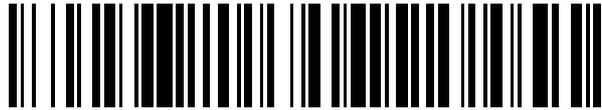


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 460**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2010 E 10705301 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2398913**

54 Título: **Método de obtención de ácido nucleico que codifica inmunoglobulina**

30 Prioridad:

20.02.2009 EP 09002396

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

18.05.2016

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**KRELL, HANS WILLI;
LIFKE, ALEXANDER;
LIFKE, VALERIA;
MADIN, KAIRAT y
WEILKE, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 570 460 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

Método de obtención de ácido nucleico que codifica inmunoglobulina

5 La presente invención se refiere a un método y medios de obtención de ácido nucleico que codifica inmunoglobulina a partir de una célula única productora de inmunoglobulina con una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplexada, y también a un método de producción de una inmunoglobulina por el cual el ácido nucleico que codifica inmunoglobulina se obtiene de una célula única productora de inmunoglobulina en combinación con traducción *in vitro*. También se engloba por la presente memoria descriptiva un método para la caracterización de fragmentos Fab humanos recombinantemente producidos.

Antecedentes de la invención

15 Desde el establecimiento de la tecnología de hibridomas (Cole, S.P.C., et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); y Boerner, P., et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95), las inmunoglobulinas monoclonales han surgido para desempeñar una función central en la investigación científica, asistencia sanitaria humana y diagnóstico. Por consiguiente, la generación de inmunoglobulinas monoclonales, especialmente terapéuticas, es un campo que está experimentando una intensa investigación. A este respecto, la tecnología de hibridomas y la tecnología de presentación en fagos (Hoogenboom, H.R., y Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597) son, entre otras, dos tecnologías comúnmente usadas para la generación de inmunoglobulinas monoclonales. En la tecnología de hibridomas, la obtención de clones estables es un obstáculo, disminuyendo así la diversidad de los anticuerpos, ya que solo un número limitado de linfocitos B se fusionan satisfactoriamente, se propagan y a partir de aquí se caracterizan. Similarmente, un inconveniente de los enfoques de bibliotecas combinatorias basadas en expresión en fago o levadura es el emparejamiento aleatorio de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina. La disociación del emparejamiento de cadenas pesadas y ligeras original, y el emparejamiento no relacionado, necesitan el cribado de un gran número de células productoras de inmunoglobulina con el fin de identificar pares de cadena pesada y ligera de alta afinidad. Además, tales pares no relacionados pueden mostrar reactividad cruzada no deseada con antígenos humanos. Finalmente, la diversidad genética de inmunoglobulinas específicas de diana identificadas por selección y cribado de bibliotecas combinatorias está comúnmente limitada debido a sesgos de selección inherentes.

La generación de inmunoglobulinas a partir de célula productora de inmunoglobulina puede realizarse según métodos conocidos en la técnica. Tales métodos son, por ejemplo, la técnica de hibridomas. Un método diferente se basa en la identificación de la secuencia de ácidos nucleicos de la inmunoglobulina. Normalmente, es suficiente identificar la secuencia de las regiones variables o incluso solo las regiones CDR o solo la región CDR3. Por ejemplo, se aísla el ARNm de un conjunto de células productoras de inmunoglobulina y se usa para la construcción de una biblioteca de ADNc que codifica las regiones CDR de la inmunoglobulina. La biblioteca de ADNc se transfecta entonces en una célula huésped adecuada, tal como NS0 o CHO, y se criba para producción de inmunoglobulina específica.

40 El documento WO 2008/104184 informa de un método de clonación de anticuerpos relacionados. La eficaz generación de anticuerpos monoclonales a partir de linfocitos B humanos individuales se informa por Tiller et al. (Tiller, T., et al., J. Immunol. Meth. 329 (2007) 112-124). Braeuningner et al. (Braeuningner, A., et al., Blood 93 (1999) 2679-2687) informan del análisis molecular de linfocitos B individuales a partir de linfoma de linfocitos B rico en linfocitos T. El diseño sistemático y la prueba de cebador de (RT-) PCR anidada se informa por Rohatgi et al. (Rohatgi, S., et al, J. Immunol. Meth. 339 (2008) 205-219). En el documento WO 02/13862 se informan un método y composición para alterar una patología mediada por linfocitos B. Haurum et al. (Meijer, P.J. y Haurum, J.S., J. Mol. Biol. 358 (2006) 764-772) informan de una RT-PCR de extensión por solapamiento múltiple de una etapa. Stollar et al. y Junghans et al. informan del análisis de secuencias por reacción de PCR de célula única (Wang, X. y Stollar, B.D., J. Immunol. Meth. 244 (2000) 217-225; Coronella, J.A. y Junghans, R.P., Nucl. Acids Res. 28 (2000) E85). Jiang, X. y Nakano, H., et al. (Biotechnol. Prog. 22 (2006) 979-988) informan de la construcción de un elemento de expresión lineal para transcripción y traducción *in vitro*.

Sumario de la invención

55 La presente invención se refiere en realizaciones específicas de un aspecto a un método para proporcionar un anticuerpo monoclonal humano que comprende la traducción *in vitro* de un ácido nucleico que codifica fragmentos de inmunoglobulina G humana por el cual el ácido nucleico se obtiene por amplificación específica de fragmentos de ADNc obtenidos del ARNm de un único linfocito B humano productor de inmunoglobulina, plasmoblasto o célula plasmática o un linfocito B de un animal que comprende un locus de inmunoglobulina humana.

60 Con este método es posible caracterizar cada uno de los varios linfocitos B proporcionados con respecto a las características de unión al antígeno de la inmunoglobulina producida. Así, no se produce pérdida de diversidad de inmunoglobulinas. Como los linfocitos B analizados son linfocitos B maduros obtenidos después del proceso de maduración *in vivo*, es muy poco probable que sus inmunoglobulinas producidas muestren reactividad cruzada con otros antígenos.

La invención comprende un método para la PCR semi-anidada múltiplex y RT-GSP-PCR en un tubo múltiple (RT-PCR de cebador específico de gen) para la amplificación de cadenas HC de IgG y LC de IgG relacionadas (isotipo IgG humana) a partir de un único linfocito B o plasmoblasto o célula plasmática. El producto de PCR Fab se transcribe posteriormente en ARNm y se traduce *in vitro* en lisado de *E. coli*. La expresión se examinó usando ELISA y transferencia Western.

En el presente documento se informa de un método de obtención de un ácido nucleico que codifica un dominio variable de inmunoglobulina a partir de una única célula que comprende las siguientes etapas:

- 10 - obtener una primera composición de ácido nucleico realizando una primera reacción en cadena de la polimerasa con tres a seis cebadores 5' y un cebador 3',
- obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de inmunoglobulina realizando con la composición obtenida en la primera reacción en cadena de la polimerasa una segunda reacción en cadena de la polimerasa con trece a dieciséis cebadores 5' y un cebador 3',

por el cual, cuando se une al ácido nucleico que va a amplificarse, la distancia de las localizaciones de unión del cebador 5' con respecto a la localización de unión del cebador 3' empleada en la segunda reacción en cadena de la polimerasa se reduce en comparación con la de la primera reacción en cadena de la polimerasa.

En el presente documento se informa de un método de obtención de un ácido nucleico que codifica un dominio variable de inmunoglobulina a partir de una única célula que comprende las siguientes etapas:

- 25 - obtener una composición de ácido nucleico realizando una primera reacción en cadena de la polimerasa con cuatro a seis cebadores 5' y un cebador 3',
- obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de inmunoglobulina realizando con la composición obtenida en la primera reacción en cadena de la polimerasa una segunda reacción en cadena de la polimerasa con trece a quince cebadores 5' y un cebador 3',

por el cual, en la segunda reacción en cadena de la polimerasa, cualquiera de los cebadores 5' son los mismos que aquellos en la primera reacción en cadena de la polimerasa y el cebador 3' se cambia o el cebador 3' es el mismo que en la primera reacción en cadena de la polimerasa y al menos un cebador 5' se cambia,

por el cual, cuando se une al ácido nucleico que va a amplificarse, el número de nucleótidos entre el extremo 5' de cada uno de los cebadores 5' y el extremo 3' del cebador 3' en la segunda reacción en cadena de la polimerasa se reduce en comparación con el número de nucleótidos entre el extremo 5' de cada uno de los cebadores 5' y el extremo 3' del cebador 3' en la primera reacción en cadena de la polimerasa.

En el presente documento se informa de un método de obtención de un ácido nucleico que codifica un dominio variable de inmunoglobulina a partir de una única célula por una RT-GSP-PCR de un tubo múltiplex que comprende la siguiente etapa:

- 45 - realizar una transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa en una etapa con un cebador 5' y un cebador 3'.

En una realización, los métodos según la invención se caracterizan por que el cebador 5' empleado en la primera reacción en cadena de la polimerasa se une en la región codificante para el péptido conductor de la inmunoglobulina. En otra realización, los métodos según la invención se caracterizan por que el cebador 5' empleado en la segunda reacción en cadena de la polimerasa o el cebador 5' empleado en una RT-GSP-PCR de un tubo múltiplex se unen en la región codificante de la primera región estructural de la inmunoglobulina. En otra realización, los métodos según la invención se caracterizan por que el cebador empleado en la segunda reacción en cadena de la polimerasa proporciona nucleótidos protuberantes que codifican el codón de iniciación de la traducción ATG para el cebador 5' y/o el codón de terminación de la traducción TTA para el cebador 3'. Los métodos según la invención se caracterizan por que comprenden la etapa adicional de:

- 55 - proporcionar una única célula y obtener el ARNm de esta célula.

