Genetic Engineering". Setlow y Hollaender, eds., Vol. 3, Plenum Publishing Corporation, NY, (1981), pp.157-188; y Kabat *et al.*, "Sequences of Immunological Interest". Institutos Nacionales de Sanidad, Bethesda, MD, (1987).

En aspectos preferidos, la preparación que contiene el ARNm celular total es primero enriquecida para la presencia de ARNm codificante de V_H y/o V_L . El enriquecimiento se realiza comúnmente sometiendo la preparación de ARNm total o el producto de ARNm parcialmente purificado de la misma a una reacción de amplificación con cebador que emplea un cebador de síntesis de polinucleótidos según lo descrito en la presente memoria. Los ejemplos de procedimientos para producir repertorios de genes V_H y V_L usando cebadores de síntesis de polinucleótidos se describen en la solicitud conforme al PCT N.º: PCT/US 90/02836 (N.º de publicación internacional WO 90/14430). Los procedimientos particularmente preferidos para producir un repertorio de genes se basan en el uso de oligonucleótidos preseleccionados como cebadores en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para formar productos de la reacción PCR según lo descrito en la presente memoria.

En un aspecto, se inmunizan *in vitro* células B aisladas frente a un antígeno preseleccionado. La inmunización *in vitro* se define como la expansión clónica de células B específicas de un epítipo en cultivo como respuesta a una estimulación antigénica. El resultado final es el aumento de la frecuencia de las células B específicas del antígeno en el repertorio de inmunoglobulinas y, por tanto, la disminución del número de clones en una genoteca de expresión que debe ser rastreada para identificar un clon que exprese un anticuerpo de la especificidad deseada. La ventaja de la inmunización *in vitro* es que se pueden generar anticuerpos monoclonales humanos frente a un número ilimitado de antígenos terapéuticamente valiosos incluyendo inmunogenes tóxicos o débiles. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos específicos de los determinantes polimórficos de antígenos asociados con tumores, factores reumatoides y antígenos de histocompatibilidad, que no pueden producirse en animales inmunizados. Además, puede ser posible generar respuestas inmunológicas que normalmente se encuentran suprimidas *in vivo*.

ES 2 315 612 T3

La inmunización *in vitro* se puede usar para dar lugar a bien una respuesta inmunológica primaria o secundaria. Las respuestas inmunológicas primarias, que resultan de un primer tiempo de exposición de una célula B a un antígeno, resultan en la expansión clónica de células específicas de un epítipo y la secreción de anticuerpos de IgM con constantes de afinidad aparente de bajas a moderadas (10^6 - $10^8 M^{-1}$). La inmunización primaria de linfocitos esplénicos y tonsilares humanos en cultivo se puede usar para producir anticuerpos monoclonales frente a una variedad de antígenos, incluyendo células, péptidos, macromoléculas, haptenos y antígenos asociados a tumores. Las células B de la memoria procedentes de donantes inmunizados también se pueden estimular en cultivo para dar lugar a una respuesta inmunológica secundaria caracterizada por una expansión clónica y la producción de anticuerpos de alta afinidad ($>10^9 M^{-1}$) del isótopo de IgG, particularmente, frente a antígenos víricos mediante la expansión clónica de linfocitos sensibilizados derivados de individuos seropositivos.

En un aspecto, se agotan los linfocitos de la sangre periférica de diversas células citolíticas que parecen modular secuencia abajo la activación de células B específicas del antígeno. Cuando se eliminan primero sub-poblaciones ricas en lisosomas (células asesinas naturales, células T citotóxicas y supresoras, monocitos) mediante el tratamiento con metiléster de leucina lisosmotrópico, las células restantes (incluyendo las células B, células auxiliares T, células accesorias) responden con especificidad antigénica durante la inmunización *in vitro*. Los requisitos de las linfoquinas para inducir la producción de anticuerpos en cultivo se cubren con un sobrenadante de cultivo procedente de células T radiadas activadas.

Además de la inmunización *in vitro*, se puede usar el cribado celular (absorción por inmutafinidad) para aumentar más la frecuencia de las células B con especificidad antigénica. Las técnicas para la selección de sub-poblaciones de células B mediante la unión antigénica en fase sólida están bien extendidas. Se pueden optimizar las condiciones de cribado para enriquecer selectivamente con células B que se unan con alta afinidad a una variedad de antígenos, incluyendo proteínas de la superficie celular. El cribado se puede usar solo o en combinación con una inmunización *in vitro* para aumentar la frecuencia de las células con especificidad antigénica por encima de los niveles que se pueden obtener con cualquier técnica individualmente. Las genotecas de expresión de inmunoglobulinas construidas a partir de poblaciones enriquecidas de células B son influidas a favor de clones de anticuerpos con especificidad antigénica, y por tanto, permiten la identificación de clones con las especificidades deseadas de genotecas más pequeñas y menos complejas.

En un aspecto, se pueden transferir linfocitos de sangre periférica (PBL) de donantes a ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID), pudiéndose luego elevar *in vivo* en los ratones con SCID para aumentar la respuesta inmunológica antes de la recogida de los ácidos nucleicos codificantes de la cadena pesada y ligera de las células B de ratones con SCID. Véase, por ejemplo, Duchosal *et al*, *Nature*. 355:258-262 (1992). En ese informe, los PBL humanos procedentes de un donante que tenía títulos de toxoide antitetánico (TT) fueron elevados mientras estaban en el ratón huésped con SCID. La genoteca resultante de 370.000 clones produjo 2 partículas de fago que expresaron un Fab superficial capaz de unir el TT.

3. Preparación de cebadores de polinucleótido

El término “polinucleótido”, como se usa en la presente memoria en referencia a cebadores, sondas y fragmentos o segmentos de ácido nucleico por ser sintetizados mediante la extensión de cebadores, se define como una molécula compuesta por dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, preferiblemente, más de 3. Su tamaño exacto dependerá de muchos factores, que a su vez dependen de las condiciones finales de uso.

El término “cebador”, como se usa en la presente memoria, se refiere a un polinucleótido bien purificado de un digesto de restricción de ácido nucleico o producido sintéticamente, que es capaz de actuar como punto de iniciación de la síntesis de ácidos nucleicos cuando está colocado en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebador que es complementario a una cadena de ácidos nucleicos, i.e., en presencia de nucleótidos y un agente para la polimerización tal como ADN polimerasa, transcriptasa inversa y similares, y a una temperatura y a un pH adecuados. El cebador es preferiblemente monocatenario para obtener la máxima eficacia, pero puede estar alternativamente en forma bicatenaria. Si es bicatenario, primero se trata el cebador para separarlo de su cadena complementaria antes de ser usado para preparar los productos de extensión. Preferiblemente, el cebador es un polidesoxirribonucleótido. El cebador debe ser lo suficientemente largo para cebar la síntesis de los productos de la extensión en presencia de los agentes de polimerización. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, incluyendo la temperatura y el origen del cebador. Por ejemplo, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, un cebador de polinucleótido contiene de 15 a 25 o más nucleótidos, aunque puede contener menos nucleótidos. Las moléculas de cebador cortas generalmente requieren temperaturas más bajas para formar complejos híbridos suficientemente estables con el molde.

Los cebadores usados en la presente memoria se seleccionan para que sean “sustancialmente” complementarios a las diferentes cadenas de cada secuencia específica por ser sintetizada o amplificada. Esto significa que el cebador debe ser lo suficientemente complementario para hibridarse no aleatoriamente con su respectiva cadena de molde. Por lo tanto, la secuencia cebadora puede o no reflejar la secuencia exacta del molde. Por ejemplo, se puede unir un fragmento de nucleótidos no complementario al extremo 5' del cebador, siendo el resto de la secuencia cebadora sustancialmente complementaria a la cadena. Tales fragmentos no complementarios codifican comúnmente un sitio de restricción de endonucleasas. Alternativamente, se pueden intercalar dentro del cebador secuencias de bases no complementarias o más largas, siempre y cuando la secuencia cebadora sea lo suficientemente complementaria con

ES 2 315 612 T3

la secuencia de la cadena por ser sintetizada o amplificada como para hibridarse no aleatoriamente con la misma y formar así un producto de la extensión en condiciones de síntesis de polinucleótidos.

5 Los cebadores de la presente invención también pueden contener una secuencia promotora de ARN polimerasa dependiente del ADN o su complemento. Véase, por ejemplo, Krieg *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 12:7057-70 (1984); Studier *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 189:113-130 (1986); y “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Segunda edición. Maniatis *et al.*, eds., Cold Spring Harbor, NY (1989).

10 Cuando se usa un cebador que contiene un promotor de la ARN polimerasa dependiente del ADN, el cebador se hibrida con la cadena de polinucleótidos por ser amplificada y la segunda cadena de polinucleótidos del promotor de la ARN polimerasa dependiente del ADN se completa usando un agente inductor tal como ADN polimerasa I de *E. coli* o el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa de *E. coli*. El polinucleótido inicial se amplifica alternando entre la producción de un polinucleótido de ARN y un polinucleótido de ADN.

15 Los cebadores también pueden contener una secuencia molde o un sitio de iniciación de la replicación para una ARN polimerasa dirigida por ARN. La ARN polimerasa dirigida por ARN incluye la QB replicasa descrita por Lizardi *et al.*, *Biotechnology*. 6:1197-1202 (1988). Las polimerasas dirigidas por ARN producen grandes números de cadenas de ARN procedentes de un pequeño número de cadenas de ARN molde que contienen una secuencia molde o un sitio de iniciación de la replicación. Estas polimerasas proporcionan comúnmente una amplificación un millón de veces mayor de la cadena de molde según lo descrito por Kramer *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 89:719-736 (1974).

20 Los cebadores de polinucleótido se pueden preparar usando cualquier procedimiento adecuado tal como, por ejemplo, los procedimientos con fosfotriéster o fosfodiéster. Véase Narang *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 68:90, (1979); Patente estadounidense n.º: 4.356.270; y Brown *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 68:109, (1979).

25 La elección de la secuencia de nucleótidos del cebador depende de factores tales como la distancia en el ácido nucleico desde la región codificante del receptor deseado, su sitio de hibridación sobre el ácido nucleico en relación con cualquier segundo cebador por ser usado, el número de genes del repertorio con el que se va a hibridar, y similares.

30 a. Cebadores para producción

35 *Repertorios de genes de inmunoglobulina*: los repertorios de genes V_H y V_L se pueden preparar por separado antes de su utilización en la presente invención. La preparación de los repertorios se realiza comúnmente mediante la extensión de cebadores, preferiblemente mediante la extensión de cebadores en un formato de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

40 Para producir un repertorio de homólogos de ADN codificantes de V_H mediante la extensión de cebadores, se selecciona la secuencia de nucleótidos de un cebador para hibridarla con una pluralidad de genes de la cadena pesada de inmunoglobulinas en un punto sustancialmente adyacente a la región codificante de V_H de manera que se obtenga una secuencia de nucleótidos codificante de un polipéptido funcional (capaz de unirse). Para hibridar una pluralidad de diferentes cadenas de ácido nucleico codificantes de V_H , el cebador debe ser un complemento sustancial de una secuencia de nucleótidos conservada entre las diferentes cadenas. Tales puntos incluyen secuencias de nucleótidos de la región constante, cualquiera de las regiones marco de la región variable, preferiblemente, la tercera región marco, la región líder, la región promotora, la región J y similares.

45 Si los repertorios de homólogos de ADN codificante de V_H y codificante de V_L van a ser producidos mediante amplificación (PCR), se deben usar dos cebadores, i.e., un par de cebadores PCR, para cada cadena codificante de ácido nucleico por ser amplificada. El primer cebador se convierte en parte de la cadena sin sentido (negativa o complementaria) y se hibrida con una secuencia de nucleótidos conservada entre las cadenas de V_H (positiva o codificante) del repertorio. Para producir homólogos de ADN codificantes de V_H , se eligen por tanto los primeros cebadores para hibridarse con (i.e., ser complementarios a) las regiones conservadas de la región J, la región CH1, la región bisagra, la región CH2 o la región CH3 de los genes de inmunoglobulina y similares. Para producir un homólogo de ADN codificante de V_L , se eligen por tanto los primeros cebadores para hibridarse con (i.e., ser complementarios a) una región conservada de la región J o la región constante se los genes de la cadena ligera de inmunoglobulinas y similares. Los segundos cebadores se convierten en parte de la cadena codificante (positiva) y se hibridan con una secuencia de nucleótidos conservada entre las cadenas negativas. Para producir homólogos de ADN codificantes de V_H , se eligen por tanto segundos cebadores para hibridarlos con una secuencia de nucleótidos conservada en el extremo 5' del gen de inmunoglobulina codificante de V_H tal como en esa zona codificante de la región líder o de la primera región marco. Debería indicarse que en la amplificación de los homólogos de ADN codificantes de tanto V_H como de V_L , la secuencia de nucleótidos de 5' conservada del segundo cebador puede ser complementaria a una secuencia añadida exógenamente usando desoxinucleotidil transferasa terminal según lo descrito por Loh *et al.*, *Science*, 243:217-220 (1989). Uno o ambos primer y segundo cebador pueden contener una secuencia de nucleótidos que defina un sitio de reconocimiento de endonucleasas. El sitio puede ser heterólogo al gen de inmunoglobulina que esté siendo amplificado y aparece comúnmente en o cerca del extremo 5' del cebador.

65 Cuando está presente, la parte que define el sitio de restricción se localiza comúnmente en una parte no cebadora 5'-terminal del cebador. El sitio de restricción definido por el primer cebador se selecciona comúnmente para que sea uno reconocido por una enzima de restricción que no reconozca el sitio de restricción definido por el segundo cebador,

ES 2 315 612 T3

siendo el objetivo poder producir una molécula de ADN que tenga terminales cohesivos que no sean complementarios entre sí y que permitan así la inserción direccional en un vector.

En un aspecto, la presente invención utiliza un conjunto de polinucleótidos que forma cebadores que tienen una región cebadora localizada en el terminal 3' del cebador. La región cebadora es comúnmente la de 15 a 30 bases de nucleótidos más hacia 3' (3'-terminales). La parte cebadora 3'-terminal de cada cebador es capaz de actuar como cebador para catalizar la síntesis de ácidos nucleicos, i.e., de iniciar una reacción de extensión del cebador lejos de su terminal 3'. Uno o ambos cebadores pueden contener adicionalmente una región no cebadora 5'-terminal (más hacia 5'), i.e., una región que no participa en la hibridación con el molde del repertorio.

En la PCR, cada cebador trabaja en combinación con un segundo cebador para amplificar una secuencia de ácidos nucleicos diana. La elección de los pares de cebadores PCR para su uso en la PCR depende de consideraciones ya tratadas en la presente memoria para producir repertorios de genes. Es decir, los cebadores tienen una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia conservada en el repertorio. Las secuencias cebadoras de V_H y V_L útiles se muestran en las tablas 5 y 6, que se presentan más adelante en la presente memoria.

4. Reacción en cadena de la polimerasa para producir repertorios de genes

La estrategia usada para clonar los genes V_H y V_L contenidos en un repertorio dependerá, como se sabe en la técnica, del tipo, de la complejidad y de la pureza de los ácidos nucleicos que forman el repertorio. Otros factores incluyen si los genes están contenidos o no en un o una pluralidad de repertorios y de si van a ser o no amplificados y/o sometidos a una mutagénesis.

Los repertorios de genes codificantes de V_H y V_L están compuestos por cadenas codificantes de polinucleótidos, tales como ARNm y/o la cadena sentido de ADN genómico. Si el repertorio está en forma de ADN genómico bicatenario, primero es habitualmente desnaturalizado, comúnmente mediante fusión, en cadenas simples. Un repertorio se somete a una reacción de PCR tratando (poniendo en contacto) el repertorio con un par de cebadores PCR, teniendo cada miembro del par una secuencia de nucleótidos preseleccionada. El par de cebadores PCR es capaz de iniciar las reacciones de extensión de cebadores mediante la hibridación con secuencias de nucleótidos, preferiblemente de una longitud de al menos aproximadamente 10 nucleótidos, y más preferiblemente, de al menos aproximadamente 20 nucleótidos, conservados dentro del repertorio. El primer cebador de un par de cebadores PCR se denomina algunas veces en la presente memoria "cebador sentido", porque se hibrida con la cadena codificante o sentido de un ácido nucleico. Además, el segundo cebador de un par de cebadores PCR se denomina a veces en la presente memoria "cebador antisentido", porque se hibrida con una cadena no codificante o antisentido de un ácido nucleico, i.e., una cadena complementaria a una cadena codificante.

La reacción PCR se realiza mezclando el par de cebadores PCR, preferiblemente, una cantidad predeterminada de los mismos, con los ácidos nucleicos del repertorio, preferiblemente, una cantidad predeterminada de los mismos, en un tampón de PCR para formar una mezcla de reacción de PCR. Se mantiene la mezcla en condiciones de síntesis de polinucleótidos durante un período de tiempo, que es comúnmente predeterminado, suficiente para la formación de un producto de reacción de PCR, produciendo así una pluralidad de diferentes homólogos de ADN codificantes de V_H y/o codificantes de V_L .

Se puede usar una pluralidad de primeros cebadores y/o una pluralidad de segundos cebadores en cada amplificación, p.ej., se puede aparear una especie del primer cebador con un número de diferentes segundos cebadores para formar varios pares de cebadores diferentes. Alternativamente, se puede usar un par individual de primer cebador y segundo cebador. En cualquier caso, es posible combinar los productos de amplificación de las amplificaciones que usan la misma o combinaciones diferentes del primer y el segundo cebador para aumentar la diversidad de la genoteca de genes.

En otra estrategia, el objetivo consiste en clonar los genes codificantes de V_H y/o V_L de un repertorio proporcionando un complemento de polinucleótido del repertorio, tal como una cadena antisentido de ADNbc genómico o el polinucleótido producido tras someter ARNm a una reacción con transcriptasa inversa. Los procedimientos para producir tales complementos son conocidos en la técnica.

La reacción PCR se realiza usando cualquier procedimiento adecuado. Generalmente, tiene lugar en una solución acuosa tamponada, i.e., un tampón de PCR, preferiblemente a un pH de 7-9, lo más preferible, de aproximadamente 8. Preferiblemente, se añade un exceso molar (para el ácido nucleico genómico, habitualmente de aproximadamente una proporción de cebador:molde de $10^6:1$) del cebador al tampón que contiene la cadena molde. Se prefiere un gran exceso molar para mejorar la eficacia del procedimiento.

El tampón de PCR también contiene los trifosfatos de desoxirribonucleótido dATP, dCTP, dGTP y dTTP, y una polimerasa, comúnmente termoestable, todo en cantidades adecuadas para la reacción de extensión del cebador (síntesis de polinucleótidos). La solución resultante (mezcla de PCR) se calienta hasta aproximadamente 90°C-100°C durante aproximadamente 1 a 10 minutos, preferiblemente de 1 a 4 minutos. Tras este período de calentamiento, se deja enfriar la solución hasta 54°C, lo que es preferible para la hibridación de cebadores. La reacción de síntesis puede tener lugar a una temperatura que varía de la temperatura ambiente hasta una temperatura por encima de la cual la polimerasa (agente inductor) ya no funcione eficazmente. De este modo, por ejemplo, si se usa ADN polimerasa como

ES 2 315 612 T3

agente inductor, la temperatura generalmente no es mayor de aproximadamente 40°C. Un ejemplo de tampón de PCR comprende los siguientes ingredientes: KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM; pH 8,3; MgCl₂ 1,5 mM; gelatina al 0,001% (p/vol), dATP 200 μM; dTTP 200 μM; dCTP 200 μM; dGTP 200 μM; y 2,5 unidades de ADN polimerasa I de *Thermus aquaticus* (Patente estadounidense n.º: 4.889.818) por cada 100 microlitros de tampón.

El agente inductor puede ser cualquier compuesto o sistema que funcione para conseguir la síntesis de los productos de extensión de cebadores, incluyendo enzimas. Las enzimas adecuadas a este efecto incluyen, por ejemplo, ADN polimerasa I de *E. coli*, fragmento de Klenow de ADN polimerasa I de *E. coli*, ADN polimerasa de T₄, otras ADN polimerasas disponibles, transcriptasa inversa y otras enzimas, incluyendo enzimas termoestables, que faciliten la combinación de los nucleótidos de la manera apropiada para formar productos de la extensión de cebadores que sean complementarios a cada cadena de ácido nucleico. Generalmente, la síntesis se iniciará en el extremo 3' de cada cebador y continuará en el sentido 5' a lo largo de la cadena molde hasta que la síntesis termine, produciendo moléculas de diferentes longitudes. Sin embargo, puede haber agentes inductores que inicien la síntesis en el extremo 5' y continúen en el sentido anterior, usando el mismo procedimiento descrito anteriormente.

El agente inductor también puede ser cualquier compuesto o sistema que funcione para conseguir la síntesis de los productos de extensión de cebadores de ARN, incluyendo enzimas.

El agente inductor puede ser una ARN polimerasa dependiente del ADN tal como la ARN polimerasa de T7, la ARN polimerasa de T3 o la ARN polimerasa de SP6. Estas polimerasas producen un polinucleótido de ARN completo. La elevada tasa de renovación de la ARN polimerasa amplifica el polinucleótido inicial como se ha descrito por Chamberlin *et al.*, "The Enzymes". ed. P. Boyer, pp. 87-108, Academic Press, Nueva York (1982). Otra ventaja de la ARN polimerasa de T7 es que se pueden introducir mutaciones en la síntesis de polinucleótidos reemplazando una parte de ADNc por uno o más oligodesoxinucleótidos mutagénicos (polinucleótidos) y transcribiendo el molde parcialmente apareado erróneamente directamente como ha sido descrito por Joyce *et al.*, *Nuc. Acid Res.*, 17:711-722 (1989). Los sistemas de amplificación basados en la transcripción han sido descritos por Gingeras *et al.*, en "PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications", pp. 245-252, Academic Press, Inc., San Diego, CA (1990).

Si el agente inductor es una ARN polimerasa dependiente del ADN e incorpora, por tanto, trifosfatos de ribonucleótidos, se añaden suficientes cantidades de ATP, CTP, GTP y DTP a la mezcla de reacción de extensión de cebadores, y se trata la solución resultante según lo descrito anteriormente.

La cadena recién sintetizada y su cadena de ácido nucleico complementaria forman una molécula bicatenaria que se puede usar en las subsiguientes etapas del procedimiento.

Se pueden usar ventajosamente la primera y/o segunda reacción PCR tratada anteriormente para incorporar en el receptor un epítipo preseleccionado útil en la detección inmunológica y/o el aislamiento de un receptor. Esto se realiza utilizando un primer y/o un segundo cebador de síntesis de polinucleótidos o vector de expresión para incorporar una secuencia de residuos de aminoácido predeterminada en la secuencia de residuos de aminoácido del receptor.

Tras producir homólogos de ADN codificantes de V_H y V_L para una pluralidad de genes codificantes de V_H y V_L diferentes de los repertorios, comúnmente, las moléculas de ADN son amplificadas todavía más. Aunque es posible amplificar las moléculas de ADN mediante técnicas clásicas tales como la incorporación en un vector de replicación autónoma, es preferible amplificar primero las moléculas someténdolas a una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) antes de insertarlas en un vector. La PCR se lleva a cabo comúnmente termocíclicamente, i.e., aumentando y disminuyendo repetidas veces la temperatura de una mezcla de reacción de PCR dentro de un intervalo de temperaturas cuyo límite inferior es de aproximadamente 10°C a aproximadamente 40°C y cuyo límite superior es de aproximadamente 90°C a aproximadamente 100°C. El aumento y el descenso pueden ser continuos, pero es preferiblemente que sean fásicos con períodos de tiempo de una estabilidad de temperatura relativa a cada temperatura que favorezca la síntesis, la desnaturalización y la hibridación de polinucleótidos.

En las patentes estadounidenses n.º 4.683.195; 4.683.202; 4.800.159 y 4.965.188, y al menos en varios textos incluyendo "PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", H. Erlich, ed., Stockton Press, Nueva York (1989); y "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Innis *et al.*, eds. Academic Press, San Diego, California (1990), se describen procedimientos de amplificación por PCR.

En un aspecto, sólo se usa un par de primer y segundo cebador por cada reacción de amplificación. Entonces se combinan los productos de la reacción de amplificación obtenidos de una pluralidad de diferentes amplificaciones, cada una usando una pluralidad de diferentes pares de cebadores.

Sin embargo, la presente revelación también contempla la producción de homólogos de ADN mediante la co-amplificación (usando dos pares de cebadores) y la amplificación múltiplex (usando hasta aproximadamente 8, 9 ó 10 pares de cebadores).

En aspectos preferidos, el procedimiento de PCR se usa no sólo para producir una genoteca de moléculas de ADN, sino además para inducir mutaciones en la genoteca o para crear diversidad a partir de un solo clon parental y proporcionar así una genoteca que tenga una mayor heterogeneidad. En primer lugar, debería indicarse que el propio procedimiento de PCR es inherentemente mutagénico debido a una variedad de factores conocidos en la técnica. En se-

ES 2 315 612 T3

gundo lugar, además de las variaciones inductoras de mutaciones descritas en la patente estadounidense n.º 4.683.195 a la que se hace referencia anteriormente, se pueden emplear otras variaciones de PCR inductora de mutaciones. Por ejemplo, se puede formar la mezcla de reacción para PCR con diferentes cantidades de uno o más de los nucleótidos por ser incorporados en el producto de extensión. Bajo tales condiciones, la reacción de PCR pasa a producir sustituciones de nucleótidos dentro del producto de extensión como resultado de la escasez de una determinada base. De manera similar, se pueden incorporar cantidades molares aproximadamente iguales de los nucleótidos en la mezcla de reacción PCR inicial en una cantidad para realizar eficazmente x número de ciclos y luego pasar la mezcla a través de un número de ciclos en exceso de x , tal como, por ejemplo, $2x$. Alternativamente, se pueden inducir mutaciones durante la reacción PCR incorporando en la mezcla de reacción derivados de nucleótido tales como inosina, que no se encuentre normalmente en los ácidos nucleicos del repertorio que está siendo amplificado. Durante la posterior síntesis y replicación de ADN *in vivo* de los ácidos nucleicos de la célula huésped, el derivado de nucleótido será reemplazado por un nucleótido sustituto, induciendo así una mutación puntual.

5. Vectores de expresión de ADN lineal

Un vector de expresión de ADN para su uso en un procedimiento de la invención para producir una genoteca de moléculas de ADN es una molécula de ADN linealizada según lo descrito anteriormente que tiene dos terminales cohesivos (secuencia arriba y secuencia abajo) adaptados para la unión direccional a un gen de polipéptido.

Los vectores de expresión de ADN se preparan comúnmente mediante la digestión con endonucleasas de restricción de un vector de expresión de ADN circular de esta invención para cortar por dos sitios de restricción preseleccionados de la secuencia de nucleótidos del vector adaptado a la unión direccional para producir una molécula de ADN lineal que tenga los terminales cohesivos necesarios que estén adaptados a una unión direccional. La unión direccional se refiere a la presencia de dos terminales cohesivos (un primero y un segundo) sobre un vector, o sobre una molécula de inserto de ADN por ser unida en el vector seleccionado, tal que los terminales de una sola molécula no sean complementarios. Un primer terminal del vector es complementario a un primer terminal del inserto, y el segundo terminal del vector es complementario al segundo terminal del inserto.

6. Reacciones de unión para producir genotecas de genes

En la preparación de una genoteca de moléculas de ADN de esta invención, se prepara una mezcla de unión según lo descrito anteriormente y se somete la mezcla a condiciones de unión durante un período de tiempo suficiente para que el repertorio mezclado de genes de polipéptido se una (pase a estar unido operativamente) a una pluralidad de vectores de expresión de ADN para formar la genoteca.

Las condiciones de unión son condiciones seleccionadas para favorecer una reacción de unión en la que se forme un enlace de tipo fosfodiéster entre terminales fosforilo 5' e hidroxilo 3' adyacentes de ADN. La reacción de unión está preferiblemente catalizada por la enzima ADN ligasa de T_4 . Las condiciones de unión pueden variar en el tiempo, la temperatura, la concentración de los tampones, las cantidades de moléculas de ADN por ser unidas y las cantidades de ligasa, como se sabe. Las condiciones de unión preferidas implican el mantenimiento de la mezcla de unión a 4 grados Centígrados (4°C) a 12°C durante 1 a 24 horas en presencia de 1 a 10 unidades de ADN ligasa de T_4 por mililitro (ml) y aproximadamente 1 a 2 microgramos (μg) de ADN. El tampón de unión de una mezcla de unión comúnmente contiene Tris-HCl 0,5M (pH 7,4), MgCl_2 0,01M; ditiotrietol 0,01M, espermidina 1 mM, ATP 1 mM y 0,1 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA). También se pueden usar otros tampones de unión.

En el ejemplo 2, se describen ejemplos de reacciones de unión.

7. Preparación de genotecas de genes dicistrónicos

En un aspecto, la presente invención contempla procedimientos para la preparación de una genoteca de moléculas de ADN dicistrónico. Una molécula de ADN dicistrónico es una sola molécula de ADN que tiene la capacidad de expresar dos polipéptidos separados desde dos cistrones separados. En más aspectos, los dos cistrones están unidos operativamente en ubicaciones relativas de la molécula de ADN tal que ambos cistrones están bajo el control transcripcional de un solo promotor. Cada molécula dicistrónica es capaz de expresar el primer y el segundo polipéptido desde el primer y el segundo cistrón, respectivamente, que puede formar, en un huésped adecuado, un receptor heterodimérico sobre la superficie de una partícula de fago filamentosos.

El procedimiento para producir una genoteca de moléculas de ADN dicistrónico comprende las etapas de:

- (a) formar una primera mezcla de unión mediante la combinación en un tampón de unión:
 - (i) un repertorio de genes del primer polipéptido en forma de ADNbc, teniendo cada uno terminales cohesivos adaptados a la unión direccional, y
 - (ii) una pluralidad de vectores de expresión de ADN en forma lineal, teniendo cada uno terminales cohesivos secuencia arriba y secuencia abajo que están (a) adaptados a recibir direccionalmente los genes del primer polipéptido en un marco de lectura común y (b) unidos operativamente a las respectivas secuencias de ADN traducibles secuencia arriba y secuencia abajo. La secuencia de ADN

ES 2 315 612 T3

traducible secuencia arriba codifica una señal de secreción peIB, la secuencia de ADN traducible secuencia abajo codifica un anclaje a la membrana de cubierta proteínica de fago filamentoso y las secuencias de ADN traducibles están unidas operativamente a las respectivas secuencias de control de la expresión de ADN secuencia arriba y secuencia abajo.

- 5
- (b) Someter la mezcla a condiciones de unión durante un período de tiempo suficiente para unir operativamente los genes del primer polipéptido con los vectores y producir una pluralidad de moléculas de ADN circular, cada una teniendo un primer cistrón para la expresión del primer polipéptido.
- 10
- (c) Tratar la pluralidad de moléculas de ADN circular en condiciones de escisión de ADN para producir una pluralidad de vectores de expresión de ADN en una forma lineal, cada uno con segundos terminales cohesivos secuencia arriba y secuencia abajo que están (i) adaptados a recibir direccionalmente un repertorio de genes del segundo polipéptido en un marco de lectura común y (ii) unidos operativamente a las respectivas secuencias de ADN secuencia arriba y secuencia abajo. La secuencia de ADN secuencia arriba es una secuencia traducible codificante de una señal de secreción, la secuencia de ADN secuencia abajo tiene al menos un codón de terminación en el marco de lectura y la secuencia de ADN traducible está unida operativamente a una secuencia de control de la expresión de ADN.
- 15
- (d) formar una segunda mezcla de unión mediante la combinación en un tampón de unión:
- 20
- (i) una pluralidad de vectores de expresión de ADN formados en la etapa (c) y
- (i) el repertorio de genes del segundo polipéptido en forma de ADN_{bc}, teniendo cada uno terminales cohesivos adaptados a la unión direccional con la pluralidad de vectores de expresión de ADN; y
- 25
- (e) Someter la segunda mezcla a condiciones de unión durante un período de tiempo suficiente para unir operativamente los genes del segundo polipéptido con dichos vectores y producir una pluralidad de moléculas de ADN circular, teniendo cada una el segundo cistrón para la expresión del segundo polipéptido, formando así la genoteca.
- 30

En aspectos preferidos, una señal de secreción es una señal de secreción peIB. También se prefiere el uso de un anclaje a la membrana de fago filamentoso derivado de cpIII o cpVIII según lo descrito en la presente memoria.

35 Los vectores de expresión de ADN útiles para la práctica del procedimiento anterior son vectores de expresión dicistrónicos descritos más detalladamente con anterioridad.

En la práctica del procedimiento de producción de una genoteca de moléculas de ADN dicistrónico, es preferible que los primeros terminales cohesivos secuencia arriba y secuencia abajo no tengan las mismas secuencias de nucleótidos que los segundos terminales cohesivos secuencia arriba y secuencia abajo. En este aspecto, la etapa (c) de tratamiento para linealizar las moléculas de ADN circular implica comúnmente el uso de endonucleasas de restricción que sean específicas para producir dicho segundo terminal, pero que no escindan la molécula de ADN circular en los puntos que formaban el primer terminal. Los ejemplos de primer y segundo terminal preferidos son terminales definidos por la escisión de pCBAK8 con Xho I y Spe I para formar los primeros terminales secuencia arriba y secuencia abajo, y los definidos por la escisión de pCBAK8 con Sac I y Xba I para formar los segundos terminales secuencia arriba y secuencia abajo. En este aspecto, se pueden utilizar otros pares de terminales cohesivos en los respectivos pares del primer y segundo terminal, siempre y cuando los cuatro terminales sean cada uno terminales no complementarios distintos. Los ejemplos son los terminales encontrados en los vectores pCOMB3, pCOMB2-3, pCOMB2-3', pCOMB8 y pCOMB2-8 descritos en la presente memoria.

50 Los procedimientos de tratamiento de la pluralidad de moléculas de ADN circular en condiciones de escisión de ADN para formar moléculas de ADN lineal se conocen en general y dependen de la secuencia de nucleótidos por ser escindica y de los mecanismos de escisión. Los tratamientos preferidos implican la mezcla de las moléculas de ADN con una endonucleasa de restricción específica de un sitio de reconocimiento de endonucleasas en la ubicación de escisión deseada en una cantidad suficiente para que la endonucleasa de restricción escinda la molécula de ADN.

55 Los tampones, las condiciones de escisión y las concentraciones de sustrato para la escisión de la endonucleasa de restricción son conocidos y dependen del tipo concreto de enzima utilizado. En el ejemplo 2, se describen ejemplos de condiciones de escisión de enzimas de restricción.

60 En una realización, la invención proporciona un procedimiento para producir una genoteca de moléculas de ADN que tiene un solo cistrón, seguido por el procedimiento descrito anteriormente y la detención tras completar la etapa (b). Tal genoteca contiene moléculas de ADN, comprendiendo cada una un cistrón para expresar un polipéptido de esta invención.

65 8. Procedimientos para cambiar la diversidad de una genoteca

La presente revelación proporciona procedimientos para cambiar la diversidad de una genoteca de fagos filamentosos de esta revelación. Estos procedimientos aumentan generalmente la diversidad de la genoteca, aumentando así la mezcla de complejos de unión de posibles epítomos a partir de la cual se rastrea una actividad de unión deseada.

ES 2 315 612 T3

Alternativamente, los procedimientos pueden ser dirigidos a un enriquecimiento de una clase de complejo de unión de epítomos. La clase se define comúnmente por la capacidad de unir un determinado epítomo o familia de epítomos presente en un antígeno o grupo de antígenos preseleccionado.

5

a. Aumento de la diversidad de la genoteca por mutación

Un procedimiento particularmente preferido para aumentar la diversidad consiste en alterar la secuencia de los residuos de aminoácido de uno o más polipéptidos del complejo de unión de un epítomo codificado por el genoma de un fago de esta invención. Las alteraciones se pueden introducir convenientemente en el nivel de ácido nucleico mediante la mutación del ácido nucleico. El procedimiento se puede poner en práctica sobre una sola especie de ácido nucleico codificante de un polipéptido de esta invención, o se puede poner en práctica sobre una genoteca de ácidos nucleicos presentes en una genoteca de fagos de esta invención.

15 La mutación del ácido nucleico se puede realizar mediante una variedad de procedimientos, pero lo más conveniente es realizarla en una reacción PCR durante un procedimiento de PCR. La mutagénesis por PCR puede ser aleatoria o estar dirigida a secuencias de nucleótidos específicas, como generalmente se conoce. Ya se ha descrito anteriormente la realización de la PCR en condiciones favorables para una mutagénesis aleatoria, y se denomina "PCR propensa a error". De manera similar, la mutagénesis dirigida implica el uso de cebadores de PCR diseñados para dirigirse a un tipo específico de mutación en una región específica de la secuencia de nucleótidos.

20 En un aspecto, la revelación contempla el aumento de la diversidad de uno o más complejos de unión de epítomos mediante la mutación dirigida por PCR de una región determinante de la complementariedad (CDR) de un dominio variable de anticuerpo presente en un polipéptido de complejo de unión de epítomo de esta invención. La mutagénesis de CDR ha sido descrita con anterioridad en términos generales para la "humanización" de un anticuerpo introduciendo secuencias humanas en la región CDR de un anticuerpo murino. Véase la solicitud europea n.º: EP 239400.

30 Por consiguiente, la revelación contempla un procedimiento de mutagénesis para alterar la especificidad inmunológica de un gen de inmunoglobulina clonado presente en un vector de ADN de esta invención. El procedimiento proporciona mutagénesis dirigida en una CDR preseleccionada de un gen de inmunoglobulina que comprende someter una molécula de ADN recombinante (ADNr) que contiene el gen de inmunoglobulina clonado que tiene una CDR diana a condiciones de la PCR adecuadas para la amplificación de una región preseleccionada de la CDR. En el procedimiento, se somete la molécula de ADNr a condiciones de PCR que incluyen un oligonucleótido de cebador PCR según lo descrito más adelante constituyendo el primer cebador en un par de cebadores para PCR como se conoce para producir un producto de PCR amplificado que derive de la región CDR preseleccionada, pero que incluya las secuencias de nucleótidos del cebador de PCR. El segundo oligonucleótido en condiciones de amplificación por PCR puede ser cualquier cebador para PCR derivado del gen de inmunoglobulina por ser mutagenizado, según lo descrito en la presente memoria.

40 Se prefieren los procedimientos que usan un oligonucleótido según lo descrito a continuación.

En un aspecto relacionado, por lo tanto, se contempla un oligonucleótido que es útil como cebador en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para inducir la mutagénesis en una región determinante de la complementariedad (CDR) de un gen de inmunoglobulina. El oligonucleótido tiene terminales 3' y 5', y comprende (1) una secuencia de nucleótidos en su terminal 3' capaz de hibridarse con una primera región marco de un gen de inmunoglobulina, (2) una secuencia de nucleótidos en su terminal 5' capaz de hibridarse con una segunda región marco de un gen de inmunoglobulina y (3) una secuencia de nucleótidos entre los terminales 3' y 5' adaptada a la introducción de mutaciones durante una PCR en la región CDR entre la primera y la segunda región marco del gen de inmunoglobulina, mutagenizando así la región CDR.

