(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 323 444**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **00118282 .3**
(96) Fecha de presentación : **06.07.1992**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1065271**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **03.01.2001**

(54) Título: **Fagemido para la selección de anticuerpos.**

(30) Prioridad: **08.07.1991 DE 4122599**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.07.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.07.2009

(73) Titular/es: **Deutsches Krebsforschungszentrum**
Stiftung des öffentlichen Rechts
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE

(72) Inventor/es: **Breitling, Frank;**
Little, Melvyn;
Dübel, Stefan;
Braunagel, Michael y
Klewinghaus, Iris

(74) Agente: **Arpe Fernández, Manuel**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Fagemido para la selección de anticuerpos.

La presente invención se refiere a fagemidos para la selección de anticuerpos específicos obtenidos de grandes bancos de genes, a la producción de estos fagemidos y a su utilización para la selección de anticuerpos específicos obtenidos de grandes bancos de genes utilizando pequeñas cantidades de antígeno.

Se han desarrollado bancos de genes plásmido-anticuerpo y fago-anticuerpo en *E. coli* de familias de inmunoglobina amplificada por RPC tras la inmunización. Se han seleccionado anticuerpos recombinantes contra inmunógenos mediante ensayos ELISA de los sobrenadantes bacterianos de colonias bacterianas aisladas (Ward, E.S., Güssow, D. Griffiths, A.D., Jones, P.T. and Winter, G., "Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*", Nature (1989), 341, 544-546) o mediante selección de placas de colonias bacterianas transferidas a nitrocelulosa en cuanto a reactividad contra inmunógenos marcados radioactivamente (Huse, W.D., Sastry, L., Iverson, S.A., Kang, A.S., Alting-Mees, M., Burton, D.R., Benkovic, S.J. and Lerner, R.A., "Generation of a large combinatorial library of the immunoglobin repertoire in phage lambda", Science (1989), 246, 1275-1281). Sin embargo, para la selección de anticuerpos específicos de bancos de genes de cadenas ligeras y pesadas combinadas aleatoriamente de animales no inmunizados en los que no existe una preponderancia de anticuerpos para un determinado antígeno, se requiere un procedimiento para la selección de millones de bacterias productoras de anticuerpos.

Un posible método para realizar una selección en un gran ámbito de anticuerpos consiste en ligar anticuerpos recombinantes a la superficie de bacterias o bacteriófagos, de modo que puedan entonces seleccionarse rápidamente mediante un antígeno ligado a una fase sólida. En lo que se refiere a las dificultades para colocar proteínas de forma selectiva en la superficie celular de bacterias, la familia M13 de bacteriófagos filamentosos es un candidato tentador debido a su pequeño tamaño y su estructura genética relativamente sencilla (véase artículo sinóptico de Webster, R.E. and Lopez, J., en "Virus Structure and Assembly", editado por S. Casjens, publicado por Jones and Bartlett Inc., Bosten/Portala Valley, USA, 1985; Day, L.A., Marzec, C.J., Reisberg, S.A. and Casadevall, A., "DNA packaging in filamentous bacteriophages", Ann. Rev. Biophys. Chem. (1988), 17, 509-539).

El producto de gen III (pIII) es una molécula relativamente flexible y accesible que está compuesta de dos dominios funcionales; un dominio amino-terminal, que se liga a los pilus F de bacterias humanas durante la infección, y un dominio carboxi-terminal, oculto dentro del virión, que es importante para la morfogénesis. Pueden insertarse péptidos entre los dos dominios de pIII (Smith, G.P., "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface", Science (1985), 228, 1315-1317) o cerca del término N (Parmley, S.F. and Smith, G.P., "Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes", Gene (1988), 73, 305-318) sin destruir sus funciones en la morfogénesis y la infección. Después de un considerable trabajo de vanguardia sobre la utilización de pIII en fagos fd para la conducción de péptidos ajenos, Parmely and Smith (1988, arriba indicado) demostraron que los epítopos peptídicos insertados en el extremo amino-terminal pueden ligar fagos a anticuerpos inmovilizados. Como resultado de este trabajo fue posible desarrollar bancos de genes peptídicos que pueden seleccionarse en cuanto a la ligadura a ligandos y anticuerpos (Scott, J.K. and Smith, G.P. "Searching for peptide ligands with an epitope library", Science (1990), 249, 386-390; Devlin, J.J., Panganiban, L.C. and Devlin, P.E., "Random peptide libraries: A source of specific protein binding molecules", Science (1990), 249, 404-406; Cwirla, S.E., Peters, E.A., Barrett, R.W. and Dower, W.J., "Peptides on phage, a vast library of peptides for identifying ligands", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990), 87, 6378-6382).

McCafferty, J., Griffith, A.D., Winter, G. and Chiswell, D.J., "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains", Nature (1990), 348, 552-554 informaron sobre el ensamblaje de una proteína de fusión anticuerpo-pIII en un fago fd con un gen Tet^R tras la inserción del DNA de anticuerpo en el extremo 5' del gen III. El fago continuó siendo infeccioso y pudo enriquecerse mediante una cromatografía de afinidad. Sin embargo, los fagos de fusión resultaban adecuados principalmente para insertos relativamente pequeños, probablemente porque los insertos grandes tienen una influencia negativa en la infectividad de pIII (Parmlee and Smith, 1988, arriba indicado). Por lo tanto, existe un gran riesgo de que en los bancos de genes de fagos predominen rápidamente los mutantes de deleción tras su amplificación.