En otra realización, los métodos según la realización previa se caracterizan por que comprenden la siguiente segunda etapa:

- 60 - obtener ADNc a partir del ARNm proporcionado con una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

En otra realización, los métodos según la invención se caracterizan por que seis cebadores 5' y un cebador 3' se emplean en la primera reacción en cadena de la polimerasa. En otra realización de la presente invención, los métodos se caracterizan por que

5 a) para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina el cebador en la primera reacción en cadena de la polimerasa comprende los ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 05 y/o 06, 07 y/o 08, 09, 10 y/o 11, 12, 13, y 104 y/o 105 y/o 106, y el cebador en la segunda reacción en cadena de la polimerasa comprende los ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, y 104 y/o 105 y/o 106, y/o 142, y/o 143,

10 b) para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina el cebador en la primera reacción en cadena de la polimerasa comprende los ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 16, 17, 18, 19, y 115, y el cebador en la segunda reacción en cadena de la polimerasa comprende los ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 53 y/o 54, 55 y/o 56, 57 y/o 58, 59, 60, 61 y/o 62, 63 y/o 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, y/o 115, y/o 144, y/o 145,

15 c) para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera lambda de inmunoglobulina el cebador en la primera reacción en cadena de la polimerasa comprende los ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 21, 22, 23 y/o 24 y/o 25 y/o 26, y 120 y/o 121 y/o 122 y/o 123 y/o 124 y/o 125, y el cebador en la segunda reacción en cadena de la polimerasa comprende los ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 72, 73 y/o 74, 75, 76, 77 y/o 78, 79, 80, 81, 82 y/o 83, 84 y/o 85, 86, 87 y/o 88, 89, 90 y/o 91, 92, y 120 y/o 121 y/o 122 y/o 123 y/o 124 y/o 125.

20 El dominio variable de inmunoglobulina puede ser un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina o un dominio variable de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina o un dominio variable de la cadena ligera lambda de inmunoglobulina.

25 Otro aspecto de la presente invención es un método de producción de un fragmento Fab de inmunoglobulina que comprende las siguientes etapas:

- proporcionar una célula única productora de inmunoglobulina,
- 30 - obtener a partir de la célula el ácido nucleico que codifica los dominios variables de la cadena ligera y pesada de inmunoglobulina, que opcionalmente también codifican una parte del dominio constante de la cadena ligera y una parte del dominio C_H1 de la cadena pesada, con un método que comprende las siguientes etapas:
 - 35 - realizar una primera reacción en cadena de la polimerasa con cuatro a seis cebadores 5' y un cebador 3',
 - realizar con el producto de la primera reacción en cadena de la polimerasa una segunda reacción en cadena de la polimerasa con trece a quince cebadores 5' y un cebador 3',

40 por el cual en la segunda reacción en cadena de la polimerasa el cebador 3' es el mismo que en la primera reacción en cadena de la polimerasa y al menos un cebador 5' se cambia, y por el cual en la segunda reacción en cadena de la polimerasa el número de nucleótidos entre el extremo 5' de cada uno de los cebadores 5' y el extremo 3' del cebador 3' se reduce en comparación con el número de nucleótidos entre el extremo 5' de cada uno de los cebadores 5' y el extremo 3' del cebador 3' en la primera reacción en cadena de la polimerasa, cuando se une al ácido nucleico que va a amplificarse,

- 45 - generar una matriz de expresión lineal que comprende el ácido nucleico obtenido,
- traducir *in vitro* el ácido nucleico y producir así el fragmento Fab de inmunoglobulina.

50 En el presente documento se informa de un método de producción de una inmunoglobulina que comprende las siguientes etapas:

- proporcionar una célula única productora de inmunoglobulina,
- 55 - obtener a partir de la célula el ácido nucleico que codifica los dominios variables de la cadena ligera y pesada de inmunoglobulina,
- enlazar el ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena ligera con un ácido nucleico que codifica un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina en forma operable, y enlazar el ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena pesada con un ácido nucleico que codifica una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina en forma operable,
- 60 - transfectar una célula eucariota o procariota con los ácidos nucleicos obtenidos en la etapa previa,
- 65 - cultivar la célula transfectada en una realización en condiciones adecuadas para la expresión de la inmunoglobulina,
- recuperar la inmunoglobulina de la célula o el medio de cultivo y así producir una inmunoglobulina.

En una realización de todos los métodos según la invención, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina de clase G (IgG). En una realización de los métodos de producción de un fragmento Fab de inmunoglobulina o una inmunoglobulina, la obtención del ácido nucleico es por un método según un aspecto de la presente invención.

5 Descripción de la invención

En el presente documento se informa de un método de obtención de un ácido nucleico que codifica un dominio variable de inmunoglobulina a partir de una única célula que comprende las siguientes etapas:

- 10
- realizar una primera reacción en cadena de la polimerasa con tres a seis cebadores 5' y un cebador 3',
 - realizar con el producto de la primera reacción en cadena de la polimerasa una segunda reacción en cadena de la polimerasa con trece a dieciséis cebadores 5' y un cebador 3', obteniéndose así un ácido nucleico que codifica un dominio variable de inmunoglobulina,
- 15

por el cual la distancia de las localizaciones de unión del cebador empleado en la segunda reacción en cadena de la polimerasa se reduce en comparación con la primera reacción en cadena de la polimerasa.

20 Empleando micro-perlas magnéticas recubiertas con el marcador de linfocitos B pan humano, CD19 (véase, por ejemplo, Bertrand, F.E., III, et al., Blood 90 (1997) 736-744), se aislaron linfocitos B de sangre periférica. Con el enfoque de dilución limitada, se dispusieron células individuales en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Se extrajo el ARNm de estas células.

25 Se ha encontrado que realizando la amplificación por PCR específica de IgG según la presente invención para obtener ácido nucleico que codifica un dominio variable de inmunoglobulina a partir de una única célula en una próxima producción a partir de aquí de la inmunoglobulina respectiva o fragmento de Fab, en una realización se obtuvieron valores de DO en el intervalo de 0,5 a 2,0, y concomitantemente se obtuvieron, por ejemplo, rendimientos de fragmento de Fab de 180 a 310 ng/ml.

30

Con los métodos según la presente invención, una reacción en cadena de la polimerasa múltiple se usa para la amplificación de dominios variables de la cadena pesada y ligera simultáneamente en la misma reacción en cadena de la polimerasa. A diferencia de la amplificación del dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera en reacciones separadas, el presente enfoque proporciona una elevada sensibilidad y una elevada cantidad de secuencias amplificadas. El uso de cebador específico de gen en ambas, es decir, todas, las reacciones en cadena de la polimerasa potencia la especificidad y exactitud de los métodos.

35

La estructura génica más compleja en el caso de IgG humana requiere una estrategia diferente para el diseño de cebadores, colocación y reacción en cadena de la polimerasa para la sensibilidad y exactitud requerida.

40

Así, en el presente documento se emplea una reacción en cadena de la polimerasa múltiple tanto sin como con el enlace de las regiones de la cadena pesada y ligera que se amplifican. Para la traducción *in vitro* de los ácidos nucleicos obtenidos es beneficioso que los dominios codificados comprendan residuos de cisteína adecuados para la formación de enlaces disulfuro intercadena.

45

Métodos y técnicas conocidos para un experto en la materia, que son útiles para llevar a cabo la presente invención, se describen por ejemplo, en Ausubel, F.M., ed., Current Protocols in Molecular Biology, Volúmenes I a III (1997), Wiley and Sons; Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; documentos US 5.202.238 y US 5.204.244.

50

El término "inmunoglobulina" indica una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los diferentes genes de la región constante, además de la infinidad de genes de la región variable de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden existir en una variedad de formatos, que incluyen, por ejemplo, Fv, Fab y F(ab)₂, además de cadenas individuales (scFv) o diacuerpos (por ejemplo, Huston, J.S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 5879-5883; Bird, R.E., et al., Science 242 (1988) 423-426; Hood, L.E. et al., Immunology, Benjamin N.Y., 2ª edición (1984); Hunkapiller, T. y Hood, L., Nature 323 (1986) 15-16).

55

Una inmunoglobulina comprende en general dos llamados polipéptidos de la cadena ligera (cadena ligera) y dos llamados polipéptidos de la cadena pesada (cadena pesada). Cada uno de los polipéptidos de la cadena pesada y ligera contiene un dominio variable (región variable) (generalmente la porción del extremo amino de la cadena de polipéptidos) que comprende regiones de unión que son capaces de interaccionar con un antígeno. Cada uno de los polipéptidos de la cadena pesada y ligera comprende una región constante (generalmente la porción del extremo carboxilo). La región constante de la cadena pesada media en la unión del anticuerpo i) a células que llevan un receptor Fc gamma (Fc γ R, tales como células fagocíticas, o ii) a células que llevan el receptor Fc neonatal (FcRn)

60

65

también conocido como el receptor de Brambell. También media en la unión a algunos factores que incluyen factores del sistema del complemento clásico tales como el componente (C1q). El dominio variable de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina comprende a su vez diferentes segmentos, es decir, cuatro regiones estructurales (FR) y tres regiones hipervariables (CDR).

5 La ingeniería genética de inmunoglobulinas se describe, por ejemplo, en Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; documentos US 5.202.238 y US 5.204.244; Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270; Lonberg, N., Nat. Biotechnol. 23 (2005) 1117-1125.

10 El término "inmunoglobulina quimérica" indica una inmunoglobulina, preferentemente una inmunoglobulina monoclonal, que comprende un dominio variable, es decir, región de unión, de una primera especie no humana y al menos una porción de una región constante derivada de una segunda fuente diferente o especie. Las inmunoglobulinas quiméricas se preparan generalmente por técnicas de ADN recombinante. En una realización, las inmunoglobulinas quiméricas comprenden un dominio variable de ratón, rata, hámster, conejo u oveja y una región constante humana. En una realización, la región constante de la cadena pesada humana es una región constante de IgG humana. En otra realización, la región constante de la cadena ligera humana es una cadena kappa o una cadena lambda.