50

En la medida en que los genes de inmunoglobulina tienen tres regiones CDR tanto en la cadena pesada como en la cadena ligera de una inmunoglobulina, cada una separada por una región marco distinta, se entenderá que el ejemplo anterior es fácilmente aplicable a la introducción de mutaciones en una CDR específica mediante la selección de las secuencias de nucleótidos de 5' y 3' anteriores para su hibridación con las regiones marco que flanquean la CDR diana. Por lo tanto, las anteriores primera y segunda secuencia marco pueden ser las secuencias conservadas que flanquean CDR1, CDR2 o CDR3 tanto en la cadena pesada como en la cadena ligera. La CDR3 ejemplar y preferida es la de la cadena pesada de inmunoglobulinas humanas.

55

La longitud de las secuencias de nucleótidos terminales 3' y 5' del presente oligonucleótido mutagenizante puede variar como es bien sabido, siempre y cuando la longitud proporcione un tramo de nucleótidos complementario a las secuencias marco diana para su hibridación. En el caso de la secuencia de nucleótidos terminal 3', debe ser de suficiente longitud y complementariedad con la región marco diana localizada en 3' con respecto a la región CDR por ser mutagenizada para que se hibride y proporcione un terminal hidroxilo 3' para iniciar una reacción de extensión de cebador. En el caso de la secuencia de nucleótidos terminal 5', debe tener suficiente longitud y complementariedad con la región marco diana localizada en 5' con respecto a la región CDR por ser mutagenizada para proporcionar un medio de hibridación en una reacción de extensión por solapamiento PCR según lo descrito anteriormente con el fin de ensamblar la cadena pesada o ligera de inmunoglobulina completa.

60

65

ES 2 315 612 T3

Las regiones marco que flanquean una CDR están bien caracterizadas en las técnicas inmunológicas, e incluyen secuencias de nucleótidos o secuencias consenso conocidas según lo descrito en otra parte de la presente memoria. Cuando se va a mutagenizar un solo gen preseleccionado de inmunoglobulina, se conocen las secuencias definidas por el marco que flanquean una determinada CDR, o pueden ser fácilmente determinadas mediante protocolos de secue-
5 nciación de nucleótidos. Cuando se va a mutagenizar un repertorio de genes de inmunoglobulina, las secuencias derivadas de los marcos están preferiblemente conservadas, según lo descrito en otra parte de la presente memoria.

Preferiblemente, la longitud de las secuencias de nucleótidos terminales 3' y 5' son cada una de al menos 6 nucleótidos, y pueden ser de hasta 50 o más nucleótidos de longitud, aunque no son necesarias estas longitudes para garantizar una hibridación exacta y reproducible. Las longitudes preferidas están en el intervalo de 12 a 30 nucleótidos, y comúnmente, son de aproximadamente 18 nucleótidos.

Una secuencia de nucleótidos definida por un marco particularmente preferida par su uso como secuencia de nucleótidos del terminal 3' tiene la secuencia de nucleótidos 5'-TGGGGCCAAGGGACCACG-3' (SEC ID N° 122).

Una secuencia de nucleótidos definida por un marco particularmente preferida para su uso como secuencia de nucleótidos del terminal 5' tiene la secuencia de nucleótidos 5'-GTGTATTATTGTGCGAGA-3' (SEC ID N° 123).

La secuencia de nucleótidos localizada entre los terminales 3' y 5' adaptada para mutagenizar una CDR puede ser cualquier secuencia de nucleótidos, en la medida en que la nueva secuencia sea incorporada mediante los procedimientos anteriores. Sin embargo, el presente enfoque proporciona un procedimiento para producir una gran población de CDR mutagenizadas en una sola reacción PCR mediante el uso de una población de secuencias redundantes que definen nucleótidos aleatorizados o casi aleatorizados en la región CDR por ser mutagenizada.

Un oligonucleótido preferido comprende una secuencia de nucleótidos entre los terminales 3' y 5' anteriormente descritos que está representada por la fórmula: [NMR]_n, en la que N puede ser independientemente cualquier nucleótido, R puede ser S, K o análogos de los mismos, en la que S es G o C, K es G o T, y en la que n es de 3 a aproximadamente 24. En realizaciones preferidas, el oligonucleótido tiene la fórmula:

5'-GTGTATTATTGTGCGAGA[NNR]_nTGGGGCCAAGGGACCACG-3' (SEC ID N° 124).

El ejemplo de oligonucleótido particularmente preferido es en el que R es S y n es 16, tal que el oligonucleótido representa una gran población de secuencias de oligonucleótidos redundantes.

De este modo, la revelación contempla un procedimiento para aumentar la diversidad de una genoteca de partículas de fago filamentoso que comprende las etapas de: a) proporcionar una genoteca de partículas de fago filamentoso y b) mutar la secuencia de nucleótidos codificante del dominio variable de inmunoglobulina presente en cada vector de expresión de ADN de la genoteca para formar una genoteca de partículas de fago cada una conteniendo una secuencia de nucleótidos de dominio variable de inmunoglobulina mutada.

Proporcionar esto puede incluir manipular los genomas de las partículas de fago de la genoteca con el fin de aislar los ácidos nucleicos en la preparación de una reacción PCR de mutagénesis. Las manipulaciones de una genoteca de fagos para aislar el genoma de los fagos para su uso en una reacción PCR se describen en otra parte de la presente memoria.

En un aspecto, la mutación comprende someter la secuencia de nucleótidos codificante del dominio variable de inmunoglobulina a una reacción en cadena de la polimerasa propensa al error. En otro aspecto, la mutación comprende someter la secuencia de nucleótidos codificante del dominio variable de inmunoglobulina a un procedimiento para mutar una CDR de la secuencia de nucleótidos codificante del dominio variable de inmunoglobulina usando un oligonucleótido dirigido hacia la CDR según lo descrito en la presente memoria.

Los procedimientos ejemplares para mutar la región CDR de un ácido nucleico codificante de un complejo de unión de epítomos particular usando el anterior oligonucleótido dirigido a una CDR o usando la PCR propensa al error para producir una gran genoteca de diversos complejos se describen en los ejemplos.

b. Enriquecimiento de una genoteca

La revelación describe un procedimiento para cambiar la diversidad de la genoteca enriqueciéndola de una clase preseleccionada de complejos de unión de epítomos. El procedimiento generalmente implica una selección por afinidad de aquellas partículas de fago de una genoteca que sean capaces de unirse a un antígeno preseleccionado. El procedimiento de selección por afinidad o cribado se describe detalladamente en el apartado de ejemplos.

Por lo tanto, la revelación contempla un procedimiento para cambiar la diversidad de una genoteca de partículas de fago filamentoso que comprende las etapas de a) proporcionar una genoteca de partículas de fago filamentoso, b) poner en contacto la genoteca proporcionada con un ligando preseleccionado en condiciones suficientes para que los miembros de la genoteca se unan al ligando y formen un complejo de ligando-partícula de fago, y c) aislar las partículas de fago del complejo lejos de los miembros de la genoteca no unidos para formar una genoteca enriquecida en ligandos que comprenda partículas de fago que tengan una especificidad de unión por el ligando preseleccionado.

ES 2 315 612 T3

En aspectos preferidos, el ligando preseleccionado está sujeto a un soporte sólido y el complejo de ligando-partícula de fago se forma en fase sólida. Este aspecto comprende además las etapas de i) lavar el soporte sólido tras la etapa de la puesta en contacto para aclarar los miembros de la genoteca no unidos del soporte sólido; e ii) eluir cualquier partícula de fago unida en fase sólida del soporte sólido. Las partículas de fago eluidas se recogen, formando así partículas de fago aisladas que comprenden una genoteca enriquecida.

La elución se puede realizar en una variedad de condiciones que afecten a la interacción del complejo de unión de ligando-epítipo. Las condiciones típicas incluyen tampones de pH bajo y alto contenido en sales. Se prefieren particularmente los tampones de un pH de aproximadamente 1 a 5, preferiblemente, de un pH de aproximadamente 2 a 3. Alternativamente, se puede afectar a la interacción mediante la competición con una cantidad en exceso del ligando preseleccionado en el tampón de elución. Ambos procedimientos de elución se describen en los ejemplos.

Un aspecto relacionado combina las características de tanto el aumento de diversidad de una genoteca mediante la mutación como el enriquecimiento de la genoteca mediante el cribado hacia afinidades de complejos de unión de epítomos “maduros” por un ligando preseleccionado. Por lo tanto, es posible desarrollar nuevas especificidades de unión y especificidades de unión más potentes usando los presentes procedimientos para cambiar la diversidad de la genoteca.

La combinación de estos procedimientos se puede configurar en una variedad de modos, como resultará evidente para el experto en la técnica. Por ejemplo, se puede aislar una genoteca, mutagenizarla (diversificarla) y luego rastrear (enriquecer con) una determinada actividad de unión. Alternativamente, es posible enriquecer con una determinada actividad de una genoteca, mutagenizar el complejo de unión de un epítipo específico y enriquecer más la genoteca producida mediante la mutagénesis.

En otra variante de este tema, es posible utilizar las diferencias entre las genotecas basadas en los anclajes a la membrana derivados de cpIII y cpVIII debido a sus inherentes diferencias de valencia. Como una genoteca de fagos que tenga el anclaje a la membrana derivado de cpIII contendrá comúnmente sólo de 1 a 4 copias del complejo de unión de epítomos sobre la superficie de cada partícula de fago, el fago presenta un complejo de unión de una valencia relativamente “baja”, de un valor cercano a uno. Por el contrario, una genoteca de fagos que tenga el anclaje a la membrana derivado de cpVIII contendrá comúnmente de 20 a 1.000 copias del complejo de unión de epítomos sobre la superficie de cada partícula de fago, presentando la partícula una valencia relativamente “alta”. De este modo, las genotecas basadas en cpIII se denominan monovalentes y las genotecas basadas en cpVIII se denominan multivalentes.

Aplicando los principios conocidos de la afinidad y la valencia de anticuerpos, se entiende que es posible enriquecer una genoteca basada en cpIII tras el rastreo de interacciones de unión de afinidad generalmente más elevada (constantes de unión de 10^6 a 10^9 M^{-1}) en comparación con el intervalo más amplio de afinidades (constantes de unión de 10^4 a 10^9 M^{-1}) aislables usando un reactivo multivalente encontrado en la genoteca basada en cpVIII. Por lo tanto, las genotecas basadas en cpVIII son útiles para aislar un intervalo amplio de afinidades de complejos de unión de epítomos de baja a alta, mientras que las genotecas basadas en cpIII son útiles para aislar un intervalo más pequeño de complejos de unión de epítomos de afinidades más altas.

Por lo tanto, la revelación contempla la producción de una primera genoteca enriquecida mediante el enriquecimiento de una genoteca basada en cpVIII. A partir de ahí, se transfieren los genes para la codificación de los polipéptidos del complejo de unión de epítomos a un vector basado en cpIII, y posteriormente se enriquecen de una interacción de unión de alta afinidad. En un aspecto, se puede utilizar la etapa de mutación antes de la transferencia al vector basado en cpIII.

En otro aspecto, se demuestra la capacidad de madurar una nueva afinidad mediante un ejemplo de la presente memoria en el que se somete a mutagénesis un gen codificante de un heterodímero de V_H/V_L clonado capaz de expresar un heterodímero que se une al ligando toxoide tetánico (TT) usando una mutagénesis de PCR dirigida a la CDR, y se inserta la población de ácidos nucleicos mutagenizados resultante en una genoteca basada en cpIII y se rastrea en busca de la unión a un ligando diferente, la fluoresceína. Se identificó un complejo de unión de epítomos de alta afinidad que une la fluoresceína.

En un aspecto relacionado, se clonó una genoteca *naive* (no inmunizada) en una genoteca basada en cpVIII y se rastreó en busca de la unión al antígeno progesterona. Se clonaron aglutinantes de baja afinidad en una genoteca basada en cpIII y se identificaron tres clones de unión de alta afinidad que unieron la progesterona. Se mezclaron los tres clones y se sometió la mezcla a una mutagénesis de PCR propensa a error, clonándose la genoteca resultante de ácidos nucleicos mutados en un vector basado en cpIII y rastreando frente a progesterona para producir un complejo de unión de epítomos de alta afinidad que uniera la progesterona. Por lo tanto, se “maduró” un complejo de alta afinidad de una genoteca *naive*.

De este modo, la presente revelación también contempla un procedimiento para madurar la afinidad de un complejo de unión de epítomos codificado por un fago filamentoso de esta invención que comprende las etapas de a) proporcionar el genoma de un fago filamentoso, b) mutar la secuencia de nucleótidos codificante del dominio variable de inmunoglobulina presente en el genoma proporcionado para formar una genoteca de partículas de fago que contenga una secuencia de nucleótidos de dominio variable de inmunoglobulina mutada, c) poner en contacto la genoteca formada en la etapa (b) con un ligando preseleccionado en condiciones suficientes para que los miembros de la genoteca se

unan al ligando y formen un complejo de ligando-partículas de fago, y d) aislar partículas de fago de dicho complejo lejos de los miembros de la genoteca no unidos para formar una genoteca enriquecida en ligando que comprenda partículas de fago que tengan una especificidad de unión por el ligando preseleccionado.

5 F. Genotecas de fagos

La presente invención contempla una genoteca de moléculas de ADN en la que cada una codifica un polipéptido de fusión de esta invención, estando la genoteca en forma de una población de diferentes partículas de fago filamentosas, conteniendo cada una molécula de ADN diferente de esta invención. El término “molécula de ADN diferente” pre-
10 tende significar una molécula de ADN que difiere en la secuencia de bases de nucleótido codificante de un polipéptido de esta invención en comparación con la secuencia de nucleótidos de otra molécula de ADN de la genoteca.

De este modo, una genoteca de fagos es una población de fagos filamentosos, preferiblemente, fago filamentosos f1, fd o M13, teniendo cada fago empaquetado en el interior de la partícula un vector de expresión de ADN de esta
15 invención, estando el ADN encapsulado en la partícula de fago mediante las proteínas matriciales del fago. En otras palabras, una genoteca de fagos contiene una pluralidad de partículas de fago filamentosas, conteniendo cada partícula de fago diferente al menos un complejo de unión de epítopos en su superficie según lo descrito en la presente memoria. Una genoteca preferida está compuesta por partículas de fago que contienen moléculas de ADN que codifican al menos 10^6 , preferiblemente 10^7 y más preferiblemente, 10^{8-9} polipéptidos de fusión diferentes de esta invención.
20 “Polipéptidos de fusión diferentes” pretende significar polipéptidos de fusión que difieren en secuencia de residuos de aminoácido. Hay incluso diversidades de genoteca mayores cuando se utilizan procedimientos de combinación aleatoria o mutagénesis según lo descrito en la presente memoria para aumentar la diversidad de la genoteca.

Cuando el vector de expresión empaquetado codifica el primer y el segundo polipéptido de un receptor de ensamblaje autónomo, p.ej., polipéptidos V_H y V_L para formar un Fab, la genoteca también se puede caracterizar por su contenido o expresión de una multiplicidad de especificidades del receptor. De este modo, las genotecas expresan al menos 10^5 , preferiblemente, al menos 10^6 y más preferiblemente, al menos 10^7 receptores diferentes, tales como anticuerpos diferentes, receptores de células T, integrinas y similares.

El tamaño de la genoteca puede variar en función de un número de factores, particularmente, en función del el procedimiento mediante el que se produce la genoteca. Como se usa en la presente memoria, “tamaño” tiene la connotación de complejidad o diversidad de la genoteca, es decir, el número diferente de especies que forman parte de la genoteca, en lugar del número absoluto de partículas de la genoteca.

De este modo, cuando se produce una genoteca clonando primero por separado dos repertorios de genes correspondientes al primer y segundo polipéptido, el tamaño de la genoteca resultante tras combinar aleatoriamente los dos repertorios en forma de un vector dicistrónico aumenta considerablemente. Por ejemplo, si se consideran repertorios de genes de anticuerpo variables de cadena ligera y cadena pesada, cada uno con 10^8 miembros diferentes, la combinación de los dos repertorios produce teóricamente una genoteca de 10^{12} especies diferentes de vector dicistrónico posibles.

Se diseñó un sistema experimental para evaluar la capacidad de “revolver” dos repertorios según lo descrito anteriormente con el fin de generar una mayor diversidad. El sistema utilizó una genoteca de Fab combinatoria derivada de un ratón inmunizado con el hapteno para-nitrofenil-fosfonamidato (NPN). Se aislaron veintidós clones diferentes, y se aislaron y secuenciaron los ácidos nucleicos codificantes de la cadena pesada y la cadena ligera para determinar que
45 21 de los 22 pares eran diferentes a nivel de la secuencia de ácido nucleico. Se volvieron a combinar aleatoriamente (se revolvieron) los 22 clones de unión al ligando NPN y se volvió a rastrear en busca de la unión a NPN.

Suponiendo que la cadena pesada y la cadena ligera sólo pueden formar moléculas de receptor heterodimérico de unión al ligando si se vuelven a unir los pares originales, el modelo predice que el 4,6 por ciento de las combinaciones totales proporcionaría combinaciones de unión al ligando. Cualquier porcentaje mayor demuestra que los apareamientos distintos a los pares originales también son capaces de unirse a NPN. Los resultados demuestran que el 27 por ciento de los clones aislados se unieron a NPN, lo que indica un aumento 5,8 veces mayor del tamaño de los receptores de la genoteca capaces de unirse a NPN tras su combinación aleatoria. Esto demostró que el aumento está limitado a aquellos clones que se unen a NPN. Otros miembros de la genoteca revuelta aleatoriamente tienen la capacidad de unirse a diversos ligandos distintos de NPN. De este modo, se demostró que la combinación aleatoria aumenta la diversidad.

También se puede aumentar la complejidad de la genoteca usando los procedimientos descritos en la presente memoria para mutar secuencias de nucleótidos en una genoteca pre-existente de secuencias. Dicho en términos de
60 diferencias en los residuos de aminoácido para un polipéptido de fusión expresado, puede haber potencialmente un aumento veinte veces mayor del tamaño de la genoteca por cada posición de residuo de aminoácido que sea diana de una mutación aleatoria.

Por ejemplo, mediante el uso de una mutagénesis dirigida a la región determinante de la complementariedad (CDR) de los genes de anticuerpo según lo descrito en los ejemplos, una región lineal de 16 residuos de aminoácido fue diana de una mutación aleatoria. Partiendo de una sola especie y mutando las 16 posiciones de residuo por medio de todas las combinaciones posibles con una selección de 20 aminoácidos diferentes se produciría teóricamente una genoteca de 20^{16} especies diferentes, o de 6×10^{20} especies diferentes.

ES 2 315 612 T3

Según lo descrito en la presente memoria, una ventaja particular de un fago filamentosos de la presente invención es que es posible segregar la molécula de ADN presente en la partícula de fago, y codificante de uno o ambos miembros del receptor heterodimérico, de otras moléculas de ADN presentes en la genoteca en base a la presencia del polipéptido de fusión expresado en concreto sobre la superficie de la partícula de fago.

5 El aislamiento (la segregación) de una molécula de ADN codificante de uno o ambos miembros de un receptor heterodimérico se realiza mediante la segregación de la partícula de fago filamentosos que contiene el gen o los genes de interés lejos de la población de otras partículas de fago que comprenden la genoteca. La segregación de las partículas de fago implica la separación física y la propagación de las partículas de fago individuales lejos de otras partículas de la genoteca. Los procedimientos para la separación física de las partículas de fago filamentosos para producir partículas individuales y la propagación de las partículas individuales para formar poblaciones de fagos de la progenie derivadas de la partícula segregada individual son conocidos en las técnicas sobre fagos filamentosos.

15 Un procedimiento de separación preferido implica la identificación del heterodímero expresado sobre la superficie de la partícula de fago por medio de una especificidad de unión al ligando ente la partícula de fago y un ligando preseleccionado. El uso ejemplar y preferido es el uso de procedimientos de “cribado” mediante los cuales se pone en contacto una suspensión de partículas de fago con un ligando (antígeno) en fase sólida y se deja que se unan específicamente (o inmunorreaccionan cuando el heterodímero incluye un dominio variable de inmunoglobulina). Tras la unión, se lavan las partículas no unidas de la fase sólida, siendo las partículas de fago unidas la que contienen receptor heterodimérico específico del ligando (heterodímero) en su superficie. Entonces se pueden recuperar las partículas unidas mediante la elución de la partícula unida desde la fase sólida, comúnmente mediante el uso de disolventes acuosos que interfieran con la interacción del ligando-receptor. El disolvente típico incluye tampones que tienen fuerza iónica elevada, bajo pH o una cantidad de ligando competente soluble suficiente para interrumpir la interacción de unión de receptor-ligando.

25 Un procedimiento alternativo para separar una partícula de fago basado en la especificidad por el ligando del heterodímero expresado en la superficie procedente de una población de partículas consiste en precipitar las partículas de fago de la fase en disolución mediante en entrecruzamiento con el ligando. En el ejemplo 4c, se describe detalladamente un procedimiento de entrecruzamiento y precipitación ejemplar y preferido.

30 El uso de procedimientos de segregación de partículas anterior proporciona un medio para rastrear una población de partículas de fago filamentosos presente en una genoteca de fagos de esta invención. Según lo aplicado a una genoteca de fagos, se puede utilizar el rastreo para enriquecer la genoteca de una o más partículas que expresen un heterodímero que tenga una especificidad de unión por un ligando preseleccionado. Cuando se diseña la genoteca para que contenga múltiples especies de heterodímeros, todos con cierta medida detectable de actividad de unión al ligando, pero que difieren en la estructura proteínica, la antigenicidad, la afinidad o avidéz de unión al ligando y similares, se pueden utilizar los procedimientos de rastreo consecutivamente para producir primero una genoteca enriquecida en una especificidad de unión preseleccionada y producir luego una segunda genoteca más enriquecida mediante un mayor rastreo que comprenda una o más partículas de fago aisladas. Los procedimientos para medir actividades de unión a ligandos, la antigenicidad e interacciones similares entre un ligando y un receptor son conocidos en general y no se tratan en mayor profundidad, pues no son características esenciales de la presente invención.

45 De este modo, en un aspecto, una genoteca de fagos es una población de partículas enriquecida en una especificidad de unión por un ligando preseleccionado.

En otro aspecto, una genoteca de fagos comprende una población de partículas en la que cada partícula contiene al menos un polipéptido de fusión de esta invención sobre la superficie de la partícula de fago. La cantidad real de polipéptido de fusión presente sobre la superficie de una partícula de fago depende, en parte, de la elección del anclaje a la membrana de la cubierta proteínica presente en el polipéptido de fusión.

50 Cuando el anclaje deriva de cpIII, hay comúnmente de aproximadamente 1 a 4 polipéptidos de fusión por cada partícula de fago. Cuando el anclaje deriva de cpVIII, que es la más preferida, existe la posibilidad de cientos de polipéptidos de fusión sobre la superficie de la partícula dependiendo de las condiciones de crecimiento y de otros factores según lo tratado en la presente memoria. La cantidad real de polipéptidos de fusión presentes sobre una partícula de fago se puede ajustar controlando la cantidad “capturada” por la partícula de fago cuando está siendo sintetizada en una célula huésped.

60 Comúnmente, una partícula de fago de una genoteca de esta invención contiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 polipéptidos de fusión derivados de cpVIII sobre la superficie de cada partícula, y más preferiblemente, de aproximadamente 20 a 50 polipéptidos de fusión por partícula. Las cantidades ejemplares de polipéptido de fusión superficial se muestran con las micrografías electrónicas descritas en el ejemplo 4a, que describen partículas que tienen de aproximadamente 20 a 24 polipéptidos de fusión derivados de cpVIII por partícula.

65 En otro aspecto, la presente revelación contempla una población de partículas de fago que son la progenie de una sola partícula y, por tanto, todas expresan el mismo heterodímero sobre la superficie de la partícula. Tal población de fagos es homogénea y derivada clónicamente, y por tanto, proporciona una fuente para expresar grandes cantidades de un determinado polipéptido de fusión. En el ejemplo 4, se describe una población de fagos clónicamente homogénea ejemplar.

ES 2 315 612 T3

Una partícula de fago filamentoso de una genoteca de esta invención se produce mediante procedimientos de preparación de partículas de fago filamentoso estándar y depende de la presencia de un vector de expresión de ADN de esta invención de un origen de replicación de fago filamentoso según lo descrito en la presente memoria para proporcionar la señales necesarias para (1) la producción de una forma replicativa de fago filamentoso monocatenaria y (2) el empaquetado de la forma replicativa en una partícula de fago filamentoso. Tal molécula de ADN se puede empaquetar cuando esté presente en un huésped de célula bacteriana tras la introducción de una complementariedad genética para proporcionar las proteínas de fago filamentoso requeridas para la producción de partículas de fago infeccioso. Un procedimiento preferido y típico para la complementariedad genética consiste en infectar una célula huésped bacteriana que contiene un vector de expresión de ADN de esta invención con un fago filamentoso auxiliar, proporcionando así los elementos genéticos necesarios para el ensamblaje de las partículas de fago. Los procedimientos de rescate de auxiliares ejemplares se describen en la presente memoria en el ejemplo 2, y por Short *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 16:7563-7600 (1988).

El nivel de receptor heterodimérico capturado sobre la superficie de una partícula de fago filamentoso durante el procedimiento de extrusión de partículas de fago de la célula huésped se puede controlar mediante una variedad de procedimientos. En un aspecto, los niveles de polipéptidos de fusión se controlan mediante el uso de promotores potentes en el primer y segundo cistrón para expresar los polipéptidos, tal que la transcripción de los cistrones del polipéptido de fusión tenga lugar a una velocidad relativa más elevada que la velocidad de transcripción del gen cpVIII en el fago auxiliar. En otro aspecto, el fago auxiliar puede tener una mutación ámbar en el gen para expresar cpVIII, tal que se transcriba menos cpVIII de tipo natural en la célula huésped que los polipéptidos de fusión, conduciendo a mayores proporciones de polipéptido de fusión en comparación con cpVIII durante el procedimiento de extrusión.

En otro aspecto, se puede controlar la cantidad de receptor heterodimérico sobre la superficie de las partículas de fago controlando el tiempo transcurrido entre la expresión de los polipéptidos de fusión y la super-infección realizada por el fago auxiliar. Tras la introducción del vector de expresión en la célula huésped, mayores tiempos de retraso antes de la adición del fago auxiliar permitirán una mayor acumulación de polipéptidos de fusión en la célula huésped, aumentando así la cantidad de polipéptido de fusión capturado por la partícula de fago en extrusión.

G. Procedimientos de diagnóstico

La presente revelación también describe un sistema de diagnóstico, preferiblemente en forma de equipo, para analizar la presencia de un ligando preseleccionado, o un antígeno, en una muestra en la que sea deseable detectar la presencia, y preferiblemente, la cantidad, del ligando o del antígeno en una muestra según los procedimientos de diagnóstico descritos en la presente memoria.

La muestra puede ser un tejido, un extracto de tejido, una muestra de fluido o una muestra de fluido corporal, tal como sangre, plasma o suero.

El sistema de diagnóstico incluye, en una cantidad suficiente para realizar al menos un análisis, un fago filamentoso o un receptor heterodimérico de unión a ligandos según la presente invención, como un reactivo envasado por separado.

Los sistemas de diagnóstico ejemplares para detectar un ligando preseleccionado en fase sólida y utilizar un fago filamentoso de esta invención se describen en el apartado de ejemplos.

Las instrucciones de uso del/de los reactivo/s envasados están por lo común incluidas.

Como se usa en la presente memoria, el término “envase” se refiere a una matriz sólida o material tal como vidrio, plástico (p.ej., polietileno, polipropileno o policarbonato), papel, papel de aluminio y similares capaz de contener en unos límites fijos un receptor heterodimérico, fago filamentoso o una genoteca de fagos de la presente invención. De este modo, por ejemplo, un envase puede ser un vial de vidrio usado para contener cantidades en miligramos de una preparación de fago marcada contemplada, o puede ser un pocillo de placa de microvaloración al que se hayan fijado operativamente cantidades micrográficas de un receptor o partícula(s) de fago contemplados, i.e., se hayan unido para que sean capaces de unir un ligando.

Las “instrucciones de uso” incluyen comúnmente una expresión tangible que describe la concentración de reactivo o al menos un parámetro del procedimiento de análisis tal como las cantidades relativas de reactivo y de la muestra por ser mezcladas, los períodos de tiempo de mantenimiento para las mezclas de reactivo/muestras, la temperatura, las condiciones de tamponamiento y similares.

Un sistema de diagnóstico de la presente revelación preferiblemente también incluye un marcador o un medio indicador capaz de señalar la formación de un complejo de reacción de unión que contenga un receptor heterodimérico de unión a un ligando o un fago que forme un complejo con el ligando preseleccionado.

El término “complejo”, como se usa en la presente memoria, se refiere al producto de una reacción de unión específica tal como una reacción de fago-ligando o de receptor-ligando. Los complejos ejemplares son productos de inmunorreacción.

ES 2 315 612 T3

Como se usa en la presente memoria, los términos “marcador” y “medio indicador” en sus diversas formas gramaticales se refieren a átomos y moléculas simples que están bien directa o indirectamente implicados en la producción de una señal detectable que indique la presencia de un complejo. Se puede unir cualquier marcador o medio indicador a o incorporarse en un polipéptido expresado o una partícula de fago que se use en un procedimiento de diagnóstico. Tales marcadores son conocidos por sí mismos en Química de Diagnóstico Clínico y constituyen una parte de esta invención sólo en la medida en que se utilizan con procedimientos y/o sistemas de proteínas nuevas de otro tipo.

El medio de marcaje puede ser un agente de marcaje fluorescente que se una químicamente a anticuerpos o antígenos sin desnaturalizarlos para formar un fluorocromo (colorante) que sea un trazador inmunofluorescente útil. Los agentes de marcaje fluorescentes adecuados son los fluorocromos tales como isocianato de fluoresceína (FIC), isotiocianato de fluoresceína (FITC), cloruro de 5-dimetilamin-1-naftalensulfonilo (DANSC), isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), lisamina, sulfonil-cloruro de rodamina 8200 (RB 200 SC) y similares. En DeLuca, “Immunofluorescence Analysis”, en *Antibody As a Tool*. Marchalonis, *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Ltd., pp. 189-231 (1982), se encuentra una descripción de técnicas de análisis de inmunofluorescencia.

En aspectos preferidos, el grupo indicador es una enzima, tal como peroxidasa de rábano picante (HRP), glucosa oxidasa y similares. En casos en los que el principal grupo indicador es una enzima tal como HRP o glucosa oxidasa, se necesitan más reactivos para visualizar la formación de un complejo de receptor-ligando (inmunorreactivo). Tales reactivos adicionales para la HRP incluyen el peróxido de hidrógeno y un precursor colorante de la oxidación tal como diaminobencidina. Otro reactivo útil con la glucosa oxidasa es el ácido 2,2'-amino-di-(3-etil-bencitiazolin-G-sulfónico (ABTS)).

Los elementos radiactivos también son útiles agentes de marcaje y se usan de manera ilustrativa en la presente memoria. Un agente de radiomarcaje ejemplar es un elemento radiactivo que produce emisiones de rayos gamma. Los elementos que emiten rayos gamma, tales como ^{124}I , ^{125}I , ^{128}I , ^{132}I y ^{51}Cr representan una clase de grupos indicadores de elementos radiactivos productores de emisiones de rayos gamma. Se prefiere particularmente el ^{125}I . Otro grupo de medios de marcaje útiles son aquellos elementos tales como ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O y ^{13}N que emiten positrones. Los positrones así emitidos producen rayos gamma tras encontrarse con electrones presentes en el cuerpo del animal. También es útil un emisor beta, tal como el ^{3}H .

La unión de marcadores, i.e., el marcaje de polipéptidos y proteínas es conocida en la técnica. Por ejemplo, se pueden marcar proteínas o fagos mediante la incorporación metabólica de aminoácidos que contienen radioisótopos proporcionados como un componente del medio de cultivo. Véase, por ejemplo, Galfre *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 73:3-46 (1981). Las técnicas de conjugación o acoplamiento de proteínas mediante grupos funcionales activados son particularmente aplicables. Véase, por ejemplo, Aurameas, *et al.*, *Scand. J. Immunol.*, Vol. 8 Supl. 7:7-23 (1978), Rodwell *et al.*, *Biotech.*, 3:889-694 (1984), y la patente estadounidense n.º: 4.493.795.

Los sistemas de diagnóstico también pueden incluir, preferiblemente en un envase independiente, un agente de unión específico. Un “agente de unión específico” es una entidad molecular capaz de unir selectivamente una especie de reactivo de la presente invención o un complejo que contenga tal especie, pero que no sea propiamente un polipéptido o un fago de la presente invención. Los agentes de unión específica ejemplares son moléculas de anticuerpo, proteínas complementarias o fragmentos de las mismas, proteína A de *S. aureus*, y similares. Preferiblemente, el agente de unión específico une la especie reactiva cuando la especie está presente como parte de un complejo.

En aspectos preferidos, el agente de unión específico está marcado. Sin embargo, cuando el sistema de diagnóstico incluye un agente de unión específico que no está marcado, el agente se usa comúnmente como un medio de amplificación o un reactivo. En estos aspectos, el agente de unión específica marcado es capaz de unir específicamente el medio de amplificación cuando el medio de amplificación está unido a un complejo que contenga una especie reactiva.

Los equipos de diagnóstico de la presente revelación se pueden usar en un formato de “ELISA” para detectar la cantidad de un ligando preseleccionado en una muestra de fluido. “ELISA” se refiere a un análisis de inmunoabsorción ligado a una enzima que emplea un anticuerpo o un antígeno unido a una fase sólida y un conjugado de enzima-antígeno o de enzima-anticuerpo para detectar y cuantificar la cantidad de un antígeno presente en una muestra, y es fácilmente aplicable a los presentes procedimientos. En el capítulo 22 de la cuarta edición de “Basic and clinical Immunology” por D.P. Sites *et al.*, publicado por Lange Medical Publications de Los Altos, CA en 1982 y en las patentes estadounidenses n.º: 3.654.090; 3.850.752; y 4.016.043, se encuentra una descripción de la técnica de ELISA.

De este modo, en algunos aspectos, se puede fijar un polipéptido o un fago de la presente invención a una matriz sólida para formar un soporte sólido que comprenda un envase en los presentes sistemas de diagnóstico.

Comúnmente, un reactivo se fija a una matriz sólida mediante adsorción desde un medio acuoso, aunque es posible usar otros modos de fijación aplicables a las proteínas y los polipéptidos que son conocidos por los expertos en la técnica. En la presente memoria, se describen procedimientos de adsorción ejemplares.

También se conocen en la técnica matrices sólidas útiles. Tales materiales son agua insoluble e incluyen dextrano entrecruzado disponible con la marca comercial SEPHADEX de Pharmacia Fine Chemicals (Piscataway, NJ); agorosa; perlas de poliestireno, perlas de aproximadamente 1 micrómetro a aproximadamente 5 milímetros de diámetro disponibles en Abbott Laboratories de Chicago del Norte, IL; cloruro de polivinilo, poliestireno, poliacrilamida entre-

ES 2 315 612 T3

cruzada, tejidos basados en nitrocelulosa o nailon tales como láminas, bandas o álabes; o tubos, placas o los pocillos de una placa de microvaloración tal como aquéllos fabricados con poliestireno o polivinilcloruro.

La especie reactiva, el agente de unión específica marcado o el agente de amplificación de cualquier sistema de diagnóstico descrito en la presente memoria se puede proporcionar en solución, como una dispersión líquida o como un polvo sustancialmente seco, p.ej., en forma liofilizada. Cuando el medio indicador es una enzima, también se puede proporcionar el sustrato enzimático en un envase separado de un sistema. También se puede incluir un soporte sólido tal como una placa de microvaloración y uno o más tampones como elementos envasados por separado en ese sistema de análisis de diagnóstico.

Los materiales de envasado tratados en la presente memoria en relación con los sistemas de diagnóstico son aquéllos utilizados habitualmente en los sistemas de diagnóstico.

H. Procedimientos de análisis

La presente revelación contempla diversos procedimientos de análisis para determinar la presencia, y preferiblemente, la cantidad de un ligando preseleccionado, comúnmente presente en una composición acuosa, tal como una muestra de fluido biológico, usando un receptor heterodimérico o un fago de esta invención como un reactivo de unión a un ligando para formar un producto de reacción de unión cuya cantidad se refiere, bien directa o indirectamente, a la cantidad del ligando preseleccionado de la muestra.

Los expertos en la técnica entenderán que hay numerosos procedimientos químicos de diagnóstico clínico conocidos en los que se puede usar un reactivo de unión de esta invención para formar un producto de reacción de unión cuya cantidad se refiera a la cantidad del ligando de una muestra.

Se pueden emplear diversos protocolos heterogéneos y homogéneos, bien competitivos o no competitivos, en la realización de un procedimiento de análisis revelado en la presente memoria.

En un aspecto, la revelación contempla un ensayo de unión directa que usa un receptor heterodimérico de unión a un ligando de esta revelación como reactivo de unión para detectar la presencia de un ligando preseleccionado con el que se une el receptor. El procedimiento comprende las etapas de a) mezclar una muestra sospechosa de contener un antígeno preseleccionado con un receptor heterodimérico de unión a un ligando que se una al ligando preseleccionado en condiciones de unión suficientes para que el receptor heterodimérico de unión del ligando se una al ligando y forme un complejo de ligando-receptor; b) detectar la presencia del complejo de ligando-receptor o del receptor heterodimérico de unión al ligando en el complejo.

Las condiciones de unión son aquéllas que mantienen la actividad de unión al ligando del receptor. Esas condiciones incluyen un intervalo de temperaturas de aproximadamente 4 a 50 grados centígrados, un intervalo de valores de pH de aproximadamente 5 a 9 y una fuerza iónica que varía de aproximadamente la del agua destilada a la de aproximadamente el cloruro sódico uno molar.

La etapa de detección se puede dirigir, como es sabido en las técnicas inmunológicas, a bien el complejo o al reactivo de unión (el componente receptor del complejo). De este modo, se puede utilizar un reactivo de unión secundario tal como un anticuerpo específico del receptor.

Alternativamente, el complejo puede ser detectable en virtud de haberse usado una molécula de receptor marcada, mediante la cual el complejo queda marcado. La detección en este caso comprende detectar el marcador presente en el complejo.

En un aspecto preferido, el receptor heterodimérico de unión a un ligando se proporciona como un acoplamiento sobre una partícula de fago filamentoso, i.e., sobre la superficie del fago. Un análisis ejemplar que usa un fago filamentoso se describe en un formato de ELISA en el apartado de ejemplos.

En otra realización, se marca detectablemente una partícula de fago filamentoso, tal como mediante un radioisótopo incorporado en una proteína o un ácido nucleico del fago según lo descrito en la presente memoria. En este aspecto, la detección comprende detectar el marcador del complejo, detectando así la presencia del ligando en el complejo.

Otro procedimiento de diagnóstico utiliza la multivalencia de una partícula de fago filamentoso para entrecruzarse con un ligando, formando así una agregación de múltiples ligandos y partículas de fago que producen un agregado precipitable. Este aspecto es comparable con los procedimientos conocidos de precipitación inmunológica. Este aspecto comprende las etapas de mezclar una muestra con una pluralidad de partículas de fago de esta invención para formar una mezcla de unión en condiciones de unión, seguida por la etapa de separación para aislar los complejos de unión formados. Comúnmente, el aislamiento se realiza mediante centrifugación o filtración para eliminar el agregado de la mezcla. La presencia de complejos de unión indica la presencia del ligando preseleccionado por ser detectado.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, pero no limitar, el alcance de la invención.