El documento WO92/01047, que se publicó el 23 de enero de 1992 y es un documento según el artículo 54(3) CPE, da a conocer construcciones de fagemidos específicas que codifican proteínas de fusión de fragmentos de anticuerpos específicos en el extremo N de la proteína pIII de fagos fd. Estos fagemidos están basados en el vector pUC119. Los fagemidos descritos específicamente se designan como pCAT-3scFvD1.3 y el grupo estrechamente relacionado de los fagemidos pHEN1 I-IV. En pCAT-3scFvD1.3, el fragmento de anticuerpo codificado es un Fv de cadena sencilla de un anticuerpo, D1.3, contra la lisozima del huevo de gallina. La secuencia de ácidos nucleicos que codifica el fragmento de anticuerpo, que está representada en la figura 5 del documento WO 92/01047, y la construcción que codifica la proteína pIII del anticuerpo se clonan en el pUC 119. En los fagemidos pHEN1 I-IV, las construcciones codifican las regiones variables V_H de la cadena pesada y/o V_L de la cadena ligera del anticuerpo de ratón NQ10.12.5 junto con Ck y CH1 (isotipo Gamma 1) contra 2-fenil-5-oxazolona. En el documento WO92/01047 se remite a Griffiths *et al*., Nature 312, 271-275, 1984, donde se da a conocer el anticuerpo NQ10.12.5; Griffiths *et al.* proporcionan las secuencias de ácidos nucleicos de los genes de anticuerpo.

La presente invención se refiere a la utilización de un fagemido que comprende DNA que codifica para una proteína de fusión de un anticuerpo y una proteína pIII de colífago, comprendiendo la proteína pIII de colífago los dominios amino-terminales y los dominios carboxi-terminales de una proteína pIII de colífago, en un método de selección sustractivo, utilizando células normales y neoplásticas para la identificación de antígenos asociados a tumores.

El anticuerpo es preferentemente un anticuerpo de cadena sencilla.

Se incorporó a un fagemido DNA que codifica para una proteína de fusión anticuerpo-pIII, preferentemente una proteína de fusión anticuerpo-pIII de cadena sencilla. Una gran ventaja del sistema de fagemido según la invención frente a McCafferty *et al*. (arriba indicado) consiste en que puede multiplicarse como plásmido y no se halla bajo presión selectiva en lo que se refiere a la eliminación de DNA de anticuerpo, ya que la expresión de la proteína de fusión está muy inhibida. Esto es particularmente importante durante la amplificación de los bancos de genes de anticuerpo, en la que los mutantes de deleción de rápida proliferación podrían volverse rápidamente dominantes. El DNA de fagemido, que supone menos de la mitad del DNA de fago arriba indicado, también transforma bacterias con mayor eficacia. Además, al contrario que el sistema de fago arriba indicado, se producen grandes cantidades del DNA de fagemido de menor tamaño y, tras la inducción, se dispone de grandes cantidades de proteína de anticuerpo, con lo que se facilita en gran medida el análisis.

La expresión de la proteína de fusión anticuerpo-pIII, en particular de la proteína de fusión anticuerpo-pIII de cadena sencilla, utilizando el fagemido pSEX y su empaquetamiento en partículas virales facilita el desarrollo de sistemas bacterianos para el aislamiento de anticuerpos de gran afinidad. Ahora es posible seleccionar millones de clones productores de anticuerpos de bancos de genes de anticuerpos mediante una ligadura a antígenos inmovilizados. Otra ventaja frente a los procedimientos usuales de selección consiste en que sólo se necesitan pequeñas cantidades de antígeno, un factor importante si las reservas de una proteína rara son limitadas. Este sistema permite también seleccionar anticuerpos mutados casualmente, para aumentar sus afinidades de ligadura. El procedimiento puede repetirse varias veces, hasta alcanzar la especificidad deseada. Ahora es por primera vez posible realizar a gran escala distintos ensayos para seleccionar organismos y células afines. Para la identificación de antígenos asociados a tumores puede utilizarse una selección sustractiva, por ejemplo empleando células normales y neoplásticas. El sistema de fagemido resulta también sumamente útil para el estudio de interacciones moleculares, por ejemplo mediante una selección de anticuerpos que impidan una ligadura ligando-receptor.

Los ejemplos siguientes aclaran la invención.

Ejemplo 1

Construcción de un fagemido (pSEX)

