



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 352 818**

(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: **08017685 .2**

(96) Fecha de presentación : **06.07.1992**

(97) Número de publicación de la solicitud: **2025753**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **18.02.2009**

(54) Título: **Fagémidos para el cribado de anticuerpos.**

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

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.02.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.02.2011

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

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

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Fagémidos para el cribado de anticuerpos.

5 La presente invención se refiere a fagémidos para la selección de anticuerpos específicos a partir de bibliotecas recombinantes grandes, a la producción de estos fagémidos y a su uso para seleccionar anticuerpos específicos a partir de bibliotecas recombinantes grandes usando pequeñas cantidades de antígeno.

10 Las bibliotecas de anticuerpos en plásmidos y fagos se han establecido en *E. coli* a partir de familias de inmunoglobulinas amplificadas por PCR después de una inmunización. Los anticuerpos recombinantes frente a inmunógenos se seleccionaron por un ensayo ELISA del sobrenadante bacteriano a partir de colonias bacterianas aisladas (Ward, E.S., Güssow, D., Griffiths, A.D., Jones, P.T. y Winter, G.: "Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*", Nature 341 (1989) 544-546) o por cribado de réplicas de la placa de colonias bacterianas en nitrocelulosa para detectar la reactividad frente a los inmunógenos marcados radiactivamente (Huse, W.D., Sastry, L., Iverson, S.A., Kang, A.S., Alting-Mees, M., Burton, D.R., Benkovic, S.J. y Lerner, R.A.: "Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda", Science 246 (1989) 1275-1281). Sin embargo, para la selección de anticuerpos específicos a partir de bibliotecas de cadenas ligeras y pesadas combinadas aleatoriamente de animales no inmunizados que no contienen un predominio de anticuerpos frente a un antígeno particular, se requiere un procedimiento para cribar millones de bacterias que producen anticuerpos.

20 Una forma posible de cribar un amplio rango de anticuerpos es unir anticuerpos recombinantes a la superficie de bacterias o bacteriófagos de manera que puedan seleccionarse rápidamente por antígenos unidos a una fase sólida. Dadas las dificultades de dirigir proteínas a la superficie celular de las bacterias, un candidato atractivo debido a su pequeño tamaño y su sencilla estructura genética es la familia M13 de bacteriófagos filamentosos (para revisiones véanse Webster, R.E. y Lopez, J. en "Virus Structure and Assembly" ed. S. Casjens, publ. Jones y Bartlett Inc., Boston/Portala Valley, EEUU, 1985; Day, L.A., Marzec, C.J., Reisberg, S.A. y Casadevall, A.: "DNA packaging in filamentous bacteriophages", Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 17 (1988) 509-539).

30 Kang *et al.* (PNAS 1991, vol. 88, p 4363-4366) describe un método para el desarrollo y análisis rápido de bibliotecas de Fab de anticuerpo combinatorias, que se basa en un vector fagémido con fagos auxiliares.

35 WO 88/06630 se refiere a organismos modificados genéticamente que presentan un producto expresado de un gen insertado en su superficie. En particular, se describe un anticuerpo monocatenario que se presenta en la superficie de un microorganismo modificado genéticamente.

40 El producto del gen III (pIII) es una molécula relativamente flexible y accesible compuesta por dos dominios funcionales; un dominio amino terminal que se une al pilus F de bacterias masculinas durante la infección y un dominio carboxilo terminal incluido en el 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 228 (1985) 1315-1317) o cerca del N terminal (Parmley, S.F. y Smith, G.P.: Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. Gene, 73 (1988) 305-318) sin destruir sus funciones en la morfogénesis y la infección. Después de mucho trabajo pionero en el uso de pIII en fagos fd para transportar péptidos extraños, Parmley y Smith (1988, loc. cit.) mostraron que los epítomos peptídicos insertados en el extremo amino terminal podían unir fagos a anticuerpos inmovilizados. Como consecuencia de este trabajo, ha sido posible generar bibliotecas peptídicas que pueden cribarse para detectar la unión a ligandos y anticuerpos (Scott, J.K. y Smith, G.P.: Searching for peptide ligands with an epitope library. Science 249 (1990) 386-390; Devlin, J.J., Panganiban, L.C. y Devlin, P.E.: Random peptide libraries: A source of specific protein binding molecules. Science 249 (1990) 404-406; Cwirla, S.E., Peters, E.A., Barrett, R.W. y Dower, W.J. Peptides on phage, a vast library of peptides for identifying ligands.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 (1990) 6378-6382).