5 Los aspectos de los ejemplos que no se refieren específicamente a la invención reivindicada se incluyen únicamente a modo de ilustración y comparación.

1. Construcción de un vector de expresión dicistrónico para producir un receptor heterodimérico sobre partículas de fago

10

Para obtener un sistema vectorial destinado a generar un gran número de fragmentos de anticuerpos Fab que puedan ser rastreados directamente, se han construido previamente genotecas de expresión en bacteriófago Lambda según lo descrito en Huse *et al.*, *Science*, 246:1275-1281 (1989). Estos sistemas no contenían características de diseño que proporcionaran el Fab expresado por ser dirigido a la superficie de una partícula de fago filamentoso.

15

El criterio principal usado en la selección de un sistema vectorial fue la necesidad de generar un mayor número de fragmentos Fab que pudieran ser rastreados directamente. El bacteriófago Lambda fue seleccionado como punto inicial para desarrollar un vector de expresión por tres razones. En primer lugar, el empaquetado *in vitro* del ADN de fago era el procedimiento más eficaz de reintroducción de ADN en células huésped. En segundo lugar, era posible detectar la expresión de proteínas a nivel de placas de fagos simples. Finalmente, el rastreo de las genotecas de fagos implicaba comúnmente menor dificultad con una unión inespecífica. La alternativa, los vectores de clonación de plásmidos, sólo es ventajosa en el análisis de clones una vez identificados. Esta ventaja no se perdía en el presente sistema, debido al uso de un vector de expresión dicistrónico tal como pCombVIII, mediante el que se permitía la escisión de un plásmido que contenía la cadena pesada, la cadena ligera o insertos de expresión de Fab.

25

a. Construcción del vector de expresión dicistrónico pCOMB

(i) Preparación de Lambda ZapTM II

30

Lambda ZapTM II es un derivado del Lambda Zap original (ATCC N.º 40.298) que mantiene todas las características del Lambda Zap original incluyendo 6 sitios de clonación únicos, la expresión de proteínas de fusión y la capacidad de escindir rápidamente el inserto en forma de un fagémido (Bluescript SK-), pero carece de la mutación SAM 100, permitiendo su crecimiento sobre muchas cepas no Sup F, incluyendo XL1-Blue. El Lambda ZapTM II fue construido según lo descrito en Short *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 16:7583-7600, 1988, reemplazando el gen S de Lambda contenido en un fragmento de ADN 4254 pares de bases (pb) producido mediante la digestión de Lambda Zap con la enzima de restricción Nco I. Este fragmento de ADN de 4254 pb fue reemplazado por el fragmento de ADN de 4254 pb que contenía el gen S de Lambda aislado de gt10 de Lambda (ATCC N.º: 40.179) tras digerir el vector con la enzima de restricción Nco I. El fragmento de ADN de 4254 pb aislado de gt10 de Lambda fue ligado en el vector Lambda Zap original usando ADN ligasa de T₄ y protocolos estándar tales como los descritos en "Molecular Biology" Ausubel *et al.*, eds., John Wiley and Sons, NY, 1987, para formar Lambda ZapTM II.

40

(ii) Preparación de Lambda Hc2

45

Para expresar una pluralidad de homólogos de ADN codificantes de V_H en una célula huésped de *E. coli*, se construyó un vector denominado Lambda Hc2. El vector proporcionaba lo siguiente: la capacidad de colocar los homólogos de ADN codificantes de V_H en el propio marco de lectura; un sitio de unión al ribosoma según lo descrito por Shine *et al.*, *Nature*. 254:34, 1975; una secuencia líder que dirigiera la proteína expresada hacia el espacio periplásmico denominado señal de secreción peIB; una secuencia de polinucleótido que codificara un epítipo conocido (epítipo tag); y además un polinucleótido que codificara una proteína espaciadora entre el homólogo de ADN codificante de V_H y el polinucleótido codificante del epítipo tag. Lambda Hc2 ya ha sido descrito anteriormente por Huse *et al.*, *Science*, 246:1275-1281 (1989).

50

Para preparar Lambda Hc2, se construyó una secuencia de ADN sintético que contenía todas las características anteriores diseñando segmentos de polinucleótido monocatenarios de 20-40 bases que se hibridaran entre sí y formaran la secuencia de ADN sintética bicatenaria mostrada en la figura 3. Los segmentos de polinucleótido monocatenarios individuales se muestran en la tabla 3.

55

60

Los polinucleótidos N2, N3, N9-4, N11, N10-5, N6, N7 y N8 (Tabla 3) fueron quinados mediante la adición de 1 µl de cada polinucleótido, 0,1 microgramos/microlitro (µg/µl) y 20 unidades de polinucleótido quinasa de T₄ a una solución que contenía Tris-HCl 70 mM, pH 7,6; MgCl₂ 10 mM, ditiotreitól 5 mM (DTT), beta-mercaptoetanol 10 mM, 500 microgramos por mililitro (µg/ml) de albúmina de suero bovino (BSA). La solución se mantuvo a 37 grados centígrados (37°C) durante 30 minutos y la reacción se detuvo manteniendo la solución a 65°C durante 10 minutos. Se añadieron los dos últimos polinucleótidos, 20 ng de polinucleótidos N1 y polinucleótidos N12 a la anterior solución de reacción de la quinasa junto con un volumen de 1/10 de una solución que contenía Tris-HCl 20,0 mM, pH 7,4; MgCl₂ 2,0 mM, NaCl 50,0 mM. Se calentó esta solución hasta 70°C durante 5 minutos y se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente, aproximadamente 25°C, durante 1,5 horas en un vaso de precipitados de 500 ml de agua. Durante este período de tiempo, los 10 polinucleótidos se aparearon para formar el inserto de ADN sintético bicatenario mostrado en la figura 3. Los polinucleótidos individuales fueron unidos mediante enlace covalente entre sí para estabilizar el

65

ES 2 315 612 T3

inserto de ADN sintético añadiendo 40 μ l de la reacción anterior a una solución que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; MgCl₂ 7 mM, DTT 1M, adenosina trifosfato 1 mM (ATP) y 10 unidades de ADN ligasa de T₄. Se mantuvo esta solución a 37°C durante 30 minutos y luego se desactivó la ADN ligasa de T₄ manteniendo la solución a 65°C durante 10 minutos. Se quinaron los polinucleótidos finales mezclando 52 μ l de la anterior reacción, 4 μ l de una solución que contenía ATP 10 mM y 5 unidades del polinucleótido quinasa de T₄. Se mantuvo esta solución a 37°C durante 30 minutos y luego se desactivó el polinucleótido quinasa de T₄ manteniendo la solución a 65°C durante 10 minutos.

TABLA 3

SEC ID N°:
(22) N1) 5' GGCCGCAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCAT 3'
(23) N2) 5' AATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATT 3'
(24) N3) 5' GTTATTACTCGCTGCCCAACCAGCCATGGCCC 3'
(25) N6) 5' CAGTTTCACCTGGGCCATGGCTGGTTGGG 3'
(26) N7) 5' CAGCGAGTAATAACAATCCAGCGGCTGCCGTAGGCAATAG 3'
(27) N8) 5' GTATTTCAATTATGACTGTCTCCTTGAAATAGAATTTGC 3'
(28) N9-4) 5' AGGTGAAACTGCTCGAGATTTCTAGACTAGTTACCCGTAC 3'
(29) N10-5) 5' CGGAACGTCGTACGGGTAAGTCTAGAAATCTCGAG 3'
(30) N11) 5' GACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTTCG 3'
(31) N12) 5' TCGACGAATTCTATTAAGAACCGTAGTC 3'

Se unió el inserto de ADN sintético completado directamente en el vector Lambda Zap™ II descrito en el ejemplo 1a(i) que había sido digerido previamente con las enzimas de restricción, Not I y Xho I. Se empaquetó la mezcla de unión según las instrucciones del fabricante usando extracto de empaquetamiento Gigapack II Gold disponible en Stratagene, La Jolla, California. Se colocó en una placa la mezcla de unión empaquetada sobre células XL1-Blue (Stratagene). Se quitaron las partes centrales de las placas con Lambda individuales y se retiraron los insertos según el protocolo de separación *in vivo* para Lambda Zap™ II proporcionado por el fabricante (Stratagene). Este protocolo de separación *in vivo* movió el inserto clonado del vector Lambda Hc2 y a un vector de fagémido para facilitar la manipulación y la secuenciación. La exactitud de las anteriores etapas de clonación fue confirmada mediante la secuenciación del inserto usando el procedimiento desoxi de Sanger descrito por Sanger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 74:5463-5467, (1977) y usando las instrucciones del fabricante del equipo de secuenciación de ³⁵S-ATP con transcriptasa inversa del AMV (Stratagene). En la figura 3, se muestra la secuencia del inserto de ADN sintético bicatenario resultante del vector de expresión de V_H (Lambda Hc2). La secuencia de cada cadena (parte superior y parte inferior) de Lambda Hc2 figuran en el listado secuencial como SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2, respectivamente. En la figura 4, se muestra el vector de expresión Lambda Hc2 resultante.

(iii) Preparación de Lambda Lc2

Para expresar una pluralidad de homólogos de ADN codificantes de V_L en una célula huésped de *E. coli*, se construyó un vector denominado Lambda Lc2 con la capacidad de colocar los homólogos de ADN codificante de V_L en el marco de lectura adecuado, de proporcionar un sitio de unión al ribosoma según lo descrito por Shine *et al.*, *Nature*, 254:34 (1975), de proporcionar la señal de secreción de la secuencia líder del gen *peIB* que ha sido previamente usada para secretar satisfactoriamente fragmentos Fab en *E. coli* por Lei *et al.*, *J. Bac.*, 169:4379 (1987) y Better *et al.*, *Science*. 240:1041 (1988), y también de proporcionar un polinucleótido que contiene un sitio de endonucleasa de restricción para la clonación. Lambda Lc2 ya ha sido descrito anteriormente por Huse *et al.*, *Science*, 246:1275-1261 (1989).

Se construyó una secuencia de ADN sintético que contenía todas las características anteriores diseñando segmentos de polinucleótido monocatenarios de 20-60 bases que se hibridarían entre sí, formando la secuencia de ADN sintética bicatenaria mostrada en la figura 5. En la tabla 4, se muestra la secuencia de cada segmento de polinucleótido monocatenario individual (01-08) de la secuencia de ADN sintético bicatenario.

Los polinucleótidos 02, 03, 04, 05, 06 y 07 (tabla 4) fueron quinados añadiendo 1 μ l (0,1 μ g/ μ l) de cada polinucleótido y 20 unidades de polinucleótido quinasa de T₄ a una solución que contenía Tris-HCl 70 mM, pH 7,6; MgCl 10 mM; DTT 5 mM; beta-mercaptoetanol 10 mM, 500 mg/ml de BSA. La solución se mantuvo a 37°C durante 30 minutos y la reacción se detuvo manteniendo la solución a 65°C durante 10 minutos. Se añadieron los 20 ng de cada uno de los dos polinucleótidos finales, 01 y 08, a la anterior solución de reacción de quinasamiento junto con un

ES 2 315 612 T3

volumen de 1/10 de una solución que contenía Tris-HCl 20,0 mM, pH 7,4; MgCl 2,0 mM y cloruro de sodio (NaCl) 15,0 mM. Se calentó esta solución hasta 70°C durante 5 minutos y se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente, aproximadamente 25°C, durante 1,5 horas en un vaso de precipitados de 500 ml de agua. Durante este período de tiempo, los 8 polinucleótidos se aparearon para formar el inserto de ADN sintético bicatenario mostrado en la figura 5.

5 Los polinucleótidos individuales fueron unidos mediante enlace covalente entre sí para estabilizar el inserto de ADN sintético añadiendo 40 μ l de la reacción anterior a una solución que contenía 50 ml de Tris-HCl, pH 7,5; 7 ml de MgCl; 1 mm de DTT, 1 mm de ATP y 10 unidades de ADN ligasa de T₄. Se mantuvo esta solución a 37°C durante 30 minutos y luego se desactivó la ADN ligasa de T₄ manteniendo la solución a 65°C durante 10 minutos. Se quinaron los polinucleótidos finales mezclando 52 μ l de la anterior reacción, 4 μ l de una solución que contenía ATP 10 mM y 5

10 unidades de polinucleótido quinasa de T₄. Se mantuvo esta solución a 37°C durante 30 minutos y luego se desactivó el polinucleótido quinasa de T₄ manteniendo la solución a 65°C durante 10 minutos.

TABLA 4

15

20

25

30

SEC ID N°:
(32) 01) 5' TGAATTCTAACTAGTCGCCAAGGAGACAGTCAT 3'
(33) 02) 5' AATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATT 3'
(34) 03) 5' GTTATTACTCGCTGCCCAACCAGCCATGGCC 3'
(35) 04) 5' GAGCTCGTCAGTTCTAGAGTTAAGCGGCCG 3'
(36) 05) 5' GTATTTATTATGACTGTCTCCTTGCGACTAGTTTAGAA-TTCAAGCT 3'
(37) 06) 5' CAGCGAGTAATAACAATCCAGCGGCTGCCGTAGGCAATAG 3'
(38) 07) 5' TGACGAGCTCGGCCATGGCTGGTTGGG 3'
(39) 08) 5' TCGACGGCCGCTTAACTCTAGAAC 3'

35

40

45

Se unió el inserto de ADN sintético completado directamente en el vector Lambda ZapTM II descrito en el ejemplo 1(a)(i), que había sido digerido previamente con las enzimas de restricción, Sac I y Xho I. Se empaquetó la mezcla de unión según las instrucciones del fabricante usando extracto de empaquetamiento Gigapack II Gold disponible (Stratagene). Se colocó en una placa la mezcla de unión empaquetada sobre células XL1-Blue (Stratagene). Se retiraron las partes centrales de las placas de Lambda individuales y se separaron los insertos según el protocolo de separación *in vivo* para Lambda ZapTM II proporcionado por el fabricante (Stratagene). Este protocolo de separación *in vivo* movió el inserto clonado del vector Lambda Lc2 y a un vector de fagémido para facilitar la manipulación y la secuenciación. La exactitud de las anteriores etapas de clonación fue confirmada mediante la secuenciación del inserto usando las instrucciones del fabricante del equipo de secuenciación de ³⁵S-ATPd con transcriptasa inversa del AMV (Stratagene). En la figura 5, se muestra la secuencia del inserto de ADN sintético bicatenario resultante del vector de expresión Lc2 (Lambda Lc2). Cada cadena figura por separado en el listado secuencial como SEC ID N°:3 y SEC ID N°: 4. En la figura 6, se representa mediante un diagrama esquemático el vector Lc2 resultante.

50

55

60

Un vector preferido para su uso en esta invención, denominado Lambda Lc3, es un derivado de Lambda Lc2 preparado anteriormente. Lambda Lc2 contiene un sitio de restricción de Spe I (ACTAGT) localizado en 3' con respecto al sitio de restricción de EcoR I y en 5' con respecto al sitio de unión al ribosoma de Shine-Dalgarno según lo mostrado en la secuencia de la figura 5 y en SEC ID N°: 3. También hay presente un sitio de restricción de Spe I en Lambda Hc2 según lo mostrado en las figuras 3 y 4, y en SEC ID N°: 1. Se construyó un vector combinatorio, denominado pComb, combinando las partes de Lambda Hc2 y Lc2 según lo descrito en el ejemplo 1a(iv) que figura a continuación. El vector pComb combinatorio resultante contenía dos sitios de restricción de Spe I, uno proporcionado por Lambda Hc2 y otro proporcionado por Lambda Lc2, con un sitio de EcoR I entre ellos. A pesar de la presencia de dos sitios de restricción de Spe I, los homólogos de ADN que tenían terminales cohesivos de Spe I y EcoR I fueron unidos direccionalmente satisfactoriamente en un vector de expresión pComb digerido previamente con Spe I y EcoR I según lo descrito en el ejemplo 1b que figura a continuación. La proximidad del sitio de restricción de EcoR I al sitio de Spe I en 3' proporcionada por el vector Lc2 inhibió la digestión completa del sitio de Spe I en 3'. De este modo, la digestión de pComb con Spe I and EcoR I no dio como resultado la retirada del sitio de EcoR I entre los dos sitios de Spe I.

65

Puede que no se desee la presencia del segundo sitio de restricción de Spe I para las uniones en un vector pComb digerido sólo con Spe I, pues la región entre los dos sitios sería eliminada. Por lo tanto, se produce un derivado de Lambda Lc2 carente del segundo sitio o del sitio de Spe I en 3', designado Lambda Lc3 digiriendo primero Lambda Lc2 con Spe I para formar un vector linealizado. Se rellenan los terminales para redondear los extremos que estén ligados entre sí para dar como resultado Lambda Lc3 carente de un sitio de Spe I. Lambda Lc3 es un vector preferido para su uso en la construcción de un vector combinatorio como el descrito a continuación.

ES 2 315 612 T3

(iv) Preparación de pComb

Se separaron los fagémidos de los vectores de expresión Lambda Hc2 o Lambda Lc2 usando un protocolo de separación *in vivo* descrito anteriormente. Se preparó ADN bicatenario a partir de células que contenían fagémidos según los procedimientos descritos por Holmes *et al.*, *anal. Biochem.*, 114:193 (1981). Los fagémidos resultantes de la separación *in vivo* contenían las mismas secuencias de nucleótidos para la clonación y expresión de fragmentos de anticuerpo que los vectores precursores, y se denominan fagémido Hc2 y Lc2, correspondientes a Lambda Hc2 y a Lc2, respectivamente.

Para la construcción del vector de fagémido combinatorio pComb, producido mediante la combinación de partes de fagémido Hc2 y fagémido Lc2, primero se digirió fagémido Hc2 con Sac I para eliminar el sitio de restricción localizado en 5' con respecto al promotor LacZ. Entonces se redondearon los extremos del fagémido linealizado con polimerasa de T₄ y se unieron para dar como resultado un fagémido Hc2 carente de un sitio de Sac I. El fagémido Hc2 modificado y el fagémido Lc2 fueron entonces digeridos mediante restricción por separado con Sea I y EcoR I para dar como resultado un fragmento de Hc2 que tenía de 5' a 3' los sitios de restricción de Sea I, Not I, Xho I, Spe I y EcoR I y un fragmento de Lc2 que tenía de 5' a 3' los sitios de restricción de EcoR I, Sac I, Xba I y Sac I. Entonces se unieron los fagémidos linealizados entre sí por sus respectivos extremos cohesivos para formar pComb, un fagémido circular que tiene una disposición lineal de los sitios de restricción de Not I, Xho I, Spe I, EcoR I, Sac I, Xba I, Not I, Apa I y Sea I. Entonces se insertó el vector de fagémido unido en un huésped bacteriano apropiado y se seleccionaron transformantes frente al antibiótico ampicilina.

Los transformantes resistentes a la ampicilina seleccionados fueron rastreados en cuanto a la presencia de dos sitios de Not I. El vector de fagémido combinatorio resistente a la ampicilina resultante fue denominado pComb, mostrándose su organización esquemática en la figura 7. El vector combinatorio resultante, pComb, constaba de una molécula de ADN que tiene dos casetes para expresar dos proteínas de fusión y que tiene secuencias de residuos de nucleótido para los siguientes elementos unidos operativamente enumerados en un sentido de 5' a 3': un primer casete constituido por un promotor LacZ inducible secuencia arriba del gen LacZ; un sitio de restricción de Not I; un sitio de unión al ribosoma; una secuencia líder de peIB; un espaciador; una región de clonación limitada por un sitio de restricción de Xho en 5' y de Spe I en 3'; un decapéptido tag seguido por las secuencias de terminación del control de la expresión; un sitio de restricción de EcoR I localizado en 5' con respecto a un segundo casete constituido por un sitio de unión al ribosoma de control de la expresión; una secuencia líder de peIB; una región espaciadora; una región de clonación limitada por el sitio de restricción de Sac I en 5' y de Xba I en 3' seguida por las secuencias de terminación del control de la expresión y un segundo sitio de restricción de Not I.

Un vector combinatorio preferido para su uso en esta invención, denominado pComb2, se construye combinando partes de fagémido Hc2 y de fagémido Lc3 según lo descrito anteriormente para preparar pComb. El vector combinatorio resultante, pComb2, está constituido por una molécula de ADN que tiene dos casetes idénticos a pComb para expresar dos proteínas de fusión de manera idéntica a pComb a excepción de que un segundo sitio de restricción de Spe I del segundo casete está eliminado.

b. Construcción de vectores pCombVIII y pCombIII para expresar proteínas de fusión que tienen un anclaje a la membrana de cubierta proteínica de bacteriófago

Debido a los múltiples sitios de clonación de restricción de endonucleasas, el vector de expresión de fagémido pComb preparado anteriormente es un útil vehículo de clonación para modificar la preparación de un vector de expresión de esta invención. Para llegar a ese fin, se digiere pComb con EcoR I y Spe I siguiendo con un tratamiento con fosfatasa para producir pComb linealizado.

(i) Preparación de pCombVIII

Se mezcló un producto de PCR producido en el ejemplo 2, y que tenía una secuencia de nucleótidos que define un dominio de anclaje a la membrana de la cubierta proteínica VIII (cpVIII) de bacteriófago filamentoso y los terminales cohesivos de Spe I y EcoR I, con el pComb linealizado para formar una mezcla de unión. El fragmento de PCR codificante del anclaje a la membrana de cpVIII fue unido direccionablemente en el vector de expresión de fagémido pComb por los correspondientes terminales cohesivos, lo que resultó en la formación de pCombVIII (también denominado pCombs). pCombVIII contiene un casete definido por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID N°: 116 de la base de nucleótido 1 a la base 269, y contiene una señal de secreción peIB unida operativamente al anclaje a la membrana de cpVIII.

Se preparó un vector de expresión de fagémido preferido para su uso en esta invención, denominado bien pComb2-VIII o pComb2-8, según lo descrito anteriormente uniendo direccionalmente el fragmento de PCR codificante del anclaje a la membrana de cpVIII en un vector de expresión de fagémido pComb2 por los terminales cohesivos de Spe I y EcoR I. El pComb2-8 sólo tenía un sitio de restricción de Spe I.

(ii) Preparación de pCombIII

Se construyó un vector de expresión de fagémido por separado usando secuencias codificante del dominio de anclaje a la membrana de cpIII de bacteriófago. Se preparó un producto de PCR que definía un anclaje a la membrana

ES 2 315 612 T3

de cpIII que contenía una secuencia de la región promotora LacZ en 3' con respecto al anclaje a la membrana para la expresión de la cadena ligera y los terminales cohesivos de Spe I y EcoR I según lo descrito para cpVIII, estando descrito en el ejemplo 2g. Entonces se unió el producto de PCR derivado de cpIII en el vector pComb2 linealizado que sólo tenía un sitio de Spe I para formar el vector pComb2-3 (también denominado pComb2-III).

5

Se preparó un vector de expresión de fagémido más preferido para su uso en esta invención que tenía más sitios de clonación de enzimas de restricción, denominado pComb-III' o pComb2-3', según lo descrito anteriormente para pComb2-3 con la adición de un fragmento de 51 pares de bases de pBluescript según lo descrito por Short *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 16:7583-7600 (1988) y disponible comercialmente en Stratagene. Para preparar pComb2-3', primero se digirió pComb2-3 con las enzimas de restricción Xho I y Spe I para formar un pComb2-3 linealizado. Se digirió el vector pBluescript con las mismas enzimas liberando un fragmento de 51 pares de bases que contenía los sitios de las enzimas de restricción Sal I, Acc I, Hinc II, Cla I, Hind III, EcoR V, Pst I, Sma I y BamH I. Se unió el fragmento de los 51 pares de bases en el vector pComb2-3 linealizado por los terminales cohesivos de Xho I y Spe I para formar pComb2-3'.

15

c. Construcción de vectores pCBAK que tienen un marcador de la resistencia al cloranfenicol

Para utilizar un gen marcador seleccionable diferente, tal como cloranfenicol acetil transferasa (CAT), para la selección de bacterias transformadas con un vector de esta invención, se desarrollaron vectores de expresión basados en pComb que tenían un gen codificante de CAT y fueron denominados vectores pCBAK. Los vectores pCBAK se preparan combinando partes de pCB y de pComb.

20

(i) Preparación de pCB

Se modificaron y combinaron vectores de fagémido pBluescript, pBC SK(-) y pBS SK(-) (Stratagene), para generar un tercer vector denominado pCB según lo descrito a continuación. Se digirió pBC SK(-), que contiene un gen marcador seleccionable de resistencia al cloranfenicol con Bst BI y se redondearon los extremos con polimerasa de T₄. Una segunda digestión con Pvu I permitió la retirada de un fragmento de 1 kilobase (kb) dejando un vector linealizado de 2,4 kb que conservaba el gen marcador seleccionable de la resistencia a CAT, un promotor LacZ inducible secuencia arriba del gen LacZ y una región de origen de ColE1. Se recuperó el fragmento de 2,4 kb. Se digirió el vector pBS SK(-) con Aat II y se redondearon los extremos con polimerasa de T₄. Una segunda digestión con Pvu I permitió el aislamiento de un fragmento de 800 pares de bases (pb) que contenía el origen de replicación de f1. La unión del fragmento de f1 de 800 pb derivado de pBS con el fragmento de pBC de 2,4 kb creó un vector precursor pCB que contenía un sitio de Sac I, un origen de replicación de f1, un gen marcador seleccionable de la resistencia a CAT, un origen de ColE1, un sitio de clonación múltiple (MCS) flanqueado por los promotores T₃ y T₇, y un promotor LacZ inducible secuencia arriba del gen LacZ.

35

El vector precursor pCB fue entonces digerido con Sac I y se redondearon los extremos con polimerasa de T₄. Entonces se volvió a unir el vector pCB tratado con polimerasa de T₄ para formar vector pCB, que carecía de un sitio de Sac I

40

(ii) Preparación de pCBAK0

Se digirió el vector pCB que contenía el gen marcador seleccionable de la resistencia a CAT con Sac II y Apa I, y se trató con fosfatasa para prevenir que se volviera a unir y para formar el vector pCB linealizado. Se digirió por restricción el vector pComb preparado en el ejemplo 1(a) (iv) con Sac II y Apa I para liberar un fragmento que contenía las secuencias de residuos de nucleótido que partían de 5' con respecto al promotor LacZ y se extendían más allá del extremo 3' del segundo sitio de Not I. Entonces se unió direccionalmente el fragmento de ADN de pComb de Sac II y Apa I en el vector pCB digerido de igual manera para formar el vector de expresión de fagémido pCBAK0. Los vectores de expresión pCBAK preferidos se construyen con pComb2. El vector de expresión pCBAK resultante sólo contenía un sitio de restricción de Spe I.

50

(iii) Preparación de pCBAK8

Para preparar un vector de expresión de fagémido basado en pCBAK que codificara un dominio de anclaje a la membrana de cubierta proteínica de bacteriófago en la proteína de fusión expresada, se linealizó el vector de clonación de fagémido pCB preparado en el ejemplo 1c(ii) mediante la digestión con Sac II y Apa I. Se digirió por restricción el vector de expresión de fagémido pCombVII preparado en el ejemplo 1b(i) con Sac II y Apa I para formar un fragmento que contenía una secuencia de residuos de nucleótido que partía de 5' con respecto al promotor LacZ y se extendía más allá del extremo 3' del segundo sitio de Not I. Se unió direccionalmente el fragmento en el vector de clonación pCB linealizado para formar el vector de expresión de fagémido pCBAK8.

60

(iv) Preparación de pCBAK3

Se construyó de manera similar el vector de expresión de fagémido, pCBAK3, para la expresión de proteína de fusión que tenía dominios de anclaje a la membrana de cpIII uniéndose direccionalmente el fragmento digerido por restricción con Sac II y Apa I procedente de pCombIII con el vector de clonación pCB linealizado con Sac II y Apa I.

65

2. Construcción de vectores de expresión dicistrónicos para expresar heterodímero anti-NPN sobre superficies de fago

En la puesta en práctica de este procedimiento, primero se dirigen la cadena pesada (Fd constituido por V_H y C_H1) y ligera (κ) (V_L , C_L) de los anticuerpos hacia el periplasma de *E. coli* para el ensamblaje de las moléculas de Fab heterodiméricas. Para obtener la expresión de genotecas de Fab de anticuerpos sobre una superficie de fago, las secuencias de residuos de nucleótido codificantes de bien la cadena Fd o la cadena pesada deben estar unidas operativamente a la secuencia de residuos de nucleótido codificante de un anclaje a la membrana de cubierta proteínica de bacteriófago filamentoso. Dos cubiertas proteínicas preferidas para su uso en esta invención con el fin de proporcionar un anclaje a la membrana son VIII y III (cpVIII y cpIII, respectivamente). En los ejemplos descritos en la presente memoria, se describen procedimientos para unir operativamente una secuencia de residuos de nucleótido codificante de una cadena Fd con los anclajes a la membrana bien de cpVIII o de cpIII en una proteína de fusión de esta invención.

En un vector de fagémido, un primer y un segundo cistrón constituidos por secuencias de ADN traducibles son unidos operativamente para formar una molécula de ADN dicistrónico. Cada cistrón de la molécula de ADN dicistrónico está unido a secuencias de control de la expresión de ADN para la expresión coordinada de una proteína de fusión, Fd-cpVIII o Fd-cpIII, y una cadena ligera κ .

El primer cistrón codifica una señal de secreción periplásmica (líder pelB) unida operativamente a la proteína de fusión bien Fd-cpVIII o Fd-cpIII. El segundo cistrón codifica un segundo líder pelB unido operativamente a una cadena ligera κ . La presencia del líder pelB facilita la secreción coordinada pero independiente tanto de la proteína de fusión como de la cadena ligera del citoplasma bacteriano en el espacio periplásmico.

El procedimiento descrito anteriormente se representa mediante un diagrama esquemático en la figura 8. En síntesis, el vector de expresión de fagémido porta un gen marcador seleccionable de la resistencia a la cloranfenicol acetyl transferasa además de la fusión de Fd-cpVIII y la cadena κ . El origen de replicación del fago f1 facilita la generación de fagémidos monocatenarios. La expresión inducida por el isopropil tiogalactopiranosido (IPTG) de un mensaje dicistrónico codificante de la fusión de Fd-cpVIII (V_H , C_{H1} , cpVIII) y la cadena ligera (V_L , C_L) conduce a la formación de las cadenas pesada y ligera. Cada cadena es enviada al espacio periplásmico por la secuencia líder de pelB, que posteriormente es escindida. La cadena pesada se ancla a la membrana por el dominio de anclaje a la membrana de cpVIII, mientras que la cadena ligera es secretada en el periplasma. La cadena pesada en presencia de la cadena ligera parece formar moléculas Fab. Se puede lograr el mismo resultado, como alternativa, si se ancla la cadena ligera a la membrana por una proteína de fusión de cadena ligera que tenga un anclaje a la membrana, siendo la cadena pesada secretada por una secuencia líder pelB en el periplasma.

Con la posterior infección de *E. coli* con un fago auxiliar, mientras tiene lugar el ensamblaje del bacteriófago filamentoso, se incorpora la cubierta proteínica VIII a lo largo de todas las partículas de fago filamentoso según lo mostrado en las figuras 8 y 9. Si se usa cpIII, la acumulación se produce en la cola del bacteriófago. La ventaja de la utilización de los anclajes de membrana procedentes de cpVIII frente a los procedentes de cpIII es del doble. En primer lugar, hay una multiplicidad de sitios de unión, constituidos por aproximadamente 2.700 monómeros de cpVIII ensamblados en una disposición tubular, a lo largo de la superficie de la partícula. En segundo lugar, el constructo no interfiere en la infectividad del fago.

a. Selección de polinucleótidos

Las secuencias de nucleótidos codificantes de las CDR de proteínas de inmunoglobulina son muy variables. Sin embargo, hay varias regiones de secuencias conservadas que flanquean los dominios de la región V bien de la cadena ligera o de la cadena pesada, por ejemplo, y que contienen secuencias de nucleótidos sustancialmente conservadas, i.e., secuencias que se hibridarán a la misma secuencia cebadora. Por lo tanto, se construyeron cebadores para la síntesis (amplificación) de polinucleótidos que se hibridan con las secuencias conservadas e incorporan sitios de restricción en el homólogo de ADN producido que son adecuados para unir operativamente los fragmentos de ADN sintetizados a un vector. Más específicamente, los cebadores son diseñados para que los homólogos de ADN resultantes producidos puedan ser insertados en un vector de expresión de esta invención en marco de lectura con la secuencia de ADN traducible secuencia arriba en la región del vector que contiene el medio de unión direccional.

(i) Cebadores de V_H

Para la amplificación de los dominios V_H , se diseñan cebadores para introducir terminales cohesivos compatibles con la unión direccional en los sitios únicos de Xho I y Spe I del vector de expresión de fagémido Hc2. Por ejemplo, se diseñó el cebador 3' (cebador 12A de la tabla 5) para que fuera complementario al ARNm en la región J_H . En todos los casos, los cebadores 5' (cebadores 1-10, tabla 5) fueron seleccionados para que fueran complementarios al ADNc de la primera cadena de la región del terminal N conservada (cadena antisentido). Inicialmente, la amplificación se realizó con una mezcla de 32 cebadores (cebador 1, tabla 5) que fueron degenerados en cinco posiciones. Se pudo amplificar el ARNm del hibridoma con cebadores mixtos, pero los primeros intentos por amplificar ARNm procedente de bazo dieron resultados variables. Por lo tanto, se compararon varias alternativas a la amplificación mediante el uso de los cebadores 5' mixtos.

ES 2 315 612 T3

La primera alternativa consistió en construir múltiples cebadores únicos, ocho de los cuales se muestran en la tabla 5, correspondientes a los miembros individuales de la mezcla de cebadores mixtos. Los cebadores 2-9 individuales de la tabla 5 fueron construidos incorporando cualquiera de los dos nucleótidos posibles en tres de las cinco posiciones degeneradas.

5

La segunda alternativa consistió en construir un cebador que contenía inosina (cebador 10, tabla 5) en cuatro de las posiciones variables basado en el trabajo publicado de Takahashi, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 82:1931-1935, (1985) y Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 260: 2605-2608, (1985). El cebador tiene la ventaja de que no está degenerado y, al mismo tiempo, minimiza los efectos negativos de los apareamientos erróneos en las posiciones no conservadas según lo tratado por Martin *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 13:8927 (1985). Sin embargo, no se sabía si la presencia de nucleótidos de inosina resultaría en la incorporación de secuencias no deseadas en las regiones de V_H clonadas. Por lo tanto, no se incluyó la inosina en la posición uno que permanece en los fragmentos amplificados tras la escisión de los sitios de restricción. Como resultado, la inosina no estaba en el inserto clonado.

Se diseñaron más cebadores de amplificación de V_H incluyendo el cebador 3' único para que fueran complementarios a una parte del primer dominio de la región constante del ARNm de la cadena pesada gamma 1 (cebadores 16 y 17, tabla 5). Estos cebadores producirán homólogos de ADN que contendrán polinucleótidos codificantes de aminoácidos de V_H y los dominios de la primera región constante de la cadena pesada. Estos homólogos de ADN se pueden usar por tanto para producir fragmentos Fab en lugar de Fv.

20

Se contemplan otros cebadores 3' únicos diseñados para su hibridación con regiones similares de otra clase de cadena pesada de inmunoglobulina tales como IgM, IgE e IgA. También se contemplan otros cebadores 3' que se hibridan con una región específica de una determinada clase de región constante CH_1 y que están adaptados a la transferencia de los dominios V_H amplificados usando este cebador a un vector de expresión capaz de expresar aquellos dominios de V_H con una clase diferente de región constante de cadena pesada o de cadena ligera.

25

Como control para la amplificación a partir de ARNm de bazo o de hibridoma, se construyó un conjunto de cebadores que se hibridaron a una región altamente conservada de la IgG de región constante, el gen de la cadena pesada. El cebador 5' (cebador 11, tabla 5) es complementario al ADNc de la región C_H2 , mientras que el cebador 3' (cebador 13, tabla 5) es complementario al ARNm de la región C_H3 . Se cree que no hubo apareamientos erróneos entre estos cebadores y sus moldes.

30

Los cebadores usados para la amplificación de los fragmentos Fd de cadena pesada para la construcción de los Fab se muestran en la tabla 5. La amplificación se realizó en ocho reacciones separadas, cada una con uno de los cebadores 5' (cebadores 2-9) y uno de los cebadores 3' (cebador 16). El resto de cebadores 5' que habían sido usados para la amplificación en una sola reacción son bien un cebador degenerado (cebador 1) o un cebador que incorpora inosina en 4 posiciones degeneradas (cebador 10, tabla 5 y cebadores 17 y 18, tabla 6). El cebador 3' restante (cebador 14, tabla 6) se ha usado para construir fragmentos Fv. Muchos de los cebadores 5' incorporan un sitio de Xho I y los cebadores 3' incorporan un sitio de restricción de Spe I para la inserción del homólogo de ADN de V_H en el vector de expresión del fagémido Hc2 (figura 4).

40

Los cebadores de la amplificación de V_H diseñados para amplificar regiones variables de la cadena pesada humana se muestran en la tabla 6. Uno de los cebadores de cadena pesada 5' contiene residuos de inosina en las posiciones de nucleótidos degeneradas, lo que permite la hibridación de un solo cebador con un gran número de secuencias de la región variable. Los cebadores diseñados para su hibridación con las secuencias de la región constante de diversos ARNm de IgG también se muestran en la tabla 6.

45

(ii) Cebadores de V_L

Las secuencias de nucleótidos codificantes de las CDR de V_L son muy variables. Sin embargo, hay varias regiones de secuencias conservadas que flanquean los dominios de CDR de V_L incluyendo J_L , regiones marco de V_L y líder/promotor de V_L . Por lo tanto, se construyeron cebadores de amplificación que se hibridaron con las secuencias conservadas e incorporaron sitios de restricción que permitieron la clonación de fragmentos amplificados en el vector de fagémido Lc2 cortado con Sac I y Xba I.

55

Para la amplificación de los dominios de CDR de V_L , se diseñaron los cebadores 5' (cebadores 1-6 de la tabla 6) para que fueran complementarios al ADNc de la primera cadena de la región conservada del terminal N. Estos cebadores también introdujeron un sitio de endonucleasa de restricción Sac I para permitir que el homólogo de ADN de V_L fuera clonado en el vector de expresión del fagémido Lc2. El cebador 3' de amplificación de V_L (cebador 9 de la tabla 6) fue diseñado para que fuera complementario al ARNm de las regiones J_L y para introducir el sitio de la endonucleasa de restricción Xba I necesario para insertar el homólogo de ADN de V_L en el vector de expresión del fagémido Lc2 (figura 6).

60

Se diseñaron más cebadores 3' de amplificación de V_L para que se hibridaran con la región constante del ARNm bien de kappa o de Lambda (cebadores 10 y 11 de la tabla 6). Estos cebadores permiten la producción de un homólogo de ADN que contiene secuencias de polinucleótido codificantes de los aminoácidos de la región constante de bien la cadena kappa o la cadena Lambda. Estos cebadores hacen posible la producción de un fragmento Fab en lugar de un fragmento Fv.