Se clonaron DNA que codifican para un anticuerpo de cadena sencilla (scAb) y pIII, tras la inserción de un conjunto específico de sitios de restricción y una secuencia de unión sensible a la proteasa en el sitio de clonación múltiple, en pUC 119. El DNA de Ab codificaba para los dominios variables de la cadena pesada y ligera de un Ab humanizado contra lisozima de clara de huevo de gallina, que procedía de la anti-lisozima Ab D1.3 (Amit *et al*., Science (1986), 233, 747-754; Verhoeyen, M. *et al*., Science (1988), 239, 1534-1536). Estos dominios se unieron mediante una secuencia de unión de 18 aminoácidos, que contenía el epítopo del Ab YOL1/34 monoclonal (Breitling, F. and Little, M., "Carboxy-terminal regions on the surface of tubulin and microtubules: Epitope locations of YOL1/34, DM1A and DM1B", J. Mol. Biol. (1986), 189, 367-370), con lo que pudo identificarse el Ab. Para la puesta a disposición de una unión más flexible con pIII se modificó el extremo 3' del DNA para la cadena ligera mediante la adición de nucleótidos, que codificaban para los primeros seis aminoácidos del dominio constante en la cadena kappa humana, seguidos de un sitio de restricción BamHI. Se amplificó DNA de pIII del bacteriófago M13 utilizando cebadores correspondientes a los extremos 5' y 3' del gen III. A continuación se clonó el DNA de pIII de Ab en un fagemido de la familia pDS, que contenía un promotor T7 de colífago combinado con dos operadores lac (Bujard, H., Gentz, R., Lancer, M., Stüber, D., Müller, H.-M., Ibrahim, I., Häuptle, M-T. and Dobberstein, B., "A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vitro* and *in vivo*", Methods Enzymol. (1987), 155, 416-433; Lancer, M. and Bujard, H., "Promoters determine the efficiency of repressor action", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988), 85, 8973-8977; Müller, H.-M., Ph. D. thesis, Univ. Heidelberg, 1989). Finalmente se ligó un DNA codificador para la secuencia líder de la enzima bacteriana pectato liasa al extremo 5' del DNA de Ab, con lo que se obtuvo el fagemido pSEX (figura 1a). En la figura 1b se muestran las secuencias líder, de enlace y de los cebadores RPC. También se utilizó una secuencia de enlace alternativa (figura 1c) con el epítopo YOL1/34 al final del enlazador, que contenía un sitio de restricción útil para la inserción de bancos de genes de Ab. Aunque ambos enlazadores tag contenían una cantidad importante de restos ácidos, no tuvieron efecto alguno en la producción de scAbs funcionales, en comparación con los scAbs cuyos enlazadores sólo estaban compuestos de los aminoácidos neutros glicina y serina.

Ejemplo 2

Expresión de una proteína de fusión anticuerpo-pIII

Para comprobar si el vector fagemido acabado era capaz de expresar la proteína de fusión en toda su longitud, se añadieron 100 μm de IPTG a un cultivo de *E. coli* transformado con pSEX y que se hallaba en fase log. El cultivo mostró una ostensible disminución en su tasa de crecimiento, comparado con el control, lo que indicaba una síntesis importante de una proteína codificada por fagemido. En el análisis de transferencia Western se identificó la construcción anticuerpo-pIII mediante tres anticuerpos; un anticuerpo monoclonal contra una parte de la secuencia de enlace (EEGEFSEAR) y dos sueros de conejo anti-péptido contra secuencias N-terminales de las cadenas pesadas y ligeras (QVQLQQSGGG o DJQMTQSPSS). Migraba con un peso molecular evidente de 93 kd (figura 2). El gran tamaño de la proteína de fusión (predicción: Mr 68.100) está condicionado muy probablemente por el componente pIII (Mr 42.100), que migra con un peso molecular evidente de aproximadamente 55.000 - 70.000 kd (Goldsmith, M.E. and Königsberg, W.H., "Adsorption protein of the bacteriophage fd: isolation, molecular properties and location in the virus", Biochemistry (1977), 16, 2868-2694). Una proteólisis parcial de la proteína de fusión se manifestó con la presencia de algunas bandas más débiles de menor peso molecular, que se tiñeron de forma idéntica a los tres anticuerpos.

Un fraccionamiento celular mostró que la proteína estaba presente en el citoplasma y en fracciones de membrana, pero no en el periplasma ni en el sobrenadante del cultivo (figura 2, trazas 3-6), al contrario que el componente de anticuerpo solo sin pIII, que se secretó en el periplasma y en el medio (datos no mostrados). Esto no era sorprendente, ya que, en las partículas de fago, pIII se sintetiza a partir de la membrana bacteriana interior, un proceso que aparentemente depende sólo del dominio C-terminal. Los mutantes de deleción de pIII sin este dominio llegan al periplasma, sin ligarse a la membrana citoplasmática (Boeke, J.D. and Model, P., "A prokaryotic membrane anchor sequence: carboxyl terminuns of bacteriophage fl gene III protein retained in the membrane", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982), 79, 5200-5204), y no se forman partículas de fago normales (Crissman, J.W. and Smith, G.P., "Gene III protein of filamentous phages: evidence for a carboxy-terminal domain with a role in morphogenesis", Virology (1984), 132, 445-455). La secuencia de anclaje es probablemente un segmento hidrófobo de 23 aminoácidos en el término carboxilo (Davis, N.G., Boeke, S. and Model, P., "Fine structure of a membrane anchor domain", J. Mol. Biol. (1985), 181, 111-121).

La capacidad de la proteína de fusión para ligar un antígeno se estudió vertiendo la fracción soluble en tritón sobre una columna de lisozima ligada a sefarosa. Las transferencias Western del material no ligado y de las fracciones obtenidas después de un lavado minucioso y una elución con dimetilamina 0,05 M mostraron que la proteína de fusión se había retenido en toda su longitud realmente de forma específica en la columna de lisozima (figura 2, trazas 7-12).