20 Otras formas de inmunoglobulinas quiméricas englobadas por la presente invención son aquellas en las que se ha cambiado la clase o subclase de la inmunoglobulina no humana de la que se deriva el dominio variable. Tales inmunoglobulinas también se denominan "inmunoglobulinas de cambio de clase". Las formas de "inmunoglobulinas de cambio de clase" englobadas por la presente invención también son aquellas en las que la región constante tiene diferencias de la secuencia de la región constante no mutante que producen una inmunoglobulina con diferentes propiedades, por ejemplo, con respecto a la unión a C1q y/o unión al receptor Fc (FcR). La "parte Fc" de una inmunoglobulina no participa directamente en la unión al antígeno, pero presenta diversas funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada, las inmunoglobulinas se dividen en las clases: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Algunas de estas clases se dividen adicionalmente en subclases, es decir, IgG en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, o IgA en IgA1 e IgA2. Según la clase de inmunoglobulina a la que pertenece una inmunoglobulina, las regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulinas se llaman α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) y μ (IgM), respectivamente. Las inmunoglobulinas según la invención pertenecen en una realización a la clase IgG. Una "parte Fc de una inmunoglobulina" es un término muy conocido para el experto y se define basándose en la escisión por papaína de inmunoglobulinas. En una realización de la invención, la inmunoglobulina contiene como parte Fc una parte Fc humana o una parte Fc derivada de origen humano. En otra realización de la invención, la parte Fc es tanto una parte Fc de una inmunoglobulina humana de la subclase IgG4 o IgG1 como es una parte Fc de un anticuerpo humano de la subclase IgG1, IgG2 o IgG3, que se modifica de tal forma que no puede detectarse unión del receptor Fc γ (por ejemplo, Fc γ R11a) y/o unión de C1q como se define más adelante. En una realización, la parte Fc es una parte Fc humana, en otra realización una parte Fc de subclase IgG4 o IgG1 humana o una parte Fc mutada de subclase IgG1 humana. En otra realización, la parte Fc es de subclase IgG1 humana con mutaciones L234A y L235A. Mientras que IgG4 muestra unión de receptor Fc γ (Fc γ R11a) reducida, las inmunoglobulinas de otras subclases de IgG muestran una fuerte unión. Sin embargo, Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (pérdida de hidrato de carbono de Fc), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 o/y His435 son residuos que, si están alterados, también proporcionan unión del receptor Fc γ reducida (Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., et al., FASEB J. 9 (1995) 115-119; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; documento EP 0 307 434). En una realización, la inmunoglobulina está en relación con la unión del receptor Fc γ de subclase IgG4 o IgG1 o de subclase IgG1 o IgG2, con una mutación en L234, L235 y/o D265, y/o contiene la mutación PVA236. En otra realización, las mutaciones son S228P, L234A, L235A, L235E y/o PVA236 (PVA236 significa que la secuencia de aminoácidos ELLG (dada en un código de aminoácido de una letra) de la posición de aminoácido 233 a 236 de IgG1 o EFLG de IgG4 está sustituida por PVA). En otra realización, las mutaciones son S228P de IgG4, y L234A y L235A de IgG1. La parte Fc de una inmunoglobulina participa directamente en ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo) y CDC (citotoxicidad dependiente del complemento). Una inmunoglobulina que no se une al receptor Fc γ y/o factor del complemento C1q no provoca citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). En una realización, la región constante de la cadena pesada tiene secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 01, o SEQ ID NO: 02, o SEQ ID NO: 01 con mutaciones L234A y L235A, o SEQ ID NO: 02 con mutación S228P, y la región constante de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03 o SEQ ID NO: 04.

60 Formas "humanizadas" o "injertadas en CDR" de inmunoglobulinas no humanas (por ejemplo, roedor o conejo) son inmunoglobulinas que contienen secuencias parciales derivadas de una inmunoglobulina no humana y secuencias parciales derivadas de una inmunoglobulina humana. En general, las inmunoglobulinas humanizadas se derivan de una inmunoglobulina humana (inmunoglobulina receptora o aceptora), en la que los residuos de una región hipervariable están sustituidos por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (inmunoglobulina donante), tal como ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, que tienen la especificidad y afinidad deseadas (véanse, por ejemplo, Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; documentos US 5.202.238; US 5.204.244). En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina aceptora están sustituidos por residuos no humanos correspondientes. Además, las inmunoglobulinas humanizadas

pueden comprender adicionalmente modificaciones, por ejemplo, residuos de aminoácidos que no se encuentran en la inmunoglobulina aceptora o en la inmunoglobulina donante. Tales modificaciones producen variantes de tal inmunoglobulina receptora o donante, que son homólogas, pero no idénticas a la secuencia progenitora correspondiente.

5 Se han descrito en la materia métodos de humanización de inmunoglobulina no humana. Generalmente, una inmunoglobulina humanizada comprende uno o más residuos de aminoácidos introducidos en ella de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente residuos de "importación", que normalmente se toman de un dominio variable de "importación". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores sustituyendo secuencias de la región hipervariable con las secuencias correspondientes de una inmunoglobulina no humana (véase, por ejemplo, Winter, G. y Harris, W.J., Immunol. Today 14 (1993) 243-246).

15 El término "inmunoglobulina humana", como se usa en el presente documento, indica una inmunoglobulina que tiene regiones variables y constantes (dominios) derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana y que tienen alta similitud de secuencias o identidad con estas secuencias de la línea germinal. La región variable de la cadena pesada está en una realización derivada de secuencia de la línea germinal DP-50 (GenBank LO6618) y la región variable de la cadena ligera se deriva de la secuencia de la línea germinal L6 (GenBank X01668) o la región variable de la cadena pesada se deriva de DP-61 (GenBank M99682) y la región variable de la cadena ligera se deriva de secuencia de la línea germinal L15 (GenBank K01323). Las regiones constantes del anticuerpo son regiones constantes de tipo IgG1 o IgG4 humana o una variante de las mismas. Tales regiones pueden ser alotópicas y se describen por, por ejemplo, Johnson, G. y Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218, y las bases de datos referenciadas en su interior.

25 El término "inmunoglobulina recombinante", como se usa en el presente documento, indica una inmunoglobulina que se prepara, expresa o crea por medios recombinantes, tales como inmunoglobulinas aisladas de células huésped, tales como *E. coli*, NS0, BHK, o células CHO, o de un animal (por ejemplo, un ratón o conejo) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana. Las "inmunoglobulinas humanas recombinantes" según la invención tienen en una realización regiones variables y constantes en una forma reordenada. Las inmunoglobulinas humanas según la invención se han sometido a hipermutación somática *in vivo*. Así, las secuencias de aminoácidos recombinantes de las regiones VH y VL de las inmunoglobulinas humanas recombinantes son secuencias que pueden asignarse a secuencias VH y VL de la línea germinal humana definidas, pero pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de la línea germinal del anticuerpo *in vivo*.

35 El término "inmunoglobulina monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a una inmunoglobulina obtenida de una población de inmunoglobulinas sustancialmente homogéneas, es decir, las inmunoglobulinas individuales de la población son idénticas, excepto por mutaciones que existen de forma natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Las inmunoglobulinas monoclonales son altamente específicas, siendo dirigidas contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de inmunoglobulina policlonal, que incluyen diferentes inmunoglobulinas dirigidas contra diferentes sitios antigénicos (determinantes o epitopes), cada inmunoglobulina monoclonal se dirige contra un único sitio antigénico. Además de su especificidad, las inmunoglobulinas monoclonales son ventajosas porque pueden sintetizarse sin contaminar por otras inmunoglobulinas. El adjetivo "monoclonal" indica el carácter de la inmunoglobulina, como que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de inmunoglobulinas y no debe interpretarse como que requiera la producción de la inmunoglobulina por cualquier método particular.

Las inmunoglobulinas que tienen "modificaciones conservativas de la secuencia", que son modificaciones de la secuencia de aminoácidos que no afectan o alteran las características de la inmunoglobulina, se indican como "inmunoglobulinas de variante". Las modificaciones pueden introducirse por técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen aquellas en las que el residuo de aminoácido se sustituye por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Así, un residuo de aminoácido predicho no esencial para la unión del antígeno en una inmunoglobulina puede sustituirse con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral.

60 El término "dominio variable" (dominio variable de una cadena ligera (VL), dominio variable de una cadena pesada (VH)), como se usa en el presente documento, indica cada uno de los dominios individuales de un par de cadenas ligeras y pesadas de una inmunoglobulina que participan directamente en la unión del antígeno diana. Los dominios variables son generalmente dominios del extremo N de cadenas ligeras y pesadas. Los dominios variables de la cadena ligera y pesada tienen la misma estructura general, es decir, poseen una "región estructural de inmunoglobulina", y cada dominio comprende cuatro "regiones estructurales" (FR), cuyas secuencias están ampliamente conservadas, conectadas por tres "regiones hipervariables" (o "regiones determinantes de la

complementariedad”, CDR). Los términos “región determinante de la complementariedad” (CDR) o “región hipervariable” (HVR), que se usan indistintamente dentro de la presente solicitud, indican los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que participan principalmente en la unión al antígeno. Regiones “estructurales” (FR) son aquellas regiones de dominio variable distintas de las regiones hipervariables. Por tanto, los dominios ligeros y variables de la cadena pesada de una inmunoglobulina comprenden del extremo N al extremo C las regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las regiones estructurales adoptan una conformación de hoja β y las CDR forman bucles que conectan la estructura de hoja β . Las CDR en cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional por las regiones estructurales y forman junto con las CDR de la otra cadena el sitio de unión al antígeno. La región CDR3 de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina desempeña una función particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de la inmunoglobulina. Las regiones CDR y FR se determinan según la definición estándar de Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

El término “aminoácido”, como se usa dentro de la presente solicitud, indica el grupo de α -aminoácidos carboxi, que directamente o en forma de un precursor puede codificarse por ácido nucleico. Los aminoácidos individuales están codificados por ácidos nucleicos que consisten en tres nucleótidos, los llamados codones o tripletes de base. Cada aminoácido está codificado por al menos un codón. La codificación del mismo aminoácido por diferentes codones se conoce como “degeneración del código genético”. El término “aminoácido”, como se usa dentro de la presente solicitud, indica los α -aminoácidos carboxi que existen de forma natural y comprende alanina (código de tres letras: ala, código de una letra: A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gln, Q), ácido glutámico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina (ile, I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, M), fenilalanina (phe, F), prolina (pro, P), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (tyr, Y) y valina (val, V).