65

ES 2 315 612 T3

Los cebadores usados para la amplificación de las secuencias de la cadena ligera kappa para la construcción de Fab se muestran al menos en la tabla 6. La amplificación con estos cebadores se realizó en 5 reacciones separadas, cada una con uno de los cebadores 5' (cebadores 3-6 y 12) y uno de los cebadores 3' (cebador 13). El cebador 3' restante (cebador 9) se ha usado para construir fragmentos F_v. Los cebadores 5' contienen un sitio de restricción de Sac I y los cebadores 3' contienen un sitio de restricción de Xba I.

Los cebadores de amplificación de V_L diseñados para amplificar regiones variables de la cadena ligera humana tanto de los isótopos lambda como kappa también se muestran en la tabla 6.

10 Todos los cebadores y polinucleótidos sintéticos descritos en la presente memoria, incluyendo aquellos mostrados en las tablas 3-7, fueron bien adquiridos en Research Genetics de Huntsville, Alabama, o sintetizados en un sintetizador de ADN de Applied Biosystems, modelo 381A, usando las instrucciones del fabricante.

15

TABLA 5

20	(1) 5' AGGT(C/G)(C/A)A(G/A)CT(G/T)CTCGAGTC(T/A)GG 3'	Cebador 5' degenerado para la amplificación de regiones variables de cadena pesada (V _H) humanas y de ratón
25	(2) 5' AGGTCCAGCTGCTCGAGTCTGG 3'	Cebador 5' único para la amplificación de V _H humano y de ratón de V _H humano y de ratón
30	(3) 5' AGGTCCAGCTGCCGAGTCAGG 3'	" "
35	(4) 5' AGGTCCAGCTTCTCGAGTCTGG 3'	" "
40	(5) 5' AGGTCCAGCTTCTCGAGTCAGG 3'	" "
45	(6) 5' AGGTCCAAGCTGCTCGAGTCTGG 3'	" "
50	(7) 5' AGGTCCAAGCTGCTCCAGTCAGG 3'	" "
55	(8) 5' AGGTCCAAGCTTCTCGAGTCTGG 3'	" "
60	(9) 5' AGGTCCAAGCTTCTCGAGTCAGG 3'	" "
65	(10) 5' AGGTIIAICTICTCGAGTC(T/A)GG 3'	Cebador 5' degenerado que contiene inosina en 4 posiciones degeneradas para la amplificación de V _H de ratón
70	(11) 5' GCCCAAGGATGTGCTCACC 3'	Cebador 5' para la amplificación en la región C _H 2 de IgG1 de ratón

ES 2 315 612 T3

TABLA 5 (continuación)

5	(12)	5'CTATTAGAATTCAACGGTAACAGTGGTGCCTTGGCCCCA 3'	Cebador 3' para la amplificación de V _H y la introducción de un sitio de Eco RI de 3'
10			
15	(12A)	5'CTATTAAGTAGTAACGGTAACAGTGGTGCCTTGGCCCCA 3'	Cebador 3' para la amplificación de V _H usando el sitio de Spe I de 3'
20	(13)	5' CTCAGTATGGTGTGTGC 3'	Cebador 3' para la amplificación en la región C _H 3 de IgG1 de ratón
25			
30	(14)	5' GCTACTAGTTTTGATTTCCACCTTG 3'	Cebador 3' para la amplificación de regiones variables de cadena ligera kappa de ratón (V _L)
35			
40	(15)	5' CAGCCATGGCCGACATCCAGATC 3'	Cebador 5' para la amplificación de regiones variables de cadena ligera kappa de ratón
45			
50	(16)	5' AATTTTACTAGTCACCTTGGTGCTGCTGGC 3'	Cebador 3' único para la amplificación de V _H incluyendo parte de la primera región constante gamma 1 de ratón
55			
60	(17)	5' TATGCAACTAGTACAACCACAATCCCTGGGCACAAT TTT 3'	Cebador 3' único para la amplificación de Fd incluyendo parte de la primera región constante IgG1 de ratón y la región bisagra

65

ES 2 315 612 T3

TABLA 5 (continuación)

5	(18) 5'AGGCTTACTAGTACAATCCCTGGGCACAAT 3'	Cebador 3' para la amplificación de Fd de ratón incluyendo parte de la primera región constante de IgG1 de ratón y parte de la región bisagra
---	---	---

TABLA 6

20	(1) 5' CCAGTTCCGAGCTCGTTGTGACTCAGGAATCT 3'	Cebador 5' único para la amplificación de regiones variables de cadena ligera kappa
25	(2) 5' CCAGTTCCGAGCTCGTGTTGACGCAGCCGCCC 3'	" "
30	(3) 5' CCAGTTCCGAGCTCGTGCTCACCCAGTCTCCA 3'	" "
35	(4) 5' CCAGTTCCGAGCTCCAGATGACCCAGTCTCCA 3'	" "
40	(5) 5' CCAGATGTGAGCTCGTGATGACCCAGACTCCA 3'	" "
45	(6) 5' CCAGATGTGAGCTCGTCATGACCCAGTCTCCA 3'	" "
50	(7) 5' CCAGATGTGAGCTCTTGATGACCCAACTCAA 3'	" "
55	(8) 5' CCAGATGTGAGCTCGTGATAACCCAGGATGAA 3'	" "
60	(9) 5' GCAGCCATTCTAGAGTTTCAGCTCCAGCTTGCC 3'	Cebador 3' único para la amplificación de regiones variables de cadena ligera kappa
65	(10) 5' CCGCCGTCTAGAACAACACTCATTCTGTTGAAGCT3'	Cebador 3' único para la amplificación de la cadena ligera kappa de ratón incluyendo la región constante

ES 2 315 612 T3

TABLA 6 (continuación)

5	(11) 5' CCGCCGTCTAGAACATTCTGCAGGAGACAGACT 3'	Cebador 3' único para la amplificación de la cadena ligera lambda de ratón incluyendo la región constante
10		
15	(12) 5' CCAGTTCCGAGCTCGTGATGACACAGTCTCCA 3'	Cebador 5' único para la amplificación de V _L
20		
25	(13) 5' GCGCCGTCTAGAATTAACACTCATTCTGTTGAA 3'	Cebador 3' único para la amplificación de la cadena ligera kappa
30		
35	(14) 5' CTATTAAGTAGTAACGGTAACAGTGGTGCCTTGCCCCA 3'	Cebador 3' único para la amplificación de F _v de ratón
40		
45	(15) 5' AGGCTTACTAGTACAATCCCTGGGCACAAT 3'	Cebador 3' único para la amplificación de Fd de IgG de ratón
50		
55	(16) 5' GCCGCTCTAGAACACTCATTCTGTTGAA 3'	Cebador 3' único para la amplificación de cadena ligera kappa de ratón
60		
65	(17) 5' AGGTIIAICTICTCGAGTCTGC 3'	Cebador 5' degenerado que contiene inosina en 4 posiciones generadas para amplificar V _H de ratón
	(18) 5' AGGTIIAICTICTCGAGTCAGC 3'	" "

ES 2 315 612 T3

TABLA 6 (continuación)

5	(19) 5' GTGCCAGATGTGAGCTCGTGATGACCCAGTCTCCA 3'	Cebador 5' único para la amplificación de V _L de kappa humana y de ratón
10		
15	(20) 5' TCCTTCTAGATTACTAACACTCTCCCCTGTTGAA 3'	Cebador 3' único para la amplificación de V _L de kappa
20		
25	(21) 5' GCATTCTAGACTATTATGAACATTCTGTAGGGGC 3'	Cebador 3' único para la amplificación de V _L de lambda humana, de ratón y de conejo
30		
35	(22) 5' CTGCACAGGGTCCTGGGCCGAGCTCGTGGTGACTCAG 3'	Cebador 5' único para la amplificación de V _L de lambda humana
40		
45	(23) 5' AGITGCAIITGCTCGAGTCTGG 3'	Cebador 5' degenerado para la amplificación de V _H humana que contiene inosina en 3 posiciones degeneradas
50		
55	(24) 5'GTGGGCATGTGTGAGTTGTGTCAGTTGGGGTTTTGAGCTC 3'	Cebador 3' único para la amplificación de V _H humana
60		
65	(25) 5' AGCATCACTAGTACAAGATTTGGGCTC 3'	Cebador 3' único para la amplificación de Fd de IgG1 humana

ES 2 315 612 T3

TABLA 6 (continuación)

5	(26)	5' AGGTGCAGCTGCTCGAGTCTGG 3'	Cebadores 5' únicos para la amplificación de regiones variables humanas (V _H)
10	(27)	5' AGGTGCAGCTGCTCGAGTCGGG 3'	" "
	(28)	5' AGGTGCAACTGCTCGAGTCTGG 3'	" "
15	(29)	5' AGGTGCAACTGCTCGAGTCGGG 3'	" "
20	(30)	5' TCCTTCTAGATTACTAACACTCTCCCCTGTTGAA 3'	Cebador 3' de la región constante de la cadena ligera kappa humana
25	(31)	5' CTGCACAGGGTCCTGGGCCGAGCTCGTGGTGA CT CAG 3'	Cebador 5' para la amplificación de regiones variables de cadena ligera lambda humana
30	(32)	5' GCATTCTAGACTATTAACATTCTGTAGGGGC 3'	Cebador 3' de la región constante de la cadena ligera lambda humana
35	(33)	5' ACCCAAGGACACCCTCATG 3'	Cebador de control en hibridación con la región CH ₂ humana
40	(34)	5' CTCAGTATGGTGGTTGTGC 3'	Cebador de control en hibridación con la región CH ₃ humana
45	(35)	5' GTCTCACTAGTCTCCACCAAGGGCCCATCGGTC 3'	Cebador 5' para la amplificación de la primera región constante de la cadena pesada de la IgG humana
50	(36)	5' ATATACTAGTGAGACAGTGACCAGGGTTCCTTGGCCCCA 3'	Cebador 3' para la amplificación de regiones variables de la cadena pesada humana
55			
60			
65			

ES 2 315 612 T3

TABLA 6 (continuación)

5	(37) 5' ACGTCTAGATTCCACCTTGGTCCC 3'	Cebador 3' para la amplificación de regiones variables de la cadena kappa humana
10	(38) 5' GCATACTAGTCTATTAACATTCTGTAGGGGC 3'	Cebador 5' para la amplificación de la región constante de la cadena ligera kappa humana
15	(39) 5' CCGGAATTCTTATCATTACCCGGAGA 3'	Cebador 3' localizado en la región CH3 de la IgG1 humana para amplificar toda la cadena pesada
20	(40) 5' CTGCACTAGTTGGAATGGGCACATGCAG 3'	Cebador 3' para la amplificación de la región Fd de la IgM de ratón

25 Los 19 cebadores que figuran en la tabla 5 han sido enumerados en el listado secuencial y se les ha asignado la siguiente SEC ID N°:

- 30 (1) = SEC ID N°: 40
- (2) = SEC ID N°: 41
- (3) = SEC ID N°: 42
- 35 (4) = SEC ID N°: 43
- (5) = SEC ID N°: 44
- (6) = SEC ID N°: 45
- 40 (7) = SEC ID N°: 46
- (8) = SEC ID N°: 47
- 45 (9) = SEC ID N°: 48
- (10) = SEC ID N°: 49
- (11) = SEC ID N°: 50
- 50 (12) = SEC ID N°: 51
- (12A) = SEC ID N°: 52
- 55 (13) = SEC ID N°: 53
- (14) = SEC ID N°: 54
- (15) = SEC ID N°: 55
- 60 (16) = SEC ID N°: 56
- (17) = SEC ID N°: 57
- 65 (18) = SEC ID N°: 58

Los 40 cebadores enumerados como “(1)” a “(40)” de la tabla 6 también han sido enumerados individual y secuencialmente en el listado secuencial comenzando con la SEC ID N°: 59 a la SEC ID N°: 98, respectivamente.

ES 2 315 612 T3

b. Preparación de un repertorio de genes codificante de dominio variable de inmunoglobulina

Se seleccionó nitrofenilfosfonamidato (NPN) como ligando para la unión al receptor en la preparación de un receptor heterodimérico según los procedimientos de la invención.

5

Se conjugó hemocianina de lapa californiana (KLH) con NPN para formar un conjugado de NPN-KLH usado para inmunizar un ratón con el fin de producir una respuesta inmunológica contra el NPN y proporcionar así una fuente de genes de receptor heterodimérico específico del ligando.

10

El conjugado de NPN-KLH se preparó mezclando 250 μ l una solución que contenía 2,5 mg de NPN en dimetilformamida con 750 μ l de una solución que contenía 2 mg de KLH en tampón de fosfato de sodio 0,01 Molar (M) (pH 7,2). Las dos soluciones se mezclaron mediante la adición lenta de la solución de NPN a la solución de KLH mientras se agitaba la solución de KLH con una varilla agitadora giratoria. Después de esto se mantuvo la mezcla a 4°C durante 1 hora con la misma agitación para dejar que se produjera la conjugación. Se aisló el NPN-KLH conjugado del NPN y de la KLH sin conjugar mediante la filtración sobre gel a través de Sephadex G-25. El conjugado NPN-KLH aislado fue inyectado en ratones según lo descrito a continuación.

15

Se preparó el conjugado de NPN-KLH para su inyección en ratones añadiendo 100 μ g de conjugado a 250 μ l de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se añadió un volumen igual de adyuvante de Freund completo y se emulsionó la solución entera durante 5 minutos. Se inyectaron 300 μ l de la emulsión a un ratón 129 G_{1x+}. Se administraron inyecciones subcutáneamente en varios puntos usando una aguja de calibre 21. Se proporcionó una segunda inmunización con NPN-KLH dos semanas después. Se preparó esta inyección según lo siguiente: se diluyeron 50 microgramos (μ g) de NPN-KLH en 250 μ l de PBS, y se añadió un volumen igual de alumbre a la solución de NPN-KLH. Si inyectaron 500 μ l de la solución intraperitonealmente al ratón usando una aguja de calibre 23. Un mes después, se administró a los ratones una inyección final de 50 μ g de conjugado de NPN-KLH diluido en 200 μ l de PBS. Esta inyección fue administrada intravenosamente en la vena lateral de la cola usando una aguja de calibre 30. Cinco días después de esta inyección final, se sacrificaron los ratones y se aisló el ARN celular total de sus bazo.

20

25

Se preparó ARN celular total del bazo de un solo ratón inmunizado con KLH-NPN según lo descrito anteriormente usando procedimientos de preparación de ARN descritos por Chomczynski *et al.*, *Anal Biochem.*, 162:156-159 (1987) y usando el equipo de aislamiento de ARN (Stratagene) según las instrucciones del fabricante. En síntesis, inmediatamente después de extirpar el bazo al ratón inmunizado, se homogeneizó el tejido en 10 ml de una solución desnaturalizante que contenía isotiocianato de guanina 4,0M, citrato de sodio 0,25M a un pH 7,0 y beta-mercaptoetanol 0,1M usando un homogeneizador de vidrio. Se mezcló un ml de acetato de sodio a una concentración 2M y un pH 4,0 con el bazo homogeneizado. También se añadió un ml de fenol que había sido saturado previamente con H₂O a la solución desnaturalizante que contenía el bazo homogeneizado. Se añadieron a esta sustancia homogeneizada dos ml de mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 (v/v)). Se mezcló la sustancia homogeneizada vigorosamente durante 10 segundos y se mantuvo sobre hielo durante 15 minutos. Luego se transfirió la sustancia homogeneizada a un tubo centrifugado de polipropileno de pared gruesa de 50 ml (Fisher Scientific Company, Pittsburg, PA). Se centrifugó la solución a 10.000 xg durante 20 minutos a 4°C. Se transfirió la capa acuosa que contenía ARN a un tubo de centrifugación de polipropileno de 50 ml recién preparado y se mezcló con un volumen igual de alcohol isopropílico. Se mantuvo esta solución a -20°C durante al menos una hora para precipitar el ARN. Se centrifugó la solución que contenía el ARN precipitado a 10.000 xg durante veinte minutos a 4°C. Se recogió el ARN celular total en nódulos y se disolvió en 3 ml de la solución desnaturalizante anteriormente descrita. Se añadieron tres ml de alcohol isopropílico al ARN celular total re-suspendido y se mezcló vigorosamente. Se mantuvo esta solución a -20°C durante al menos una hora para precipitar el ARN. Se centrifugó la solución que contenía el ARN precipitado a 10.000 xg durante diez minutos a 4°C. Se lavó el ARN en nódulos una vez con una solución que contenía etanol al 75%. Se secó el ARN en nódulos al vacío durante 15 minutos y luego se volvió a suspender en H₂O tratada con pirocarbonato de dimetilo (DEPC) (DEPC-H₂O).

35

40

45

50

Se preparó ARN mensajero (ARNm) enriquecido en secuencias que contenían tramos de poly A largos a partir de ARN celular total usando los procedimientos descritos en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Maniatis *et al.*, eds., Cold Spring Harbor, NY, (1982). En síntesis, se volvió a suspender una mitad del ARN total aislado de un solo bazo de ratón inmunizado según lo descrito anteriormente en un ml de DEPC-H₂O y se mantuvo a 65°C durante cinco minutos. Se añadió un ml de 2 x tampón de carga altamente salino constituido por Tris-HCl 10 mM (clorhidrato de Tris[hidroximetil]aminometano), cloruro de sodio 1M (NaCl), ácido etilen-diamin-tetraacético de disodio 2,0 mM (EDTA) a un pH de 7,5 y dodecil-sulfato de sodio (SDS) al ARN resuspendido y se dejó enfriar la muestra hasta la temperatura ambiente. Entonces se aplicó la mezcla a una columna de oligo-Dt (tipo 2 o tipo 3 de Collaborative Research) que fue preparada previamente lavando el oligo-dT con una solución que contenía hidróxido de sodio 0,1M y EDTA 5 mM, y luego equilibrando la columna con DEPC-H₂O. Se recogió el eluido en un tubo de polipropileno estéril y se volvió a aplicar a la misma columna tras calentar el eluido durante 5 minutos a 65°C. Entonces se lavó la columna de oligo-dT con 2 ml de tampón de alta carga salina constituido por Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, cloruro de sodio 500 mM, EDTA 1 mM a un pH 7,5 y SDS al 0,1%. Entonces se lavó la columna de oligo-dT con 2 ml de 1 x tampón salino medio constituido por Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 100 mM, EDTA 1 mM y SDS al 0,1%. Se eluyó el ARN mensajero de la columna de oligo-dT con 1 ml de tampón constituido por Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM a un pH 7,5 y SDS al 0,05%. Se purificó el ARN mensajero extrayendo esta solución con fenol/cloroformo tras lo que se realizó una sola extracción con cloroformo al 100%. Se concentró el ARN mensajero mediante precipitación en etanol y se volvió a suspender en H₂O con DEPC.

55

60

65

ES 2 315 612 T3

El ARN mensajero (ARNm) aislado mediante el procedimiento anterior contiene una pluralidad de diferentes polinucleótidos codificantes de V_K , i.e., más de aproximadamente 10^4 genes diferentes codificantes de V_K y contiene un número similar de genes codificantes de V_L . De este modo, la población de ARNm representa un repertorio de genes codificantes de regiones variables.

5

c. Preparación de homólogos de ADN

En la preparación de la amplificación por PCR, se usó ARNm preparado anteriormente como un molde para la síntesis de ADNc mediante una reacción de extensión de cebadores. En una reacción de transcripción de $50 \mu\text{l}$ típica, primero se hibridan (se aparean) $5-10 \mu\text{g}$ de ARNm de bazo en agua con 500 ng ($50,0 \text{ pmoles}$) del cebador $3'$ de V_H (cebador 12A, tabla 5) a 65°C durante cinco minutos. Posteriormente, se ajusta la mezcla a dATP, dCTP, dGTP y dTTP $1,5 \text{ mM}$, Tris-HCl 40 mM , pH $8,0$; MgCl_2 8 mM ; NaCl 50M y espermidina 2 mM . Se añade transcriptasa inversa del virus de la leucemia murino de Moloney (Stratagene), 26 unidades, y se mantiene la solución durante 1 hora a 37°C .

Se realiza una amplificación por PCR en una reacción de $100 \mu\text{l}$ que contiene los productos de la reacción de la transcripción inversa (aproximadamente 5 ug del híbrido de ADNc/ARN), 300 ng del cebador $3'$ de V_H (cebador 12A de la tabla 5), 300 ng de cada uno de los cebadores $5'$ de V_H (cebadores 2-10 de la tabla 5), 200M de una mezcla de varios dNTP, KCl 50 mM ; Tris-HCl 10M , pH $8,3$; MgCl_2 15M ; gelatina al $0,1\%$ y 2 unidades de ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq) (Perkin-Elmer-Cetus, Emeryville, California). Se recubre la mezcla de reacción con aceite mineral y se somete a 40 ciclos de amplificación. Cada ciclo de amplificación incluye la desnaturalización a 92°C durante 1 minuto, el apareamiento a 52°C durante 2 minutos y la síntesis de polinucleótido mediante extensión de cebadores (alargamiento) a 72°C durante $1,5$ minutos. Entonces se extrajeron las muestras que contenían el homólogo de ADN codificante de V_H amplificado dos veces con fenol/cloroformo, una vez con cloroformo, se precipitaron en etanol y se almacenaron a -70°C en Tris-HCl 10 mM ; pH $7,5$ y EDTA 1 mM .

25

Mediante el uso de cebadores $5'$ (2-9, tabla 5), se consigue una síntesis y una amplificación eficaz de homólogos de ADN codificantes de V_H a partir de ARNm de bazo según lo mostrado mediante electroforesis sobre gel de agarosa. El ADNc amplificado (homólogo de ADN codificante de V_H) fue observado como una banda principal del tamaño esperado (360 pb). La cantidad de fragmento de polinucleótido codificante de V_H amplificado en cada reacción es similar, lo que indica que todos estos cebadores eran aproximadamente igualmente eficaces en la iniciación de la amplificación. El rendimiento y la calidad de la amplificación con estos cebadores son reproducibles.

30

El cebador que contenía inosina también sintetiza homólogos de ADN codificantes de V_H a partir de ARNm de bazo reproduciblemente, conduciendo a la producción del fragmento de tamaño esperado, de una intensidad similar a la de otros ADNc amplificados. La presencia de inosina también permite la síntesis y la amplificación de homólogos de ADN eficaces, lo que indica claramente que tales cebadores son útiles en la generación de una pluralidad de homólogos de ADN codificantes de V_H . Los productos de amplificación obtenidos a partir de los cebadores de la región constante (cebadores 11 y 13, tabla 5) son más intensos, lo que indica que la amplificación fue más eficaz, posiblemente debido a un mayor grado de homología entre el molde y los cebadores. Siguiendo los procedimientos anteriores, se construye una genoteca de genes codificantes de V_H a partir de productos de ocho amplificaciones, cada una realizada con un cebador $5'$ diferente. Se mezclan partes iguales de los productos de cada reacción de extensión de cebadores, y los productos mezclados se usan luego para generar una genoteca de vectores que contienen homólogos de ADN codificante de V_H .

35

40

También se preparan homólogos de ADN de la V_L a partir de ARNm purificado preparado según lo descrito anteriormente. En la preparación de la amplificación por PCR, se usa ARNm preparado según los ejemplos anteriores como un molde para la síntesis de ADNc. En una reacción de transcripción de $50 \mu\text{l}$ típica, primero se aparean $5-10 \mu\text{g}$ de ARNm de bazo en agua con 300 ng ($50,0 \text{ pmoles}$) del cebador $3'$ de V_L (cebador 14, tabla 5) a 65°C durante cinco minutos. Posteriormente, se ajusta la mezcla a dATP, dCTP, dGTP y dTTP $1,5 \text{ mM}$, Tris-HCl 40 mM , pH $8,0$; MgCl_2 8 mM ; NaCl 50M y espermidina 2 mM . Se añade transcriptasa inversa del virus de la leucemia murino de Moloney (Stratagene), 26 unidades, y se mantiene la solución durante 1 hora a 37°C . La amplificación por PCR se realiza en una reacción de $100 \mu\text{l}$ que contiene aproximadamente $5 \mu\text{g}$ del híbrido de ADNc/ARN producido según lo descrito anteriormente, 300 ng del cebador $3'$ de V_L (cebador 14 de la tabla 5), 300 ng del cebador $5'$ de V_L (cebador 16 de la tabla 5), 200M de una mezcla de varios dNTP, KCl 50 mM ; Tris-HCl 10M , pH $8,3$; MgCl_2 15M ; gelatina al $0,1\%$ y 2 unidades de ADN polimerasa de Taq. Se recubre la mezcla de reacción con aceite mineral y se somete a 40 ciclos de amplificación. Cada ciclo de amplificación incluye la desnaturalización a 92°C durante 1 minuto, un apareamiento a 52°C durante 2 minutos y un alargamiento a 72°C durante $1,5$ minutos. Entonces se extrajeron las muestras amplificadas dos veces con fenol/cloroformo, una vez con cloroformo, se precipitaron en etanol y se almacenaron a -70°C en Tris-HCl 10 mM ; pH $7,5$ y EDTA 1 mM .

45

50

55

60

d. Inserción de homólogos de ADN en un vector de expresión de ADN

Para preparar una genoteca de expresión enriquecida en secuencias de V_H , se preparan homólogos de ADN enriquecidos en secuencias de V_H según el ejemplo 2c usando el mismo conjunto de cebadores $5'$ pero con el cebador 12A (tabla 5) como cebador $3'$. Se digieren los productos amplificados por PCR resultantes ($2,5 \mu\text{g}/30 \mu\text{l}$ de NaCl 150 mM ; Tris-HCl 8 mM ; pH $7,5$; MgSO_4 6 mM , DTT 1Mm ; $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ de BSA) a 37°C con las enzimas de restricción Xho I (125 unidades) y Spe I (125 unidades). En los experimentos de clonación que requieren una mezcla de los productos de las reacciones de amplificación, se combinan volúmenes iguales ($50 \mu\text{l}$; $1-10 \mu\text{g}$ de concentración) de cada mezcla

65

ES 2 315 612 T3

de reacción tras la amplificación, pero antes de la digestión por restricción. Se purifican los homólogos de V_H sobre gel de agarosa al 1% usando la técnica de electroelución estándar descrita en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Maniatis *et al.*, eds., Cold Spring Harbor, NY, (1982). Tras la electroforesis sobre gel del ARNm de bazo amplificado por PCR digerido, se retira la región de los fragmentos de ADN que contienen gel de aproximadamente 350 pb, se electroeluyen en una membrana de diálisis, se precipitan con etanol y se vuelven a suspender en una solución de TE que contiene Tris-HCl 10 mM; pH 7,5 y EDTA 1 mM hasta una concentración final de 50 ng/ μ l. Los homólogos de ADN de V_H resultantes representan un repertorio de genes de polipéptido que tienen terminales cohesivos adaptados a la unión direccional con el vector Lambda Hc2. Estos homólogos de ADN de V_H son entonces insertados directamente mediante la unión direccional en vector de expresión Lambda Hc2 preparado según lo descrito a continuación.

El vector de ADN de expresión Lambda Hc2 se prepara para insertar un homólogo de ADN mezclando 100 μ g de este ADN con una solución que contiene 250 unidades de cada una de las endonucleasas de restricción Xho I y Spe I (ambas de Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) y un tampón recomendado por el fabricante. Se mantiene esta solución a 37°C durante 1,5 horas. Se calienta la solución a 65°C durante 15 minutos hasta que se desactivan las endonucleasas de restricción. Se enfría la solución hasta 30°C y se añaden 25 unidades de fosfatasa desactivable térmicamente (HK) (Epicenter, Madison I) y $CaCl_2$ a la solución según las especificaciones del fabricante. Se mantiene esta solución a 30°C durante 1 hora. Se purifica el ADN extrayendo la solución con una mezcla de fenol y cloroformo, tras lo que se realiza una precipitación con etanol. Ahora ya está listo el vector de expresión Lambda Hc2 para su unión a los homólogos de ADN de V_H preparados en los ejemplos anteriores. Se insertan estos homólogos de ADN de V_H directamente en el vector de expresión Lambda Hc2 digerido con las enzimas de restricción Xho I y Spe I que se preparó anteriormente uniendo 3 moles de insertos de homólogo de ADN de V_H con cada mol de vector de expresión Hc2 durante un noche a 5°C Se obtienen aproximadamente $3,0 \times 10^5$ unidades formadoras de placa tras el empaquetamiento del ADN con Gigapack II Bold (Stratagene) de las que el 50% son recombinantes. Se empaqueta la mezcla de unión que contiene los homólogos de ADN de V_H según las especificaciones del fabricante usando extracto de empaquetamiento Gigapack Gold II (Stratagene). Entonces se transforman las genotecas de expresión de Lambda Hc2 resultantes en células XL1-Blue.

Para preparar una genoteca enriquecida en secuencias de V_L , se preparan productos amplificados por PCR enriquecidos en secuencias de V_L según el ejemplo 2c. Se digieren estos homólogos de ADN de V_L con las enzimas de restricción Sac I y Xba I, y se purifican los homólogos de ADN de V_L digeridos sobre gel de agarosa al 1% según lo descrito anteriormente para los homólogos de ADN de V_H para formar un repertorio de genes de polipéptido de V_L adaptado a la unión direccional. Entonces se unen direccionalmente los homólogos de ADN de V_L preparados en el vector de expresión Lambda Lc2 anteriormente digerido con las enzimas de restricción Sac I y Xba I según lo descrito para Lambda Hc2. Se empaqueta la mezcla de unión que contiene los homólogos de ADN de V_L para formar una genoteca de expresión de Lambda Lc2 según lo descrito anteriormente, estando lista para ser emplacada sobre células XL1-Blue.

e. Homólogos de ADN de V_H y V_L de combinación aleatoria sobre el mismo vector de expresión

La construcción de una genoteca que contiene vectores para la expresión de dos cistrones que expresen cadenas pesadas y ligeras se realiza en dos etapas. En la primera etapa, se construyen genotecas de cadenas pesadas y ligeras separadas en los vectores de expresión Lambda Hc2 y Lambda Lc2, respectivamente, según lo descrito mediante el uso de repertorios de genes obtenidos a partir de un ratón inmunizado con NPN-KLH. En la segunda etapa, se combinan estas dos genotecas en los sitios anti-simétricos de EcoR I presentes en cada vector. Esto resultó en una genoteca de clones, cada uno de los cuales co-expresa potencialmente una cadena pesada y una cadena ligera. Las combinaciones reales son aleatorias y no reflejan necesariamente las combinaciones presentes en la población de células B del animal precursor.

Se aísla el ARNm de bazo resultante de las anteriores inmunizaciones (ejemplo 2b) y se usa para crear una genoteca primaria de secuencias de genes de V_H usando el vector de expresión Lambda Hc2. La genoteca primaria contiene $1,3 \times 10^6$ unidades formadoras de placa (ufp) y se puede rastrear en busca de la expresión del decapeptido tag para determinar el porcentaje de clones que expresan las secuencias de V_H y C_{H1} (Fd). La secuencia para este péptido sólo está en marco para la expresión tras la clonación de un fragmento Fd (o V_H) en el vector. Al menos el 80% de los clones de la genoteca expresan fragmentos Fd basados en la inmunodetección del decapeptido tag.

La genoteca de cadena ligera se construye de la misma manera que la de cadena pesada y contiene $2,5 \times 10^6$ miembros. El rastreo de placas, usando un anticuerpo anti-cadena kappa, indica que el 60% de la genoteca contenida expresa insertos de cadena ligera. Un pequeño porcentaje de insertos resulta de la desfosforilación incompleta del vector tras la escisión con Sac I y Xba I.

Una vez obtenidas, las dos genotecas se usan para construir una genoteca combinatoria cruzándolas en el sitio de EcoR I. Para realizar el cruzamiento, primero se purifica ADN de cada genoteca.

Se amplifica la genoteca de Lambda Lc2 preparada en el ejemplo 2d y se preparan 500 μ g de ADN de fago de la genoteca de expresión de Lambda Lc2 a partir de la solución madre de fago amplificada usando los procedimientos descritos en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Maniatis *et al.*, eds., Cold Spring Harbor, NY (1982). Se mantienen cincuenta μ g de este ADN de fago de la genoteca de expresión amplificada en una solución que contiene 100 unidades de la endonucleasa de restricción MLu I (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) en 200 μ l de un

ES 2 315 612 T3

tampón suministrado por el fabricante de la endonucleasa durante 1,5 horas a 37°C. Entonces se extrae la solución con una mezcla de fenol y cloroformo. Luego se precipita en etanol el ADN y se vuelve a suspender en 100 µl de agua. Se añade esta solución con 100 unidades de la endonucleasa de restricción EcoR I (Boehringer) a un volumen final de 200 µl de tampón que contiene los componentes especificados por el fabricante. Se mantiene esta solución a 37°C durante 1,5 horas y luego se extrae la solución con una mezcla de fenol y cloroformo. Luego se precipita en etanol el ADN y se vuelve a suspender en TE.

Se amplifica la genoteca de expresión de Lambda Hc2 preparada en el ejemplo 2d y se preparan 500 µg de ADN de fago de la genoteca de expresión de Lambda Hc2 usando los procedimientos detallados anteriormente. Se mantienen 50 µg de este ADN de fago de la genoteca de expresión amplificada en una solución que contiene 100 unidades de la endonucleasa de restricción Hind III (Boehringer) en 200 µl de un tampón suministrado por el fabricante de la endonucleasa durante 1,5 horas a 37°C. Entonces se extrae la solución con una mezcla de fenol y cloroformo saturada con Tris-HCl 0,1M, pH 7,5. Luego se precipita en etanol el ADN y se vuelve a suspender en 100 µl de agua. Se añade esta solución con 100 unidades de la endonucleasa de restricción EcoR I (Boehringer) a un volumen final de 200 µl de tampón que contiene los componentes especificados por el fabricante. Se mantiene esta solución a 37°C durante 1,5 horas y luego se extrae la solución con una mezcla de fenol y cloroformo. Luego se precipita en etanol el ADN y se vuelve a suspender en TE.

Se unen entre sí las genotecas de expresión de Hc2 y Lc2 digeridos por estricción. Para este fin, se prepara una mezcla de ADN constituida por 1 µg de Hc2 y 1 µg de ADN de genoteca de fago Lc2 en una reacción de 10 µl usando los reactivos suministrados en un equipo de unión (Stratagene). Se calienta la mezcla de ADN hasta 45°C durante 5 minutos para fundir cualquier terminal cohesivo que pudiera haberse vuelto a aparear. Luego se enfría la mezcla hasta 0°C para evitar que se vuelva a producir la unión. Se mezcla ADN ligasa de bacteriófago T₄ (0,1 unidades de Weiss que son equivalentes a 0,02 unidades según lo determinado en un análisis de resistencia a la exonucleasa) en la solución de ADN enfriada junto con 1 µl de ATP 5 mM y 1 µl de 10 x tampón de ADN ligasa de bacteriófago T₄ (10 x tampón se prepara mezclando Tris-HCl 200 mM, pH 7,6; MgCl₂ 50 mM; DTT 50 mM y 500 µg/ml de BSA) para formar una mezcla de unión. Tras la unión durante 16 h a 4°C, se empaqueta 1 µl del ADN de fago unido con extracto de empaquetamiento Gigapack Gold II y se emplace sobre células XL1-Blue preparadas según las instrucciones de los fabricantes para formar una genoteca de fagos Lambda de vectores de expresión dicistrónicos capaces de expresar cadenas pesadas y ligeras derivadas del ratón inmunizado con NPN. Una parte de los clones obtenidos se usa para determinar la eficacia de la combinación.

f. Selección de vectores dicistrónicos productores de herodímeros reactivos anti-NPN

Se rastreó la genoteca de expresión de Fab combinatoria preparada anteriormente en el ejemplo 2a para identificar clones que tenían afinidad por NPN. Para determinar la frecuencia de los clones de fago que co-expresaban los fragmentos de cadena ligera y pesada, se rastrearon por duplicado la genoteca de cadena ligera, de cadena pesada y la combinatoria según lo anterior para la expresión de la cadena ligera y pesada. En este estudio de aproximadamente 500 fagos recombinantes, aproximadamente el 60% co-expresaron proteínas de cadena ligera y pesada.

Las tres genotecas, la de cadena ligera, la de cadena pesada y la combinatoria, fueron rastreadas para determinar si contenían fago recombinante que expresara fragmentos de anticuerpos que se unieran a NPN. En un procedimiento típico, se emplacaron 30.000 fagos sobre células XL1-Blue y se rastrearon elevaciones de nitrocelulosa por duplicado en busca de la unión a NPN acoplado a BSA marcada con ¹²⁵I. Se yodó la BSA siguiendo el procedimiento T con cloramina según lo descrito por Bolton *et al.*, *Biochem.*, 133: 529-534 (1973). Los rastreos por duplicado de 80.000 fagos recombinantes de la genoteca de cadena ligera y un número similar de genoteca de cadena pesada no identificaron ningún clon que se uniera al antígeno. Por el contrario, el rastreo de un número similar de clones de la genoteca de expresión de Fab identificó muchas placas de fago que se unieron a NPN. Esta observación indica que en condiciones en las que muchas cadenas pesadas en combinación con cadenas ligeras se unen a un antígeno, las mismas cadenas pesadas y ligeras no lo hacen solas. Por lo tanto, en el caso de NPN, se cree que hay muchas cadenas pesadas y ligeras que sólo se unen al antígeno cuando están combinadas con las cadenas ligeras y pesadas específicas, respectivamente.

Para evaluar la capacidad de rastrear grandes números de clones y obtener una estimación más cuantitativa de la frecuencia de los clones que se unen a un antígeno de la genoteca combinatoria, se rastreó un millón de placas de fago y se identificaron aproximadamente 100 clones que se unieron al antígeno. Para los seis clones sobre los que se creía que se unían a NPN, se seleccionó una región de la placa que contenía los seis positivos y aproximadamente 20 placas de bacteriófago circundantes, y se retiró la parte central de cada placa, se volvieron a emplacar y se rastrearon con elevaciones por duplicado. Según lo esperado, aproximadamente uno de los veinte fagos se unió específicamente al antígeno. Los núcleos de las regiones de fagos emplacados considerados negativos no dieron positivos al volver a ser emplacados.

El clon 2b, una de las placas que reaccionaron con NPN, fue separado según un protocolo de separación *in vivo* en el que se mezclaron 200 µl de solución madre de fago y 200 µl de derivado F+ de XL1-Blue ($A_{600} = 1,00$) (Stratagene) con 1 µl de fago auxiliar M13mp8 (1 x 10¹⁰ ufp/mililitro (ml)) y se mantuvo a 37°C durante 15 minutos. Tras un mantenimiento de cuatro horas en medio de Luria-Bertani (LB) y calentar a 70°C durante 20 minutos para matar térmicamente las células XL1-Blue, se volvieron a infectar los fagémidos en células XL1-Blue y se emplacaron sobre placas con LB que contenían ampicilina. Este procedimiento convirtió el inserto clonado del vector Lambda Zap II en un vector de plásmido para facilitar la manipulación y la secuenciación (Stratagene). Entonces se determinó el ADN

ES 2 315 612 T3

de fagémido codificante de V_K y parte de V_L mediante la secuenciación del ADN usando el procedimiento didesoxi de Sanger descrito en Sanger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74:5463-5467 (1977), usando un equipo Sequenase según las instrucciones del fabricante (US Biochemical Corp., Cleveland, Ohio). La secuencia de residuos de nucleótido de la cadena Fd del clon 2b figura en el listado secuencial como SEC ID N°: 99. Las secuencias de residuos de nucleótido de las regiones variable y constante de la cadena ligera kappa se encuentran en el listado secuencial como SEC ID N°: 100 y SEC ID N°: 101, respectivamente.

g. *Preparación de una secuencia de ADN codificante de un anclaje a la membrana de la cubierta proteínica de un fago filamentoso*

Anclaje a la membrana de cpVIII: Se usó M13mp18, un vector de bacteriófago comercialmente disponible, (Pharmacia, Piscataway, New Jersey), como vector de partida para aislar el gen codificante de cpVIII. Se modificó la secuencia del gen codificante del dominio de anclaje a la membrana de cpVIII que figura en el listado secuencial como SEC ID N°: 102 mediante una amplificación para incorporar los sitios de las endonucleasas de restricción, Spe I y EcoR I, y dos codones de terminación antes del sitio de EcoR I. La secuencia de residuos de aminoácido correspondiente del dominio de anclaje a la membrana de cpVIII figura como SEC ID N°: 17.