50 McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. y Chiswell, D.J.: Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. Nature, 348 (1990) 552-554 publicaron el ensamblaje de una proteína de fusión anticuerpo-pIII en un fago fd con un gen Tet^R después de insertar ADN de anticuerpo en el extremo 5' del gen III. El fago permaneció infeccioso y fue posible enriquecerlo por cromatografía de afinidad. Sin embargo, se ha mostrado que los fagos de fusión son útiles principalmente para insertos relativamente pequeños, probablemente porque los insertos grandes tienen un efecto adverso en la función de infectividad de pIII (Parmley y Smith, 1988, loc. cit.). Existe un riesgo elevado, por lo tanto, de que las bibliotecas de fagos se encuentren rápidamente dominadas por mutantes de delección después de la amplificación de la biblioteca.

60 Así, el problema técnico subyacente de la presente invención es proporcionar un medio más eficaz para cribar bibliotecas de anticuerpos en bacterias.

65 Este problema se resuelve proporcionando un fagémido según la reivindicación 1 que expresa una proteína de fusión anticuerpo-pIII funcional. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monocatenario.

El ADN que codifica una proteína de fusión anticuerpo-pIII, preferiblemente una proteína de fusión anticuerpo monocatenario-pIII, se incorporó en un fagémido. Una ventaja importante del sistema de fagémido de esta invención

respecto a McCafferty *et al.* (véase anteriormente) es que puede propagarse como un plásmido y no está bajo ninguna presión de selección para eliminar el ADN del anticuerpo, ya que la expresión de la proteína de fusión está fuertemente reprimida. Esto es particularmente importante durante la amplificación de las bibliotecas de anticuerpo cuando los mutantes de delección que proliferan muy rápido pueden dominar rápidamente. El ADN del fagémido, que es menor que la mitad del tamaño del ADN de fago anterior, también transforma bacterias más eficazmente. Además, en contraste con el sistema de fago mencionado anteriormente, se producen grandes cantidades del ADN de fagémido más pequeño y están disponibles grandes cantidades de proteína de anticuerpo después de la inducción, facilitando así en gran medida su análisis.

La expresión de la proteína de fusión anticuerpo-pIII, particularmente la proteína de fusión anticuerpo monocatenario-pIII, usando el fagémido pSEX y su empaquetamiento en partículas virales facilitan el establecimiento de sistemas bacterianos para el aislamiento de anticuerpos de alta afinidad. Ahora pueden cribarse rápidamente millones de clones que producen anticuerpos a partir de bibliotecas de anticuerpos por unión al antígeno inmovilizado. Una ventaja adicional respecto a los métodos de cribado convencionales es que sólo se requieren cantidades pequeñas de antígeno, un factor importante cuando el suministro de una proteína poco común es limitado. Este sistema también ofrece la posibilidad de cribar anticuerpos mutados aleatoriamente con el fin de incrementar sus afinidades de unión. El procedimiento puede repetirse muchas veces hasta que se consiga la especificidad deseada. Ahora es factible por primera vez llevar a cabo análisis de cribado diferencial a gran escala de células y organismos relacionados. Una selección sustractiva, p.ej., usando células normales y neoplásicas, puede usarse para identificar antígenos asociados a tumores. El sistema de fagémido también se muestra extremadamente útil para investigar interacciones moleculares p.ej. seleccionando anticuerpos que inhiban la unión del ligando al receptor.

Además, el sistema de esta invención se ha mostrado útil para presentar otras proteínas o péptidos en las superficies de partículas virales de fagémidos. Para este propósito, el ADN del anticuerpo tiene que reemplazarse con ADN del polipéptido deseado.

Los Ejemplos siguientes ilustran la presente invención.

Ejemplo 1

Construcción de un fagémido (pSEX)

Los ADN que codifican un anticuerpo monocatenario (scAb) y pIII se clonaron en pUC119 después de la inserción de un conjunto específico de sitios de restricción y una secuencia de unión sensible a proteasas en el sitio de clonación múltiple. El ADN de Ab codificaba los dominios variables de la cadena pesada y ligera de un Ab humanizado frente a lisozima de huevo blanco de gallina obtenido del Ab D1.3 anti-lisozima (Amit *et al.*, Science 233, p. 747-754, 1986; Verhoeyen, M. *et al.* Science 239 p. 1534-1536, 1988). Estos dominios se unieron por una secuencia conectora de dieciocho aminoácidos que contiene el epítipo para el Ab monoclonal YOL1/34 (Breitling, F. y Little, M.: "Carboxy-terminal regions on the surface of tubulin and microtubules: Epitope locations of YOL1/34, DM1A and DM1B", J. Mol. Biol. 189 (1986), 367-370), permitiendo así la identificación del Ab. Para proporcionar una unión más flexible a pIII, el extremo 3' del ADN de la cadena ligera se modificó por la adición de nucleótidos que codifican los primeros seis aminoácidos del dominio constante kappa humano seguido de un sitio de restricción BamHI. El ADN de pIII se amplificó a partir del bacteriófago M13 usando cebadores correspondientes a los extremos 5' y 3' del gen III. El ADN de Ab-pIII se clonó en un fagémido de la familia pDS que contenía un promotor de colifago T7 combinado con dos operadores lac (Bujard, H., Gentz, R., Lancer, M., Stüber, D., Müller, H.-M., Ibrahim, I., Häuptle, M.-T. y Dobberstein, B.: "A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vitro* and *in vivo*", Methods Enzymol. 155 (1987) 416-433; Lancer, M. y Bujard, H.: "Promoters determine the efficiency of repressor action", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 8973-8977; Müller, H.-M. Tesis doctoral, Univ. de Heidelberg, 1989). En una etapa final, el ADN que codifica la secuencia líder de la enzima bacteriana pectato liasa se ligó al extremo 5' del ADN del Ab lo que resulta en el fagémido pSEX (Fig. 1a). Las secuencias líder, conectora y cebadores de PCR se muestran en la Fig. 1b. También se empleó una secuencia conectora alternativa (Fig. 1c) con el epítipo YOL1/34 situado en el extremo del conector que contiene un sitio de restricción útil para la inserción de bibliotecas de Ab. Aunque estos dos conectores etiqueta contenían un número significativo de restos ácidos, parecían no tener efecto en la producción de scAb funcionales cuando se comparó con scAb con conectores compuestos sólo por los aminoácidos neutros glicina y serina.