Ejemplo 3

Empaquetamiento del fagemido pSEX

Para determinar si el vector de expresión fagemido podía empaquetarse, se infectaron varias veces con el fago fd *E. coli* que contenían pSEX. No se añadió IPTG, ya que se descubrió que tiene un efecto inhibidor en el empaquetamiento de un fagemido. De algo similar informó recientemente Bass *et al*., Proteins (1990), 8, 309-314, que construyó un fagemido que expresaba una proteína de fusión de una hormona del crecimiento humana y el domino C-terminal de pIII. El estudio de la producción de pIII de Ab con y sin IPTG tras la adición del fago fd demostró que el fago era por sí solo capaz de inducir una expresión (figura 3). Una posible explicación de esto es que uno de los productos de gen de fago perturba la ligadura del represor lac al operador. Por otra parte, la ligadura de proteínas de fago a la región intergénica podría influir en la topología del fagemido y provocar la liberación del represor lac. Sea como fuere, hemos descubierto que la transmigración de la región intergénica 10^3 nucleótidos al otro lado del gen bla no tiene efecto alguno en este fenómeno (datos no mostrados).

Una electroforesis en gel de agarosa del DNA liberado al medio por partículas de virus muestra, además del DNA de cadena sencilla de fd, una cantidad mayor de DNA más pequeño, que es comparable en tamaño al pSEX de cadena sencilla. El empaquetamiento del fagemido y la producción de partículas infecciosas se probaron además por la infección de *E. coli* con las partículas de virus liberadas. Se obtuvieron 10^{10} colonias de *E. coli* Amp^R por ml en relación con $3x10^9$ pfu.

Para determinar si el fagemido empaquetado tenía incorporada la proteína de fusión anticuerpo-pIII, se mezclaron 90 μl de sobrenadante de cultivo, que contenía $5x10^8$ fagemidos empaquetados determinados como unidades transductoras de Amp^R, con un exceso por un factor de mil del fago fd de tipo salvaje y se vertieron sobre una columna de lisozima inmovilizada. Después de un lavado minucioso con diez volúmenes de baño de PBS, NaCl 1 M ó NaCl 0,5 M en $NaHCO_3$ 0,1 M con un pH de 8,3, las partículas de fagemido se eluyeron con dietilamina 0,05 M. El eluato se neutralizó con NaH_2PO_4 0,5 M y se ensayó en cuanto al número de fagos y de fagemidos empaquetados (tabla). Se logró un enriquecimiento específico por un factor de hasta 121, lo que mostró la incorporación de construcciones anticuerpo-pIII funcionales a la partícula de fagemido. Las propiedades de ligadura de la partícula de fagemido pueden aumentarse aun más utilizando un mutante de deleción de pIII para el empaquetamiento. Esto garantiza que se empaqueten sólo los fagemidos que codifiquen para proteínas de fusión funcionales y que se fusionen las cinco proteínas pIII en una partícula de fagemido con anticuerpo.

Descripción de las figuras

Figura 1

Construcción de pSEX, un fagemido para la selección de anticuerpos

VH y VL son dominios variables de la cadena pesada o ligera de un Ab antilisozima.

(a) *Construcción*

Para la puesta a disposición de los sitios de restricción necesarios, los oligonucleótidos 5' GCTGAATTCGGATC CATAGGGCCCTCTAGAGTCGAC3' y 5'AATTGTCGACTCTAGAGGGCCCTATGGATCCGAATTCAGCTGCA3' 5'- se fosforilaron, se hibridaron entre sí y se ligaron en pUC119, que había sido cortado con PstI y EcoR1 y desfosforilado. En caso dado se insertaron los oligonucleótidos hibridados 5'GATCCAAAGATATCAGAGGGCC3' y 5'CTCTGATATCTTTG3' entre los sitios BamHI y Apal del primer conjunto de oligonucleótidos, con el fin de crear una secuencia sensible a la proteasa. A continuación se insertó DNA de scAB entre los sitios PstI y BamHI, a lo que siguió una ligadura del DNA de pIII mediante extremos romos tras un corte del fagemido con Apal y un tratamiento con T4-DNA-polimerasa para eliminar extremos salientes 3'. Se produjo pSEX combinando el sitio de clonación múltiple de pUHE 24-2 con el fagemido estrechamente relacionado pDS31-1, que contenía una región intergénica de fl adicional (Bujard *et al*., 1987, arriba indicado; Müller, 1989, arriba indicado). La secuencia de pDS31-1 se extiende desde Xhol, en sentido contrario al de las agujas del reloj, hasta un sitio HindIII (entre paréntesis), que se perdió tras la ligadura mediante los extremos romos. pUHE24-2 es en esencia idéntico a pDSG (Bujard *et al*., 1987), en el que un promotor T7 de colífago está combinado con dos operadores lac y un sitio de unión ribosómica (PA1/04/03, Lancer and Bujard, 1988, arriba indicado; Lanzer, 1988, arriba indicado). El fagemido obtenido se cortó con HindIII y los extremos salientes 5' se rellenaron con fragmento de Klenow. Después de otro corte con PstI, se insertó en el fagemido el fragmento de DNA de pIII de Ab PstI-HincII. Finalmente se insertó, entre los sitios de restricción NcoI y PstI, un DNA sintético que codifica para la secuencia líder de la enzima bacteriana pectato liasa y para los primeros cuatro aminoácidos de la cadena pesada. Los plásmidos pUHE se multiplicaron en *E. coli*71-18 con el plásmido pDM1, que expresa el represor lac, los plásmidos pUC se multiplicaron en DH5 y la proteína de fusión anticuerpo-pIII se expresó en JM101.