Un “ácido nucleico” o una “secuencia de ácidos nucleicos”, términos que se usan indistintamente dentro de la presente solicitud, se refiere a una molécula polimérica que consiste en los nucleótidos individuales (también llamadas bases) 'a', 'c', 'g', y 't' (o 'u' en ARN), es decir, para ADN, ARN, o modificaciones de los mismos. Esta molécula de polinucleótido puede ser una molécula de polinucleótido que existen de forma natural o una molécula de polinucleótido sintética o una combinación de una o más moléculas de polinucleótidos que existen de forma natural con una o más moléculas de polinucleótidos sintéticas. También están englobadas por esta definición moléculas de polinucleótidos que existen de forma natural en las que uno o más nucleótidos se cambian (por ejemplo, por mutagénesis), delecionan o añaden. Un ácido nucleico puede tanto aislarse, como integrarse en otro ácido nucleico, por ejemplo, en un casete de expresión, un plásmido, o el cromosoma de una célula huésped. Un ácido nucleico se caracteriza por su secuencia de ácidos nucleicos que consiste en nucleótidos individuales.

Para un experto en la materia, los procedimientos y métodos son muy conocidos para convertir una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, de un polipéptido, en una secuencia de ácidos nucleicos correspondiente que codifica esta secuencia de aminoácidos. Por tanto, un ácido nucleico se caracteriza por su secuencia de ácidos nucleicos que consiste en nucleótidos individuales y asimismo por la secuencia de aminoácidos de un polipéptido así codificado.

Ahora se ha encontrado que un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina monoclonal puede obtenerse a partir de una única célula con un método según la invención que comprende una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Adicionalmente se ha encontrado que con una combinación del método de PCR según la invención y un método de traducción *in vitro* el ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina monoclonal puede obtenerse a partir de una única célula y la inmunoglobulina codificada puede proporcionarse en cantidades suficientes para la caracterización de las propiedades de unión de inmunoglobulina. Con el fin de amplificar la cantidad muy baja de ARNm obtenida a partir de una única célula, la PCR individual (reacción en cadena de la polimerasa) tiene que ser muy sensible y tiene que realizarse una combinación de más de una PCR.

Así, se ha encontrado que basándose en la amplificación de ácido nucleico que codifica HC de IgG (cadena pesada de inmunoglobulina G) y LC de IgG (cadena ligera de inmunoglobulina G) relacionadas de una inmunoglobulina de isotipo IgG a partir de una única célula con posterior traducción *in vitro* del ácido nucleico amplificado pueden proporcionarse fragmentos Fab o inmunoglobulinas completas. Con este método puede proporcionarse un método de obtención de información de alta sensibilidad sobre una inmunoglobulina producida por una única célula. Esto es posible incluso a partir de las cantidades mínimas de ARNm de una única célula. El método según la invención permite la caracterización bioquímica de la unión característica de una inmunoglobulina expresada por un único linfocito B. Así, con este método es posible la caracterización de una mayor diversidad, a diferencia de la tecnología de hibridomas. Además, como las cadenas de inmunoglobulina relacionadas se obtienen a partir de linfocitos B maduros después del contacto con antígeno, se obtienen selectivamente los ácidos nucleicos que codifican inmunoglobulinas altamente específicas y correctamente ensambladas.

El método según la presente invención para obtener el ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina a partir de una única célula comprende una PCR semi-anidada múltiplex para la amplificación de HC de IgG y LC de IgG relacionadas (isotipo IgG humana) a partir de un único linfocito B. Para la caracterización de las características de unión de la inmunoglobulina codificada por el ácido nucleico obtenido, el producto de PCR se transformó en un ácido

nucleico que codificaba el fragmento Fab correspondiente. A partir de aquí, el fragmento de Fab se tradujo *in vitro* en lisado de *E. coli*. La expresión se confirmó usando métodos de ELISA y de transferencia Western.

En general, un aspecto de la presente invención es un método que emplea las siguientes etapas i) aislar con microperlas magnéticas recubiertas con linfocitos B CD 19 humanos de sangre periférica, ii) depositar células individuales, por ejemplo, por dilución limitada o FACS, iii) extraer el ARNm de los linfocitos B individualizados, iv) obtener uno o más ácidos nucleicos que codifican al menos los dominios variables (VH y VL) de la inmunoglobulina producidos por el linfocito B individualizado, v) traducir *in vitro* un molde de ARN lineal, y opcionalmente vi) caracterizar las propiedades de unión de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina.

La amplificación por PCR específica de IgG según la presente invención se optimizó y modificó produciendo un aumento en determinados valores de DO y, así, se obtuvieron inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina después de la traducción *in vitro*.

Se establecieron tres novedosos enfoques basados en PCR que son altamente sensibles y producen alta recuperación de los ácidos nucleicos amplificados que codifican las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas. También se proporciona un método para la expresión de fragmentos Fab funcionales y estables después de la traducción *in vitro* de ácido nucleico obtenido con el método basado en PCR según la invención.

Los términos "reacción en cadena de la polimerasa" y "PCR", que se usan indistintamente en la presente solicitud, indican un método para amplificar específicamente una región de ácidos nucleicos, por ejemplo, de ADN o ARN. Este método ha sido desarrollado por K. Mullis (véase, por ejemplo, Winkler, M.E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 2181-2185). La región puede ser un único gen, una parte de un gen, una secuencia codificante o una no codificante. La mayoría de los métodos de PCR normalmente amplifican fragmentos de ADN de cientos de pares de bases (pb), aunque algunas técnicas permiten la amplificación de fragmentos de hasta 40 kilopares de bases (kb) de tamaño. Una configuración de PCR básica requiere varios componentes y reactivos. Estos componentes incluyen un molde de ácido nucleico que contiene la región que va a amplificarse, dos cebadores complementarios al extremo 5' y 3' de la región que va a amplificarse, una polimerasa, tal como Taq polimerasa, u otra polimerasa termoestable, trifosfatos de desoxinucleótido (dNTP) a partir de los cuales la polimerasa sintetiza una nueva hebra, una disolución de tampón que proporciona un entorno químico adecuado para actividad y estabilidad óptimas de la polimerasa, cationes divalentes, generalmente Mg²⁺, y finalmente, cationes monovalentes como iones potasio.

El término "PCR semi-anidada" indica dos reacciones en cadena de la polimerasa sucesivas que emplea cada una al menos un par de cebador de PCR, en la que en la primera reacción en cadena de la polimerasa se emplea un primer par de cebadores y en la segunda reacción en cadena de la polimerasa se emplea un segundo par de cebadores. En el primer y segundo par de cebadores, uno de los cebadores es el mismo y el otro cebador se cambia, por lo que la distancia, es decir, el número de nucleótidos, entre el extremo 3' del primer cebador y el extremo 5' del segundo cebador se reduce en el par de cebadores usado en la segunda reacción en cadena de la polimerasa en comparación con el par de cebadores usado en la primera reacción en cadena de la polimerasa. El cebador cambiado es cualquiera del cebador de sentido directo o del cebador de sentido contrario. La primera PCR amplifica una secuencia como se observa en cualquier experimento de PCR. Un cebador del segundo par de cebadores, es decir, el cebador anidado, para la segunda PCR se une dentro del primer producto de PCR y produce un segundo producto de PCR que es más corto que el primero. La técnica, debido a que usa cuatro cebadores específicos, en vez de dos, tiene mayor especificidad que la PCR regular. También pueden dar producto detectable en casos en los que la PCR simple deja de hacerlo.

Los términos "reacción en cadena de la polimerasa múltiple" o "PCR múltiple", que se usan indistintamente dentro de la presente solicitud, indican una reacción en cadena de la polimerasa que emplea múltiples cebadores únicos en una única reacción / mezcla de PCR para producir amplicones de tamaños variables específicos para diferentes secuencias de ADN. Dirigiendo múltiples genes a la vez, puede obtenerse información adicional a partir de una única prueba ejecutada que de otro modo requeriría varias veces los reactivos y más tiempo para realizar. Las temperaturas de hibridación para cada conjunto de cebadores deben optimizarse para trabajar correctamente dentro de una única reacción. Además, los tamaños de amplicón deben ser lo suficientemente diferentes como para formar distintas bandas cuando se visualizan por electroforesis en gel.

En el genoma humano, los loci cromosómicos que contienen la inmunoglobulina que codifica genes se localizan sobre los cromosomas 2, 14 y 22 (véase la Figura 1). El locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina G humana puede encontrarse sobre el cromosoma 14 (14q32.2) con la orientación cromosómica en el locus: telómero - extremo 5'-V_H-D-J_H-C_H-extremo 3' - centrómero. Los segmentos V_H sobre el cromosoma se clasifican como se representa en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1: Agrupamientos de los genes V_H en familias V_H según Matsuda, F., et al., J. Exp. Med. 188 (1998) 2151-2162 y Tomlinson, I.M., et al., V Base sequence directory 1999.