Ejemplo 2

Expresión de la proteína de fusión anticuerpo-pIII

Para ensayar si el vector fagémido completo era capaz de expresar la proteína de fusión de longitud completa, se añadieron 100 μ moles de IPTG a un cultivo en fase log de *E. coli* transformado con pSEX. El cultivo mostró una disminución acusada en su velocidad de crecimiento comparado con el control, lo que indica una síntesis significativa de la proteína codificada por el fagémido. En el análisis por transferencia Western, la construcción anticuerpo-pIII se identificó mediante tres anticuerpos; un anticuerpo monoclonal frente a parte de la secuencia conectora (EEGEFSEAR) y dos sueros anti-péptido de conejo frente a las secuencias N terminales de las cadenas pesada y

ligera (QVQLQQSGGG y DIQMTQSPSS, respectivamente). Migró con un peso molecular aparente de 93 kd (Fig. 2). El gran tamaño de la proteína de fusión (predicho: Mr 68.100) se debe lo más probablemente al componente pIII (Mr 42.100) que migra con un peso molecular aparente de aproximadamente 55.000-70.000 kd (Goldsmith, M.E. y Königsberg, W.H.: "Adsorption protein of the bacteriophage fd: isolation, molecular properties and location in the virus", *Biochemistry*, 16 (1977) 2686-2694). La proteólisis parcial de la proteína de fusión se indicó por la presencia de algunas bandas menores de menor peso molecular que se tiñeron de manera idéntica con los tres anticuerpos.

El fraccionamiento celular mostró que la proteína estaba presente en las fracciones citoplásmicas y de membrana pero no en el periplasma ni en el sobrenadante del cultivo (Fig. 2, carriles 3-6) en contraste con el componente de anticuerpo solo sin pIII que se secretó en el periplasma y el medio (datos no mostrados). Esto no resultó sorprendente porque pIII se ensambla en las partículas de fago de la membrana interna bacteriana, un proceso que parece que sólo es dependiente del dominio C terminal. Los mutantes de delección de pIII sin este dominio pasan al periplasma sin unirse a la membrana citoplásmica (Boeke, J.D. y Model, P.: "A prokaryotic membrane anchor sequence: carboxyl terminus of bacteriophage f1 gene III protein retained in the membrane", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 5200-5204) y no se ensamblan las partículas de fago normales (Crissman, J.W. y Smith, G.P.: "Gene III protein of filamentous phages: evidence for a carboxy-terminal domain with a role in morphogenesis", *Virology*, 132 (1984) 445-455). La secuencia de anclaje es probablemente una cadena hidrofóbica de veintitrés aminoácidos en el carboxilo terminal (Davis, N.G., Boeke, S. y Model, P.: "Fine structure of a membrane anchor domain", *J. Mol. Biol.* 181 (1985) 111-121).

La capacidad de la proteína de fusión para unirse al antígeno se investigó haciendo pasar la fracción soluble en tritón sobre una columna de lisozima unida a sefarosa. Las transferencias Western del material no unido y las fracciones obtenidas después de un lavado concienzudo y elución con 0,05 M dietilamina mostraron que la proteína de fusión de longitud completa se había retenido de hecho específicamente en la columna de lisozima (Fig. 2, carriles 7-12).