Para preparar un cpVIII modificado, primero se aisló ADN en forma replicativa de M13mp18. En síntesis, se mezclaron en 2 ml de LB (medio de Luria-Bertani), 50 μ l de un cultivo de una cepa bacteriana que portaba un episoma F' (JM107, JM109 o TGI) con una décima parte de suspensión de partículas de bacteriófago derivada de una sola placa. Se incubó la mezcla durante 4 a 5 horas a 37°C con una agitación constante. Entonces se centrifugó la mezcla a 12.000 xg durante 5 minutos para formar nódulos de bacterias infectadas. Tras eliminar el sobrenadante, se volvieron a suspender los nódulos mediante fuertes movimientos vorticiales en 100 μ l de solución I enfriada en hielo. La solución I se preparó mezclando glucosa 50 mM, EDTA 10 mM y Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, y metiéndola en un autoclave durante 15 minutos.

Se añadieron a la suspensión bacteriana 200 μ l de solución II recién preparada y se invirtió rápidamente el tubo cinco veces. La solución II se preparó mezclando NaOH 0,2N y SDS al 1%. A la suspensión bacteriana, se añadieron 150 μ l de solución III enfriada en hielo y se sometió el tubo a suaves movimientos vorticiales en una posición invertida durante 10 segundos para dispersar la solución III por el lisado bacteriano viscoso. La solución III se preparó mezclando 60 ml de acetato de potasio 5M, 11,5 ml de ácido acético glacial y 28,5 ml de agua. Entonces se almacenó el lisado bacteriano resultante sobre hielo durante 5 minutos siguiendo con una centrifugación a 12.000 xg durante 5 minutos a 4°C en un tubo Microfuge. Se recuperó el sobrenadante resultante y se transfirió a un nuevo tubo. Se añadió al sobrenadante un volumen igual de fenol/cloroformo y se sometió la mezcla a movimientos vorticiales. Entonces se centrifugó la mezcla a 12.000 xg durante 2 minutos en un tubo Microfuge. Se transfirió el sobrenadante resultante a un nuevo tubo y se hizo precipitar el ADN de bacteriófago bicatenario con 2 volúmenes de etanol a temperatura ambiente. Tras dejar reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 2 minutos, se centrifugó la mezcla hasta formar nódulos de ADN. Se retiró el sobrenadante y se volvió a suspender el ADN de la forma replicativa en nódulos en 25 μ l de Tris-HCl, pH 7,6 y EDTA 10 mM (TE).

Entonces se usó el ADN de la forma replicativa de M13mp18 como molde para una PCR. Se usaron los cebadores, AK 5 (SEC ID N°: 103) y AK 6 (SEC ID N°: 104), cuyas secuencias figuran en la siguiente tabla 7, en la reacción PCR para amplificar el gen maduro para el dominio de anclaje del miembro cpVIII e incorporar los dos sitios de clonación, Spe I y EcoR I. Para la reacción PCR, se mezclaron 2 μ l que contenían 1 ng de ADN de forma replicativa de M13mp18 con 10 μ l de 10 x tampón de PCR adquirido comercialmente (Promega Biotech, Madison, Wisconsin) en un tubo Microfuge de 0,5 ml. A la mezcla de ADN, se añadieron 8 μ l de una solución 2,5 mM de varios NTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) para dar como resultado una concentración final de 200 micromolar (μ M). Se mezclaron tres μ l (equivalentes a 60 picomoles (pM)) del cebador AK 5 directo 5' y 3 μ l (60 pM) del cebador AK 6 inverso 3' en la solución de ADN. Se añadieron a la mezcla 73 μ l de agua estéril y 1 μ l/5 unidades de polimerasa (Promega Biotech). Se colocaron dos gotas de aceite mineral sobre la mezcla y se realizaron 40 series de amplificación por PCR en un termociclador. El ciclo de amplificación consistió en 52°C durante 2 minutos, 72°C durante 1,5 minutos y 91°C durante 2 minutos. Se purificaron entonces las muestras resultantes que contenían fragmentos de ADN de dominio de anclaje a la membrana de cpVIII modificados por PCR de M13mp18 con Gene Clean (BIO101, La Jolla, California), se extrajeron dos veces con fenol/cloroformo, una vez con cloroformo siguiendo con una precipitación en etanol, y se almacenaron a -70°C en Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 y EDTA 1M.

ES 2 315 612 T3

TABLA 7

SEC ID N°:	Cebador	
(103) ¹	AK 5 (D)	5' <u>GTGCCCAGGGATTGTACTAGTGCTGAGGGTGACGAT</u> 3'
(104) ²	AK 6 (I)	5' ACTCGA <u>ATTCTATCAGCTTGCTTTTCGAGGTGAA</u> 3'
(105) ³	Hc3 (D)	5' AGGTCCAGCTT <u>CTCGAGTCTGG</u> 3'
(106) ⁴	AK 7 (I)	5' <u>GTCACCCTCAGCACTAGTACAATCCCTGGGCAC</u> 3'
(107) ⁵	G-3 (D)	5' GAGACG <u>ACTAGTGGTGGCGGTGGCTCTCCATTC</u> <u>GTTTGTGAATATCAA</u> 3'
(108) ⁶	G-3 (I)	5' <u>TTACTAGCTAGCATAATAACGGAATACCCAAAA</u> <u>GA</u> ACTGG 3'
(109) ⁷	LAC-F	5' <u>TATGCTAGCTAGTAACACGACAGGTTTCCCGAC</u> TGG 3'
(110) ⁸	LAC-B	5' ACCGAGCTCGA <u>ATTCGTAATCATGGTC</u> 3'
(125) ⁹	LAC-B'	5' AGCTGTTGA <u>ATTCGTGAAATTGTTATCCGCT</u> 3'

D Cebador directo.
I Cebador inverso.

1: de 5' a 3': la secuencia solapante para el extremo 3' de C_HI está doblemente subrayada; la secuencia del sitio de restricción de Spe I está subrayada una vez; la secuencia solapante para cpVIII está doblemente subrayada.

2: la secuencia del sitio de restricción de EcoRI está subrayada una vez.

3: la secuencia del sitio de restricción de Xho I está subrayada.

4: de 5' a 3': la secuencia solapante para cpVIII está doblemente subrayada; la secuencia del sitio de restricción de Spe I está subrayada una vez; la secuencia solapante para el extremo 3' de C_HI está doblemente subrayada.

5: de 5' a 3': la secuencia del sitio de restricción de Spe I está subrayada una vez; la secuencia solapante con el extremo 5' de cpIII está doblemente subrayada.

6: de 5' a 3': la secuencia del sitio de restricción de I está subrayada una vez; la secuencia solapante con el extremo 3' de cpIII está doblemente subrayada.

7: de 5' a 3': la secuencia solapante con el extremo 3' de cpIII está doblemente subrayada; la secuencia del sitio de restricción de Nhe I comienza con el residuo de nucleótido "G" de la posición 4 y se extiende 5 residuos más = GCTAGC.

8: la secuencia del sitio de restricción de EcoRI está subrayada una vez.

9: Cebador inverso alternativo para amplificar LacZ; la secuencia del sitio de restricción de EcoRI está subrayada una vez.

Para verificar la amplificación del dominio de anclaje a la membrana de cpVIII modificado, se sometieron a electroforesis productos de ADN purificados por PCR en un gel de agarosa al 1%. El tamaño esperado de cpVIII era de aproximadamente 150 pares de bases. Se aisló la zona de la agarosa que contenía el fragmento de ADN de cpVIII modificado de la agarosa según lo descrito anteriormente. La secuencia del fragmento de ADN de cpVIII modificado aislado figura como SEC ID N°: 111. Entonces se mezcló el fragmento de ADN de cpVIII aislado con un fragmento preparado de manera similar de Fd modificado según lo descrito más adelante en el ejemplo 2i con el fin de formar un segmento de ADN codificante de la proteína de fusión Fd-cpVIII.

ES 2 315 612 T3

Anclaje a la membrana de cpIII: También se usó M13mp18 como vector de partida para aislar el gen codificante del dominio de anclaje a la membrana de cpIII, cuya secuencia figura en el listado secuencial como SEC ID N°: 112. La secuencia de residuos de aminoácido del dominio de anclaje a la membrana de cpIII figura como SEC ID N°: 16. Se preparó ADN de forma replicativa de M13mp18 según lo descrito anteriormente y se usó como molde para dos amplificaciones por PCR destinadas a la construcción de un fragmento de ADN constituido por el gen maduro del dominio de anclaje a la membrana de cpIII localizado en 5' con respecto a una secuencia codificante del promotor LacZ, operador y sitio de unión a la cubierta para controlar la expresión de la cadena ligera. Se crearon los sitios de restricción Spe I y EcoR I en las reacciones de amplificación y fueron localizados en los extremos 5' y 3' del fragmento, respectivamente. El procedimiento para crear este fragmento mediante la combinación de los productos de dos amplificaciones por PCR separadas se describe abajo.

El par de cebadores, G-3(F) (SEC ID N°: 107) y G-3(B) (SEC ID N°: 108) que figuran en la tabla 7, se usó en la primera reacción de PCR según lo realizado anteriormente para amplificar el gen de anclaje a la membrana de cpIII e incorporar los sitios de restricción de Spe I y Nhe I en el fragmento. El fragmento de PCR amplificado también contenía secuencias de nucleótidos para codificar una cadena de cinco aminoácidos compuesta por cuatro residuos de glicerina y una serina yuxtapuesta entre la cadena pesada y los dominios codificantes de cpIII. Una vez expresada, la secuencia de cinco aminoácidos carente de una estructura secundaria ordenada sirvió para minimizar la interacción entre los dominios de Fab y cpIII. Se verificó y purificó el fragmento de ADN de cpIII modificado por PCR resultante que tenía los sitios de Spe I y Nhe I en los extremos 5' y 3', respectivamente, del fragmento según lo descrito anteriormente. La secuencia del fragmento de ADN del dominio de anclaje a la membrana de cpIII modificado por PCR figura en el listado secuencial como SEC ID N°: 113. Se realizó una segunda amplificación por PCR usando el par de cebadores, Lac-F (SEC ID N°: 109) y Lac-B (SEC ID N°: 110) que figuran en la tabla 7, en un alícuota separado de ADN molde de la forma replicativa de M13mp18 para amplificar el promotor LacZ, el operador y el sitio de unión a la cubierta que tenía un sitio de Nhe I en 5' y un sitio de EcoR I en 3'. Los cebadores usados para esta amplificación fueron diseñados para incorporar un sitio de Nhe I en el extremo 5' del fragmento amplificado para solaparlo con una parte del extremo 3' del fragmento del gen de cpIII y del sitio de Nhe I en 3' con respecto al fragmento de cpIII amplificado. La reacción y la purificación del producto de PCR se realizaron según lo descrito anteriormente. La secuencia del fragmento de ADN de cpIII modificado por PCR resultante que tiene un sitio de restricción de Nhe I en 5' y de EcoR I en 3' figura en el listado secuencial como SEC ID N°: 114.

Un cebador Lac-B alternativo para su uso en la construcción del anclaje a la membrana de cpIII y la región del promotor LacZ fue Lac-B' como se muestra en la tabla 7. Las reacciones de amplificación se realizaron según lo descrito anteriormente con la excepción de que en la segunda amplificación por PCR, se usó Lac-B' con Lac-F en lugar de Lac-B. El producto de la reacción de amplificación figura en el listado secuencial como SEC ID N°: 114 de la posición de nucleótido 1 a la posición de nucleótido 172. El uso de Lac-B' resultó en una región LacZ carente de 29 nucleótidos en el extremo 3', pero que era funcionalmente equivalente al fragmento más largo producido con los cebadores Lac-F y Lac-B.

Los productos de la primera y las segunda amplificación por PCR en las que se usaron los pares de cebadores 6-3(F) y 6-3(B) y Lac-F y Lac-B se volvieron a combinar en los nucleótidos correspondientes al solapamiento del anclaje a la membrana de cpIII y el sitio de restricción de Nhe I, y se sometieron a una segunda serie de PCR usando el par de cebadores de G3-F (SEC ID N°: 107) y Lac-B (SEC ID N°: 110) para formar un producto de fragmentos de ADN por PCR recombinados constituido por lo siguiente: un sitio de restricción de Spe I en 5'; un dominio de anclaje a la membrana de ADN de cpIII comenzando en la secuencia de residuos de nucleótido que corresponde al residuo de aminoácido 198 de la proteína cpIII madura entera; un sitio de terminación endógeno proporcionado por el anclaje a la membrana en el número de residuo de aminoácido 112; un sitio de restricción de Nhe I, un promotor LacZ, un operador y una secuencia de sitio de unión a la cubierta; y un sitio de restricción de EcoR I en 3'. Entonces se digirió por restricción el fragmento de ADN del dominio de anclaje a la membrana de cpIII modificado por PCR recombinado con Spe I y EcoR I para producir un fragmento de ADN para su unión direccional en un vector de expresión de fagémido pComb2 que sólo tenía un sitio de Spe I preparado según el ejemplo Ia(iv) para formar un vector de expresión de fagémido pComb2-III (también denominado pComb2-III) según lo descrito en el ejemplo 1b(ii).

h. Aislamiento de segmento de ADN de V_H codificante anti-NPN

Para preparar los fragmentos Fd modificados para la recombinación con el fragmento del dominio de anclaje a la membrana de cpVIII modificado por PCR para formar un producto de fusión de ADN de Fd-cpVIII, se realizó una amplificación por PCR según lo descrito anteriormente usando el clon 2b preparado en el ejemplo 2f como un molde. Se usaron los cebadores Hc3 (SEC ID N°: 105) y AK 7 (SEC ID N°: 106), cuyas secuencias figuran en la tabla 7, en la PCR para amplificar la porción Fd del clon 2b e incorporar los sitios de clonación de Xho I y Spe I junto con una secuencia solapante de cpVIII. Se purificó el producto de Fd modificado por PCR amplificado, se sometió a electroforesis y se aisló desde geles de agarosa al 1% según lo descrito anteriormente. El tamaño del fragmento Fd fue de 680 pares de bases.

i. Preparación de un segmento de ADN codificante de una parte de la proteína de fusión Fd-cpVIII

Entonces el fragmento de ADN de Fd modificado por PCR purificado que contenía secuencias de nucleótidos solapantes de cpVIII preparado anteriormente se mezcló con el fragmento del dominio de anclaje a la membrana de cpVIII modificado por PCR para formar una mezcla. Se permitió la recombinación de los fragmentos de la mezcla en

ES 2 315 612 T3

5 sus regiones complementarias. Entonces se sometió la mezcla que contenía los fragmentos de PCR recombinados a una segunda serie de amplificación por PCR según lo descrito anteriormente usando el par de cebadores final AK 6 (SEC ID N°: 104) y Hc3 (SEC ID N°: 105) (tabla 7). Se purificó el correspondiente producto de la amplificación por PCR y se sometió a electroforesis sobre geles de agarosa según lo descrito anteriormente. Se determinó el producto de la PCR en aproximadamente 830 pares de bases (Fd = 680 + 150) lo que confirmó la fusión de Fd con cpVIII. La secuencia del producto de PCR unido a la secuencia de Fd con la secuencia de cpVIII en marco en un sentido de 5' a 3' figura como SEC ID N°: 115. Entonces se usó el producto de fusión Fd-cpVIII en uniones direccionales descritas en el ejemplo 2j para la construcción de un vector de expresión del fagémido dicistrónico pCBAK8-2b.

10 j. Construcción del vector de expresión dicistrónico pCBAK8-2b

Para construir un vector de fagémido para coordinar la expresión de una proteína de fusión Fd-cpVIII con la cadena ligera kappa, primero se unió el producto de fusión Fd-cpVIII amplificado por PCR preparado en el ejemplo 2i anterior en vector de expresión de fagémido del clon 2b aislado de la genoteca combinatoria de NPN preparada en el ejemplo 2f. Para la unión, primero se digirió por restricción el producto de fusión por PCR de Fd-cpVIII con Xho I y EcoR I. Se digirió de manera similar el vector de fagémido del clon 2b dando como resultado la eliminación de las regiones de clonación y del decapeptido. Se añadió el fragmento de Fd-cpVIII digerido y se unió en el clon 2b digerido por los terminales cohesivos generados mediante la digestión por restricción con Xho I y EcoR I. La unión dio como resultado la unión operativa de la secuencia de residuos de nucleótido codificante de la proteína de fusión del polipéptido Fd-cpVIII con un segundo casete que tenía las secuencias de residuos de nucleótido codificantes del sitio de unión al ribosoma, la secuencia líder de pelB y la cadena ligera kappa ya presente en el clon 2b para formar una molécula de ADN dicistrónico en el vector de expresión de fagémido del clon 2b.

Entonces se transformó *E. coli*, cepa TG1, con el fagémido que contenía la molécula de ADN dicistrónico y se seleccionaron los transformantes sobre ampicilina pues el clon 2b original contenía un gen marcador seleccionable de la resistencia a la ampicilina. Para conseguir una electro-transformación de alta eficacia de *E. coli*, se inoculó un volumen de 1:100 de un cultivo de una noche de células TG1 en un litro de caldo L (Bacto triptona al 1%, extracto de Bacto levadura al 0,5%, NaCl al 0,5%). Se mantuvo la suspensión celular a 37°C con una agitación vigorosa hasta obtener una absorbancia a 600 nm de 0,5 a 1,0. Entonces se recogió la suspensión celular en crecimiento en fase logarítmica enfriando primero el matraz sobre hielo durante 15 a 30 minutos siguiendo con una centrifugación en un rotor frío a 4.000 xg durante 15 minutos para sedimentar las bacterias. Se retiró el sobrenadante resultante y se volvieron a suspender los nódulos bacterianos en un total de un litro de agua fría para formar una suspensión de células. Se repitió el procedimiento de centrifugación y resuspensión dos veces más y, tras la última centrifugación, se volvieron a suspender los nódulos en 20 ml de glicerol al 10% frío. Entonces se centrifugó la suspensión celular resuspendida para formar nódulos celulares. Se volvieron a suspender los nódulos celulares resultantes hasta un volumen final de 2 a 3 ml en glicerol al 10% frío resultando en una concentración celular de 1 a 3 x 10¹⁰ células/ml. Para el procedimiento de electro-transformación, se mezclaron 40 µl de la suspensión celular preparada con de 1 a 2 µl de ADN de fagémido para formar una mezcla de ADN de fagémido y células. Se mezcló la mezcla resultante y se dejó reposar sobre hielo durante un minuto. Se configuró el aparato de electroporación, por ejemplo, un Gene Pulsa, a 25 uF y 2,5 kV. El controlador de impulsos fue configurado a 200 ohms. Se transfirió la mezcla de células y ADN a una cubeta de electroporación de 0,2 cm fría. Entonces se colocó la cubeta en la cámara de seguridad enfriada y se emitió una pulsación con los parámetros anteriores. Se añadió a la mezcla pulsada 1 ml de medio SOC y se volvieron a suspender las células con una pipeta de Pasteur (el medio SOC se preparó mezclando Bacto triptona al 2%, extracto de Bacto levadura al 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM y glucosa 20 mM). Se transfirió entonces la suspensión celular a un tubo de polipropileno de 17 x 100 mm y se mantuvo a 37°C durante una hora. Tras el período de mantenimiento, se emplacaron las células TG1 transformadas sobre placas de LB con ampicilina para la selección de colonias resistentes a la ampicilina que contuvieran fagémido que proporcionaran el gen marcador seleccionable.

Se seleccionaron colonias resistentes a la ampicilina y se analizaron en cuanto al tamaño correcto del inserto y a la expresión de Fab. En síntesis, se prepararon minipreparaciones de ADN de las colonias seleccionadas para el aislamiento de ADN de fagémido. Se digirió por restricción el ADN de fagémido aislado de cada miniprep con Xho I y EcoR I, y se sometieron a electroforesis los digestos sobre un gel de agarosa al 1%. Se seleccionó el clon AK16 como un fragmento de 830 pb, se visualizó sobre geles confirmando la inserción del producto de fusión por PCR Fd-cpVIII en el clon 2b digerido.

Entonces se digirió por restricción el fagémido de clon AK16 con Xho I y Xba I, y se aisló mediante electroforesis sobre gel de agarosa la secuencia de residuos de nucleótido de la molécula de ADN dicistrónico codificante de la proteína de fusión Fd-cpVIII, el sitio de unión al ribosoma y la secuencia líder pelB para la expresión de la cadena ligera, una región espaciadora y la cadena ligera kappa de 2b. Entonces se unió el fragmento de ADN dicistrónico aislado en un vector de expresión pCBAKO digerido por restricción con Xho I y Xba I preparado en el ejemplo 1c(ii) para formar un vector de expresión de fagémido dicistrónico denominado pCBAK8-2b.

El vector de expresión pCBAK8-2b resultante estaba constituido por las secuencias de residuos de nucleótido codificantes de los siguientes elementos: origen de replicación del fago filamentoso fl1; un gen marcador seleccionable resistente a la cloranfenicol acetil transferasa; un promotor LacZ inducible secuencia arriba del gen lacZ; un sitio de clonación múltiple flanqueado por los promotores de la polimerasa de T₃ y T₇; una molécula de ADN dicistrónico (un primer casete constituido por un sitio de unión al ribosoma, una secuencia líder de pelB y un producto de fusión de

ES 2 315 612 T3

ADN Fd-cpVIII unido operativamente a un segundo casete constituido por un segundo sitio de unión al ribosoma, una segunda secuencia líder de peIB y una cadena ligera kappa).

k. Construcción del vector de expresión dicistrónico pCBAK3-2b

5 Para construir un vector de fagémido para coordinar la expresión de una proteína de fusión Fd-cpIII con la cadena ligera kappa, primero se unió directamente el anclaje a la membrana de cpIII recombinado y amplificado por PCR y el fragmento de la región del promotor LacZ preparado en el ejemplo 2g que tenía un sitio de restricción de Spe I en 5' y de EcoR I en 3' en un vector de expresión de fagémido pComb2 digerido previamente con Spe I y EcoR I
10 I preparado en el ejemplo 1a(iv) para formar un vector de fagémido pComb2-3 (también denominado pComb2-III). Véase el ejemplo 1b(ii) para los datos sobre la construcción del vector. En esta invención, se usó este vector cuando se preferían vectores resistentes a la ampicilina. De este modo, el vector pComb2-3 resultante, que sólo tenía un sitio de restricción de Spe I, contenía secuencias del operador/promotor LacZ separadas para dirigir la expresión por separado del producto de fusión (Fd)-cpIII de cadena pesada y la proteína de cadena ligera. Las proteínas expresadas fueron
15 dirigidas al espacio periplásmico por las secuencias líder peIB para el ensamblaje funcional sobre la membrana. La inclusión de la región intergénica del fago F1 en el vector permitió el empaquetamiento del fagémido monocatenario con ayuda del fago auxiliar. El uso de una superinfección de fago auxiliar condujo a la expresión de dos formas de cpIII. De este modo, se perturbó la morfogénesis normal del fago mediante la competición entre la fusión Fab-cpIII y cpIII nativo del fago auxiliar para su incorporación en el virión según se muestra esquemáticamente en la figura 8 para
20 las fusiones de Fab-cpVIII.

Para producir vectores resistentes al cloranfenicol para su uso en esta invención, se digirió por restricción el vector de fagémido pComb2-3 resultante con Sac II y Apa I para formar un fragmento aislado. Entonces se unió direccionalmente el fragmento aislado resultante que contenía las secuencias de control de la expresión y la secuencia de cpIII en
25 un vector de fagémido pCBAKO digerido de manera similar preparado en el ejemplo 1c(ii) para formar un vector de expresión de fagémido pCBAK3. Este vector carecía de las secuencias de cadena ligera kappa y Fd.

Entonces se construyó el vector de expresión de fagémido resistente al cloranfenicol, pCBAK3-2b, para la expresión de una proteína de fusión y una cadena ligera kappa. En síntesis, primero se digirió el vector de expresión de fagémido pCBAK3 preparado anteriormente con Xho I y Spe I para formar un vector de expresión de fagémido pCBAK3 linealizado. Posteriormente se digirió por restricción con Xho I y Spe I el fragmento Fd modificado y amplificado por PCR, preparado en el ejemplo 2h que contenía los sitios de Xho I y Spe I. Luego se unió direccionalmente el fragmento Fd resultante por los terminales cohesivos en el vector de expresión de fagémido pCBAK3 digerido por restricción con Xho I y Spe I para formar un segundo vector de expresión de fagémido en el que el fragmento Fd modificado por PCR estaba unido operativamente en marco con las secuencias de residuos de nucleótidos codificantes de cpIII. Entonces se transformaron XL1-Blue de la cepa de *E. coli* (Stratagene) con el vector de fagémido anterior que contenía Fd-cpIII. Se seleccionaron los transformantes que contenían el fagémido codificante de Fd-cpIII sobre cloranfenicol. Se aisló el ADN de fagémido de los clones resistentes al cloranfenicol y se digirió por restricción con Sac I y Xba I para formar un vector de expresión de fagémido linealizado en el que se había unido direccionalmente un fragmento de cadena ligera de Sac I y Xba I preparado más adelante.
30
35
40

Se digirió por restricción con Sac I y Xba I el clon 2b de fagémido, aislado de la genoteca combinatoria original según lo descrito en el ejemplo 2a, para aislar la secuencia de residuos de nucleótido codificante de la cadena ligera kappa. Entonces se unió direccionalmente la secuencia de cadena ligera kappa aislada en el vector de expresión de fagémido digerido por restricción con Sac I y Xba I preparado anteriormente que contenía Fd-cpIII para formar el vector de expresión de fagémido, pCBAK3-2b. El vector resultante contenía la secuencia de residuos de nucleótido de una molécula de ADN dicistrónico para la expresión coordinada de una proteína de fusión Fd-cpIII con cadena ligera kappa. El vector de expresión de fagémido resultante estaba constituido por las secuencias de residuos de nucleótido codificantes de los siguientes elementos: origen de replicación del fago filamentosos f1; un gen marcador seleccionable resistente a la cloranfenicol acetil transferasa; un promotor LacZ inducible secuencia arriba del gen lacZ; un sitio de clonación múltiple flanqueado por los promotores de la polimerasa de T₃ y T₇; una molécula de ADN dicistrónico (un primer casete constituido por un sitio de unión al ribosoma y una secuencia líder de peIB unida operativamente a Fd-cpIII unido operativamente a un segundo casete constituido por un segundo LacZ, un segundo sitio de unión al ribosoma y una segunda secuencia líder de peIB unida operativamente a una cadena ligera kappa).
45
50
55

Se transformaron células XL1-Blue con el vector de expresión de fagémido, pCBAK3-2b. Se seleccionaron las colonias transformadas que contenían fagémidos resistentes al cloranfenicol según lo descrito anteriormente y se analizaron en cuanto al tamaño correcto de inserto y la expresión de Fab según lo descrito en el ejemplo 2j. Tras la verificación del inserto y de la expresión de Fab en el vector de fagémido pCBAK3-2b, se transformaron células XL1-Blue y se indujeron por la expresión de anticuerpos de Fab según lo descrito en los ejemplos 3 y 4.
60

Los resultados de la expresión, la selección y el rastreo de las fusiones de Fab-cpIII revelaron una ventaja de la presentación monovalente proporcionada por las fusiones de Fab-cpIII frente a las presentaciones multivalentes proporcionadas por las fusiones de Fab-cpVIII, pues ésta permitió la clasificación de los clones en base a la afinidad, así como en base a la especificidad, como ocurre en el sistema inmunológico. En Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EE.UU. 88:7978-7982 (1991), se describe un enriquecimiento 253 veces mayor del clon de unión fuerte 10C frente al clon de unión más débil 7E usando el sistema pComb3. Los estudios con genotecas de péptidos sobre fagos que presentaban de cuatro a cinco copias del péptido sobre la superficie de fago han demostrado que la multivalencia
65

evitó la separación de los fagos que presentaban péptidos de afinidad moderada (10^{-6} M) de aquéllos que presentaban péptidos de alta afinidad (10^{-9} M). Cwirla *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EE.UU. 87:6378-6382 (1990). La multivalencia conduce a un efecto de quelación que reduce la capacidad de discriminar entre fagos que llevan fragmentos Fab de alta afinidad de aquéllos que llevan fragmentos Fab de baja afinidad.

5 El uso del sistema se demostró más detalladamente mediante la clasificación de una genoteca de Fab combinatoria del toxoide antitetánico humano (un aglutinante por cada 5.000 clones) anteriormente caracterizada según lo descrito en el ejemplo 6 y por Persson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EE.UU. 88:2432-2436 (1991). La genoteca, originariamente en un sistema vectorial de fago Lambda, se reconstruyó en pComb2-3 conservando los apareamientos originales de las cadenas pesadas y ligeras. El tamaño de la genoteca, 10^7 clones era 10 veces mayor que la genoteca de fagos Lambda original. Tras una sola serie de cribado, 13 ó 57 clones recogidos fueron determinados como aglutinantes de toxoide tetánico, lo que representó un enriquecimiento de 10^3 veces mayor. Tras el tercer cribado, el rendimiento del fago había aumentado 200 veces, lo que indicó un enriquecimiento del fago específico. Todos los clones fueron, por tanto, aglutinantes específicos del antígeno. Grandes genotecas combinatorias de 10^8 miembros son por tanto accesibles usando este sistema. Se logran genotecas incluso mayores mediante mutagénesis según lo descrito en los ejemplos 6-8.

3. Expresión de heterodímero anti-NPN sobre superficies de fago

20 Para la expresión de anticuerpo Fab dirigido contra NPN sobre la superficie de fagos, se transformaron por separado células XL1-Blue con los vectores de fagémido pCBAK8-2b y pCBAK3-2b, preparados en los ejemplos 2j y 2k, respectivamente. Los transformantes fueron seleccionados sobre placas con LB que contenían $30 \mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol. Se seleccionaron colonias resistentes a antibióticos para cada transformación de fagémido y se cultivaron en cultivos líquidos a 37°C en super caldo (el super caldo se preparó mezclando los siguientes componentes: 20 g de ácido 3[N-morfolin]propano-sulfónico (MOPS); 60 g de triptona; 40 g de extracto de levadura, y 2 litros de agua; se ajustó el pH hasta 7,0 con NaOH 10 m) que contenía $30 \mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol y $12,5 \mu\text{g/ml}$ de tetraciclina para la respectiva selección antibiótica del fagémido y del episoma F'. Se diluyeron las células XL1-Blue transformadas resistentes a los antibióticos hasta una densidad óptica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) de 0,4 en super caldo. Se añadió el inductor, isopropil-tiogalactopiranosido (IPTG), a la suspensión bacteriana para una concentración final de 1 mM y se mantuvo la mezcla a 37°C durante 1 hora para inducir la expresión de la proteína de fusión y la cadena ligera kappa del promotor LacZ. Entonces se añadió fago auxiliar, bien R408 o VCS M13 (Stratagene) a la suspensión bacteriana inducida en un proporción de 10-20 de fagos auxiliares por cada célula bacteriana transformada para iniciar la generación de copias de la cadena sentido del ADN de fagémido. Entonces se mantuvo la mezcla que contenía el fago auxiliar durante dos horas más a 37°C para permitir que los ensamblajes de bacteriófago filamentosos de los anticuerpos Fab anti-NPN expresados fusionados con los dominios de anclaje a la membrana de bacteriófago de bien cpVIII o de cpIII se incorporaran a la superficie de las partículas de bacteriófago. Entonces se centrifugó la suspensión bacteriana dando como resultado nódulos de células bacterianas y un sobrenadante que contenía fagos. Se retiró el sobrenadante, se recogió y se analizó según lo descrito a continuación en cuanto a la presencia de moléculas de Fab anti-NPN funcionales ancladas a las partículas de fago por bien cpVIII o cpIII.

4. Análisis para verificar la presencia y la función de heterodímero anti-NPN sobre la superficie de fago filamentosos

a. Microscopía electrónica

45 Para localizar moléculas Fab funcionales, se estudió la unión a antígeno marcado con oro coloidal. Se mancharon los sobrenadantes que contenían fago y las células bacterianas preparadas en el ejemplo 3 sobre rejillas cubiertas con formvar (Polysciences, Inc., Warrington, Pensilvania) fijadas sobre una fase sólida. En algunos experimentos, las rejillas se revistieron con células y se infectaron con fago *in situ*. Posteriormente, se bloquearon las rejillas con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en PBS a un pH de 7,2, se lavaron e incubaron con 2-7 nanómetros (nm) de partículas de oro coloidal revestidas con conjugado de BSA-hapteno NPN durante un período de tiempo suficiente para formar un complejo de inmunorreacción marcado. Se lavaron las rejillas para eliminar las partículas de oro en exceso y se tiñeron negativamente en acetato de uranilo para visualizarlas por el microscopio electrónico.

55 El examen del fago filamentosos y las células permeabilizadas productoras de fago reveló un marcaje específico del fago o las membranas bacterianas expuestas. Se observó que el fago contenía de 1 a 24 copias de sitios de unión antigénica por partícula. Ni el fago auxiliar solo ni *E. coli* intacta se marcaron con antígeno. La unión inespecífica de fondo fue muy baja. Las partículas de fago filamentosos que surgieron de las superficies de *E. coli* se marcaron con antígeno según lo mostrado en la figura 9.

60 La generación de un vector de expresión de superficie de fago relacionado utilizando cpIII como pareja de fusión con el clon 2b, pCBAK3-2b, reveló un marcaje antigénico específico frente a la cabeza del fago, pero no a la columna. Además, el Fab antitetánico humano expresado como una fusión de cpIII no se unió al antígeno de BSA-NPN.

b. ELISA de fago

65 Se revistieron placas de microvaloración con conjugado de NPN-BSA (0,1 ml, $1 \mu\text{g/ml}$ en Tris-HCl 0,1M, pH 9,2) y se bloquearon con BSA al 1% en PBS. Se añadieron diluciones del doble en serie de fago derivado de pCBAK8-2b (0,1 ml), preparado en el ejemplo 3, a la placa de microvaloración previamente revestida y se incubó durante 3 horas

ES 2 315 612 T3

a temperatura ambiente o durante 16 horas a 4°C. Se lavaron las placas con PBS y se añadió conjugado de fosfatasa alcalina de cabra anti-kappa (Fisher Biotech, Pittsburgh, Pensilvania) (0,1 ml de 1/1000 diluido en PBS que contenía BSA al 0,1%) y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron las placas en PBS y se añadió sustrato (0,1 ml; 1 mg/ml de R-nitrofenilfosfato en Tris-HCl 0,1M; pH 9,5, que contenía MgCl₂ 50 mM). Tras la incubación a 37°C para el desarrollo de señales, se determinaron las densidades ópticas a 400 nm. Los análisis de competición se realizaron con la adición de cantidades crecientes de hapteno NPN libre variando de cero a 5 mg/pocillo.

Los análisis ELISA confirmaron la presencia de anticuerpo funcional Fab. En un análisis ELISA en dos puntos sobre placas revestidas con antígeno NPN, cuando se sondó con conjugado enzimático de cadena kappa anti-ratón, el sobrenadante de fago generado a partir de la infección con fago auxiliar de células que portaban el constructo pC-BAK8-2b mostró las curvas de valoración esperadas con diluciones del doble en serie del fago que contenía anticuerpo. Los resultados del ELISA en dos puntos se muestran en la figura 10. Para que se genere una señal en este análisis, la partícula de fago debe (i) tener cadenas Fd y kappa asociadas funcionalmente e (ii) ser multivalente. Se evaluó la especificidad de la partícula mediante la inhibición de la unión a la placa en presencia de concentraciones crecientes de hapteno libre. Las partículas de fago generadas mostraron la unión a una fase sólida del ELISA y pudieron ser inhibidas mediante la adición de hapteno según lo mostrado en la figura 11. Se alcanzó la inhibición completa cuando se usaron 5 ng de hapteno NPN libre en el análisis. El fago auxiliar no ofreció ninguna señal en el ELISA. Estos resultados muestran el ensamblaje funcional de los polipéptidos de cadena pesada y ligera de anticuerpo para formar un complejo de unión a un epítipo que está presente sobre la superficie de la partícula de fago y es capaz de unirse al capítulo de ligando preseleccionado que contenga un epítipo.

c. Precipitación de fago específica de un antígeno

Se transformó el sobrenadante de fago procedente de XL1-Blue con el vector de expresión dicistrónico pCBAK8-2b preparado en el ejemplo 3 (1 ml) y se incubó con conjugado de BSA-NPN (10 µl, 2 mg/ml) durante 18 horas a 4°C. Entonces se sedimentó la mezcla mediante centrifugación a 3.000 rpm en una centrifugadora Benchtop y se observó la aparición de precipitado. Se usó fago auxiliar como control. Se lavaron los nódulos varias veces en PBS frío (5 x 3 ml/lavado) y luego se volvieron a suspender en LB (0,5 ml). Se añadieron los precipitados disueltos a las células XL1-Blue recién preparadas (0,5 ml de cultivo de una noche), se incubaron durante 1 hora a 37°C y se emplacaron las alícuotas fuera sobre agar con LB que contenía cloranfenicol (30 µg/ml). Se seleccionaron las colonias aleatoriamente. Se trataron las elevaciones de colonias sobre nitrocelulosa con lisozima para digerir la pared celular, se trataron brevemente con cloroformo para romper la membrana exterior, se bloquearon en BSA el 1% en PBS y se incubaron con antígeno de BSA-NPN marcado con ¹²⁵I. Tras varios lavados en PBS (que contenían Tween 20 al 0,05%), se expuso la película al filtro lavado y secado durante toda la noche a -70°C y entonces se desarrollaron autorradiogramas.

Los precipitados se obtuvieron con fago que contenía anticuerpos, pero no con fago auxiliar en presencia de BSA-NPN. Además, las partículas conservaron la infectividad en la posterior incubación con células bacterianas que portaban el episoma F' y generaron 4 x 10⁵ colonias a partir de un solo precipitado disuelto.

Además, se llevaron a cabo análisis de restricción de ADN para determinar la presencia de insertos de cadena pesada y ligera. El análisis de restricción de ADN de los clones reveló la presencia de un fragmento de Xho I y Xba I de 1,4 kb según lo esperado para el constructo de fusión Fd-cpVIII y el inserto de cadena Kappa.

Estos resultados proporcionaron más pruebas para la especificidad antigénica y la multivalencia. Además de proporcionar parámetros inmunológicos, esta precipitación ofrece posibilidades para realizar un enriquecimiento superficial de partículas de fago específicas del antígeno. En principio, el fago que contiene anticuerpos específicos se puede enriquecer mucho mediante la precipitación con antígenos (que pueden ser marcadores de la superficie celular, moléculas víricas, bacterianas, así como sintéticas). Los precipitados de antígeno-anticuerpo lavados se pueden disolver mediante la adición de antígeno en exceso y fago viable recuperado. Para la recuperación de especies raras, se puede usar un antígeno inmovilizado que abra la posibilidad a una elución por afinidad diferencial.