(b) *Secuencia del sitio de unión ribosómica (RBS), de la secuencia líder de la pectato liasa, del enlazador tag y de los cebadores RCP para pIII*

Los aminoácidos subrayados indican el epítopo para YOL1/34. Los aminoácidos siguientes en la secuencia líder son una continuación de la secuencia de tubulina.

(c) *Posible secuencia del enlazador tag*

Los aminoácidos subrayados indican el epítopo para YOL11/34. Los aminoácidos del enlazador precedente son una continuación de la secuencia de Ab en el dominio constante.

Figura 2

Inducibilidad, localización celular y ligadura de antígeno de la proteína de fusión anticuerpo-pIII, analizada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y transferencia Western

Trazas 1 y 2: Células completas tras 1 h de incubación con IPTG 100 uM (1) o sin IPTG (2).

Trazas 3 - 6: Fraccionamiento celular; 3: sobrenadante de cultivo, 4: fracción con enriquecimiento periplasmático, 5: fraccionamiento citoplasmático soluble, 6: extracto de tritón al 1%, trazas 7 - 12: cromatografía de afinidad con la lisozima del extracto de tritón al 1% de células inducidas y no inducidas, 7: salida (+IPTG), 8: salida (-IPTG), 9: último lavado (+IPTG), 10: último lavado (-IPTG), 11: eluato (+IPTG), 12: eluato (-IPTG).

Las trazas 1 - 6 se tiñeron utilizando el anticuerpo monoclonal YOL1/34 (Serotec, Oxford, U.K.) y las trazas 7 - 12 utilizando un antisuero contra la secuencia N-terminal de la cadena ligera.

Realización

Se obtuvieron antisueros contra las cadenas pesadas y ligeras mediante una inyección subcutánea de conejos con los péptidos amino-terminales QVQLQQSGGG(AC) o DIQMTQSPSS(AC), que estaban acoplados a la hemocianina de la lapa de cerradura. Para estudiar la expresión de la proteína de fusión se resuspendieron bacterias peletizadas de cultivos inducidos con IPTG en tampón Tris/HCl 30 mM, pH 8,0, que contenía sacarosa al 20%, EDTA 1 mM, 1 mg/ml de lisozima de gallina, y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Después de 1 minuto de centrifugación a 15.000 g, se recogió el sobrenadante que contenía la proteína periplasmática y se trató la pella con ondas ultrasónicas en Tris/HCl 0,1 M, pH 8,0. Después de 5 minutos de centrifugación a 15.000 g, se decantó la fracción citosólica soluble y se incubó la pella resuspendida en Tritón X100 al 1%, con lo que se obtuvo la fracción ligada a la membrana.

Se ensayaron todas las fracciones en cuanto a la actividad de β-lactamasa según Plückthun, A. und Knowles, J.R.: "The consequences of stepwise deletions from the signal-processing site for β-lactamase", J. Biol. Chem. 262 (1987), 3951-3957, para averiguar la eficacia de la etapa de fraccionamiento. La fracción soluble en tritón se diluyó con PBS por un factor de 100 antes de añadirse a columnas de afinidad. Para la cromatografía de afinidad se acopló según las instrucciones del fabricante lisozima de gallina (Boehringer, Mannheim, FRG) con sefarosa activada con bromuro de cianógeno (Pharmacia). La lisozima-sefarosa se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente con los extractos y se vertió en columnas, que a continuación se lavaron con 10 volúmenes de baño de PBS, NaCl 1 M ó NaCl 0,5 M en $NaHCO_3$ 0,1 M, con un pH de 8,3, antes de eluirse con dietilamina 0,05 M. Todas las fracciones se precipitaron con ácido tricloracético (concentración final 20%) y se separaron en geles de poliacrilamida-SDS (Laemmli, U.K.: "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4", Nature (1970), 227, 680-685). Se realizaron transferencias Western según Towbin, H Steahelin, T. and Gordon, I.: "Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979), 76, 4350-4354, utilizando segundos anticuerpos, que estaban acoplados a peroxidasa de rábano picante, con diaminobencideno como sustrato.

Figura 3

Electroforesis en gel de pSEX circular de cadena sencilla

traza 1: fd, traza 2: fagemido de control pUHE31-1 con fd,

traza 3: pSEX1 con fd.

Se vertieron DNA de viriones de fd y partículas de fagemido empaquetadas sobre geles de agarosa al 0,8% en lxTBE según Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. en "Molecular Cloning: A laboratory Manual", 2ª edición, publicado en Cold Spring Harbor Laboratory (1989) y se tiñeron con bromuro de etidio.

Realización

Para producir fagemidos empaquetados se prepararon en placas cultivos de *E. coli* JM101 que contenían pSEX1 en medio mínimo M9 y se incubaron durante 30 h a 37ºC. 2 ml del mismo medio se inocularon con una de las colonias y se incubaron a 37ºC con una fuerte ventilación, hasta que se alcanzó una densidad óptica de aproximadamente 0,2 a 600 nm. A continuación se añadieron al cultivo 0,5 ml de medio LB y un exceso por un factor de diez del fago fd y se incubó el cultivo durante otras 3 h a 37ºC. Después de centrifugar dos veces cuidadosamente a 15.000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente, se ajustó el sobrenadante a una concentración final de polietilenglicol al 4% (Serva PEG 6000) y NaCL 0,5 M y se dejó reposar durante la noche a 4ºC. Se sedimentaron los fagemidos mediante 20 minutos de centrifugación a temperatura ambiente y 15.000 g y se suspendieron en 200 μl de tampón Tris-EDTA, pH 7,5. Se preparó DNA de fagemido mediante diez minutos de agitación con un volumen de fenol, seguidos de un tratamiento con cloroformo-isopropanol y una precipitación con isopropanol (Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª edición, publicado en Cold Spring Harbor Laboratory (1989)).