Ejemplo 3

Empaquetamiento del fagémido pSEX

Para determinar si el vector de expresión fagémido podía empaquetarse, *E. coli* que contenían pSEX se infectaron de manera múltiple con el fago fd. No se añadió IPTG porque se encontró que tenía un efecto inhibitorio en el empaquetamiento del fagémido. Un descubrimiento similar se ha publicado recientemente por Bass *et al.*, *Proteins* 8, 309-314 (1990) que construyeron un fagémido que expresa una proteína de fusión de hormona de crecimiento humana y el dominio C terminal de pIII. El examen de la producción de Ab-pIII con y sin IPTG después de añadir el fago fd mostró que el fago solo era capaz de inducir la expresión (Fig. 3). Una explicación posible es que uno de los productos génicos del fago interfiere con la unión del represor lac al operador. Alternativamente, la unión de las proteínas del fago a la región intergénica podría afectar la topología del fagémido y causar la liberación del represor lac. Independientemente de la razón, hemos encontrado que el hecho de mover la región intergénica 10³ nucleótidos hacia el otro lado del gen bla no tiene efecto en este fenómeno (datos no mostrados).

La electroforesis en gel de agarosa del ADN de las partículas virales secretadas en el medio mostró, además del ADN monocatenario de fd, una mayor cantidad de ADN más pequeño que tenía un tamaño comparable a pSEX monocatenario. Una prueba adicional del empaquetamiento del fagémido y de la producción de partículas infecciosas se mostró mediante la infección de *E. coli* con las partículas virales secretadas. Se obtuvieron 10¹⁰/ml colonias Amp^R de *E. coli* en comparación con 3x10⁹ pfu.

Para determinar si el fagémido empaquetado había incorporado la proteína de fusión anticuerpo-pIII, se mezclaron 90 µl de sobrenadante del cultivo que contienen 5 x 10⁸ fagémidos empaquetados determinado como unidades de transducción Amp^R con un exceso de 1.000 veces de fago fd de tipo salvaje y se pasaron sobre una columna de lisozima inmovilizada. Después de lavar concienzudamente con diez volúmenes de lecho de PBS, 1M NaCl y 0,5 M NaCl en 0,1 M NaHCO₃ a pH 8,3, respectivamente, las partículas de fagémido se eluyeron con 0,05 M dietilamina. El eluato se neutralizó con 0,5 M NaH₂PO₄ y se ensayó para determinar el número de fagos y fagémidos empaquetados (Tabla). Se consiguió un enriquecimiento específico de hasta 121 veces, demostrando así la incorporación de las construcciones anticuerpo-pIII funcionales en las partículas de fagémido. Las propiedades de unión de las partículas de fagémido podrían incrementarse más usando un mutante de delección de pIII para el empaquetamiento. Esto aseguraría que sólo se empaquetarían aquellos fagémidos que codifican proteínas de fusión funcionales y las cinco proteínas pIII en una partícula de fagémido estarían fusionadas a anticuerpos.

Descripción de las figuras

Fig. 1 Construcción de pSEX, un fagémido para el cribado de anticuerpos

VH y VL son dominios variables de la cadena pesada y ligera, respectivamente, de un Ab anti-lisozima.

a) Construcción.

Para proporcionar los sitios de restricción necesarios, los oligonucleótidos

5'GCTGAATTCGGATCCATAGGGCCCTCTAGAGTCGA3'

y

5'AATTGTCGACTCTAGAGGGCCCTATGGATCCGAATTCAGCTGCA3'

se fosforilaron en 5', se hibridaron y se ligaron a pUC119 que había sido escindido con PstI y EcoRI y desfosforilado. En una etapa opcional para crear una secuencia sensible a proteasas, los oligonucleótidos hibridados

5'GATCCAAAGATATCAGAGGGCC3' y 5'CTCTGATATCTTTG3' se insertaron entre los sitios BamHI y ApaI del primer conjunto de oligonucleótidos. El ADN de scAB se insertó entre los sitios PstI y BamHI seguido de la ligación de extremos romos del ADN de pIII después de escindir el fagémido con ApaI y de tratar con la ADN polimerasa T4 para eliminar los extremos protuberantes en 3'. pSEX se construyó combinando el sitio de clonación múltiple de pUHE24-2 con el fagémido muy relacionado pDS31-1 que contiene una región intergénica f1 adicional (Bujard *et al.*, 1987, véase anteriormente; Müller, 1989, véase anteriormente). La secuencia de pDS31-1 se extiende desde XhoI en sentido contrario a las agujas del reloj hasta un sitio HindIII (en paréntesis) que se había perdido después de una ligación de extremos romos. pUHE24-2 es esencialmente idéntico a pDS6 (Bujard *et al.*, 1987) con un promotor del colifago T7 combinado con dos operadores lac y un sitio de unión a ribosomas (PA1/04/03, Lancer y Bujard, 1988, véase anteriormente; Lanzer, 1988, véase anteriormente). El fagémido resultante se escindió con HindIII y los extremos protuberantes en 5' se rellenaron con fragmento Klenow. Después de una digestión adicional con PstI, el fragmento de ADN de Ab-pIII PstI-HincII se insertó en el fagémido. En una etapa final, se insertó ADN sintético que codifica la secuencia líder de la enzima bacteriana pectato liasa y los primeros cuatro aminoácidos de la cadena pesada entre los sitios de restricción NcoI y PstI. Los plásmidos pUHE se propagaron en *E. coli* 71-18 con el plásmido pDM1 que expresa el represor lac, los plásmidos pUC se propagaron en DH5 y la proteína de fusión anticuerpo-pIII se expresó en JM101.

b) Secuencia del sitio de unión a ribosomas (RBS), secuencia líder de la pectato liasa, conector etiqueta y los cebadores de PCR para pIII.