Para demostrar la utilidad del antígeno inmovilizado para el enriquecimiento de clones de la especificidad de unión definida, se realizó un experimento de cribado. Se construyó un fagémido resistente a la ampicilina que expresaba un Fab antitetánico como una fusión de cpVIII. El rescate de este clon con fago auxiliar produjo fago codificante de fagémido resistente a la ampicilina que presentaba el Fab antitetánico en su cubierta. Se mezclaron estos fagos codificantes de la especificidad por el tétanos con fagos codificantes de hapteno NPN (1:100) y se permitió la unión a una placa de microvaloración revestida con toxoide tetánico. Tras un período de mantenimiento de una hora, se lavó la placa ampliamente y se eluyeron los fagos con un tampón de bajo pH. La infección de las células XL1-Blue en crecimiento en fase logarítmica y el posterior emplacamiento de alícuotas sobre ampicilina y cloranfenicol permitieron la cuantificación directa del enriquecimiento. El examen de más de 1.000 colonias demostró que las colonias resistentes a la ampicilina derivadas de fagos eluidos superaban las colonias resistentes al cloranfenicol en 27 a 1. Por lo tanto, el cribado enriqueció en fagos que presentaban el Fab antitetánico en 2.700 veces más. Este resultado sugiere que un clon de una especificidad definida presente en una parte por millón dominará frente a los clones inespecíficos tras dos series de cribado.

5. Ventajas de ensamblar genotecas de anticuerpos Fab combinatorias a lo largo de superficies de fago

Se presenta una potente técnica para generar genotecas con 10^{8-9} miembros y seleccionar de la genoteca Fab combinatorios con actividades de unión preseleccionadas. En el vector descrito en la presente memoria, se han conservado los sitios de clonación por restricción para insertar fragmentos de anticuerpos generados por PCR según lo presentado anteriormente para el vector Lambda. El rescate de los genes codificantes del anticuerpo Fd y cadenas kappa es mediado a través de la utilización del origen de replicación de f1 conduciendo a la síntesis y al empaquetamiento de la cadena positiva del vector sobre la co-infección con fago auxiliar. Como la partícula de virus “maduro” se ensambla mediante la incorporación de la cubierta proteínica principal alrededor del ADN monocatenario cuando éste pasa a través de la membrana interna al espacio periplásmico, no sólo captura la información genética portada en el vector de fagémido, sino que además incorpora varias copias de Fab funcional a lo largo de la partícula. En la posterior infección de células huésped que portan el episoma F’, el fagémido confiere resistencia permitiendo la selección de colonias frente al antibiótico apropiado. En esencia, se ha unido la unidad de reconocimiento antigénica según las instrucciones para su producción.

No se pudo utilizar todo el potencial del sistema combinatorio anterior, pues el rastreo permitió el fácil acceso a sólo aproximadamente 0,1-1% de los miembros. En el sistema de fagémido/M13 se generan genotecas de un tamaño similar y se accede a todos los miembros mediante selección por afinidad. Además, a diferencia del vector Lambda que generaba Fab monovalentes, este sistema genera partículas multivalentes, permitiendo así la captura de un intervalo más amplio de afinidades.

Los sitios de restricción de fagémidos únicos permiten la recombinación de las cadenas Fd y Kappa permitiendo el reemplazo o la mezcla de las cadenas. El rescate de ADN monocatenario filamentosos permite la rápida secuenciación y análisis de la composición genética del clon de interés. De hecho, se puede prever que el fago codificante de la especificidad por el anticuerpo pueda ser enriquecido mediante selección antigénica antes de la secuenciación o la mutagénesis del ADN. La opción de desarrollar más un procedimiento iterativo de mutación seguido por la selección puede permitir la generación rápida de anticuerpos de alta afinidad a partir de las secuencias de la línea germinal. Es posible automatizar el procedimiento. Dejando de un lado el potencial del sistema para imitar a la naturaleza, el sistema de fagémido/M13 permitiría una disección más completa de la respuesta de los anticuerpos en seres humanos, lo que puede producir útiles reactivos terapéuticos y de diagnóstico.

El anclaje a la membrana de la cadena pesada y la compartimentalización de la cadena kappa en el periplasma es la clave para expresar esta proteína dimérica funcional. El potencial de este sistema no se limita bajo ningún concepto a los anticuerpos, pudiéndose extender a cualquier sistema o combinación de sistemas de reconocimiento de proteínas que contenga múltiples miembros. Por ejemplo, ahora es posible el acoplamiento del ligando y los sistemas efectores en una matriz de alta avidéz. De manera similar, se puede clasificar una genoteca de ligandos frente a una genoteca de receptores.

6. Mutagénesis aleatorizada de la región CDR3 de una cadena pesada codificante del toxoide antitetánico

a. Mutagénesis por PCR con oligonucleótidos degenerados

Para obtener un heterodímero mutagenizado de esta invención de una especificidad alterada que ya no pudiera reconocer más un antígeno de toxoide tetánico (TT) pero que pudiera reconocer y se uniera específicamente a un nuevo antígeno, se desarrolló un procedimiento para aleatorizar sólo la región CDR3 de un fragmento de cadena pesada codificado por una secuencia de nucleótidos conocida. Este enfoque se representa esquemáticamente en la figura 12, en la que un fragmento de cadena pesada representativo de un clon de fagémido, constituido por regiones marco alternas (1 a 4) mostradas por los bloques blancos y regiones de determinación de la complementariedad (CDR) (1 a 3) mostradas por los bloques rallados y la primera región constante (CH1), es sometido a dos series independientes de PCR. En la primera reacción de amplificación por PCR, se amplifica el extremo 5’ de la cadena pesada que comienza en el marco 1 y se extiende hasta el extremo 3’ del marco 3. En la segunda reacción de amplificación por PCR, la región CDR3 es mutagenizada aleatoriamente mostrada por el recuadro negro. Esto se realiza mediante el uso de una mezcla de cebadores de oligonucleótido sintetizados con una región degenerada entre y contigua a las secuencias 3 y 4 de la región marco conservada. Los productos de amplificación resultantes de la segunda amplificación, cada uno con una región CDR3 aleatorizada, tienen su extremo 5’ en el extremo 3’ del marco 3 y el extremo 3’ del producto se extiende hasta el extremo 3’ de la región CH1.

La mezcla de los cebadores de oligonucleótido degenerados ha sido diseñada para dar como resultado la amplificación de productos que tienen un extremo 5’ que es complementario a y que se solapará con el extremo 3’ de los productos del primer producto de la reacción PCR. De este modo, los productos de las dos reacciones PCR separadas son mezclados y sometidos a una tercera reacción PCR en la que se extiende la región solapante entre los dos productos para dar como resultado la cadena pesada que tiene una región CDR3 aleatorizada.

Había un molde de ADN de cadena pesada para su uso en esta invención disponible en un clon (un vector de fagémido denominado 7E que contiene fragmentos de cadena pesada y cadena ligera) de una genoteca de Fab de toxoide antitetánico (TT) combinatoria humana según lo descrito por Persson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EE.UU. 88:2432-2436 (1991). Para crear una genoteca combinatoria semi-sintética, se construyó el clon 7E en vector de expresión dicistrónico pComb2-3’ para la expresión de una proteína de fusión de cadena pesada-anclaje a la membrana

ES 2 315 612 T3

de cpIII (Fd-cpIII) y una cadena ligera soluble según lo descrito para anti-NPN en el ejemplo 2k Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EE.UU., 88:7978-7982 (1991).

5 El vector de fagémido pComb2-3' se preparó según lo descrito en el ejemplo 1b(ii). El apareamiento original de las cadenas pesada y ligera desde el clon Lambda 7E se mantuvo mediante la unión del fragmento de Xho I-Xba I en un vector pComb2-3' digerido con Xho I-Xba I. Para reemplazar la secuencia de anclaje a la membrana de cpIII, se unió secuencia de promotor LacZ y líder peI B eliminado por la digestión con Xho I-Xba I, un fragmento de Spe I-Sac I procedente de pComb3, como el preparado en el ejemplo 1b(ii), en el vector pComb2-3' que contenía las secuencias de cadena pesada y ligera del clon 7E. El clon de fagémido resultante, denominado de aquí en adelante 10 pC3-TT7E, se expresó primero según lo descrito en el ejemplo 3 para los heterodímeros anti-NPN sobre superficies de fago y posteriormente se rastreó mediante el cribado sobre placas revestidas con TT según lo descrito para anti-NPN en el ejemplo 4c. El clon PC3-TT7E presentó una Kd hacia TT del orden de 10^{-7} M y fue enriquecido frente al fago inespecífico en 10^3 veces más según lo descrito por Barbas *et al.*, *supra*.

15 El clon pC3-TT7E, que tenía secuencias tanto de cadena pesada como de cadena ligera, se usó como el ADN molde para la mutagénesis aleatorizada de la región CDR3 de la cadena pesada para alterar la especificidad de unión antigénica según lo descrito en la presente memoria. La secuencia de la cadena pesada se determinó según lo descrito en el ejemplo 1a(ii). Se realizaron dos reacciones PCR separadas según lo ilustrado en la figura 12.

20 La primera reacción PCR dio como resultado la amplificación de la región del fragmento de cadena pesada en el clon pC3-TT7E comenzando con la región marco 1 y extendiéndose hasta el extremo de la región marco 3 que está localizado en 5' con respecto a CDR3, que tiene una longitud de aproximadamente 400 pares de bases. Para amplificar esta región, se usaron los siguientes pares de cebadores. El cebador de oligonucleótido antisentido 5', FT3X, que tiene la secuencia de nucleótidos 5'-G-CAA-TAA-ACC-CTC-ACT-AAA-GGG-3' (SEC ID N°: 118), hibridado con 25 la cadena no codificante de la cadena pesada correspondiente a la región 5' de e incluyendo el comienzo del marco 1. El cebador de oligonucleótido sentido 3', B7EFR3, que tiene la secuencia de nucleótidos 5'-TCT-CGC-ACA-ATA-ATA-CAC-GGC-3' (SEC ID N°: 119), hibridado con la cadena codificante de la cadena pesada correspondiente al extremo 3' de la región marco 3. Los cebadores de oligonucleótido fueron sintetizados por Research Genetics (Hunsville, AL). La reacción PCR se realizó en una reacción de 100 μ l que contenía un μ g de cada uno de los cebadores de 30 oligonucleótido FTX3 y B7EFR3, 8 μ l de varios NTP 2,5Mm (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 μ l de Taq polimerasa, 10 ng de molde pCE-TT7E y 10 μ l de 10 x tampón de PCR adquirido comercialmente (Promega- Biotech). Se colocaron dos gotas de aceite mineral sobre la mezcla y se realizaron 35 series de amplificación por PCR en un termociclador. El ciclo de amplificación consistió en la desnaturalización a 94°C durante un minuto, el apareamiento a 50°C durante un minuto, seguido por la extensión a 72°C durante dos minutos. Entonces se purificaron con gel los productos de la 35 amplificación por PCR resultantes según lo descrito en el ejemplo 1d y se usaron en una reacción PCR de extensión por solapamiento con los productos de la segunda reacción PCR, ambos según lo descrito más adelante, para recombinar los dos productos en cadenas pesadas reconstruidas que contenían regiones CDR3 mutagenizadas según lo ilustrado en la figura 12. La producción total de ADN de esta amplificación fue de aproximadamente 3 μ g/100 μ l.

40 La segunda reacción PCR dio como resultado la amplificación de la cadena pesada del extremo 3' de la región marco 3 que se extendía hasta el extremo de la región CH1 que tiene una longitud de aproximadamente 390 pares de bases. Para amplificar esta región, se usaron los siguientes cebadores. La mezcla de cebadores de oligonucleótido antisentido 5', denominada 7ECDR3, tenía la secuencia de nucleótidos representada por la fórmula:

45 5'-GTG-TAT-TAT-TGT-GCG-AGA-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-TGG-GGC-CAA-GGG-A CC-ACG-3', en la que N puede ser A, C, G o T, y S es bien C o G (SEC ID N°: 120), en la que el extremo 5' de la mezcla de cebadores era complementario al extremo 3' del marco 3 representado por la secuencia de nucleótidos complementaria del cebador de oligonucleótido B73FR3 y el extremo 3' de la mezcla de cebadores era complementario al extremo 5' del marco 4. La región situada entre los dos extremos especificados 50 de la mezcla de cebadores estaba representada por una degeneración de NNS de 48 monómeros que a la larga codificó una población distinta de regiones CDR3 mutagenizadas de una longitud de 16 residuos de aminoácido. El cebador de oligonucleótido sentido 3', CG1Z, según lo descrito por Persson *et al.*, *supra*, tenía la secuencia de nucleótidos 5'-GCATGTACTAGTTTTGTCACAAGATTTGGG-3' (SEC ID N°: 121), hibridada con la cadena codificante de la cadena pesada correspondiente al extremo 3' de CH1. La segunda reacción PCR se realizó sobre pC3-TT7E en una 55 reacción de 100 μ l según lo descrito anteriormente que contenía un μ g de cada uno de los cebadores de oligonucleótido 7ECDR3 y CG1Z. Los productos de la amplificación por PCR resultantes fueron entonces purificados sobre gel según lo descrito anteriormente. La producción total de ADN de esta segunda amplificación de mutagénesis por PCR fue de aproximadamente 3 μ g/100 μ l.

60 Entonces se mezclaron cien nanogramos de los productos purificados sobre gel de la primera y segunda reacción PCR con 1 μ g de cada cebador de oligonucleótido FTX3 y CG1Z como un par de cebadores en una reacción PCR final para formar un fragmento de cadena pesada completo mediante extensión por solapamiento según lo ilustrado en la figura 12. La mezcla de reacción PCR también contenía 10 μ l 10 x tampón de PCR, 1 μ l de Taq polimerasa y 8 μ l de varios dNTP 2,5 mM según lo descrito anteriormente. La reacción PCR se realizó según lo descrito anteriormente. 65 Para obtener cantidades suficientes del producto de amplificación, se realizaron 15 reacciones PCR idénticas. Los fragmentos de cadena pesada resultantes que comenzaban en el marco 1 y se extendían hasta el extremo de CH1 y que tenían regiones CDR3 mutagenizadas aleatoriamente eran de una longitud de aproximadamente 790 pares de bases. Primero se mezclaron los productos de la amplificación de los fragmentos de cadena pesada de las 15 reacciones y

ES 2 315 612 T3

luego se purificaron sobre gel según lo descrito anteriormente antes de su incorporación en una genoteca de fagémidos. La producción total de ADN de cada amplificación fue de aproximadamente 3 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$, por lo que la producción de mezcla total contenía aproximadamente 45 μg de cadena pesada mutagenizada amplificada.

5 b. Construcción de la genoteca de fagémidos

Entonces se digirieron los fragmentos de cadena pesada purificados sobre gel resultantes preparados en el ejemplo 6a con las enzimas de restricción Xho I y Spe I, según lo descrito en el ejemplo 2d. Posteriormente, se purificaron sobre gel los fragmentos de cadena pesada digeridos resultantes antes de su inserción en el clon del vector de fagémido pC3-TT7E que había sido previamente digerido con las mismas enzimas de restricción para eliminar el fragmento de cadena pesada no mutagenizado y formar un vector lineal. La unión de 640 ng de fragmentos digeridos por Spe I y Xho I de cadena pesada que tenían regiones CDR3 mutagenizadas en dos μg del vector de fagémido pC3-TT7E linealizado para formar vectores circulares que tuvieran regiones CDR3 mutagenizadas se realizó durante una noche a temperatura ambiente usando 10 unidades de BRL ligasa (Gaithersburg, MD) en tampón de BRL ligasa en un volumen de reacción de 150 μl . Las cinco reacciones de unión separadas se realizaron para aumentar el tamaño de la genoteca de fagos que tenía las regiones CDR3 mutagenizadas. De este modo, la cantidad total de cadena pesada mutagenizada amplificada para las cinco reacciones de unión fue de 3,2 μg . Tras las reacciones de unión, se precipitó el ADN circular a -20°C durante dos horas mediante la mezcla de 2 μl de 20 mg/ml de glicógeno, 15 μl de acetato de sodio 3M a pH 5,2 y 300 μl de etanol. Entonces se sedimentó el ADN mediante microcentrifugación a 4°C durante 15 minutos. Se lavaron los nódulos de ADN con etanol al 70% frío y se secaron al vacío. Se volvieron a suspender los nódulos en 10 μl de agua y se transformaron por electroporación en 300 μl de células XL1-Blue de *E. coli* según lo descrito en el ejemplo 2k para formar una genoteca de fagos. La producción total del procedimiento de mutagénesis y transformación descrito en la presente memoria fue de aproximadamente 5×10^7 transformantes. Las células XL1-Blue de *E. coli* se seleccionaron como huéspedes pues el único codón de terminación TAT está eliminado.

Tras la transformación, para aislar los fagos en los que se ha inducido la expresión del heterodímero, para el posterior cribado sobre antígenos diana tales como fluoresceína, se añadieron 3 ml de medio SOC (el SOC fue preparado mezclando 20 g de Bacto-triptona; 5 g de extracto de levadura y 0,5 g de NaCl en un litro de agua, ajustando el pH hasta 7,5 y añadiendo 20 ml de glucosa justo antes de usarlo para inducir la expresión del heterodímero de Fd-cpIII y cadena ligera) y se agitó el cultivo a 220 rpm durante una hora a 37°C , tras lo que se añadieron 10 ml de SB (el SB fue preparado mezclando 30 g de triptona, 20 g de extracto de levadura y 10 g de tampón de Mops por litro con un pH ajustado en 7) que contenía 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de carbenicilina y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de tetraciclina, y se agitó la mezcla a 300 rpm durante una hora más. Se añadió esta mezcla resultante a 100 ml de SB que contenía 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de carbenicilina y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de tetraciclina, y se agitó durante una hora, tras lo que se añadió fago auxiliar VCSM13 (10^{12} ufp) y se agitó la mezcla durante dos horas más. Tras este tiempo, se añadieron 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de kanamicina y se mantuvo a 30°C durante una noche. La temperatura más baja dio como resultado una mejor incorporación del heterodímero sobre la superficie del fago. Se aclaró el sobrenadante mediante centrifugación (4.000 rpm durante 15 minutos en un rotor JA10 a 4°C). Se precipitaron los fagos mediante la adición de polietilenglicol 8000 al 4% (p/v) y NaCl al 3% (p/v), y se mantuvieron sobre hielo durante 30 minutos siguiendo con una centrifugación (9.000 rpm durante 20 minutos en un rotor JA10 a 4°C). Se volvieron a suspender los sedimentos de fago en 2 ml de PBS y se microcentrifugó durante tres minutos hasta obtener los residuos de sedimentos, se transfirieron a tubos limpios y se almacenaron a -20°C para el posterior rastreo según lo descrito más adelante.

Para determinar las unidades de formación de colonias (ufc) de valoración, se diluyeron fagos (fagémido empaquetado) en SB y se usó 1 μl para infectar 50 μl de células XL1-Blue de *E. coli* recién preparadas ($\text{DO}_{600} = 1$) cultivadas en SB que contenía 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de tetraciclina. Se mantuvieron los fagos y las células a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se emplacaron directamente sobre placas con LB/carbenicilina.

50 c. Selección de heterodímeros anti-fluoresceína sobre superficies de fago

1) Cribados múltiples de la genoteca de fagos que tiene regiones CDR3 mutagenizadas

La genoteca de fagos producida en el ejemplo 6b que tiene fragmentos de cadena pesada con regiones CDR3 mutagenizadas fue cribada según lo descrito en la presente memoria sobre una placa de microvaloración revestida con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de conjugado de fluoresceína-BSA para rastrear en busca de heterodímeros anti-fluoresceína. La fluoresceína fue conjugada con la BSA según los procedimientos descritos en "Antibodies: A Laboratory Manual", eds Harlow *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

El procedimiento de cribado usado fue una modificación del descrito originalmente por Parmley y Smith (Parmley *et al.*, *Gene*. 73:30-5-318). Se revistieron durante una noche dos de los cuatro pocillos de una placa de microvaloración (Costar 3690) a 4°C con 25 μl de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de antígeno TT preparado anteriormente en bicarbonato 0,1M, pH 8,6. Se lavaron los pocillos dos veces con agua y se bloquearon llenando completamente el pocillo con BSA al 3% (p/v) en PBS y manteniendo la placa a 37°C durante una hora. Tras agitar la solución de bloqueo, se añadieron 50 μl de genoteca de fagos preparada anteriormente (comúnmente 10^{11} ufc) a cada pocillo y se mantuvo la placa durante dos horas a 37°C .

Se eliminaron los fagos y se lavó la placa una vez con agua. Entonces se lavó cada pocillo diez veces con TBS/Tween (Tris-HCl 50 mM; pH 7,5; NaCl 150 mM; Tween 20 al 0,5%) durante un período de una hora a tem-

ES 2 315 612 T3

peratura ambiente, consistiendo el lavado en pipetear hacia arriba y abajo para lavar el pocillo, dejando cada vez que el pocillo se quedara completamente lleno de TBS/Tween entre cada lavado. Se lavó la placa una vez más con agua destilada y se eluyeron los fagos adherentes mediante la adición de 50 μ l de tampón de elución (HCl 0,1M, ajustado hasta un pH 2,2 con glicina sólida, que contenía 1 mg/ml de BSA) a cada pocillo seguida por el mantenimiento a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se pipeteó el tampón de elución hacia arriba y abajo varias veces, se retiró y se neutralizó con 3 μ l de base Tris 2M por cada 50 μ l de tampón de elución usado.

Se usaron los fagos eluidos para infectar 2 ml de células XL1-Blue de *E. coli* recién preparadas ($DO_{600} = 1$) durante 15 minutos a temperatura ambiente, tras lo que se añadieron 20 μ g/ml de carbenicilina y 10 μ g/ml de tetraciclina. Se extrajeron alícuotas de 20, 10 y 1/10 μ l del cultivo para emplazarlas para determinar el número de fagos (fagémidos empaquetados) que fueron eluidos de la placa. Se agitó el cultivo durante una hora a 37°C, tras lo que se añadió a 100 ml de SB que contenía 50 μ g/ml de carbenicilina y 10 μ g/ml de tetraciclina, y se agitó durante una hora. Entonces se añadieron fagos auxiliares VCSM13 (10^{12} ufp) y se agitó el cultivo durante dos horas más. Tras este tiempo, se añadieron 70 μ g/ml de kanamicina y se incubó el cultivo a 37°C durante una noche. Se repitieron la preparación de los fagos y el posterior cribado según lo descrito anteriormente.

Tras cada serie de cribado, se determinó el porcentaje de producción de fagos como % de producción - (número de fagos eluidos/número de fagos aplicados) x 100. La proporción de entrada de fagos inicial se determinó valorando sobre placas selectivas según lo descrito en el ejemplo 6b en aproximadamente 10^{11} ufc para cada serie de cribado. La proporción de salida de fagos final se determinó infectando dos ml de células XL1-Blue en fase logarítmica según lo descrito anteriormente y emplacando alícuotas sobre placas selectivas.

Como alternativa a la elución con ácido, los fagos unidos a los pocillos de la placa de microvaloración fueron eluidos añadiendo 50 μ l de una solución de fluoresceína 10^{-5} M diluida en PBS, siguiendo con un período de mantenimiento de una hora a 37°C. Entonces se pipeteó la solución hacia arriba y abajo para lavar los pocillos. El eluido resultante fue transferido a 2 ml de células XL1-Blue de *E. coli* recién preparadas para la infección según lo descrito anteriormente para la preparación de los fagos y el posterior cribado. En las series posteriores de cribado, los fagos fueron eluidos con fluoresceína 10^{-6} M.

En la tabla 8, se muestran los resultados de la cantidad de fagos que se unieron específicamente a los pocillos revestidos con fluoresceína durante cuatro series consecutivas de cribado y de la elución sólo con ácido o con fluoresceína. Se obtuvieron rendimientos comparables de fagos sobre los que se expresaron heterodímeros que se unieron específicamente a la fluoresceína con cualquier protocolo de elución. Estos datos confirman que la mutagénesis de la región CDR3 según lo descrito en la presente memoria dio como resultado la alteración de un heterodímero que inicialmente se unía específicamente a TT en uno que se unió específicamente a la fluoresceína.

TABLA 8

Fagos eluidos

	Elución con ácido	Elución con fluoresceína
Serie 1	$5,6 \times 10^5$ /pocillo	$4,7 \times 10^5$ /pocillo
Serie 2	$4,6 \times 10^6$ /pocillo	$5,6 \times 10^5$ /pocillo
Serie 3	$3,8 \times 10^5$ /pocillo	$1,4 \times 10^6$ /pocillo
Serie 4	$1,3 \times 10^6$ /pocillo	$4,0 \times 10^6$ /pocillo

La unión inespecífica a esta superficie con la fase control varió entre 10^4 y 10^5 fagos por pocillo. La producción de Fab soluble y la verificación de la unión a fluoresceína mediante ELISA según lo descrito en el apartado 2) de abajo revelaron 8 clones reactivos de 60 seleccionados aleatoriamente de entre las colonias transformadas y 38 clones reactivos de 40 seleccionados aleatoriamente de entre las colonias transformadas para las genotecas eluidas con ácido y las eluidas con fluoresceína, respectivamente.

2) Preparación de heterodímeros solubles para caracterizar la especificidad de unión a la fluoresceína

Para seguir caracterizando la especificidad de los heterodímeros mutagenizados expresados sobre la superficie de fago según lo descrito anteriormente, se prepararon heterodímeros Fab solubles tanto procedentes de los fagos eluidos con ácido como de los eluidos con fluoresceína, y se analizaron en análisis ELISA sobre placas revestidas con fluoresceína, mediante ELISA de competición con concentraciones crecientes de fluoresceína-BSA soluble y también mediante análisis de detención con fluorescencia. Los últimos análisis se realizaron según lo descrito en "Fluorescein Hapten: An Immunological Probe", ed E. W. Voss, CRC Press, Inc. pp 52-54, 1984.

ES 2 315 612 T3

Para preparar heterodímeros solubles, se aisló ADN de fagémido procedente de clones positivos y se digirió con Spe I y Nhe I. La digestión con estas enzimas produjo extremos cohesivos compatibles. Se purificó sobre gel (agarosa al 0,6%) y auto-unió el fragmento de ADN de 4,7-kb carente de la parte del gen III. La transformación de células XL1-Blue de *E. coli* proporcionó el aislamiento de recombinantes carentes del fragmento de cpIII. Se examinaron los clones para retirar el fragmento de cpIII mediante la digestión con Xho I-Xba I, lo que debería producir un fragmento de 1,6-kb. Se cultivaron los clones en 10 ml de SB que contenía 50 $\mu\text{g/ml}$ de carbenicilina y MgCl_2 20 mM a 37°C hasta que se alcanzó una DO_{600} de 0,2. Se añadió IPTG (1 mM) y se dejó desarrollarse el cultivo durante una noche a 30°C (el crecimiento a 37°C sólo proporciona una leve reducción de la producción de heterodímero). Se sedimentaron las células por centrifugación a 4.000 rpm durante 15 minutos en un rotor JA10 a 4°C. Se volvieron a suspender las células en 4 ml de PBS que contenía 34 $\mu\text{g/ml}$ de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y se lisaron mediante un tratamiento con ultrasonidos sobre hielo (2-4 minutos al 50%). Se sedimentaron los restos por centrifugación a 14.000 rpm en un rotor JA20 a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante se usó directamente para el análisis ELISA según lo descrito abajo y se almacenó a -20°C. Para el estudio de un gran número de clones, 10 ml de cultivos proporcionaron suficiente heterodímero para el análisis. En este caso, los tratamientos con ultrasonidos fueron realizados en 2 ml de tampón.

Se analizaron mediante ELISA los heterodímeros solubles preparados anteriormente. Para este análisis, se añadió 1 $\mu\text{g/pocillo}$ de solución de fluoresceína-BSA a cada pocillo de una placa de microvaloración y se mantuvieron a 4°C durante una noche para dejar que la solución de proteínas se adhiriera a las paredes del pocillo. Tras el período de mantenimiento, se lavaron los pocillos una vez con PBS y después se mantuvieron con una solución de BSA al 3% para bloquear los sitios inespecíficos sobre los pocillos. Se mantuvieron las placas a 37°C durante una hora tras lo que se invirtieron las placas y se agitaron para retirar la solución de BSA. Entonces se añadieron los heterodímeros solubles preparados anteriormente a cada pocillo y se mantuvieron a 37°C durante una hora para formar productos de inmunorreacción. Tras el período de mantenimiento, se lavaron los pocillos diez veces con PBS para eliminar el anticuerpo soluble sin unir y luego se mantuvieron con un Fab anti-humano de cabra secundario conjugado con fosfatasa alcalina diluida en BPS que contenía BSA al 1%. Se mantuvieron los pocillos a 37°C durante una hora tras lo que se lavaron los pocillos diez veces con PBS siguiendo con el desarrollo con fosfato de p-nitrofenilo (PNPP).

Entonces se analizaron los heterodímeros inmunorreactivos según lo determinado en el ELISA anterior mediante ELISA de competición para determinar la afinidad de los heterodímeros mutagenizados. El ELISA se realizó según lo descrito anteriormente con concentraciones crecientes de fluoresceína-BSA soluble variando la concentración de 10^{-9}M a 10^{-5}M realizando la adición en presencia de heterodímeros solubles. La inhibición máxima de la unión se alcanzó a una concentración de 10^{-6}M de antígeno libre, obteniéndose la inhibición máxima media con aproximadamente 10^{-7}M de antígeno libre. Los anticuerpos expresados de todos los clones tenían constantes de disociación aproximadas (Kd) en el intervalo de 10^{-7} a 10^{-8}M para los conjugados de fluoresceína-BSA tanto para las eluciones con fluoresceína como las eluciones con ácido. Las Kd verdaderas se determinaron en análisis de detención con fluorescencia. Los anticuerpos expresados sobre fagos procedentes de clones tras la elución con fluoresceína tenían afinidades mayores por la fluoresceína, 10^{-7}M frente a 10^{-6}M para los anticuerpos eluidos con ácido. El clon precursor, 7E, no mostró ninguna detención dentro de límites detectables del análisis, lo que sugiere una afinidad para la fluoresceína libre de menos de 10^{-5}M . Las afinidades de los aglutinantes más potentes de anticuerpos con la fluoresceína (10^{-7}M) se acercaron a la Kd media de la respuesta secundaria de los ratones inmunizados para la fluoresceína libre (10^{-7}M) según lo mostrado por Kranz *et al.*, *Mol. Immunol.*, 20:1313-1322 (1983).

De este modo, los heterodímeros mutagenizados de esta invención reconocieron y se unieron específicamente a la fluoresceína. Se realizaron más experimentos para confirmar que los heterodímeros mutagenizados ya no reconocían el TT al que el heterodímero no mutagenizado se unía originariamente. También se realizaron análisis de detención con fluorescencia para confirmar la especificidad de unión de los heterodímeros mutagenizados. Los heterodímeros solubles preparados a partir de fagos que fueron bien eluidos sólo con ácido o sólo con fluoresceína resultaron ser igualmente eficaces en la unión a la fluoresceína por cualquiera de los enfoques anteriormente mencionados. La mutagénesis de la región CDR3 de la cadena pesada de un heterodímero descrito en la presente memoria resultó por tanto en la alteración de la especificidad de unión del TT a la fluoresceína.

d. Análisis secuencial de heterodímeros anti-fluoresceína seleccionados

Se determinó la secuencia de nucleótidos completa de la cadena pesada mutada de un número representativo de clones de unión a fluoresceína-BSA. No se observaron mutaciones inducidas por la PCR fuera de la región CDR3. En la figura 13, se muestran las secuencias de aminoácidos predichas de la región CDR3 de cadena pesada con la correspondiente SEC ID N° entre paréntesis. Los siete clones recuperados del régimen de elución con ácido no mostraron secuencia consenso. La falta de un comportamiento de consenso en los clones eluidos con ácido puede ser aportada por su reconocimiento de un epítipo más complejo constituido por fluoresceína y BSA, y se refleja en afinidades más dispares por la fluoresceína y por fluoresceína-BSA.

Por el contrario, los clones aislados mediante la elución de fluoresceína mostraron una alta selección de secuencias consenso. De los diez clones secuenciados, sólo se observaron tres secuencias diferentes. Todos los clones tenían un residuo de glicina en la posición de residuo de aminoácido 95 y un residuo de ácido aspártico en la posición 101. Las posiciones de los residuos de aminoácido se basan en el sistema de numeración de Kabat según lo descrito por Kabat *et al.*, en "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Ministerio Estadounidense de Sanidad y Servicios Sociales (1987). Se usaron los dos posibles codones para codificar el residuo de glicina proporcionados mediante el protocolo de síntesis en el que se produjeron los 32 posibles codones. En los anticuerpos naturales, el residuo de ácido

ES 2 315 612 T3

aspártico de la posición 101 habitualmente desempeña un papel estructural mediante la formación de un puente salino con un residuo de arginina en la posición 94 de la región marco 3 (FR3). De este modo, el procedimiento de selección artificial había repetido una interacción de relevancia estructural que refleja la observada en el animal.

5 Además, nueve de los anticuerpos semi-sintéticos expresados a partir de diez clones contenían una secuencia triplete de serina-arginina-prolina cerca del centro del bucle directamente adyacente o un residuo eliminado del lado amino-terminal de un residuo de arginina, aunque el uso del codón para dos de estos residuos fue diferente. El clon F31 carecía de este motivo central. Todas las secuencias eran ricas en residuos de arginina, lo que fue codificado por tres de los 32 codones posibles. La comparación de la incidencia dentro de las secuencias CDR3 de diez diferencias
10 de arginina con leucina y serina, que también fueron codificadas por tres posibles codones en la síntesis, reveló una proporción de arginina-leucina-serina de 29:16:15. Esta inclinación hacia la selección de la arginina puede ser el resultado del carácter dianiónico de la fluoresceína.

El descubrimiento del uso de codones distintos apoya la proposición de que la selección clónica tuvo lugar a nivel
15 de la unión entre antígeno y anticuerpo, y no debida a alguna tendencia inesperada de la incorporación de nucleótidos en el ADN.

7. Mutagénesis aleatorizada de la región CDR3 de una cadena ligera codificante del toxoide antitetánico

20 a. Mutagénesis por PCR con oligonucleótidos degenerados

Siguiendo un procedimiento similar a la mutagénesis aleatoria de la cadena pesada según lo descrito en el ejemplo 6, se aleatorizó la región CDR3 de un fragmento de cadena ligera del clon de fagémido específico del toxoide antitetánico pC3-TT7E para producir anticuerpos que tuvieran una especificidad por la fluoresceína. Las amplificaciones por
25 PCR se realizaron según lo descrito en el ejemplo 6a con la excepción de los cebadores de oligonucleótidos usados en las reacciones.

La primera reacción PCR dio como resultado la amplificación de la región del fragmento de cadena ligera en el clon pC3-TT7E comenzando con el sitio de EcoR V de 5' del vector y extendiéndose hasta el extremo 5' de la región CDR3.
30 Para amplificar esta región, se usaron los siguientes cebadores: el cebador de oligonucleótido antisentido 5', KEF, que tenía la secuencia de nucleótidos 5'-GAATTCTAAACTAGCTAGTCG-3' (SEC ID N°: 126), hibridado con la cadena no codificante de la cadena ligera correspondiente al sitio de EcoR V del vector; el cebador de oligonucleótido sentido 3', KV12B, que tenía la secuencia de nucleótidos 5'-ATACTGCTGACAGTAATACAC-3' (SEC ID N°: 127), hibridado con la cadena codificante de la cadena pesada correspondiente al extremo 5' de CDR3. La amplificación por PCR se realizó según lo descrito en el ejemplo 6a. Entonces se purificaron sobre gel los productos de la PCR resultantes según
35 lo descrito en el ejemplo 1d y se usaron en una reacción PCR de extensión por solapamiento con los productos de la segunda reacción PCR, ambos según lo descrito más adelante, para recombinar los dos productos en cadenas pesadas reconstruidas que contenían regiones CDR3 mutagenizadas según lo ilustrado en la figura 12.

La segunda reacción PCR dio como resultado la amplificación de la cadena ligera desde el extremo 5' de la región CDR3 y extendiéndose hasta el extremo de la región CH1. Para amplificar esta región, se usaron los siguientes cebadores. La mezcla de cebadores de oligonucleótido antisentido 5', denominada KV5R, tenía la secuencia de nucleótidos representada por la fórmula: 5'-TATTACTGTCAGCAGTATNNKNNKNNKNNKNNKACTTTCGGCGGAGGGAC
40 C-3' (SEC ID N°: 128), en la que N puede ser A, C, G o T, y en la que K es bien G o T, siendo el extremo 5' de la mezcla de cebadores complementario al extremo 5' de CDR3 y el extremo 3' de la mezcla de cebadores complementario al extremo 3' de CDR3 y el extremo 5' del marco 4. La región situada entre los dos extremos especificados de la mezcla de cebadores estaba representada por una degeneración de 15 monómeros que a la larga codificó una población distinta de regiones CDR3 mutagenizadas internas de una longitud de 5 residuos de aminoácido limitadas por extremos 5' y 3' no mutagenizados de las regiones CDR3. El cebador de oligonucleótido sentido 3', T7B, que
45 tiene la secuencia de nucleótidos 5'-AATAGGACTCACTATAGGGCG-3' (SEC ID N°: 129), se hibridó con la cadena codificante de la cadena ligera correspondiente a la región T7 del vector. La segunda reacción PCR se realizó sobre pC3-TT7E según lo descrito en el ejemplo 6a con los cebadores KV5R y T7B. Los productos de la amplificación por PCR resultantes fueron entonces purificados sobre gel según lo descrito anteriormente.

Entonces se mezclaron quinientos nanogramos de los productos purificados sobre gel de la primera y segunda
55 reacción PCR con 1 µg de cada cebador de oligonucleótido KEF y T7B como un par de cebadores en una reacción PCR final para formar un fragmento de cadena ligera completo mediante extensión por solapamiento según lo ilustrado en la figura 12. La amplificación por PCR se realizó según lo descrito en el ejemplo 6a. Para obtener cantidades suficientes del producto de amplificación, se realizaron 5 reacciones PCR idénticas. Los fragmentos de cadena ligera resultantes
60 que comenzaban en el sitio de EcoR V de 5' y se extendían hasta la región de T7, tenían cinco aminoácidos internos de la CDR3 mutagenizada aleatoriamente.

b. Construcción de la genoteca de fagémidos

Entonces se digirieron los fragmentos de cadena ligera purificados sobre gel resultantes preparados en el ejemplo 7a con las enzimas de restricción Sac I y Xba I, según lo descrito en el ejemplo 2d. Posteriormente, se purificaron sobre gel los fragmentos de cadena ligera digeridos resultantes antes de su inserción en el clon del vector de fagémido pC3-TT7E que había sido previamente digerido con las mismas enzimas de restricción para eliminar el fragmento de cadena ligera

no mutagenizada y formar un vector lineal. La unión de 450 ng de productos de amplificación de cadena ligera en 1,4 μg de vector de fagémido pC3-TT7E linealizado para formar vectores circulares con las regiones CDR3 mutagenizadas se realizó según lo descrito en el ejemplo 6b. Las cinco reacciones de unión independientes se realizaron para aumentar el tamaño de la genoteca de fagos que tenía las regiones CDR3 internamente mutagenizadas. Tras las reacciones de unión, se precipitó el ADN circular y se transformó en XL1-Blue de *E. coli* según lo descrito en el ejemplo 6b para formar una genoteca de fagos. La producción total del procedimiento de mutagénesis y transformación descrito en la presente memoria fue de aproximadamente 2×10^7 transformantes. Los fagos fueron aislados según lo descrito para los transformantes de la mutagénesis de la cadena pesada.