Familia V _H	Número de miembros de la familia	Genes con marco de lectura abierto
V _H 1	14	9 / 11
V _H 2	4	3

V _H 3	65	22
V _H 4	32	7 / 11
V _H 5	2	2
V _H 6	1	1
V _H 7	5	1

El locus de la cadena pesada de inmunoglobulina G humana comprende en general 123-129 genes V_H, de los que 51 son funcionales, 23 genes D funcionales (D=diversidad), agrupados en siete familias, 6 genes J_H funcionales (J=unión) y en el haplotipo más frecuente 9 genes C_H funcionales (C=constante).

5 El locus para las cadenas ligeras de inmunoglobulina G humana de los tipos kappa (κ) y lambda (λ) se localiza sobre dos cromosomas diferentes, los cromosomas 2 y 22. El locus de la cadena ligera kappa puede encontrarse sobre el brazo corto del cromosoma 2 (2p11.2) y comprende 40 segmentos del gen V_κ funcional. Éstos se agrupan en siete familias. El locus también comprende 5 genes J_κ y un único gen C_κ (Schable, K.F. y Zachau, H.G., Biol. Chem. Hoppe Seyler 374 (1993) 1001-1022; Lefranc, M.P., Exp. Clin. Immunogenet. 18 (2001) 161-174).

Tabla 2: Agrupación de los genes V_κ en familias V_κ según Foster, S.J., et al., J. Clin. Invest. 99 (1997) 1614-1627.

Familia V _κ	Número de genes funcionales
V _κ 1	19
V _κ 2	9
V _κ 3	7
V _κ 4	1
V _κ 5	1
V _κ 6	3

15 El locus de la cadena ligera lambda puede encontrarse sobre el brazo largo del cromosoma 22 (22p11.2) y comprende 73-74 genes V_λ de los que 30 son funcionales. Éstos se agrupan en diez familias que además se agrupan en tres agrupaciones. El locus también comprende 7 genes J_λ, de los que 5 son funcionales.

Tabla 3: Agrupación de los genes V_λ en familias V_λ según Frippiat, J.P., et al., Hum. Mol. Genet. 4 (1995) 983-991; Farner, N.L., et al., J. Immunol. 162 (1999) 2137-2145; Lefranc, M.P., Exp. Clin. Immunogenet. 18 (2001) 242-254.

Familia V _λ	Número de genes funcionales	Agrupación
V _λ 1	5	B
V _λ 2	5	A
V _λ 3	8	A
V _λ 4	3	A-C
V _λ 5	3	B
V _λ 6	1	C
V _λ 7	2	B
V _λ 8	1	C
V _λ 9	1	B
V _λ 10	1	c

20 La amplificación basada en PCR del ácido nucleico que codifica una HC y LC de IgG o al menos el dominio variable de la misma de una célula única productora de inmunoglobulina, por ejemplo, de un único linfocito B, se basa en la deposición de célula única de linfocitos B, seguido de una amplificación de ácido nucleico basada en PCR con cebador específicos para el dominio variable de la cadena pesada y ligera. El resultado de la PCR es esencialmente dependiente del cebador de PCR empleado. En el mejor de los casos, el cebador empleado debe cubrir todos los genes V, no debe ser propenso a la formación de dímeros y debe unirse específicamente al ADNc que codifica la inmunoglobulina. Así, en una realización, el ácido nucleico que codifica un dominio variable de inmunoglobulina se obtiene de ADNc.

30 Debido al gran número de genes funcionales sobre el locus de inmunoglobulina G humana es necesario emplear diferentes cebadores en la reacción de PCR con el fin de cubrir tantos genes conocidos como sea posible. Por tanto, se ha establecido un conjunto de cebadores degenerados que también es un aspecto de la presente invención. La amplificación del ácido nucleico que codifica la cadena pesada y ligera puede realizarse en una reacción en cadena de la polimerasa. En esta realización, los cebadores se eligen con el fin de proporcionar la amplificación de ácidos nucleicos de aproximadamente la misma longitud con el fin de permitir las mismas condiciones de PCR. En esta realización se emplean cebadores para el ácido nucleico que codifica la cadena pesada, de los que uno está

uniéndose en la región C_H1 de la cadena pesada, proporcionando así un fragmento de ácido nucleico de tamaño comparable al del ácido nucleico correspondiente que codifica la cadena ligera.

5 En el presente documento se informa de un método de obtención de un ácido nucleico que codifica al menos un dominio variable de inmunoglobulina a partir de una única célula que comprende las siguientes etapas:

- obtener una primera composición de ácido nucleico realizando una primera reacción en cadena de la polimerasa con tres a seis cebadores 5' y un cebador 3',
- 10 - obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de inmunoglobulina realizando con la composición obtenida en la primera reacción en cadena de la polimerasa una segunda reacción en cadena de la polimerasa con trece a dieciséis cebadores 5' y un cebador 3',

15 por el cual la distancia de las localizaciones de unión del cebador empleado en la segunda reacción en cadena de la polimerasa se reduce en comparación con la primera reacción en cadena de la polimerasa.

Los cebadores 5' empleados en la primera reacción en cadena de la polimerasa se unen en la región codificante para el péptido conductor de la inmunoglobulina. Los cebadores 5' empleados en la segunda reacción en cadena de la polimerasa se unen en la región codificante para la primera región estructural de la inmunoglobulina. Los cebadores empleados en la segunda reacción en cadena de la polimerasa proporcionan nucleótidos protuberantes que codifican el codón de iniciación de la traducción ATG para el cebador 5' y/o el codón de terminación de la traducción TTA para el cebador 3'. Este nucleótido protuberante es útil en una reacción en cadena de la polimerasa de solapamiento siguiente opcional para la generación de ácidos nucleicos para la traducción *in vitro* del ácido nucleico obtenido. El dominio variable de inmunoglobulina puede ser un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina o un dominio variable de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina o un dominio variable de la cadena ligera lambda de inmunoglobulina.

Los cebadores empleados en la primera reacción en cadena de la polimerasa para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina tienen la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 05 y/o 06, y SEQ ID NO: 07 y/o 08, y SEQ ID NO: 09, y SEQ ID NO: 10 y/o 11, y SEQ ID NO: 12, y SEQ ID NO: 13, y SEQ ID NO: 14 y/o 15.

Tabla 4: Cebadores empleados en la primera reacción en cadena de la polimerasa para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina.

Descripción de cebador	Secuencia	Denotación	SEQ ID NO:
Unión del cebador de V _H en la región codificante del péptido conductor	TCACCATGGACTG(C/G)ACCTGGA	V _H L-1	05, 06
	CCATGGACACACTTTG(C/T)TCCAC	V _H L-2	07, 08
	TCACCATGGAGTTTGGGCTGAGC	V _H L-3	09
	AGAACATGAAACA(C/T)CTGTGGTTC TT	V _H L-4	10, 11
	ATGGGGTCAACCGCCATCCT	V _H L-5	12
	ACAATGTCTGTCTCCTTCCTCAT	V _H L-6	13
Unión del cebador en la región codificante de la región constante	GCCAGGGGAAGAC(C/G)GATG	huC _H -II	14, 15

35 Los cebadores empleados en la primera reacción en cadena de la polimerasa para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina tienen la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 16 a 20.

40 Tabla 5: Cebadores empleados en la primera reacción en cadena de la polimerasa para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina.

Descripción de cebador	Secuencia	Denotación	SEQ ID NO:
Unión del cebador de V _K en la región codificante del péptido conductor	GCTCAGCTCCTGGGGCTCCTG	V _K L-1	16
	CTGGGGCTGCTAATGCTCTGG	V _K L-2	17
	TTCCTCCTGCTACTCTGGCTC	V _K L-3	18
	CAGACCCAGGTCTTCATTTCT	V _K L-4	19
Unión del cebador en la región codificante de la región constante	TTTCAACTGCTCATCAGATGGCGG	huC _K -II	20

Los cebadores empleados en la primera reacción en cadena de la polimerasa para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera lambda de inmunoglobulina tienen la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 21, y SEQ ID NO: 22, y SEQ ID NO: 23 y/o 24 y/o 25 y/o 26, y SEQ ID NO: 27 y/o 28.

5 Tabla 6: Cebadores empleados en la primera reacción en cadena de la polimerasa para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera lambda de inmunoglobulina.

Descripción de cebador	secuencia	denotación	SEQ ID NO:
Unión del cebador de V _λ en la región codificante del péptido conductor	CCTCTCCTCCTCACCTCCT	V _λ L-1	21
	CTCCTCACTCAGGGCACA	V _λ L-2	22
	ATGGCCTGGA(T/C)C(C/G)CTCTCC	V _λ L-3	23, 24, 25, 26
Unión del cebador en la región codificante de la región constante	AGCTCCTCAGAGGAGGG(C/T)GG	C _λ II	27,28

10 Los cebadores empleados en la segunda reacción en cadena de la polimerasa para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina tienen la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 29 y/o 30, y SEQ ID NO: 31, y SEQ ID NO: 32 y/o 33, y SEQ ID NO: 34 y/o 35, y SEQ ID NO: 36, y SEQ ID NO: 37 y/o 38, y SEQ ID NO: 39 y/o 40, y SEQ ID NO: 41, y SEQ ID NO: 42, y SEQ ID NO: 43 y/o 44, y SEQ ID NO: 45, y SEQ ID NO: 46 y/o 47, y SEQ ID NO: 48, y SEQ ID NO: 49 y/o 50, y SEQ ID NO: 51 y/o 52.

15 Tabla 7: Cebadores empleados en la segunda reacción en cadena de la polimerasa para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina.