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

c) Secuencia conector etiqueta alternativa.

Los aminoácidos subrayados indican el epítipo para YOL1/34. Los aminoácidos conectores anteriores son una continuación de la secuencia de Ab en el dominio constante.

Fig. 2 Inducibilidad, localización celular e unión al antígeno de la proteína de fusión anticuerpo-pIII analizada por electroforesis en gel en geles de poliacrilamida al 8% y transferencia Western

Carriles 1 y 2: Células totales después de 1 h de inducción con 100 μ M IPTG (1) o sin IPTG (2).

Carriles 3-6: Fraccionamiento celular; 3: sobrenadante del cultivo, 4: fracción periplásmica enriquecida, 5: fraccionamiento citoplásmico soluble, 6: extracto con tritón al 1%.

Carriles 7-12: Cromatografía de afinidad con lisozima del extracto con tritón al 1% a partir de células inducidas y no inducidas, 7: efluente (+IPTG), 8: efluente (-IPTG), 9: último lavado (+IPTG), 10: último lavado (-IPTG), 11: eluato (+IPTG), 12: eluato (-IPTG).

Los carriles 1-6 se tiñeron usando el anticuerpo monoclonal YOL1/34 (Serotec, Oxford, Reino Unido) y los carriles 7-12 usando un antisuero frente a la secuencia N terminal de la cadena ligera.

Método

Los antisueros frente a las cadenas pesada y ligera se obtuvieron por la inyección subcutánea a conejos de los péptidos amino terminales QVQLQSGGG(AC) y DIQMTQSPSS(AC), respectivamente, acoplados a hemocianina de lapa. Para investigar la expresión de la proteína de fusión, las bacterias sedimentadas de cultivos inducidos con IPTG se resuspendieron en 30 mM de tampón Tris/HCl, pH 8,0, que contiene 20% sacarosa, 1 mM EDTA, 1 mg/ml de lisozima de pollo y se incubaron durante 10 min en hielo. Después de centrifugar durante 1 min a 15.000 g, el sobrenadante que contiene las proteínas periplásmicas se recogió y el sedimento se sonizó en 0,1 M Tris/HCl pH 8,0. La fracción citosólica soluble se decantó después de centrifugar durante 5 min a 15.000 g y el sedimento resuspendido se incubó en 1% Tritón X100 para obtener la fracción unida a membrana. Todas las fracciones se analizaron para

determinar la actividad β -lactamasa según Plückthun, A. y Knowles, J.R.: "The consequences of stepwise deletions from the signal-processing site for β -lactamase", J. Biol. Chem. 262 (1987) 3951-3957 para evaluar la eficacia del procedimiento de fraccionamiento. La fracción soluble de tritón se diluyó 100 veces con PBS antes de aplicarla a columnas de afinidad. Para la cromatografía de afinidad, se acopló lisozima de pollo (Boehringer, Mannheim, FRG) a Sefarosa activada con bromuro de cianógeno (Pharmacia) según las instrucciones del fabricante. La Sefarosa-lisozima se incubó durante 20 min a temperatura ambiente con los extractos y se vertió en columnas que posteriormente se lavaron con diez volúmenes de lecho de PBS, 1M NaCl y 0,5M NaCl en 0,1M NaHCO₃ a pH 8,3, respectivamente, antes de eluirla con 0,05M dietilamina. Todas las fracciones se precipitaron con ácido tricloroacético (concentración final 20%) y se resolvieron en geles de poliacrilamida con SDS (Laemmli, Reino Unido: "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4". Nature 227 (1970) 680-685). Se realizaron transferencias Western según Towbin, H. Staehelin, T. y Gordon, I.: "Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications", (1979), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354, usando anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano con diaminobencideno como sustrato.

Fig. 3 Electroforesis en gel de pSEX monocatenario circular

Carril 1: fd, carril 2: fagémido pUHE31-1 control con fd, carril 3: pSEXI con fd.

El ADN de viriones fd y de partículas de fagémido empaquetadas se aplicaron en geles de agarosa al 0,8% en 1xTBE según Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a. ed. Cold Spring Harbor Laboratory (1989) y se tiñeron con bromuro de etidio.