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA

Enriquecimiento específico de fagemidos empaquetados en una columna de afinidad de antígeno

	Volumen total (ml)	Volumen placas (µl)	en Número Amp[E] colonias	Total	Volumen placas (µl)	en Número pfu total	Total	Exceso pfu/Amp	Factor de enriquecimiento
Aplicado	10	10^{-3}	51	$5,1x10^{8}$	10^{-6}	45	$4,5x10^{11}$	882	-
Eluido	1,1	10^{-1}	26	$2,9x10^{5}$	10^{-2}	19	$2,1x10^{6}$	7,3	121

Referencias citadas en la descripción

La lista de referencias citada por el solicitante lo es solamente para utilidad del lector, no formando parte de los documentos de patente europeos. Aún cuando las referencias han sido cuidadosamente recopiladas, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citado en la descripción

- WO 9201047 A [0006] [0006] [0006]

Bibliografía de patentes citada en la descripción

- **WARD**, E.S.; **GOSSOW**, D.; **GRIFFITHS**, A.D.; **JONES**, P.T.; **WINTER**, G. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature*, 1989, vol. 341, 544-546 [0002]

- **HUSE**, W.D.; **SASTRY**, L.; **IVERSON**, S.A.; **KANG**, A.S.; **ALTING-MEES**, M.; **BURTON**, D.R.; **BENKOVIC**, S.J.; **LERNER**, R.A. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobin repertoire in phage lambda. *Science*, 1989, vol. 246, 1275-1281 [0002]

- VON **WEBSTER**, R.E.; **LOPEZ**, *J. Virus* Structure and Assembly. von Jones and Bartlett Inc, 1985 [0003]

- **DAY**, L.A.; **MARZEC**, C.J.; **REISBERG**, S.A.; **CASADEVALL**, A. DNA packaging in filamentous bacteriophages. *Ann. Rev. Biophys. Chem.*, 1988, vol. 17, 509-539 [0003]

- **SMITH**, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985, vol. 228, 1315-1317 [0004]

- **PARMLEY**, S.F.; **SMITH**, G.P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*, 1988, vol. 73, 305-318 [0004]

- **SCOTT**, J.K.; **SMITH**, G.P. Searching for peptide ligands with an apitope library. *Science*, 1990, vol. 249, 386-390 [0004]

- **DEVLIN**, J.J.; **PANGANIBAN**, L.C.; **DEVLIN**, P.E. Random peptide libraries: A source of specific protein binding molecules. *Science*, 1990, vol. 249, 404-406 [0004]

- **CWIRLA**, S.E.; **PETERS**, E.A.; **BARRETT**, R.W.; **DOWER**, W.J. Peptides on phage, a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA, 1990, vol. 87, 6378-6382 [0004]

- **MCCAFFERTY**, J.; **GRIFFITH**, A.D.; **WINTER**, G.; **CHISWELL**, D.J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0005]

- **GRIFFITHS** y otros *Nature*, 1984, vol. 312, 271-275 [0006]

- **TOWBIN**, H; **STEAHELIN**, T.; **GORDON**, I. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA, 1979, vol. 76, 4350-4354 [0028]

- **AMIT** y otros *Science*, 1986, vol. 233, 747-754 [0012]

- **VERHOEYEN**, M. y otros *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0012]

- **BREITLING**, F.; **LITTLE**, M. Carboxy-terminal regions on the surface of tubulin and microtubules: Epitope locations of YOL1/34, DM1A and DM1B. *J. Mol. Biol*., 1986, vol. 189, 367-370 [0012]

- **BUJARD**, H.; **GENTZ**, R.; **LANCER**, M.; **STÜBER**, D.; **MÜLLER**, H.-M.; **IBRAHIM**, I; **HÄUPTLE**, M-T.; **DOBBERSTEIN**, B. A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vitro* and *in vivo*. *Methods Enzymol*., 1987, vol. 155, 416-433 [0012]

- **LANCER**, M.; **BUJARD**, H. Promoters determine the efficiency of repressor action. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA, 1988, vol. 85, 8973-8977 [0012]

- **MOLLER**, H.-M. Ph. D. *thesis*, 1989 [0012]

- **GOLDSMITH**, M.E.; **KÖNIGSBERG**, W.H. Adsorption protein of the bacteriophage fd: isolation, molecular properties and location in the virus. *Biochemistry*, 1977, vol. 16, 2868-2694 [0013]

• **BOEKE**, J.D.; **MODEL**, P. A prokaryotic membrane anchor sequence: carboxyl terminuns of bacteriophage fl gene III protein retained in the membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA, 1982, vol. 79, 5200-5204 [0014]

• **CRISSMAN**, J.W.; **SMITH**, G.P. Gene III protein of filamentous phages: evidence for a carboxy-terminal domain with a role in morphogenesis. *Virology*, 1984, vol. 132, 445-455 [0014]