Descripción de cebador	Secuencia	Denotación	SEQ ID NO:
Unión del cebador V _H en la región codificante FR1	CTTTAAGAAGGAGATATAACCATGGT (G/T)CAGCTGGTGCAG	V _H L-1a	29, 30
	CTTTAAGAAGGAGATATAACCATGCA GGTCCAGCTTGTGCAG	V _H L-1b	31
	CTTTAAGAAGGAGATATAACCATG (G/C)AGGTCCAGCTGGTACAG	V _H L-1c	32, 33
	CTTTAAGAAGGAGATATAACCATGCA (A/G)ATGCAGCTGGTGCAG	V _H L-1d	34, 35
	CTTTAAGAAGGAGATATAACCATGCA G ATCACCTTGAAGGAG	V _H L-2a	36
	CTTTAAGAAGGAGATATAACCATGCA G GTCACCTTGA(A/G)GGAG	V _H L-2b	37, 38
	CTTTAAGAAGGAGATATAACCATGGA (A/G)GTGCAGCTGGTGGAG	V _H L-3a	39, 40
	CTTTAAGAAGGAGATATAACCATGCA G GTGCAGCTGGTGGAG	V _H L-3b	41
	CTTTAAGAAGGAGATATAACCATGGA G GTGCAGCTGTTGGAG	V _H L-3c	42
	CTTTAAGAAGGAGATATAACCATGCA G (C/G)TGCAGCTGCAGGAG	V _H L-4a	43, 44
	CTTTAAGAAGGAGATATAACCATGCA G GTGCAGCTACAGCAG	V _H L-4b	45
	CTTTAAGAAGGAGATATAACCATGGA (A/G)GTGCAGCTGGTGCAG	V _H L-5a	46, 47
	CTTTAAGAAGGAGATATAACCATGCA GGTACAGCTGCAGCAG	V _H L-6a	48
	CTTTAAGAAGGAGATATAACCATGCA GGT(C/G)CAGCTGGTGGAA	V _H L-7a	49, 50
	Unión del cebador en la región codificante de la región constante	ATCGTATGGGTAGCTGGTCCCTTAG AC(C/G)GATGGGCCCTTGGTGGAA	huC _H -III

20 Los cebadores empleados en la segunda reacción en cadena de la polimerasa para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina tienen la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 53 y/o 54, y SEQ ID NO: 55 y/o 56, y SEQ ID NO: 57 y/o 58, y SEQ ID NO: 59, y SEQ ID NO: 60, y SEQ ID NO: 61 y/o 62, y SEQ ID NO: 63 y/o 64, y SEQ ID NO: 65, y SEQ ID NO: 66, y SEQ ID NO: 67, y SEQ ID NO: 68, y SEQ ID NO: 69, y SEQ ID NO: 70, y SEQ ID NO: 71.

Tabla 8: Cebadores empleados en la segunda reacción en cadena de la polimerasa para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina.

Descripción de cebador	Secuencia	Denotación	SEQ ID NO:
Unión del cebador V _k en la región codificante FR1	CTTTAAGAAGGAGATATACCATG (A/G)ACATCCAGATGACCCAG	V _k L-1a	53, 54
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGG (A/C)CATCCAGTTGACCCAG	V _k L-1b	55, 56
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGGC CATCC(A/G)GATGACCCAG	V _k L-1c	57, 58
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGGT CATCTGGATGACCCAG	V _k L-1d	59
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGGA TATTGTGATGACCCAG	V _k L-2a	60
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGG AT(A/G)TTGTGATGACTCAG	V _k L-2b	61, 62
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGG AAATTGTGTTGAC(A/G)CAG	V _k L-3a	63, 64
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGG AAATAGTGATGACGCAG	V _k L-3b	65
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGG AAATTGTAATGACACAG	V _k L-3c	66
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGG ACATCGTGATGACCCAG	V _k L-4a	67
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGG AAACGACACTCACGCAG	V _k L-5a	68
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGG AAATTGTGCTCACTCAG	V _k L-6a	69
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGGA TGTTGTGATGACACAG	V _k L-6b	70
Unión del cebador en la región codificante de la región constante	ATCGTATGGGTAGCTGGTCCCTTAA AGATGAAGACAGATGGTGC	huC _κ -III	71

5 Los cebadores empleados en la segunda reacción en cadena de la polimerasa para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera lambda de inmunoglobulina tienen la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 72, y SEQ ID NO: 73 y/o 74, y SEQ ID NO: 75, y SEQ ID NO: 76, y SEQ ID NO: 77 y/o 78, y SEQ ID NO: 79, y SEQ ID NO: 80, y SEQ ID NO: 81, y SEQ ID NO: 82 y/o 83, y SEQ ID NO: 84 y/o 85, y SEQ ID NO: 86, y SEQ ID NO: 87 y/o 88, y SEQ ID NO: 89, y SEQ ID NO: 90 y/o 91, y SEQ ID NO: 92, y SEQ ID NO: 93.

10

Tabla 9: Cebadores empleados en la segunda reacción en cadena de la polimerasa para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera lambda de inmunoglobulina.

Descripción de cebador	Secuencia	Denotación	SEQ ID NO:
Unión del cebador V _λ en la región codificante FR1	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGCA GTCTGTGCTGACTCAG	V _λ L-1a	72
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGCA GTCTGTG(C/T)TGACGCAG	V _λ L-1b	73, 74
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGCA GTCTGTCTGACGCAG	V _λ L-1c	75
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGCA GTCTGCCCTGACTCAG	V _λ L-2a	76
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGTC CTATG(A/T)GCTGACTCAG	V _λ L-3a	77, 78
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGTC CTATGAGCTGACACAG	V _λ L-3b	79
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGTC TTCTGAGCTGACTCAG	V _λ L-3c	80
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGTC CTATGAGCTGATGCAG	V _λ L-3d	81

Descripción de cebador	Secuencia	Denotación	SEQ ID NO:
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGCA GC(C/T)TGTGCTGACTCAA	V _λ L-4a	82, 83
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGCAG (C/G)CTGTGCTGACTCAG	V _λ L-5a	84, 85
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGAA TTTTATGCTGACTCAG	V _λ L-6a	86
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGCAG (A/G)CTGTGGTACTCAG	V _λ L-7a	87, 88
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGCAG ACTGTGGTGACCCAG	V _λ L-8a	89
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGC (A/T)GCCTGTGCTGACTCAG	V _λ L-4/9a	90, 91
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGCAG GCAGGGCTGACTCAG	V _λ L-10a	92
Unión del cebador en la región codificante de la región constante	ATCGTATGGGTAGCTGGTCCCTTAG GGAACAGAGTGACCG	huC _λ -III	93

En el presente documento se informa de un método de obtención de un ácido nucleico que codifica al menos un dominio variable de inmunoglobulina a partir de una única célula que comprende la siguiente etapa:

- 5 - obtener una primera composición de ácido nucleico realizando una primera reacción en cadena de la polimerasa con tres o cuatro cebadores 5' y un cebador 3',
- obtener un ácido nucleico que codifica al menos un dominio variable de inmunoglobulina realizando con la composición obtenida en la primera reacción en cadena de la polimerasa una segunda reacción en cadena de la polimerasa con un cebador 5' y un cebador 3',

por el cual los cebadores empleados en la primera y en la segunda reacción en cadena de la polimerasa pueden ser los mismos.

15 Los cebadores empleados en la reacción en cadena de la polimerasa proporcionan nucleótidos protuberantes que codifican el codón de iniciación de la traducción ATG para el cebador 5' y/o el codón de terminación de la traducción TTA para el cebador 3'. Este nucleótido protuberante es útil en una posterior reacción en cadena de la polimerasa de solapamiento adicional para la generación de ácidos nucleicos para la traducción *in vitro* del ácido nucleico obtenido.

20 El dominio variable de inmunoglobulina puede ser un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina o un dominio variable de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina o un dominio variable de la cadena ligera lambda de inmunoglobulina.

Los cebadores empleados en la primera reacción en cadena de la polimerasa de dos etapas para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina tienen la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 94, y SEQ ID NO: 95, y SEQ ID NO: 96 y/o 97 y/o 98 y/o 99, y SEQ ID NO: 100 y/o 101 y/o 102 y/o 103, y SEQ ID NO: 104 y/o 105 y/o 106.

Tabla 10: Cebadores empleados en la primera reacción en cadena de la polimerasa de dos etapas para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina.

Descripción de cebador	Secuencia	Denotación	SEQ ID NO:
Unión del cebador V _H en la región codificante FR1	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGCA GGTGCAGCTGGTGCAGTC	huV _H -1	94
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGCA GGTCAACTTAAGGGAGTCTGG	huV _H -2	95
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGAG GTGCAGCTG(C/G)TG(C/G)AGTC	huV _H -3	96, 97, 98, 99
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGCA GGT(A/G)CAGCTGCAG(C/G)AGTC	huV _H -4	100, 101, 102, 103
Unión del cebador en la región codificante de la región constante	ATCGTATGGGTAGCTGGTCCCTTA GTGGTGGTGGTGGTGGTGA (C/G/T)TCTTGTCCACCTGGTGTG	huC _H -2	104, 105, 106

Los cebadores empleados en la primera reacción en cadena de la polimerasa de dos etapas para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina tienen la secuencia de

ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 107 y/o 108 y/o 109 y/o 110, y SEQ ID NO: 111 y/o 112, y SEQ ID NO: 113, y SEQ ID NO: 114, y SEQ ID NO: 115.

5 Tabla 11: Cebadores empleados en la primera reacción en cadena de la polimerasa de dos etapas para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina.