Método

Para la preparación de los fagémidos empaquetados, *E. coli* JM101 que contiene pSEXI se plaquearon en medio mínimo M9 y se incubaron durante 30 h a 37°C. Se inocularon 2 ml del mismo medio con una de las colonias y se incubó a 37°C con aireación vigorosa hasta que alcanzó una densidad óptica de aproximadamente 0,2 a 600 nm. Se añadieron 0,5 ml de medio LB y un exceso de 10 veces de fago fd al cultivo y se incubó durante 3 h más a 37°C. Después de centrifugar cuidadosamente dos veces a 15.000 g durante 5 min a temperatura ambiente, el sobrenadante se ajustó a una concentración final de 4% de polietilen glicol (Serva PEG 6000) y 0,5M NaCl y se dejó reposar toda la noche a 4°C. Los fagémidos se sedimentaron por centrifugación a 15.000 g durante 20 min a temperatura ambiente y se suspendieron en 200 μ l de un tampón Tris-EDTA, pH 7,5. El ADN de los fagémidos se preparó por agitación con un volumen de fenol durante diez minutos seguido de tratamiento con cloroformo-isopropanol y se precipitó con isopropanol (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2a. ed. Cold Spring Harbor Laboratory (1989)).

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla
Enriquecimiento específico de los fagémidos empaquetados en una columna de afinidad con antígeno

	Volumen total (ml)	Volumen plaqueado (μl)	No. de colonias Amp ^r	Total	Volumen plaqueado (μl)	Contaje total de pfu	Total	Exceso de pfu/Amp ^r	Factor de enriquecimiento
Aplicado	10	10 ⁻³	51	5,1 x 10 ⁸	10 ⁻⁶	45	4,5 x 10 ¹¹	882	--
Eluido	1,1	10 ⁻¹	26	2,9 x 10 ⁵	10 ⁻²	19	2,1 x 10 ⁶	7,3	121

ES 2 352 818 T3

Las realizaciones de la invención también pueden encontrarse en las reivindicaciones de la aplicación anterior en la versión según se presentó originalmente:

1. Proceso para preparar un fagémido que comprende ADN que codifica una proteína de fusión a partir de un polipéptido y una proteína pIII de colifago, en el que la proteína pIII de colifago comprende el dominio amino terminal y el dominio carboxi terminal de una proteína pIII de colifago, en el que el ADN, que codifica una proteína de fusión de un polipéptido y una proteína pIII de colifago, se incorpora en un vector fagémido.

2. Proceso según la reivindicación 1, en el que el polipéptido es un anticuerpo.

3. Proceso según la reivindicación 1, en el que el polipéptido es un anticuerpo monocatenario.

4. Proceso según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se inserta una secuencia sensible a proteasas entre la secuencia de ADN que codifica el polipéptido y la secuencia de ADN que codifica la proteína pIII de colifago.

5. Uso de un fagémido según una de las reivindicaciones 1 a 4 para seleccionar polipéptidos específicos de bibliotecas de polipéptidos.

6. Uso según la reivindicación 5 para seleccionar anticuerpos específicos de bibliotecas de anticuerpos.

7. Uso del fagémido según una de las reivindicaciones 1 a 4 para exponer polipéptidos en la superficie de partículas de fagémidos.

8. Biblioteca de polipéptidos en fagémidos que comprende los fagémidos según se han definido en una de las reivindicaciones 1 a 4.

9. Biblioteca de polipéptidos en fagémidos que comprende los fagémidos según se han definido en una de las reivindicaciones 1 a 4, en la que los fagémidos están empaquetados en partículas virales.

10. Uso de una biblioteca según la reivindicación 8 ó 9 para seleccionar polipéptidos específicos.

11. Uso de una biblioteca según la reivindicación 8 ó 9 para seleccionar anticuerpos específicos.

12. Uso según la reivindicación 10 u 11 que comprende además la producción de los anticuerpos o polipéptidos seleccionados.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un fagémido que comprende ADN que codifica una proteína de fusión anticuerpo-proteína pIII de colifago en el que la proteína pIII de colifago comprende el dominio amino terminal y el dominio carboxi terminal de una proteína pIII de colifago para seleccionar anticuerpos que inhiben la unión del ligando al receptor.

2. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monocatenario.