• **DAVIS**, N.G.; **BOEKE**, S.; **MODEL**, P. Fine structure of a membrane anchor domain. *J. Mol. Biol*., 1985, vol. 181, 111-121 [0014]

• VON **BASS** y otros *Proteins*, 1990, vol. 8, 309-314 [0016]

• **PLÜCKTHUN**, A.; **KNOWLES**, J.R. The consequences of stepwise deletions from the signal-processing site for β-lactamase. *J. Biol. Chem*., 1987, vol. 262, 3951-3957 [0028]

• **LAEMMLI**, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, 680-685 [0028]

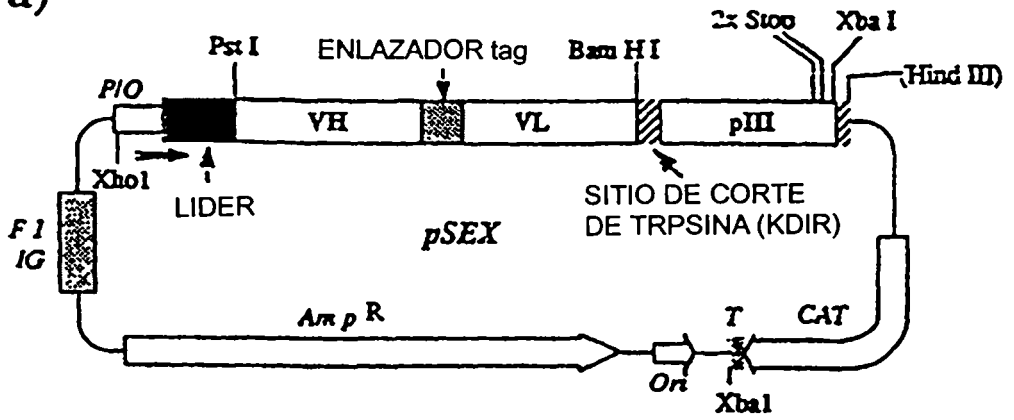
• **SAMBROOK**, J.; **FRITSCH**, E.F.; **MANIATIS**, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, 1989 [0030] [0031]

REIVINDICACIONES

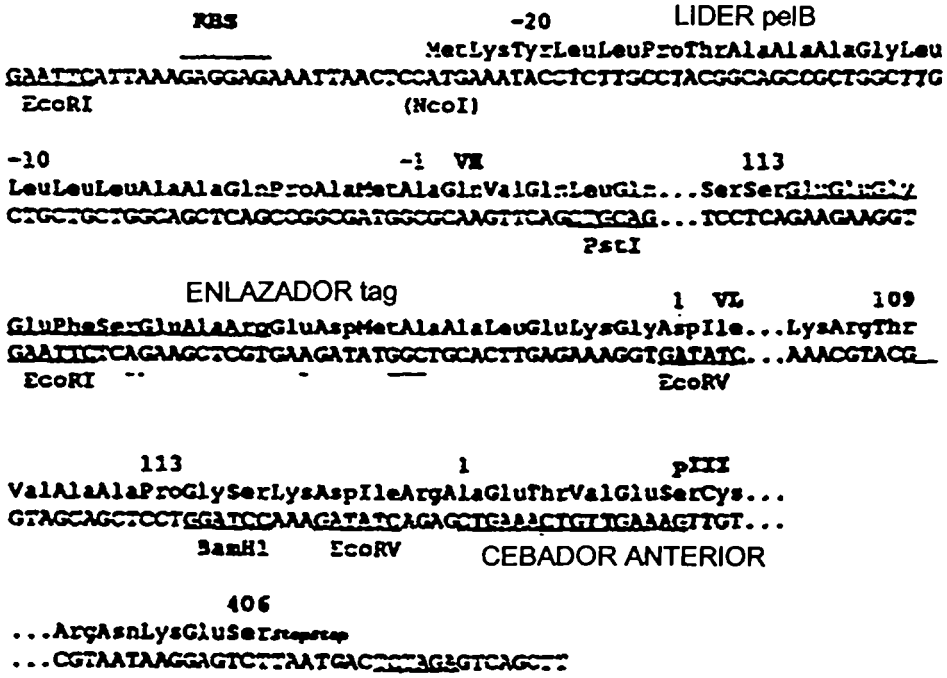
1. Utilización de un fagemido que comprende DNA que codifica para una proteína de fusión de un anticuerpo y una proteína pIII de colífago, comprendiendo la proteína pIII de colífago los dominios amino-terminales y los dominios carboxi-terminales de una proteína pIII de colífago, en un método de selección sustractivo, utilizando células normales y neoplásticas para la identificación de antígenos asociados a tumores.