Descripción de cebador	Secuencia	Denotación	SEQ ID NO:
Unión del cebador V _κ en la región codificante FR1	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGG A CATC(C/G)(A/T)GATGACCCAGTCT	huV _κ -1	107, 108, 109, 110
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGG A TATTGTG(A/C)TGA CT CAGTCTCC	huV _κ -2	111,112
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGG A AATTGTGTGACGCAGTCTCC	huV _κ -3	113
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGG A AACGACACTCACGCAGTCTC	huV _κ -4	114
Unión del cebador en la región codificante de la región constante	ATCGTATGGGTAGCTGGTCCCTTAA CACTCTCCCCTGTTGAAGCTC	huC _κ -2	115

10 Los cebadores empleados en la primera reacción en cadena de la polimerasa de dos etapas para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera lambda de inmunoglobulina tienen la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 116, y SEQ ID NO: 117, y SEQ ID NO: 118 y/o 119, y SEQ ID NO: 120 y/o 121 y/o 122 y/o 123 y/o 124 y/o 125.

Tabla 12: Cebadores empleados en la primera reacción en cadena de la polimerasa de dos etapas para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera lambda de inmunoglobulina.

Descripción de cebador	Secuencia	Denotación	SEQ ID NO:
Unión del cebador V _λ en la región codificante FR1	CTTTAAGAAGGAGATATACCATG CAGTCTGTGCTGACTCAGCC	huV _λ -1	116
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATG CAGTCTGCCCTGACTCAGCC	huV _λ -2	117
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATG TCCTATGAGCTGAC(A/T)CAGCC	huV _λ -3	118, 119
Unión del cebador en la región codificante de la región constante	ATCGTATGGGTAGCTGGTCCCTTAA TGAACATTC(C/T)G(C/T)AGGGGC (A/T)ACT	huC _λ -2	120, 121, 122, 123, 124, 125

15 Los cebadores empleados en la segunda reacción en cadena de la polimerasa de dos etapas tienen la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 126 y SEQ ID NO: 127.

Tabla 13: Cebadores empleados en la segunda reacción en cadena de la polimerasa de dos etapas.

Descripción de cebador	Secuencia	Denotación	SEQ ID NO:
primer cebador	CTTTAAGAAGGAGATATACCATG	LTGS-lfp	126
segundo cebador	ATCGTATGGGTAGCTGG	LTGS-rfp	127

20 Otro aspecto de la presente invención es un método de obtención de un ácido nucleico que codifica al menos un dominio variable de inmunoglobulina a partir de una única célula que comprende las siguientes etapas:

- obtener una primera composición de ácido nucleico realizando una primera reacción en cadena de la polimerasa con cuatro a seis cebadores 5' y un cebador 3',
- obtener un ácido nucleico que codifica al menos un dominio variable de inmunoglobulina realizando con la composición obtenida en la primera reacción en cadena de la polimerasa una segunda reacción en cadena de la polimerasa con trece a quince cebadores 5' y un cebador 3',

30 por el cual en la segunda reacción en cadena de la polimerasa el cebador 3' es el mismo que en la primera reacción en cadena de la polimerasa y al menos un cebador 5' es diferente, y
 por el cual en la segunda reacción en cadena de la polimerasa el número de nucleótidos entre el extremo 5' de cada uno de los cebadores 5' y el extremo 3' del cebador 3' es más pequeño en comparación con el número de nucleótidos entre el extremo 5' de cada uno de los cebadores 5' y el extremo 3' del cebador 3' en la primera reacción
 35 en cadena de la polimerasa.

En una realización de este método, los cebadores 5' empleado en la primera reacción en cadena de la polimerasa se unen en la región codificante para el péptido conductor de la inmunoglobulina. En otra realización, los cebadores

5' empleados en la segunda reacción en cadena de la polimerasa se unen en la región codificante para la primera región estructural de la inmunoglobulina. En otra realización, los cebadores empleados en la segunda reacción en cadena de la polimerasa proporcionan nucleótidos protuberantes que codifica el codón de iniciación de la traducción ATG para el cebador 5' y/o el codón de terminación de la traducción TTA para el cebador 3'. Este nucleótido protuberante es útil en una posterior reacción en cadena de la polimerasa de solapamiento adicional para la generación de ácidos nucleicos para la traducción *in vitro* del ácido nucleico obtenido. En una realización de este método de obtención de un dominio variable de ácido nucleico que codifica inmunoglobulina se emplean seis cebadores 5' y un cebador 3' en la primera reacción en cadena de la polimerasa. En otra realización se emplean cuatro cebadores 5' y un cebador 3' en la segunda reacción en cadena de la polimerasa. En una realización el dominio variable de inmunoglobulina es un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina o un dominio variable de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina o un dominio variable de la cadena ligera lambda de inmunoglobulina.

En una realización de los métodos según la invención, los cebadores empleados en la primera reacción en cadena de la polimerasa para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina tienen la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 05 y/o 06, y SEQ ID NO: 07 y/o 08, y SEQ ID NO: 09, y SEQ ID NO: 10 y/o 11, y SEQ ID NO: 12, y SEQ ID NO: 13, y SEQ ID NO: 104 y/o 105 y/o 106.

Tabla 14: Cebadores empleados en la primera reacción en cadena de la polimerasa para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina.

Descripción de cebador	Secuencia	Denotación	SEQ ID NO:
Unión del cebador V _H en la región codificante del péptido conductor	TCACCATGGACTG(C/G)ACCTGGA	V _H L-1	05, 06
	CCATGGACACACTTTG(C/T)TCCAC	V _H L-2	07, 08
	TCACCATGGAGTTTGGGCTGAGC	V _H L-3	09
	AGAACATGAAACA(C/T)CTGTGGTTCTT	V _H L-4	10, 11
	ATGGGGTCAACCGCCATCCT	V _H L-5	12
	ACAATGTCTGTCTCCTCCTCAT	V _H L-6	13
Unión del cebador en la región codificante de la región constante	TCGTATGGGTAGCTGGTCCCTTAGTGGT GGTGGTGGTGGTGAAC(C/G/T)TCTTGT CCACCTTGGTGTG	huC _H -2	104, 105, 106

En una realización de los métodos según la invención, los cebadores empleados en la primera reacción en cadena de la polimerasa para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina tienen la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 16, y SEQ ID NO: 17, y SEQ ID NO: 18, y SEQ ID NO: 19, y SEQ ID NO: 115.

Tabla 15: Cebadores empleados en la primera reacción en cadena de la polimerasa para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina.

Descripción de cebador	Secuencia	Denotación	SEQ ID NO:
Unión del cebador V _K en la región codificante del péptido conductor	GCTCAGCTCCTGGGGCTCCTG	V _K L-1	16
	CTGGGGCTGCTAATGCTCTGG	V _K L-2	17
	TTCTCCTGCTACTCTGGCTC	V _K L-3	18
	CAGACCCAGGCTTTCATTCT	V _K L-4	19
Unión del cebador en la región codificante de la región constante	ATCGTATGGGTAGCTGGTCCC TTAACACTCTCCCCTGTTGAA GCTC	huC _K -2	115

En una realización de los métodos según la invención, los cebadores empleados en la primera reacción en cadena de la polimerasa para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera lambda de inmunoglobulina tienen la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 21, y SEQ ID NO: 22, y SEQ ID NO: 23 y/o 24 y/o 25 y/o 26, y SEQ ID NO: 120 y/o 121 y/o 122 y/o 123 y/o 124 y/o 125.

Tabla 16: Cebadores empleados en la primera reacción en cadena de la polimerasa para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera lambda de inmunoglobulina.

Descripción de cebador	Secuencia	Denotación	SEQ ID NO:
Unión del cebador V _L en la región codificante del péptido conductor	CCTCTCCTCCTCACCTCCT	V _L L-1	21
	CTCCTCACTCAGGGCACA	V _L L-2	22
	ATGGCCTGGA(T/C)C(C/G)CTCTCC	V _L L-3	23, 24, 25, 26

Unión del cebador en la región codificante de la región constante	ATCGTATGGGTAGCTGGTCCCTTA TGAACATTC(C/T)G(C/T)AGGGGC (A/T)ACT	huC _λ -2	120, 121, 122, 123, 124, 125
---	--	---------------------	------------------------------------

En una realización de los métodos según la invención, los cebadores empleados en la segunda reacción en cadena de la polimerasa para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina tienen la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 128, y SEQ ID NO: 129, y SEQ ID NO: 130, y SEQ ID NO: 131, y SEQ ID NO: 132, y SEQ ID NO: 133, y SEQ ID NO: 134, y SEQ ID NO: 135, y SEQ ID NO: 136, y SEQ ID NO: 137, y SEQ ID NO: 138, y SEQ ID NO: 139, y SEQ ID NO: 140, SEQ y ID NO: 141, y SEQ ID NO: 104 y/o 105 y/o 106.

Tabla 17: Cebadores empleados en la segunda reacción en cadena de la polimerasa para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina.

Descripción de cebador	Secuencia	Denotación	SEQ ID NO:
Unión del cebador V _H en la región codificante FR1	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGCA GGTKCAGCTGGTGCAG	V _H -1a	128
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGCA GGTCCAGCTTGTGCAG	V _H -1b	129
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGSAG GTCCAGCTGGTACAG	V _H -1c	130
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGCA RATGCAGCTGGTGCAG	V _H -1d	131
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGCA GATCACCTTGAAGGAG	V _H -2a	132
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGCA GGTCACCTTGARGGAG	V _H -2b	133
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGGA RGTGCAGCTGGTGGAG	V _H -3a	134
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGCA GGTGCAGCTGGTGGAG	V _H -3b	135
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGGA GGTGCAGCTGTTGGAG	V _H -3c	136
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGCA GSTGCAGCTGCAGGAG	V _H -4a	137
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGCA GGTGCAGCTACAGCAG	V _H -4b	138
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGGA RGTGCAGCTGGTGCAG	V _H -5a	139
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGCA GGTACAGCTGCAGCAG	V _H -6a	140
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGCA GGTACAGCTGGTGCAG	V _H -7a	141
Unión del cebador en la región codificante de la región constante	ATCGTATGGGTAGCTGGTCCCTTAGT GGTGGTGGTGGTGGTGAAC(C/G/T)T CTTGTCACCTTGGTGTG	huC _H -2	104, 105, 106

En una realización de los métodos según la invención, los cebadores empleados en la segunda reacción en cadena de la polimerasa para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina tienen la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 53 y/o 54, y SEQ ID NO: 55 y/o 56, y SEQ ID NO: 57 y/o 58, y SEQ ID NO: 59, y SEQ ID NO: 60, y SEQ ID NO: 61 y/o 62, SEQ ID NO: 63 y/o 64, y SEQ ID NO: 65, y SEQ ID NO: 66, y SEQ ID NO: 67, y SEQ ID NO: 68, y SEQ ID NO: 69, y SEQ ID NO: 70, y SEQ ID NO: 115.