10

15

20

25

30

35

40

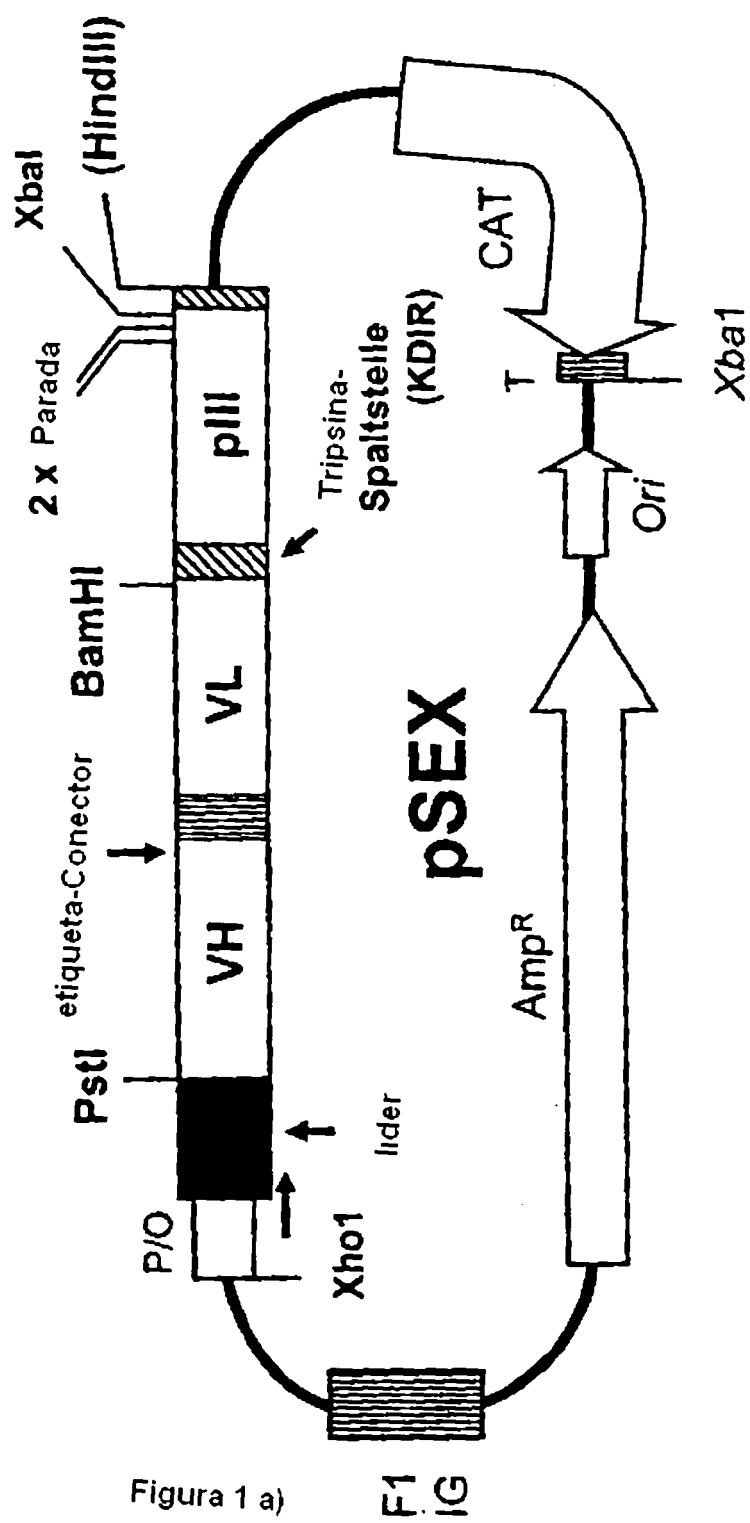
45

50

55

60

65



b)

RBS

-20 PelB
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr

GAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAACCTCCATGAAATACCTCTTGCCTACG
(NcoI)

EcoRI

-10 -1
L1161 Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala

GCAGCCGCTGGCTTGCTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGGCGATGGCG

etiqueta-conector

VH

113

Gln Val Gln Leu Gln ... Ser Ser Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala

CAAGTTCAGCTGCAG...TCCTCAGAAGAAGGTGAATTCTCAGAAGCT
EcoRI

PstI

1 VL 109

Arg Glu Asp Met Ala Ala Leu Glu Lys Gly Asp Ile ... Lys Arg Thr

CGTGAAGATATGGCTGCACTTGAGAAAGGTGATATC...AAACGTACG
EcoRV

pIII

113

Val Ala Ala Pro Gly Ser Lys Asp Ile Arg Ala Glu Thr Val Glu Ser

GTAGCAGCTCCTGGATCCAAAGATATCAGAGCTGAAACTGTTGAAAGT
BamHI EcoRV cebador anterior

406

Cys ... Arg Asn Lys Glu Ser Stop Stop

TGT...CGTAATAAGGAGTCTTAATGACTCTAGAGTCAGCT
XbaI (HindIII)

TTATTCCTCAGAATTACT

cebador posterior

c)

Etiqueta-conector

113

SerGlySerAlaSerAlaProLysLeuGluGluGlyGluPheSerGluAlaArgGluAspI

1 VL

1e

TCAGGGAGTGCATCCGCCCAAAGCTTGAAGAAGGTGAATTCTCAGAAGCCGCGAAGATAT

Figura 1 b) y c)