10 c. Selección de heterodímeros anti-fluoresceína sobre superficie de fagos y análisis secuencial de los anticuerpos seleccionados

Se cribó la genoteca de fagos producida en el ejemplo 7b que tenía fragmentos de cadena ligera con cinco aminoácidos internamente mutagenizados en la región CDR3 según lo descrito en el ejemplo 6c. Los números de fagos que se unieron específicamente a los pocillos revestidos de fluoresceína durante tres series consecutivas de cribado y elución con hapteno con una entrada de fagos de 10^{11} fueron de $0,75 \times 10^6$; 1×10^6 y $2,4 \times 10^7$. Los ciclos repetidos de transformación, de preparación de los fagos, de cribado y de elución resultaron por tanto en un enriquecimiento significativo de heterodímeros que se unieron específicamente a la fluoresceína. Los Fab solubles se prepararon según lo descrito en el ejemplo 6b2) para caracterizar la especificidad de unión a la fluoresceína. Se seleccionaron siete clones para el análisis secuencial según lo descrito en el ejemplo 6d. En la figura 14, se muestran los resultados del análisis secuencial. La región mutada de la CDR3 de cadena ligera abarca las posiciones de la cadena ligera de inmunoglobulina de aminoácidos de Kabat de 92 a 96. La secuencia de esta región desde el clon inicial, pC3-TT7E, fue de Gly-Ser-Ser-Leu-Trp (SEC ID N°: 148). De los siete anticuerpos mutados y seleccionados sobre fluoresceína, cinco de ellos procedentes de los clones P2, P21, P23, P28 y P19 tenían la secuencia de aminoácidos Thr-Arg-Pro-Gly-Val (SEC ID N°: 149), pero cada uno fue el resultado de las traducciones a partir de secuencias de nucleótidos únicas. Los dos anticuerpos restantes procedentes de los clones P15 y P11, derivados de las secuencias de nucleótidos únicas, también tenían secuencias de aminoácidos únicas. De este modo, como la mayoría de las cadenas ligeras mutagenizadas tenían la misma secuencia de aminoácidos codificada por los posibles codones en la síntesis, el procedimiento de selección artificial ha repetido una interacción de relevancia estructural que en el animal fue el resultado del proceso de selección natural.

La mutagénesis de las regiones CDR no está limitada a la región CDR3, pues es posible diseñar los cebadores para que resulten en la mutagénesis aleatoria de CDR1 y CDR2 de tanto la cadena pesada como la ligera. La mutación de las seis regiones CDR resultaría en una genoteca excepcionalmente diferente más allá de la que se puede obtener en el animal. Para obtener una aleatorización en todas las CDR, las CDR de cadena pesada podrían ser primero aleatorizadas a partir de un clon inicial siguiendo con la selección de los mejores aglutinantes de anticuerpos. Se podría realizar una segunda etapa de mutagénesis en las CDR de la cadena ligera, pudiéndose mezclar la genoteca resultante con los aglutinantes de cadenas pesadas seleccionados. Alternativamente, se podrían aleatorizar simultáneamente todas las CDR dando como resultado genotecas de cadenas pesadas y ligeras que luego se combinaran y se sometieran a una selección frente a un antígeno preseleccionado.

De este modo, los ejemplos 6 y 7 ilustran un procedimiento para la mutagénesis de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cadenas pesadas y ligeras de un gen de inmunoglobulina, y también ilustran los oligonucleótidos útiles para ello.

45 8. Selección y maduración de la afinidad *in vitro* de anticuerpos procedentes de una genoteca de inmunoglobulinas combinatoria *naive*

Se ha usado un enfoque de genoteca de inmunoglobulinas combinatoria para obtener anticuerpos monoclonales procedentes de ratones adultos no inmunes, estableciendo así los principios de (i) acceder a genotecas de anticuerpos combinatorias *naive* para especificidades predeterminadas e (ii) aumentar la afinidad de los sitios de unión de un anticuerpo seleccionado mediante mutagénesis aleatoria. Se preparó una genoteca de Fab combinatoria que expresaba fragmentos de cadena ligera k e Igu sobre la superficie de fago filamentosos a partir de médula ósea de ratones Balb/c adultos no inmunizados con el vector de presentación multivalente pComb8 preparado en el ejemplo 1b(i). Se aislaron de la genoteca fagos que presentaban Fab de baja afinidad con constantes de unión de aproximadamente 10^4 a 10^5 M^{-1} específicas de la progesterona por su capacidad para unirse al hapteno. La mutagénesis aleatoria de las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras expresadas en el vector de fago de presentación monovalente pComb3 se realizó mediante una PCR propensa a error. Posteriormente se seleccionaron los clones con una afinidad mejorada por la progesterona. De este modo, como se describe en la presente memoria, se seleccionaron anticuerpos con características deseables de una fuente no inmunológica y se consiguió la maduración de la afinidad usando los vectores gemelos pComb8 y pComb3, abriendo así un camino hacia la obtención de anticuerpos específicos de una genoteca genérica evitando la inmunización.

El procedimiento descrito en la presente memoria tiene tres características esenciales: (i) la capacidad de acceder inicialmente a Fab de baja afinidad de una genoteca *naive* mediante el uso de sistemas de expresión de fagos multivalentes, (ii) la posterior maduración de la afinidad mediante una PCR propensa a error e (iii) el uso de un constructo monocatenario durante el proceso de maduración para evitar un fondo elevado de unión artificial debida a la pérdida de la cadena ligera. Cuando se usaron conjuntamente, estos procedimientos permitieron la selección y la maduración de la afinidad de los anticuerpos de una genoteca *naive*.

ES 2 315 612 T3

a. Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc

Se usaron tres ratones Balb/cByJ machos adultos (6 meses) no inmunizados (colonia de cultivo Scripps) para preparar 5×10^7 células de médula ósea en suero bovino fetal al 4% en PBS. Para agotar las células positivas en IgG superficiales, se mantuvo la preparación con IgG_{2b} de rata anti ratón (0,1 ml), IgG de cabra anti-ratón (0,1 ml) y IgG_{2b} de conejo anti-ratón (0,1 ml) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se sedimentaron las células, se lavaron con PBS y se volvieron a suspender en 9 ml de PBS. Se añadió complemento de conejo (1 ml) y se mantuvo a 37°C durante 30 minutos. Se sedimentaron las células y se aisló el ARN total según lo descrito en el ejemplo 2b. Se usó el ARN total como molde para la síntesis del ADNc para las cadenas μ y k con los siguientes cebadores: Ig μ , 5'-ATTGGGACTAGTTTCTGCGACAGCTGGAAT-3' (SEC ID N°: 151) (la secuencia del sitio de restricción de Spe I está subrayada) y k, 5'-GCGCCGTCTAGAAATTAACACTCATTCTGTTGAA-3' (SEC ID N°: 152) (con el sitio de restricción de Xba I subrayado) respectivamente, usando el equipo Superscript (BRL).

En síntesis, se mezclaron 70 μ g de ARN total con 60 pmoles de cebador, se calentó hasta 70°C durante 10 minutos y se enfrió inmediatamente sobre hielo. Se mezclaron dos μ l de inhibidor de la Rnasa, 10 μ l de 5 x tampón de síntesis; 8 μ l de mezcla de dNTP (hasta dar una concentración final de 200 μ M de cada NTP); 5 μ l de DTT 0,1M y 1 μ l de BRL Superscript RT (200 U/ μ l), y se añadió agua tratada con DEPC hasta obtener 50 μ l de reacción. Se dejó que continuara la reacción a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego a 42°C durante 50 minutos. Se terminó la reacción manteniendo a 90°C durante 5 minutos y luego colocándola sobre hielo durante 10 minutos, tras lo que se añadió 1 μ l de Rnasa H y se mantuvo a 37°C durante 20 minutos. Se realizó una amplificación por PCR en una mezcla de reacción de 100 μ l según lo descrito en el ejemplo 2, usando 1-9 de V_H y el cebador de la cadena μ para las cadenas pesadas y 3-7 de V_L y los cebadores de la cadena k para las cadenas ligeras según se muestra en la tabla 5.

b. Construcción de genoteca de μ /k de inmunoglobulina *naive*

Se escindieron los ADN de la cadena μ y la cadena k amplificados por PCR con Xho I-Spe I y Sac I-Xba I, respectivamente. Se insertaron los fragmentos de Xho I-Spe I de la cadena μ resultantes en el vector de fagémido pComb8 preparado en el ejemplo 1b(i) para generar una genoteca de fusión de cadena μ -cpVIII. La transformación en células XL1-Blue de *E. coli* y la producción de fagos se llevaron a cabo esencialmente según lo descrito en el ejemplo 6. Posteriormente, los fragmentos de Sac I-Xba I de la cadena ligera k se clonaron en la genoteca de fusión de cadena pesada F_d μ -cpVIII.

Se estableció una genoteca combinatoria de 5×10^6 miembros clonando posteriormente los fragmentos de cadena ligera k y F_d de Ig μ en el vector pComb8, lo que permitió la fusión del fragmento F_d de cadena pesada con cpVIII. Como se visualizaron los fragmentos de anticuerpos Fab en un elevado número de copias sobre la superficie de los fagos, se seleccionó este vector para acceder a anticuerpos de baja afinidad que esperaban ser encontrados en un repertorio no seleccionado y no cebado.

c. Selección de anticuerpos de baja afinidad específicos de la progesterona

Se empaquetaron los fagémidos recombinantes preparados anteriormente en partículas de fago M13 y se realizaron cinco series de cribado en pocillos para ELISA revestido de progesterona-3-(O-carboximetil)-oxima-BSA según lo descrito en el ejemplo 6. En síntesis, se revistieron los pocillos de una placa de microvaloración a 4°C con 50 μ l de 100 μ g/ml de conjugado de progesterona-3-(O-carboximetil)-oxima-BSA (Sigma n.º P4778) en PBS. Se lavaron los pocillos dos veces con agua y se bloquearon llenando completamente con BSA al 1% (p/v) en PBS y manteniendo las placas a 37°C durante una hora. Se sacudió la solución de bloqueo y se añadieron 50 μ l de genoteca de fagos (comúnmente 10^{11} ufc) en PBS-BSA (0,1%, p/v) a cada pocillo y se mantuvieron las placas durante dos horas a 37°C. Las etapas de lavado, elución y multiplicación de los fagos se realizaron esencialmente según lo descrito en el ejemplo 6a1).

Se analizaron los fagos eluidos tras la primera y tercera serie en cuanto a la expresión de Fab anti-progesterona mediante elevaciones de las colonias bacterianas según lo descrito en el ejemplo 2f. Se sondaron las colonias para la unión a la progesterona con un conjugado de progesterona-3-(O-carboximetil)-oxima-HRP. Los filtros se desarrollaron usando 4-cloronaftol. Se tuvo cuidado de excluir los artefactos causados por los fagémidos que expresaban la fusión de F_d de Ig μ -cpVIII sin la correspondiente cadena ligera. Estos fagos con sólo cadena pesada reaccionaron inespecíficamente frente a antígenos no relacionados tales como BSA, HRP, lisozima de huevo de gallina, presumiblemente debido la zona hidrófoba presentada sobre una cadena pesada sin aparear.

Se examinaron en mayor profundidad aquellas colonias que produjeron la señal más potente en la transferencia western, y a partir del subsiguiente análisis se aislaron tres clones, PgA11, PgB6 y PgF1. Los dos primeros surgieron de la primera serie de cribado y el último fue aislado tras la tercera serie de selección. Los tres Fab, producidos en su forma soluble según lo descrito en el ejemplo 6c2) se unieron específicamente a progesterona-3-(O-carboximetil)-oxima-BSA y a progesterona-11 α -hemisuccinil-BSA. Además, los tres Fab mostraron una reactividad cruzada significativa frente a un epítipo sobre el citocromo C. Sus constantes de unión aparente para progesterona-3-(O-carboximetil)-oxima-BSA se determinaron como 10^4 M⁻¹ para PgA11 y 3×10^4 M⁻¹ y 10^5 M⁻¹ para PgF1 y PgB6, respectivamente. Estas constantes de unión fueron mucho menores que las presentadas para los anticuerpos monoclonales anti-progesterona con afinidades de 2 a 5×10^8 M⁻¹. Los clones PgB6 y PgF1 utilizaron la misma combinación de genes V_H y V_L estrechamente relacionados. Ambos de sus genes de V_H eran idénticos a dos genes de la línea germinal estrechamente

ES 2 315 612 T3

relacionados pero distintos sin prueba alguna de la mutación somática, como sería de esperar para un repertorio *naive*. Todavía no se conoce(n) el(los) gen(es) de la línea germinal verdadera para sus genes V_L estrechamente relacionados. Como ambos genes V_H se han unido a diferentes segmentos D y J, los clones PgB6 y PgF1 no pueden tener el mismo origen, sino que deben haber sido seleccionados entre dos eventos clónicos independientes, apuntando hacia una posible importancia de esta combinación concreta para la unión a la progesterona. Los genes V_L y V_H usados por PgA11 no están estrechamente relacionados con los otros dos clones.

De este modo, esto demostró que mediante el uso de un vector de presentación multivalente, se pueden aislar Fab de genotecas combinatorias *naive* con afinidades comparables a aquéllas observadas para la respuesta inmunológica primaria hacia haptenos tales como fosforilcolina y nitrofenol. Además, el enfoque de la genoteca combinatoria puede producir genes V o combinaciones de genes V que no se podrían haber seleccionado *in vivo*.

d. Maduración de la afinidad mediante mutagénesis dirigida por PCR

Para imitar el proceso de la mutación somática que conduce a la selección de anticuerpos con una mayor afinidad, se crearon mutaciones aleatorias tanto en las regiones V_L como en las V_H , y se seleccionaron posteriormente anticuerpos con una mayor afinidad por el hapteno progesterona. Para dirigir las mutaciones mediante una PCR propensa a error específicamente y sólo hacia las regiones V, se construyó un plásmido de fusión monocatenario Fv-cpIII en un vector de fagémido pComb2-3 que contenía en marco fusiones de los siguientes elementos: la secuencia líder de pelB para la secreción, los marcos de lectura de V_H y V_L unidos con un oligonucleótido sintético codificante de un péptido flexible según lo tratado en el ejemplo 6a y el resto cpIII. El uso de un vector monocatenario supera además la dificultad debida a la selección no deseada por la unión inespecífica realizada por fagos que expresan sólo cadenas pesadas de Ig.

Para preparar una fusión de una sola cadena pesada y cadena ligera (denominada F_v) con el anclaje a la membrana cpIII, se digirió el plásmido pComb2-3 preparado en el ejemplo 1b(ii) que sólo tenía un sitio de restricción de Spe I con las endonucleasas de restricción Xba I y Nhe I, y se volvió a realizar la unión, eliminando así el casete de clonación de la cadena ligera. Se insertó un ligador de ADN sintético que codifica una secuencia ligadora de 15 aminoácidos constituida por dos oligonucleótidos, un cebador antisentido 5' que tiene la secuencia de nucleótidos 5'-TCGAGAAAGTCTCTAGAGGTAATCTTCTGGTTCTGGTTCCGAATCTAAATCTA CTGAGCTCAAAGTCA-3' (SEC ID N°: 153) y un cebador sentido 3' que tiene la secuencia de nucleótidos 5'-CTAGTGACTTTGAGCTCAGTAGATTTAGATTCGGAACCAGAACCAGAAGATTTA CCTCTAGAGACTTTTC-3' (SEC ID N°: 154) en el vector pComb2-3 truncado digerido con Xho I-Spe I formando el fagémido ScpComb2-3. La secuencia de reconocimiento interno para las endonucleasas de restricción Xba I (TCTAGA) y Sac I (GAGCTC) están subrayadas. Los segmentos de V_H y V_L de los aglutinantes de progesterona fueron entonces amplificados por PCR según lo descrito en el ejemplo 2g en dos reacciones independientes.

En la primera amplificación por PCR, se usaron el cebador correspondiente a la SEC ID N°: 153 que figura anteriormente y el oligonucleótido con la secuencia de nucleótidos 5'-ATTTGGGAAGGACTGTCTAGATGMRGAGAC-3' (SEC ID N°: 155), en la que M es bien A o C y R es bien A o G, para amplificar el fragmento de cadena pesada. El fragmento de cadena ligera fue amplificado por separado con el cebador correspondiente a la SEC ID N°: 154 que figura anteriormente y el oligonucleótido con la secuencia de nucleótidos 5'-GAGGACTAGTTACAGTTGGTGCAGCATCAG-3' (SEC ID N°: 156). Las secuencias de reconocimiento internas para Xba I (TCTAGA) y Spe I (ACTAGT) están subrayadas. Los fragmentos PCR de V_H y V_L fueron digeridos con Xho I-Xba I y Sac I-Spe I, respectivamente, y posteriormente insertados en Scp-Comb2-3.

e. Expresión y detección de Fab solubles y anticuerpos de fusión monocatenarios específicos de la progesterona

Para la producción de los Fab, se separó el resto del gen VIII de los fagémidos codificante de los aglutinantes de progesterona PgA11, PgB6 y PgF1 con endonucleasas de restricción Spe I y EcoR I, y se reemplazó posteriormente con un ligador sintético codificante de un codón de terminación TAA (subrayado). El ligador estaba formado por los oligonucleótidos 5'-CTAGTAACTGAGTAAG-3' (SEC ID N°: 157) y 5'-AATTCTTACTCAGTTAA-3' (SEC ID N°: 158). La producción y la detección del fragmento de anticuerpo Fab se realizó esencialmente según lo descrito en el ejemplo 6c2), a excepción de que las células de *E. coli* fueron afectadas por tres ciclos de congelación-descongelación. Para producir los fragmentos de anticuerpos soluble, se separaron las fusiones de V_H -ligador- V_L del fagémido Scp-Comb2-3 con Xho I y Spe I, y se subclonaron en el vector de expresión pTAC01 (Pharmacia) que es un derivado de pF1260. El vector pTAC01 tiene el promotor tac inducible, la secuencia líder de pelB para la secreción y permitió una fusión en marco del constructo de fusión monocatenario insertado con una secuencia decapeptídica según lo descrito en el ejemplo 1a como un marcador para la detección inmunológica. La expresión y la detección de los fragmentos de anticuerpos de fusión monocatenarios se realizó según lo descrito anteriormente, a excepción de que se usó un anticuerpo anti-decapeptídico conjugado con una fosfatasa alcalina para el ELISA.

Se seleccionaron tres clones de fusión monocatenarios mediante el protocolo de rastreo y se denominaron Scp-Comb2-3-PgF1, -PgB6 y -PgA11. Se sometieron estos plásmidos resultantes a una mutagénesis por PCR propensa a error según lo descrito abajo.

ES 2 315 612 T3

f. Mutagénesis dirigida de la cadena pesada y cadena ligera mediante PCR propensa a error

Se mezclaron y se diluyeron en serie cantidades iguales de los plásmidos de ScpComb2-3 PgF1, PgB6 y PgA11 preparados anteriormente sin digerir. Se sometieron por separado a 35 ciclos alícuotas de 100 ng, 10 ng, 1 ng, 0,1 ng y 0,01 ng de las mezclas (1 minuto a 94°C, 2 minutos a 50°C, 1 minuto a 72°C) de amplificación en las siguientes condiciones de reacción: KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM (pH 9,0); MgCl₂ 6,5 mM; MnCl₂ 0,5 mM; gelatina al 0,01%; Triton X-100 al 0,1%; 1 mM de cada dCTP, dGTP, dTTP, dATP 0,2 mM; dITP 0,1 mM, usando cebador de secuenciación inversa M 13, 5'-AACAGCTATGACCATG-3' (SEC ID N°: 159) y un cebador inverso complementario al resto de cpIII, 5'-GACAGGAGGTTGAGGCAGGT-3' (SEC ID N°: 160) a 100 μM. El procedimiento básico de PCR propensa a error fue como el descrito originalmente por Leung *et al.*, *J. Methods Cell. Mol. Biol.*, 1:11-15 (1989). La región de ADN por ser mutagenizada fue amplificada por PCR en condiciones que redujeron la fidelidad de la síntesis de ADN por la Taq ADN polimerasa. Según lo demostrado por Leung *et al.*, *supra*, las concentraciones de los reactivos MuCl₂ y dATP usadas en las amplificaciones por PCR dieron como resultado frecuencias de mutación del 1,0% y 1,4%, respectivamente. De este modo, la frecuencia de la mutación aumentó a medida que decreció la concentración de dATP.

Se mezclaron todas las reacciones PCR de todas las diluciones molde y se trataron con fenol antes de la digestión con Xho I y Spe I. Se volvieron a unir los fragmentos de PCR purificados sobre gel y digeridos en el plásmido ScpComb2-3 digerido con Xho I-Spe I. Se sometieron a electroporación los productos de la unión en XLI-Blue de *E. coli* dando lugar a 10⁶ transformantes. Las etapas posteriores de producción y cribado de fagos se llevaron a cabo según lo descrito en el ejemplo 6, a excepción de que los fagos fueron cribados en ausencia de BSA.

De este modo, se estableció una genoteca de anticuerpos de fagémido monocatenarios anti-progesterona mutados y se cribó sobre progesterona-3-(O-carboximetil)-oxima-BSA, tomándose el número de ufc eluidas como una medida de la afinidad relativa de los anticuerpos monocatenarios visualizados por el hapteno. Tras la tercera serie de cribado, se observó un aumento de 50 a 100 veces mayor en la producción de los fagémidos eluidos en relación con la población no mutada. Los mutantes individuales mostraron un aumento de 10 a 300 veces mayor en la producción tras el cribado en comparación con los clones precursores, lo que indica que los mutantes codificaron sitios de unión del anticuerpo con una afinidad mayor. Se seleccionaron los cuatro mejores mutantes, ScPgB6-1, -2, -3 y -4 para determinar su afinidad por el conjugado de hapteno y el análisis secuencial.

g. Determinación de la afinidad de anticuerpos anti-progesterona de fusión monocatenarios mutagenizados

Las constantes de unión de los fragmentos de anticuerpos solubles preparados a partir de los cuatro mejores mutantes, ScPgB6-1, -2, -3 y -4 seleccionados anteriormente se determinaron mediante ELISA de competición según lo descrito en el ejemplo 6c2). En síntesis, se revistieron los pocillos de una placa de microvaloración a 4°C con 50 μl de 100 μg/ml de conjugado de progesterona-3-(O-carboximetil)-oxima-BSA en PBS. Se lavaron los pocillos dos veces con agua y se bloquearon con BSA al 1% (p/v) en PBS a 37°C durante una hora. Se mezclaron los sobrenadantes de Fab o de fusión monocatenarios con progesterona-3-(O-carboximetil)-oxima-BSA (0,1% p/v) y se mantuvieron en los pocillos a 37°C durante dos horas. Se lavaron las placas con PBS-Tween (0,05% (v/v)) y se añadió conjugado de fosfatasa alcalina de cadena K de cabra anti-ratón (Southern Biotech) o anticuerpos monoclonales de ratón anti-decapéptido conjugados con fosfatasa alcalina, y se mantuvo la mezcla durante una hora a 37°C. Se lavaron las placas como antes y se añadió sustrato (0,1 ml; p-nitrofenil-fosfato a 1 mg/ml en Tris 0,1M, pH 9,4 que contenía MgCl₂ 50 mM). Tras el mantenimiento a 25°C durante 60-180 minutos, se leyó la absorbancia a 405 nm. Se determinaron las afinidades aparentes como el recíproco de la concentración de hapteno necesaria para inhibir el 50% de la unión máxima en un ELISA de competición. Esto fue una aproximación cercana a la afinidad y permitió realizar una clasificación de las actividades de unión.

La afinidad de los anticuerpos Sc mutados por progesterona-3-(O-carboximetil)-oxima-BSA según lo determinado por el ELISA de competición había aumentado frente al anticuerpo ScPgB6 precursor en 30 veces para ScPgB6-1, y en aproximadamente 13 veces tanto para ScPgB6-3 como para ScPgB6-4. Lo interesante es que el clon con las menores mutaciones presentó la afinidad más elevada. El patrón de reactividad cruzada de los anticuerpos Sc mutantes no cambió, a excepción de que ScPgB6-1 había perdido la mayoría de su reactividad hacia el citocromo C. En amplios estudios de 81 respuestas inmunológicas hacia haptenos, se podría asignar un aumento de la afinidad en un orden de magnitud a sustituciones específicas de un solo aminoácido, lo que implica que los intercambios de sólo uno o dos aminoácidos en el sitio de combinación de los anticuerpos anti-progesterona Sc pueden ser responsables de su aumento en la afinidad por el conjugado de hapteno. Como no se recuperó ningún mutante con el intercambio de un solo aminoácido, no se pudieron identificar el(los) residuos de importancia fundamental que causaron el aumento de la afinidad por el conjugado de hapteno. Además, no se observaron sustituciones de aminoácidos comunes en los tres mutantes, lo que sugirió que el cambio de diferentes residuos puede ser responsable del aumento de afinidad hacia 3-(O-carboximetil)-progesterona. Una sustitución de Ser₆₄ por Pro₆₄ en la CDR2 de V_H es común en los mutantes ScPgB6-3 y ScPgB6-4. Aunque ambos mutantes mostraron una afinidad similar por el conjugado de hapteno, no se puede realizar inequívocamente la evaluación de la importancia de ese residuo en la unión antigénica, pues se produjeron múltiples intercambios de aminoácidos en las regiones V_L y V_H de los dos mutantes.

h. *Secuenciación de ácidos nucleicos*

Se determinaron las secuencias de nucleótidos completas de las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras a partir de ADN bicatenario usando Sequenase 2.0 (United States Biochemical). La secuenciación del ADN reveló que los cuatro clones mutantes, ScPgb6-1, -2, -3 y -4, habían surgido de ScPgb6, siendo ScPgb6-1 y ScPgb6-2 idénticos. El tipo predominante de mutación obtenido por este protocolo de PCR fue un intercambio de los nucleótidos A-G/T-C (68%), mientras que los intercambios de T-G/A-C, G-A/C-T, T-A/A-T, G-C/C-G, o C-A/G-T tuvieron lugar a aproximadamente la misma frecuencia. Se observaron secuencias de ADN con una frecuencia de mutación mayor que la media, i.e., puntos calientes mutacionales. Además, los tres clones mutantes se diferenciaron en el número de cambios de los pares de bases. Las frecuencias de mutación tanto para las regiones V_H como V_L fueron estimadas como el 1,5% para ScPgb6-1, 2,1% para ScPgb6-3 y 4,1% para ScPgb6-4, lo que condujo a múltiples sustituciones de aminoácido en las CDR y las regiones marco de los mutantes.

En resumen, esta invención contempla el principio de selección y de maduración de la afinidad de anticuerpos específicos frente un hapteno de una genoteca *naive*. Aunque el sistema de selección y mutagénesis *in vitro* es bastante simple en comparación con la complejidad del sistema inmunológico, existen algunos rasgos comunes: (i) la afinidad de los anticuerpos seleccionados entre una genoteca combinatoria *naive* puede alcanzar el mismo orden de magnitud que la de los anticuerpos de una respuesta inmunológica primaria a haptenos; (ii) Aunque los mecanismos que generan mutaciones *in vivo* o *in vitro* fueron diferentes, se observaron puntos calientes mutacionales; (iii) el aumento de afinidad tras una serie de mutación y selección *in vitro* está en el mismo orden de magnitud que el observado para la transición de la respuesta inmunológica primaria a la secundaria hacia los haptenos; y (iv) se recuperó un sitio de combinación del anticuerpo rotado con una reactividad cruzada alterada como se observa ocasionalmente *in vivo*.

Cuando se describió por primera vez el enfoque de los anticuerpos combinatorios, resultaba cuestionable si podría ser usado para explotar eficazmente el vasto repertorio de anticuerpos *in vivo*. La presente revelación demuestra que las combinaciones de cadenas de anticuerpos pueden ser accesibles y desarrolladas, lo que nunca se puede seleccionar *in vivo*. De este modo, ahora parece que es posible superar la diversidad de la respuesta de los anticuerpos *in vivo* mediante técnicas de clonación molecular.

La anterior información pretende ser ilustrativa de la presente invención y no restrictiva. Se pueden efectuar numerosas variaciones y modificaciones sin alejarse del ámbito de la invención.

(Secuencia pasa a página siguiente)

ES 2 315 612 T3

SEC ID N° 17

5 5'
Ala Glu Gly Asp Asp Pro Ala Lys Ala Ala Phe Asn Ser Leu
10 Gln Ala Ser Ala Thr Glu Tyr Ile Gly Tyr Ala Trp Ala Met
15 Val Val Val Ile Val Gly Ala Thr Ile Gly Ile Lys Leu Phe
Lys Lys Phe Thr Ser Lys Ala Ser

SEC ID N° 99

25 5'
GGCCGCAAATTCATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACG
GCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCCAACCAGCCATGGCCCAGGTGAAA
30 CTGCTCGAGTCAGGACCTGGCCTCGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCTCTCACC
TGCTCTGTCACTGACTACTCCATCACCAGTGCTTATTACTGGAAGTGGATCCGG
35 CAGTTTCCAGGAAACAACTGGAATGGATGGGCTACATAAGCTACGACGGTGTG
AATAAGTATGATCCATCTCTCAAGAATCGAATCTCCATCACTCGTGACACATCT
40 AACAAATCAGTTTTTCCAGAAGTTGATTTCTGTGACTTCTGAGGACACAGGAACA
TATGACTGTTCAAGAGGGACTAGGGCCTCTGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGA
45 ATTTCAAGTACCCGTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTG
GCCCCTGGATCTGCTGCCCAAATAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTTC
50 AAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCC
AGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGACCTCTACACTCTGAGC
AGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCCCTCGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAAC
55 GTTGCCCAACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCCAAGGAT
TGTAAGTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAA

60

65

ES 2 315 612 T3

SEC ID N° 100

5' 5

TGAATTCTAAACTAGTCGCCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACG
GCAGCCGCTGGATTGTTACTCGCTGCCCAACCAGCCATGGCCGAGCTCCAGATGAC
10 CCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGTC
GATCAAGTGAGAATATTACAATTACT

15 SEC ID N° 101

5' 20

CTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCT
GGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACTACAATGT
25 CAAGGGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTG
ATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAG
GACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGATGCCACTACAAGACATCAAC
30 TTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAATTCTAGACGGCGC

35 SEC ID N° 102

5' 40

GCTGAGGGTGACGATCCCGCAAAGCGGCCTTTAACTCCCTGCAAGCCTCAGCGAC
CGAATATATCGGTTATGCGTGGGCGATGGTTGTTGTCATTGTCGGCGCAACTATCG
45 GTATCAAGCTGTTTAAGAAATTCACCTCGAAAGCAAGC

50 SEC ID N° 111

5' 55

GTGCCCAGGGATTGTACTAGTGCTGAGGGTGACGATCCCGCAAAGCGGCCTTTAA
CTCCCTGCAAGCCTCAGCGACCGAATATATCGGTTATGCGTGGGCGATGGTTGTTG
60 TCATTGTCGGCGCAACTATCGGTATCAAGCTGTTTAAGAAATTCACCTCGAAAGCA
AGCTGATAGAATTCGAGT

65

ES 2 315 612 T3

SEC ID N° 112

5'

5 CCATTCGTTTGTGAATATCAAGGCCAAGGCCAATCGTCTGACCTGCCTCAA
CCTCCTGTCAATGCTGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGCTCT
10 GAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGA
GGCGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGTCCGGTGATTTTGATTATGAAAAGATG
15 GCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACGGCCTA
CAGTCTGACGCTAAAGGCCAACTTGATTCTGTGCTACTGATTACGGTGCT
GCTATCGATGGTTTCATTGGTGACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGT
20 GCTACTGGTGATTTTGCTGGCTCTAATTCCCAAATGGCTCAAGTCGGTGAC
GGTGATAATTCACCTTTAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTTCCCTC
25 CCTCAATCGGTTGAATGTGCGCCCTTTTGTCTTTAGCGCTGGTAAACCATAT
GAATTTTCTATTGATTGTGACAAAATAAACTTATTCGGTGTCTTTGCGTTT
30 CTTTTATATGTTGCCACCTTTATGTATGTATTTTCTACGTTTGCTAACATA
CTGCGTAATAAGGAGTCTTAATCATGCCAGTTCCTTTGGGTATTCCGTTAT
35 TAT

SEC ID N° 113

5'

40 GAGACGACTAGTGGTGGCGGTGGCTCTCCATTCGTTTGTGAATATCAAGGC
CAAGGCCAATCGTCTGACCTGCCTCAACCTCCTGTCAATGCTGGCGGCGGC
45 TCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGC
GGTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGAGGCGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGT
TCCGGTGATTTTGATTATGAAAAGATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATG
50 ACCGAAAATGCCGATGAAAACGGCCTACAGTCTGACGCTAAAGGCCAACTT
GATTCTGTGCTACTGATTACGGTGCTGCTATCGATGGTTTCATTGGTGAC
55 GTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGTGCTACTGGTGATTTTGCTGGCTCT
AATTCCAAATGGCTCAAGTCGGTGACGGTGATAATTCACCTTTAATGAAT
AATTTCCGTCAATATTTACCTTCCCTCCCTCAATCGGTTGAATGTGCCCTT
60 TTTGTCTTTAGCGCTGGTAAACCATATGAATTTTCTATTGATTGTGACAAA
ATAAACTTATTCGGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTTATATGTTGCCACCTTT
ATGTATGTATTTTCTACGTTTGCTAACATACTGCGTAATAAGGAGTCTTAA
65 TCATGCCAGTTCCTTTGGGTATTCCGTTATTATGCTAGCTAGTAA

ES 2 315 612 T3

SEC ID N° 114

5 5'
 TATGCTAGCTAGTAACACGACAGGTTTCCCGACTGG
 AAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGT
10 TAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTT
 ATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC
15 GGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCAT
 GATTACGAATTCGAGCTCGGT

SEC ID N° 115

25 5'
 AGGTCCAGCTTCTCGAGTCTGGACCTGGCCTCGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCT
30 CTCACCTGCTCTGTCACTGACTACTCCATCACCAGTGCTTATTACTGGAACCTGGAT
 CCGGCAGTTTCCAGGAAACAACTGGAATGGATGGGCTACATAAGCTACGACGGTG
35 TCAATAAGTATGATCCATCTCTCAAGAATCGAATCTCCATCACTCGTGACACATCT
 AACAAATCAGTTTTTCCAGAAGTTGATTTCTGTGACTTCTGAGGACACAGGAACATA
40 TGACTGTTCAAGAGGGACTAGGGCCTCTGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAATTT
 CAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCT
 GGATCTGCTGCCCAAATAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTA
45 TTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGC
 ACACCTTCCCAGCTGTCTCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACT
50 GTCCCCCTCCAGCCCTCGGCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCACCCGGC
 CAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTACTAGTGCTGAGG
 GTGACGATCCCGCAAAGCGGCCTTTAACTCCCTGCAAGCCTCAGCGACCGAATAT
55 ATCGGTTATGCGTGGGCGATGGTTGTTGTATTGTCGGCGCAACTATCGGTATCAA
 GCTGTTTAAGAAATTCACCTCGAAAGCAAGCTGATAGAATTCGAGT

ES 2 315 612 T3

SEC ID N° 116

5'

5

ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTA CTGCTGCC

AACCAGCCATGGCCCAGGTGAAACTGCTCGAGATTTCTAGACTAGTGCTGAG

10

GGTGACGATCCCGCAAAGCGGCCTTTAACTCCCTGCAAGCCTCAGCGACCG

AATATATCGGTTATGCGTGGGCGATGGTTGTTGTCATTGTCGGCGCAACTAT

15

CGGTATCAAGCTGTTTAAGAAATTCACCTCGAAAGCAAGCTGATAGAATT CG

SEC ID N° 117

20

5'

GTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCG

25

CAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTGCTTT

CTTCCCTTCCFTTCTCGCCACGTTCCGCGGCTTCCCGTCAAGCTCTAAA

30

TCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCC

CAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATA

35

GACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACT

CTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGA

40

TTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGAT

TTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTA

AA

45

50

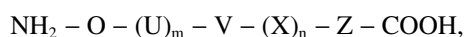
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un fago filamentoso que encapsula un genoma codificante de un primer y un segundo polipéptido capaces de formar un receptor heterodimérico de unión a un ligando, en el que el primer polipéptido está flanqueado por un dominio de señal de secreción procariota amino-terminal y un dominio de anclaje a la membrana de fago filamentoso carboxi-terminal, y el segundo polipéptido está fusionado a un dominio de señal de secreción procariota amino-terminal, y en el que dicho primer polipéptido tiene una secuencia de residuos de aminoácido representada por la fórmula, mostrada en el sentido del terminal amino al terminal carboxilo:



en la que O representa una secuencia de residuos de aminoácido que define un dominio de señal de secreción procariota amino-terminal; U representa un primer polipéptido espaciador; V representa una secuencia de residuos de aminoácido que define el dominio de unión a un ligando de una cadena de un polipéptido receptor heterodimérico; X representa un segundo espaciador; y Z representa una secuencia de residuos de aminoácido que define un dominio de anclaje a la membrana de una cubierta proteínica de fago filamentoso, con la condición de que m sea el número entero 0 ó 1, tal que cuando m sea 0, U no esté presente, y cuando m sea 1, U esté presente; y n sea 0 ó 1, tal que cuando n sea 0, X no esté presente y cuando n sea 1, X esté presente,

y en la que los espaciadores polipeptídicos U y X, cuando están presentes, pueden tener cada uno cualquier secuencia de residuos de aminoácido de una longitud de 1 a 6 residuos de aminoácido.

2. El fago filamentoso de la reivindicación 1, en el que dicho dominio de anclaje a la membrana de fago filamentoso carboxi-terminal es un dominio de anclaje a la membrana de cpVIII.

3. El fago filamentoso de la reivindicación 2, en el que dicho dominio de anclaje a la membrana de fago filamentoso carboxi-terminal tiene una secuencia de residuos de aminoácido representada por la fórmula en SEC ID N°: 17 del residuo 1 al residuo 50.

4. El fago filamentoso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho receptor es un complejo de unión de un epítipo.

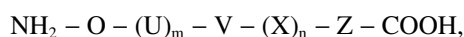
5. Un fago filamentoso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho primer polipéptido es un polipéptido V_H que tiene más de 60 residuos de aminoácido y menos de 125 residuos de aminoácido, y dicho segundo polipéptido es un polipéptido V_L que tiene más de 60 residuos de aminoácido y menos de 125 residuos de aminoácido.

6. El fago filamentoso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, estando dicho fago marcado detectablemente.

7. El fago filamentoso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha señal de secreción procariota es una señal de secreción peIB.