2. Utilización según la reivindicación 1, siendo el anticuerpo un anticuerpo de cadena sencilla.

a)


Pst I
ENLAZADOR tag
BamHI
2x Stop
Xba I
(Hind III)
PlO
VH
VL
pIII
Xho1
LIDER
SITIO DE CORTE
DE TRPSINA (KDIR)
pSEX
F1
IG
Amp R
T
CAT
On
Xba1

b)


RBS
-20
LIDER pelB
MetLysTyrLeuLeuProThrAlaAlaAlaGlyLeu
EcoRI
(NcoI)
-10
-1 VH
113
LeuLeuLeuAlaAlaGlnProAlaMetAlaGlnValGlnLeuGln...SerSerGluGlnGly
PstI
ENLAZADOR tag
1 VL
109
GluPheSerGluAlaArgGluAspMetAlaAlaLeuGluLysGlyAspIle...LysArgThr
EcoRI
EcoRV
113
1
pIII
ValAlaAlaProGlySerLysAspIleArgAlaGluThrValGluSerCys...
BamHI
EcoRV
CEBADOR ANTERIOR
406
...ArgAsnLysGluSer
XbaI
(HindIII)
CEBADOR POSTERIOR

c)

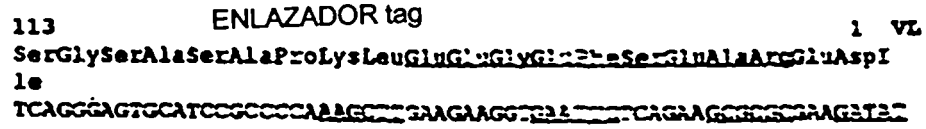

113
ENLAZADOR tag
1 VL
SerGlySerAlaSerAlaProLysLeuGluGluGlyGluPheSerGluAlaArgGluAspI
le

Fig.1

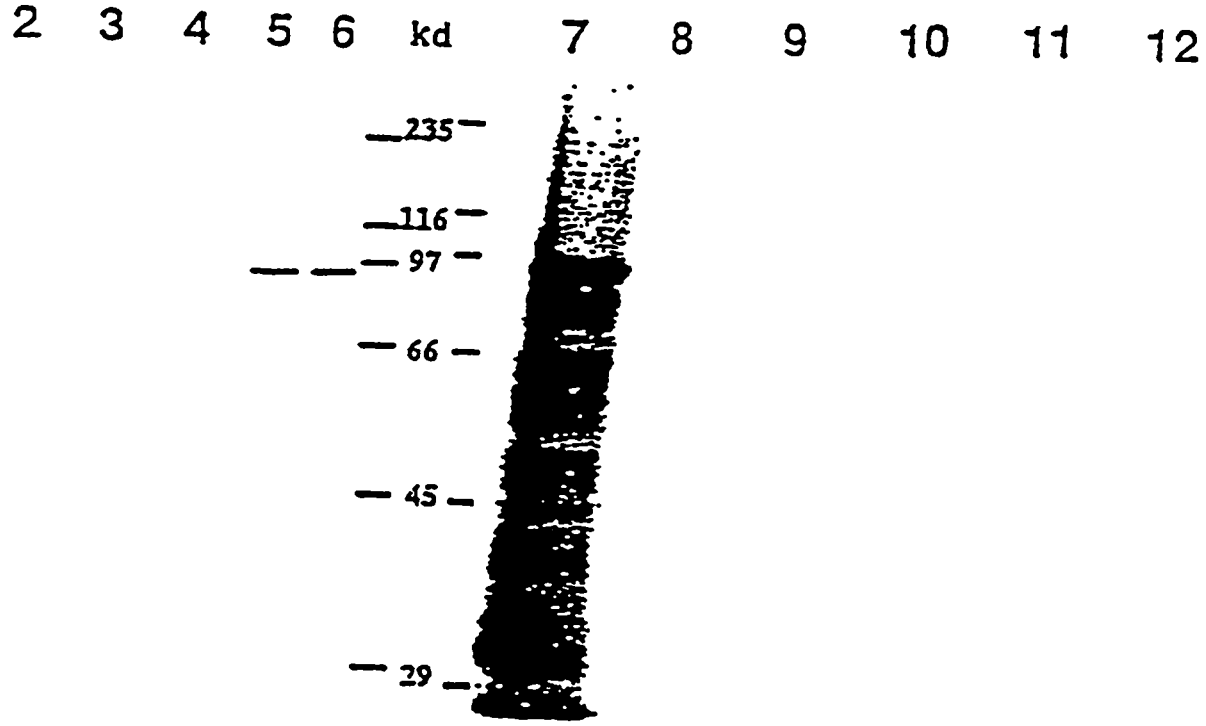


Fig. 2

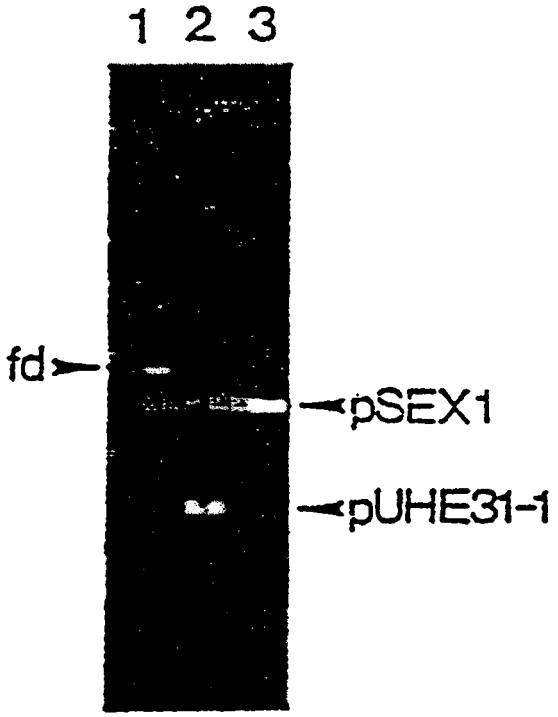


FIG. 3