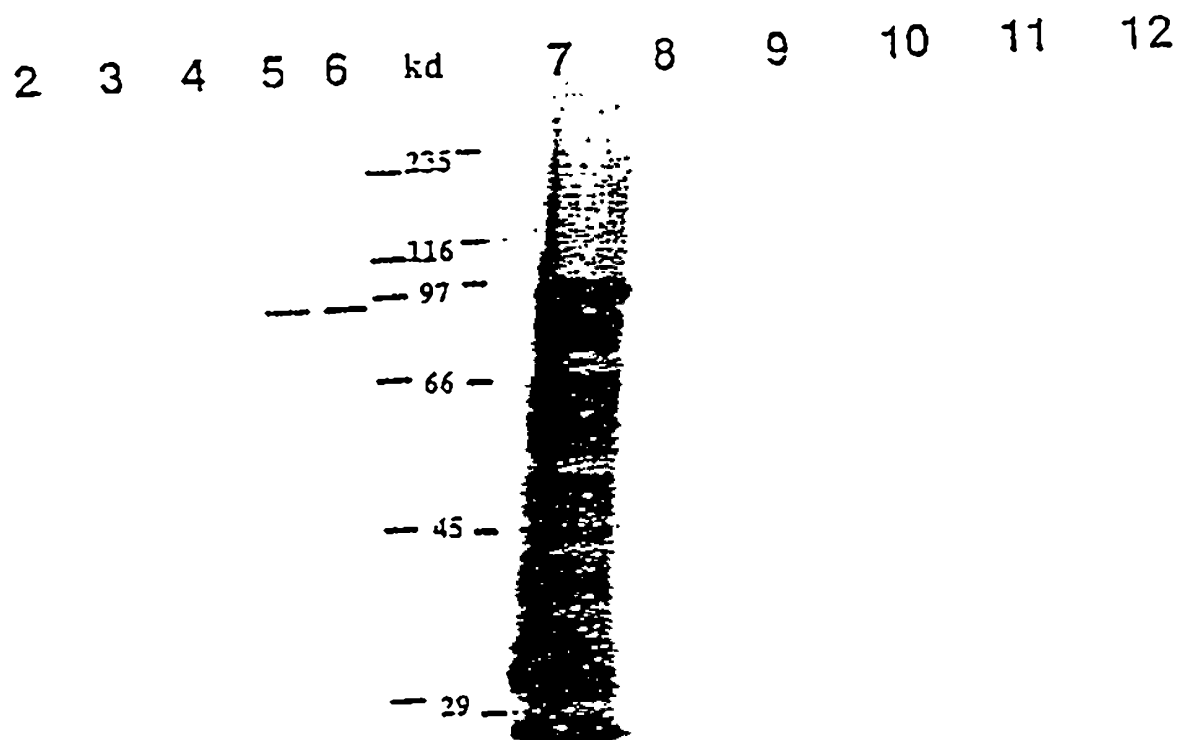


Figura 2

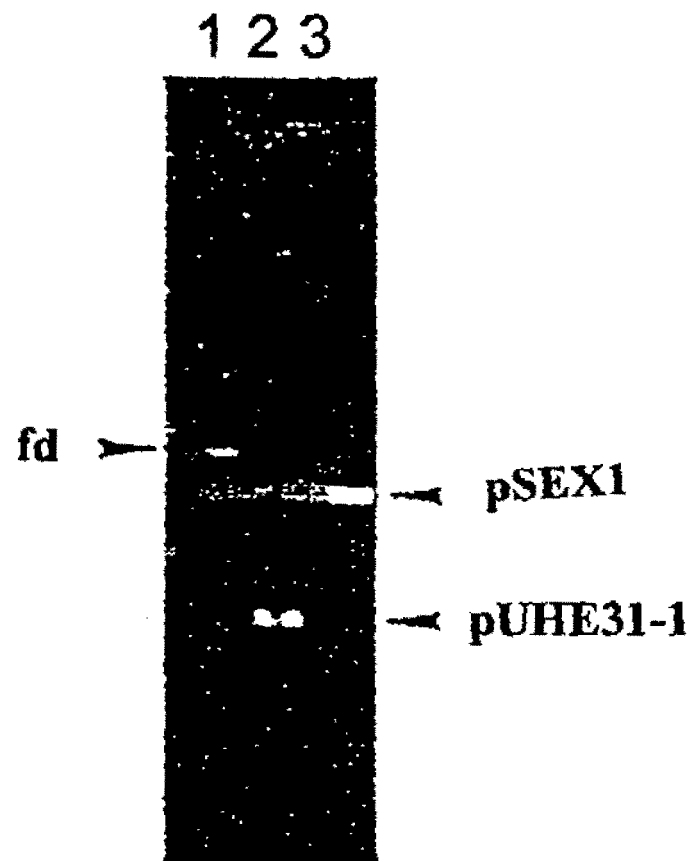


Figura 3