8. El fago filamentoso de la reivindicación 7, en el que dicha señal de secreción peIB tiene una secuencia de aminoácidos representada por una fórmula seleccionada del grupo constituido por (a) SEC ID N°: 5, (b) SEC ID N°: 6 y (c) SEC ID N°: 7.

9. Un polipéptido que comprende un polipéptido receptor de unión a un ligando unido operativamente por el terminal amino con un dominio de señal de secreción procariota y unido operativamente por el terminal carboxilo con un dominio de anclaje a la membrana de fago filamentoso, teniendo dicho polipéptido una secuencia de residuos de aminoácido representada por la fórmula, mostrada en el sentido del terminal amino al terminal carboxilo:



en la que O representa una secuencia de residuos de aminoácido que define un dominio de señal de secreción procariota amino-terminal; U representa un primer polipéptido espaciador; V representa una secuencia de residuos de aminoácido que define el dominio de unión a un ligando de una cadena de un polipéptido receptor heterodimérico; X representa un segundo espaciador; y Z representa una secuencia de residuos de aminoácido que define un dominio de anclaje a la membrana de una cubierta proteínica de fago filamentoso, con la condición de que m sea el número entero 0 ó 1, tal que cuando m sea 0, U no esté presente, y cuando m sea 1, U esté presente; y n sea 0 ó 1, tal que cuando n sea 0, X no esté presente y cuando n sea 1, X esté presente,

y en la que los espaciadores polipeptídicos U y X, cuando están presentes, pueden tener cada uno cualquier secuencia de residuos de aminoácido de una longitud de 1 a 6 residuos de aminoácido.

ES 2 315 612 T3

10. El polipéptido de la reivindicación 9, en el que dicho dominio de anclaje a la membrana de fago filamentoso es un dominio de anclaje a la membrana de cpVIII.

11. El polipéptido de la reivindicación 10, en el que dicho dominio de anclaje a la membrana de fago filamentoso carboxi-terminal tiene una secuencia de residuos de aminoácido representada por la fórmula en SEC ID N°: 17 del residuo 1 al residuo 50.

12. El polipéptido de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que dicho polipéptido receptor de unión a un ligando es un polipéptido de cadena variable de anticuerpo.

13. El polipéptido de la reivindicación 12, en el que dicho polipéptido de cadena variable es un polipéptido de cadena pesada de anticuerpo.

14. Una genoteca de partículas de fago filamentoso, en la que cada partícula de fago es un fago filamentoso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

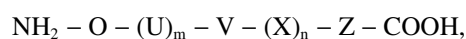
15. Una genoteca de partículas de fago filamentoso según la reivindicación 14, en la que cada partícula de fago contiene al menos un receptor heterodimérico de unión a un ligando que comprende el primer y el segundo polipéptido, estando dicho primer polipéptido fusionado a un dominio de anclaje a la membrana de cpIII que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID N°: 113 de la base 28 a la base 663.

16. El fago filamentoso de la reivindicación 1, en el que dicho dominio de anclaje a la membrana de fago filamentoso carboxi-terminal es un dominio de anclaje a la membrana de cpIII que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID N°: 113 de la base 28 a la base 663.

17. Un procedimiento para producir una genoteca de moléculas de ADN, comprendiendo cada molécula de ADN un cistrón para expresar un polipéptido receptor sobre la superficie de una partícula de fago filamentoso, procedimiento que comprende:

- (a) formar una mezcla de unión combinando en un tampón de unión:
 - (i) un repertorio de genes de polipéptido receptor en forma de ADNbc, teniendo cada vector terminales cohesivos adaptados a una unión direccional y
 - (ii) una pluralidad de vectores de expresión de ADN en forma lineal, teniendo cada vector secuencia arriba y secuencia abajo terminales cohesivos (a) adaptados a recibir direccionalmente dichos genes de polipéptido receptor en un marco de lectura común y (b) unidos operativamente a las respectivas secuencias de ADN traducibles secuencia arriba y secuencia abajo, codificando dicha secuencia de ADN traducible secuencia arriba una señal de secreción procariota, codificando dicha secuencia de ADN traducible secuencia abajo un dominio de anclaje a membrana de fago filamentoso carboxi-terminal, y estando dichas secuencias de ADN traducibles unidas operativamente a las respectivas secuencias de control de la expresión del ADN secuencia arriba y secuencia abajo; y
- (b) someter dicha mezcla a condiciones de unión durante un período de tiempo suficiente para unir operativamente dichos genes de polipéptido receptor con dichos vectores, formando así dicha genoteca,

en la que cada molécula de ADN comprende un cistrón para expresar un polipéptido que tiene una secuencia de residuos de aminoácido representada por la fórmula mostrada en el sentido del terminal amino al terminal carboxilo:



en la que O representa una secuencia de residuos de aminoácido que define un dominio de señal de secreción procariota amino-terminal; U representa un primer polipéptido espaciador; V representa una secuencia de residuos de aminoácido que define el dominio de unión a un ligando de una cadena de un polipéptido receptor heterodimérico; X representa un segundo espaciador; y Z representa una secuencia de residuos de aminoácido que define un dominio de anclaje a la membrana de una cubierta proteínica de fago filamentoso, con la condición de que m sea el número entero 0 ó 1, tal que cuando m sea 0, U no esté presente, y cuando m sea 1, U esté presente; y n sea 0 ó 1, tal que cuando n sea 0, X no esté presente y cuando n sea 1, X esté presente,

y en la que los espaciadores polipeptídicos U y X, cuando están presentes, pueden tener cada uno cualquier secuencia de residuos de aminoácido de una longitud de 1 a 6 residuos de aminoácido.

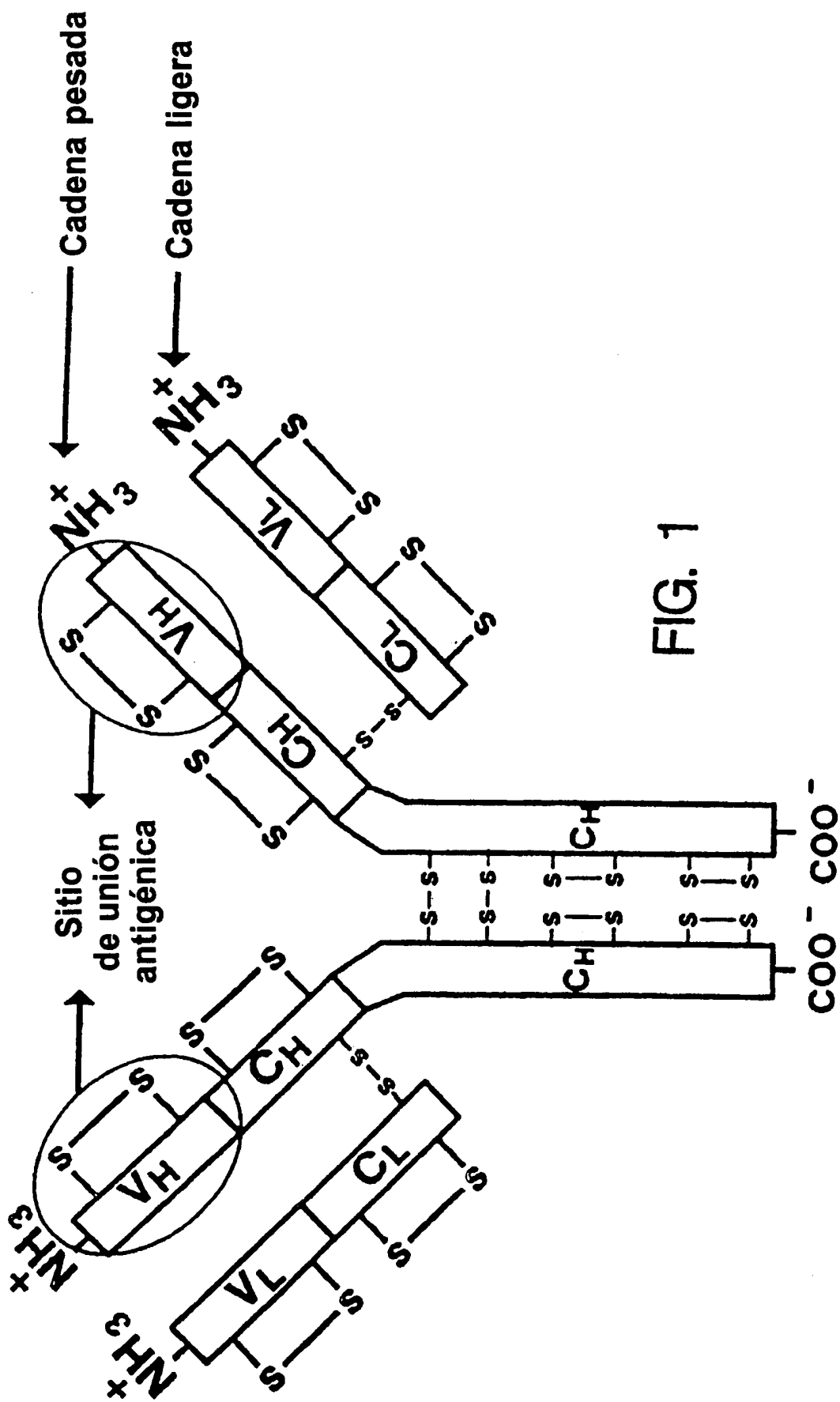


FIG. 1

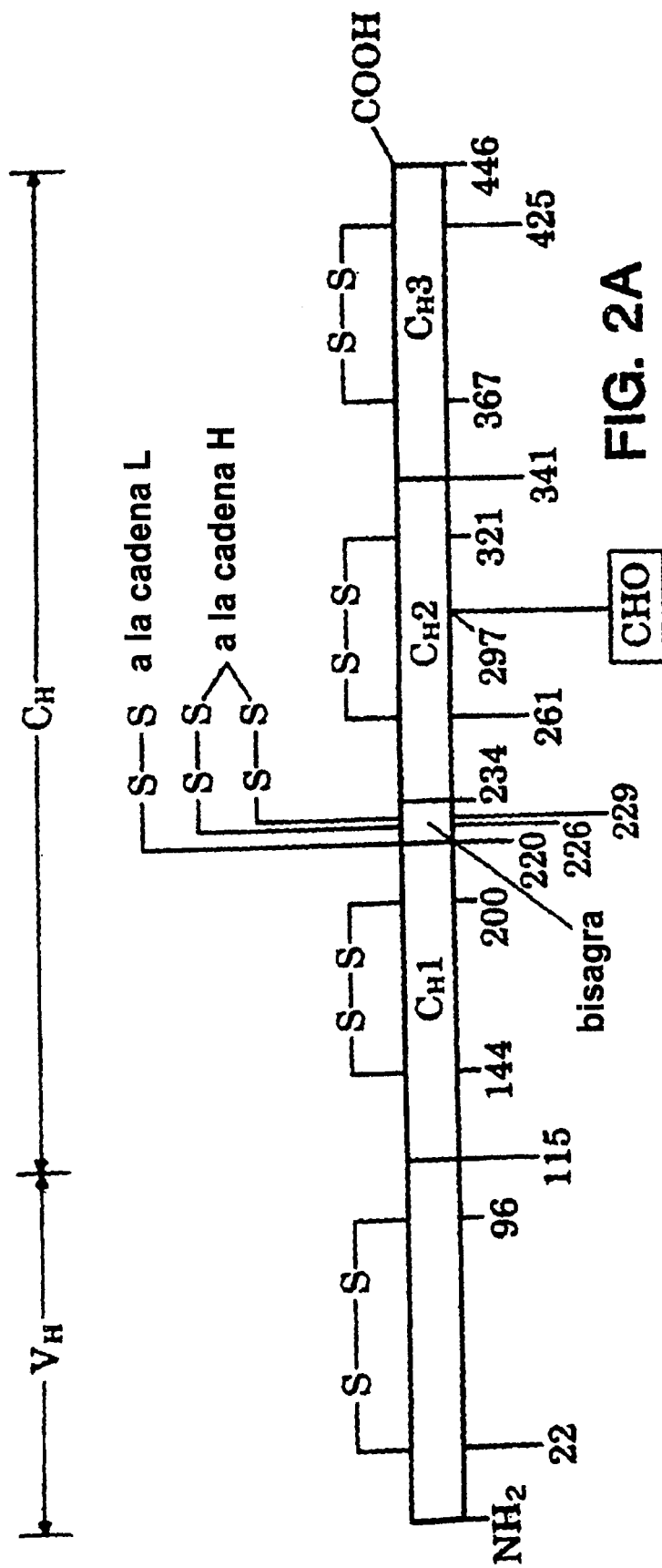


FIG. 2A

FIG. 2B-1

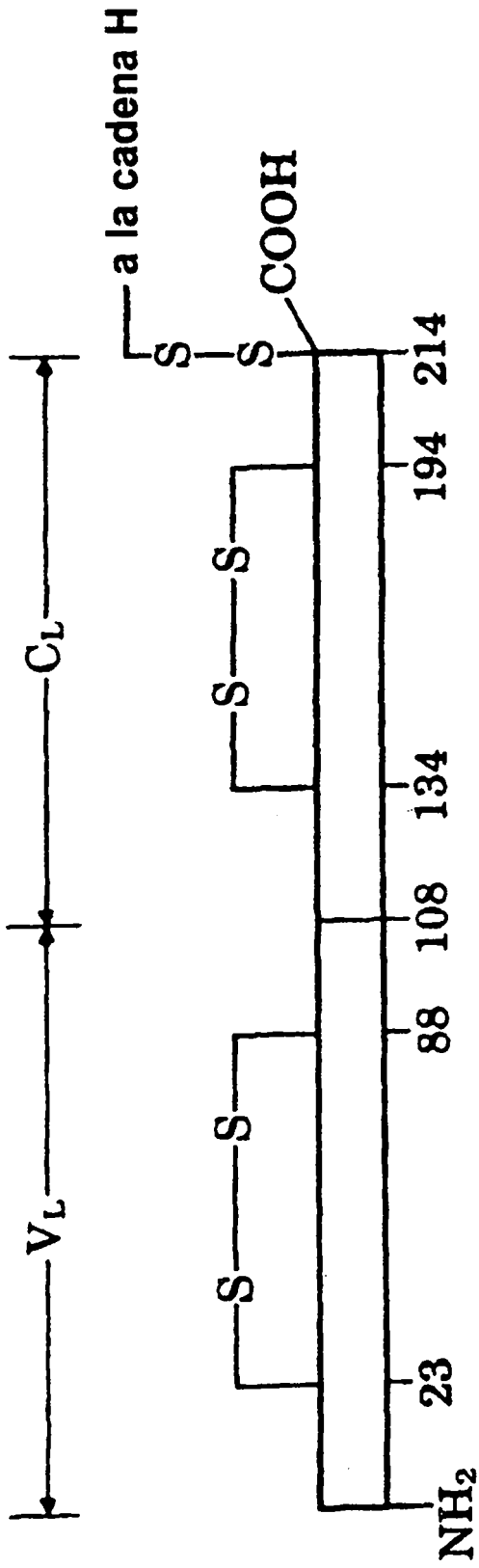
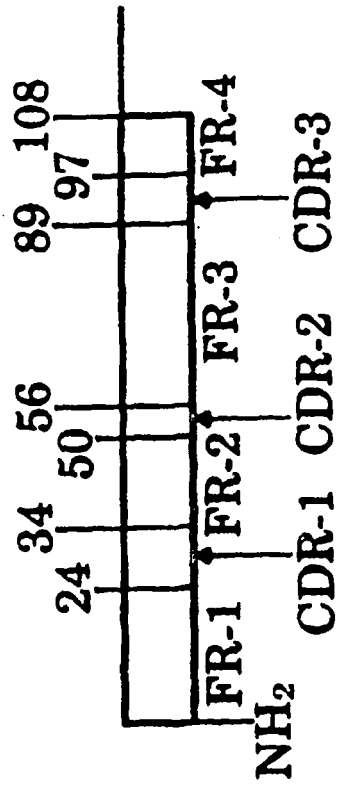


FIG. 2B-2



SHINE-DALGARNO MET

GGCCGCAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATG
CGTTTAAGATAAAGTTCCTCTGTCAGTATTAC

SECUENCIA LÍDER

AAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCT
TTTATGGATAACGGATGCCGTCGGCGA

SECUENCIA LÍDER

GGATTGTTATTACTCGCTGCCCAACCAG
CCTAACAATAATGAGCGACGGGTTGGTC

LIGADOR

LIGADOR

NCOI	ESQUELETO DE V _H	XHOI	SPEI
------	-----------------------------	------	------

CCATGGCCCAGGTGAAACTGCTCGAGATTTCTAGACTAGT
GGTACCGGGTCCACTTTGACGAGCTCTAAAGATCTGATCA

TyrProTyrAspValProAspTyrAlaSer TERMINA- LIGADOR
TACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTCTTAATAGAATTCTAATAGAAATTCG
ATGGGCATGCTGCAAGGCCTGATGCCAAGAATTATCTTAAGCAGCT

FIG. 3

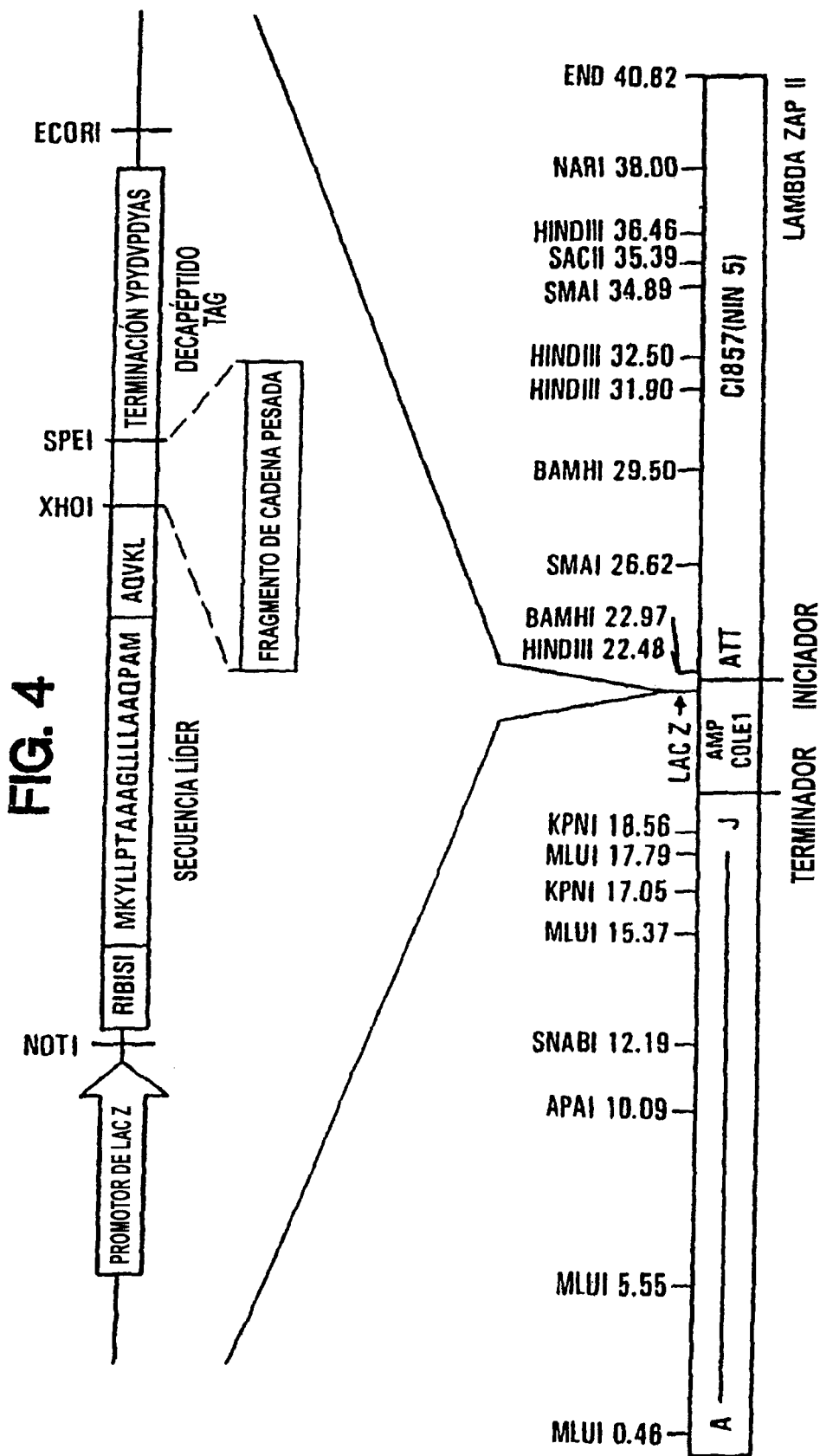


FIG. 5

ECOR I SHINE-DALGARNO MET
TGAATTCTAAACTAGTCGCCAAGGAGACAGTCATAATGAAAT
TCGAACTTAAGATTGTGATCAGCGGTTCCCTCTGTCAGTATTACTTTA

SECUENCIA LÍDER

ACCTATTGCCCTACGGCAGCCCGTGGATTGTATTACTCGCTGCCCAACCAG
TGGATAACGGATGCCCGTCGGGACCTAACATAATAATGAGCGACGGGTTGGTC

NCO I SAC I XBA I Not I
CCATGGCCGAGCTCGTCAGTCTCTAGAGTTAAGCGGCCG
GGTACCGGCTCGAGCAGTCAAGATCTCAATTCCCGGCAGCT

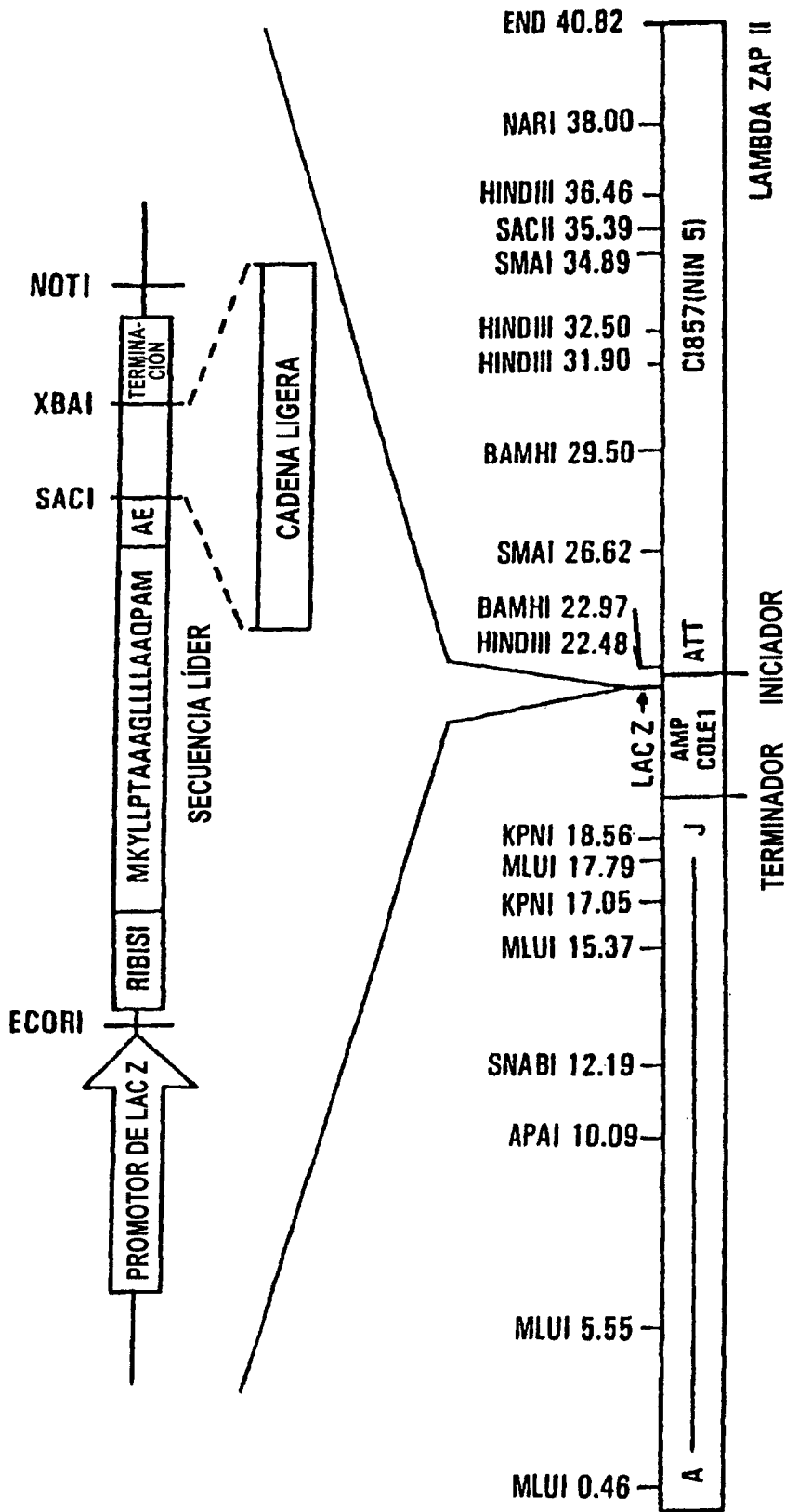
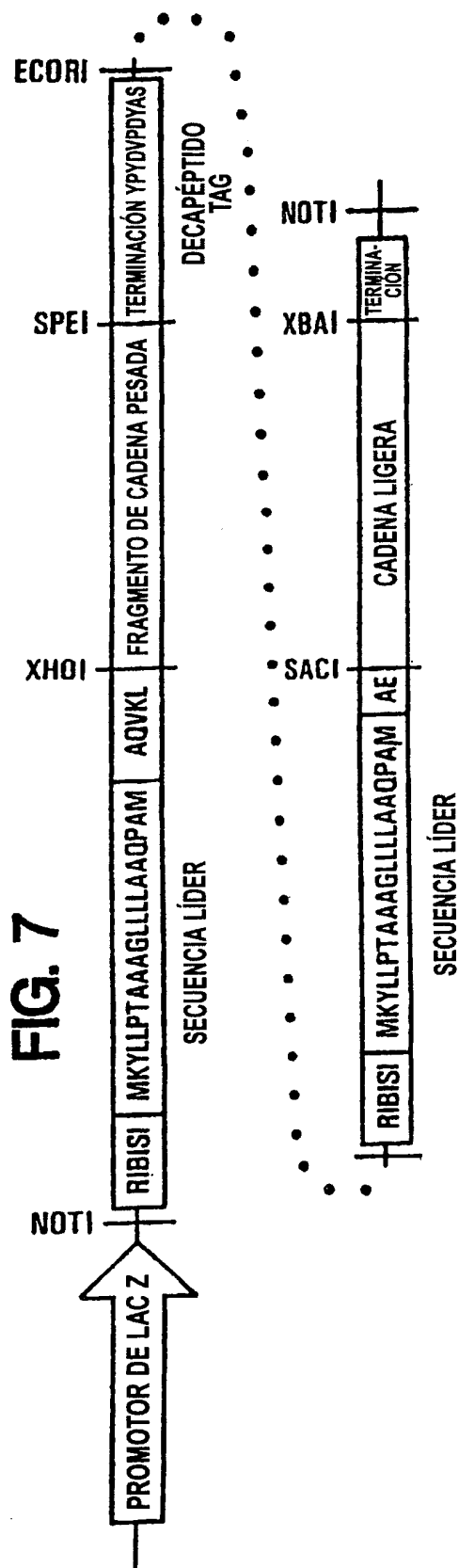


FIG. 6



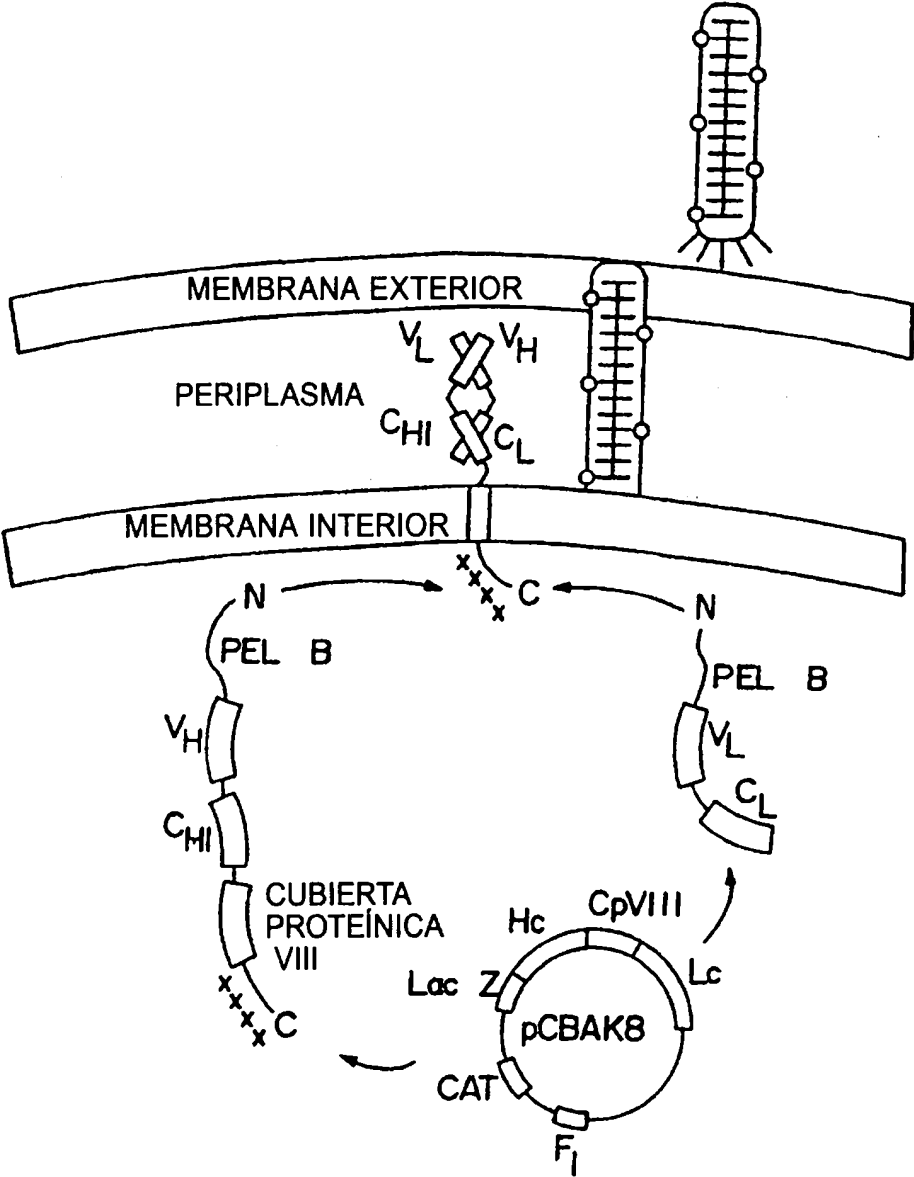


FIG. 8



FIG. 9A-1

FIG. 9A-2



FIG. 9B-1

FIG. 9B-2

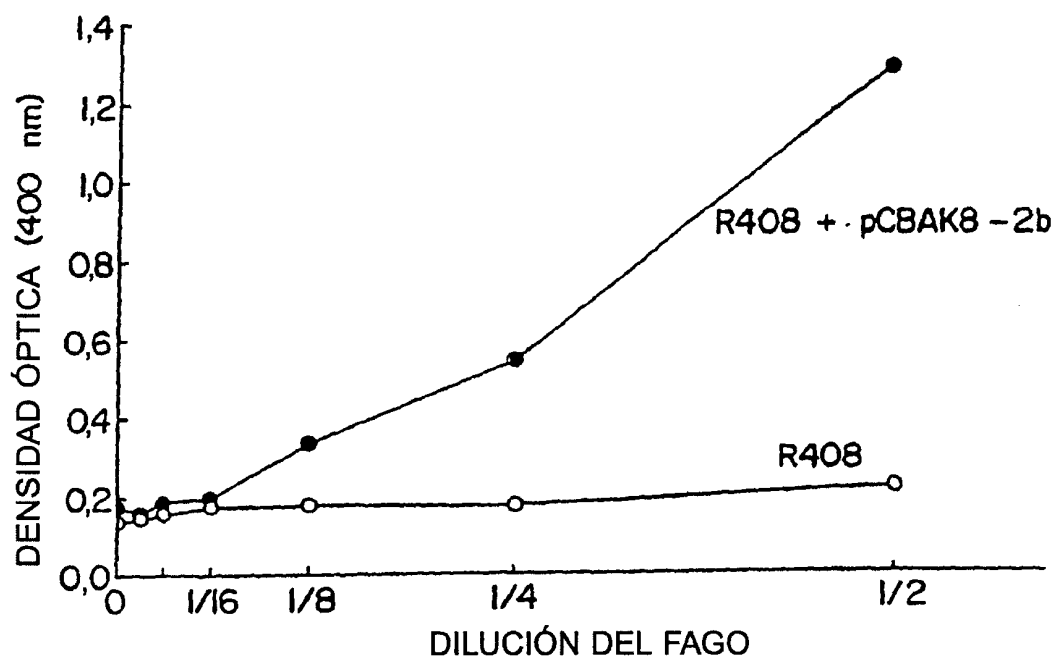


FIG. 10

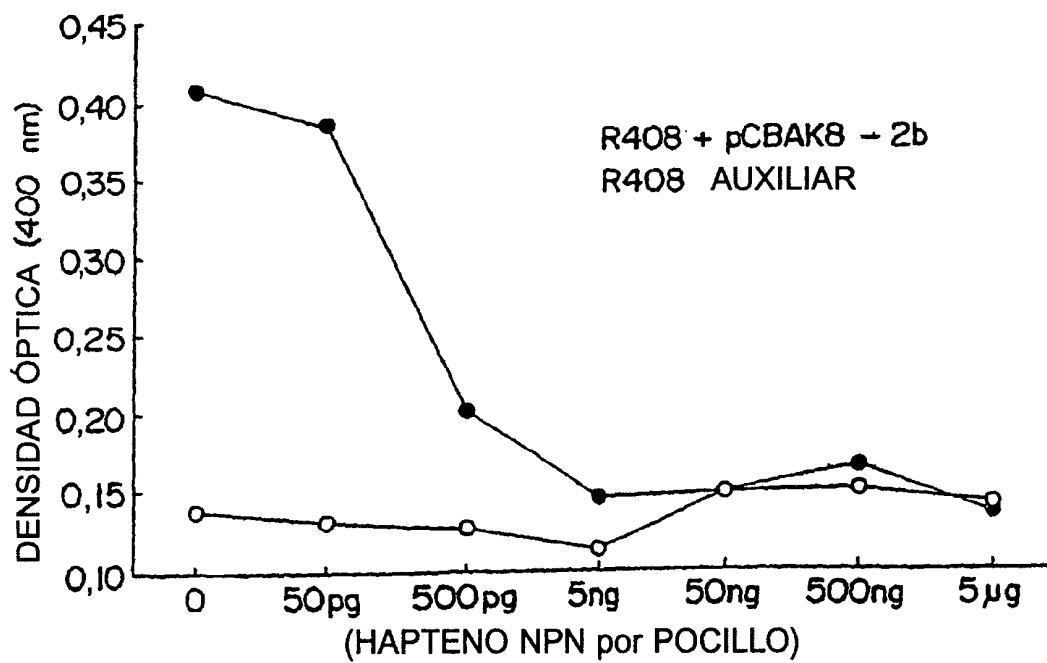


FIG. 11

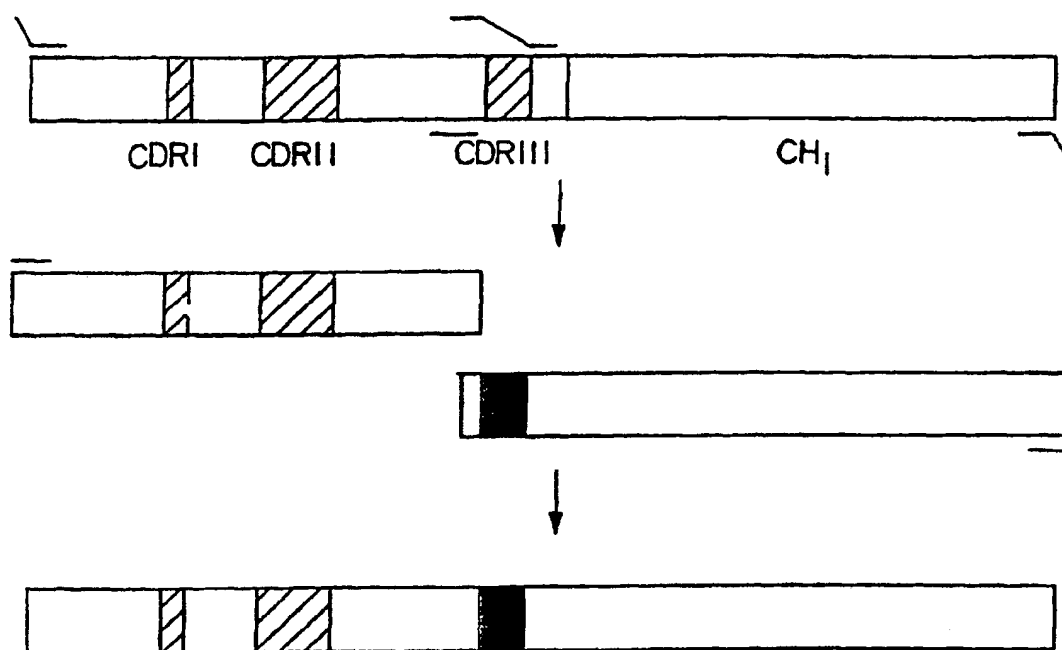


FIG. 12

Clon	Secuencia HCDR3	K _d (FI) M	K _d (FI-BSA)* M	SEC ID N°
7E	G D F W T G Y S D Y K Y A M D V	<10 ⁻⁵	<10 ⁻⁵	130
F32	G N N N	6,0 X 10 ⁻⁷	1 X 10 ⁻⁷	131
F34	G G G			132
F37	G G G			133
F1	G G G G G G	1,4 X 10 ⁻⁷	2 X 10 ⁻⁸	134
F7	G G G G G G			135
F9	G G G G G G			136
F22	G G G G G G			137
F25	G G G G G G			138
F39	G G G G G G			139
F31	G P V S R A L R R Y A G W D L	1,3 X 10 ⁻⁶	3 X 10 ⁻⁸	140
FBSA-8	V F G L S L S	1,5 X 10 ⁻⁶	5 X 10 ⁻⁸	141
FBSA-11				142
FBSA-13				143
FBSA-20				144
FBSA-30				145
FBSA-48				146
FBSA-55		1,6 X 10 ⁻⁶	1 X 10 ⁻⁷ 8 X 10 ⁻⁸ 1 X 10 ⁻⁷	147

FIG. 13

<u>Clon</u>	<u>Clon</u>	<u>CDR3 de cadena ligera correspondiente a Kabat Posiciones 92-96</u>	<u>SEC ID N°</u>
Clon inicial	7E	Gly Ser Ser Leu Trp	148
Clones eluidos con fluoresceína	p2	Thr Arg Pro Gly Val	149
	p21	Thr Arg Pro Gly Val	149
	p23	Thr Arg Pro Gly Val	149
	p28	Thr Arg Pro Gly Val	149
	p19	Thr Arg Pro Gly Val	149
	p15	Ser Phe Lys Asn Trp	150
	p11	Gly Tyr Arg Lys Trp	151

FIG. 14