Tabla 18: Cebadores empleados en la segunda reacción en cadena de la polimerasa para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina.

Descripción de cebador	Secuencia	Denotación	SEQ ID NO:
------------------------	-----------	------------	------------

Descripción de cebador	Secuencia	Denotación	SEQ ID NO:
Unión del cebador V _k en la región codificante FR1	CTTTAAGAAGGAGATATACCATG(A/G) ACATCCAGATGACCCAG	V _k L-1a	53, 54
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGG(A/ C)CATCCAGTTGACCCAG	V _k L-1b	55, 56
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGGCC ATCC(A/G)GATGACCCAG	V _k L-1c	57, 58
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGGTC ATCTGGATGACCCAG	V _k L-1d	59
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGGAT ATTGTGATGACCCAG	V _k L-2a	60
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGGAT (A/G)TTGTGATGACTCAG	V _k L-2b	61, 62
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGA AATTGTGTTGAC(A/G)CAG	V _k L-3a	63, 64
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGA AATAGTGATGACGCAG	V _k L-3b	65
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGA AATTGTAATGACACAG	V _k L-3c	66
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGA CATCGTGATGACCCAG	V _k L-4a	67
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGA AACGACACTCACGCAG	V _k L-5a	68
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGA AATTGTGCTGACTCAG	V _k L-6a	69
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGGAT GTTGTGATGACACAG	V _k L-6b	70
Unión del cebador en la región codificante de la región constante	ATCGTATGGGTAGCTGGTCCCTTAAC ACTCTCCCCTGTTGAAGCTC	huC _k -2	115

En una realización de los métodos según la invención, los cebadores empleados en la segunda reacción en cadena de la polimerasa para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera lambda de inmunoglobulina tienen la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 72, y SEQ ID NO: 73 y/o 74, y SEQ ID NO: 75, y SEQ ID NO: 76, y SEQ ID NO: 77 y/o 78, y SEQ ID NO: 79, y SEQ ID NO: 80, y SEQ ID NO: 81, y SEQ ID NO: 82 y/o 83, y SEQ ID NO: 84 y/o 85, y SEQ ID NO: 86, y SEQ ID NO: 87 y/o 88, y SEQ ID NO: 89, y SEQ ID NO: 90 y/o 91, y SEQ ID NO: 92, y SEQ ID NO: 120 o 121 o 122 o 123 o 124 o 125.

Tabla 19: Cebadores empleados en la segunda reacción en cadena de la polimerasa para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera lambda de inmunoglobulina.

Descripción de cebador	Secuencia	Denotación	SEQ ID NO:
Unión del cebador V _λ en la región codificante FR1	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGC AGTCTGTGCTGACTCAG	V _λ L-1a	72
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGC AGTCTGTG(C/T)TGACGCAG	V _λ L-1b	73, 74
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGC AGTCTGTGCTGACGCAG	V _λ L-1c	75
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGC AGTCTGCCCTGACTCAG	V _λ L-2	76
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGTC CTATG(A/T)GCTGACTCAG	V _λ L-3a	77, 78
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGTC CTATGAGCTGACACAG	V _λ L-3b	79

Descripción de cebador	Secuencia	Denotación	SEQ ID NO:
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGTC TTCTGAGCTGACTCAG	V _λ L-3c	80
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGTC CTATGAGCTGATGCAG	V _λ L-3d	81
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGC AGC(C/T)TGTGCTGACTCAA	V _λ L-4	82, 83
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGC AG(C/G)CTGTGCTGACTCAG	V _λ L-5	84, 85
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGA ATTTTATGCTGACTCAG	V _λ L-6	86
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGC AG(A/G)CTGTGGTGACTCAG	V _λ L-7	87, 88
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGC AGACTGTGGTGACCCAG	V _λ L-8	89
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGC(A/T)GCCTGTGCTGACTCAG	V _λ L-4/9	90, 91
	CTTTAAGAAGGAGATATACCATGC AGGCAGGGCTGACTCAG	V _λ L-10	92
Unión del cebador en la región codificante de la región constante	ATCGTATGGGTAGCTGGTCCCTTAT GAACATTC(C/T)G(C/T)AGGGGC (A/T)ACT	huC _λ -2	120, 121, 122, 123, 124, 125

5 En una realización de los métodos según la invención, el ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena ligera y el ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena pesada se obtienen en una reacción en cadena de la polimerasa por una combinación de los diferentes cebadores 5' y 3' en una única reacción en cadena de la polimerasa múltiplex.

En el presente documento se informa de un método de obtención de un ácido nucleico que codifica al menos un dominio variable de inmunoglobulina a partir de una única célula que comprende la siguiente etapa:

- 10 - realizar una transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa en una etapa con un conjunto de cebadores que comprende un cebador 5' y un cebador 3'.

15 El cebador 5' empleado en la reacción en cadena de la polimerasa de cebador específico de gen con transcripción inversa de un tubo múltiplex (RT-GSP-PCR) se une en la región codificante para la primera región estructural de la inmunoglobulina. Los cebadores empleados en la reacción de RT-GSP-PCR proporcionan nucleótidos protuberantes que codifican el codón de iniciación de la traducción ATG para el cebador 5' y/o el codón de terminación de la traducción TTA para el cebador 3'. Este nucleótido protuberante es útil en una posterior reacción en cadena de la polimerasa de solapamiento adicional para la generación de ácidos nucleicos para la traducción *in vitro* del ácido nucleico obtenido. Este método es para obtener un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina con una reacción de RT-GSP-PCR. El dominio variable de inmunoglobulina puede ser un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina o un dominio variable de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina o un dominio variable de la cadena ligera lambda de inmunoglobulina.

25 Los cebadores empleados en la RT-GSP-PCR de un tubo múltiplex para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina tienen la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 142 y 143.

Tabla 20: Cebador empleado en la reacción de RT-GSP-PCR de un tubo múltiplex para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina.

Descripción de cebador	Secuencia	Denotación	SEQ ID NO:
Unión del cebador V _H en la región codificante FR1	CTTTAAGAAGGAGATATACCAT GAACBTCTTGTCCACCTTGGT GTTG	V _H -lfp	142

Unión del cebador en la región codificante de la región constante	ATCGTATGGGTAGCTGGTCCCTT AAACTBTCTTGTCCACCTTGGTG TTG	V _H -rfp	143
---	---	---------------------	-----

Los cebadores empleados en la RT-GSP-PCR de un tubo múltiple para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina tienen la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 144 y 145.

5

Tabla 21: Cebadores empleados en la reacción de RT-GSP-PCR de un tubo múltiple para obtener un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina.

Descripción de cebador	Secuencia	Denotación	SEQ ID NO:
Unión del cebador V _k en la región codificante FR1	CTTTAAGAAGGAGATATACCAT GACTCTCCCCTGTTGAAGCTC	VL(k)-lfp	144
Unión del cebador en la región codificante de la región constante	ATCGTATGGGTAGCTGGTCCCTT AAACTCTCCCCTGTTGAAGCTC	VL(k)-rfp	145

Adicionalmente se ha encontrado que con una combinación del método de PCR según la invención y un sistema de traducción *in vitro* libre de células los ácidos nucleicos que codifican los dominios V_H y V_L de inmunoglobulina relacionados pueden obtenerse a partir de una única célula por el cual el dominio variable de inmunoglobulina codificado se proporciona como el fragmento Fab en cantidades suficientes para la caracterización de las propiedades de unión de inmunoglobulina. Con el fin de amplificar la cantidad muy baja de ARNm obtenida a partir de una única célula, la PCR individual (reacción en cadena de la polimerasa) tiene que ser muy sensible y tiene que realizarse una combinación de más de una PCR.

10

15

Un "sistema de traducción *in vitro* libre de células" según la invención indica un lisado libre de células de una célula procariota o eucariota, preferentemente de una procariota, que contiene ribosomas, ARNt, ATP, CGTP, nucleótidos y aminoácidos. En una realización, el procariota es *E. coli*.

20

25

30

35

40

45

50

55

La traducción *in vitro* libre de células es un método que se conoce en el estado de la técnica desde hace mucho tiempo. Spirin et al. desarrollaron en 1988 una traducción libre de células de flujo continuo (CFCF) y acoplaron el sistema de transcripción/traducción en el que se produce una cantidad relativamente alta de síntesis de proteínas (Spirin, A.S., et al., Science 242 (1988) 1162-1164). Para tal traducción *in vitro* libre de células se usaron lisados celulares que contenían ribosomas para la traducción o transcripción/traducción. Tales extractos libres de células de *E. coli* se desarrollaron por, por ejemplo, Zubay (Zubay, G., et al., Ann. Rev. Genetics 7 (1973) 267-287) y se usaron por Pratt (Pratt, J.M., et al., Nucleic Acids Research 9 (1981) 4459-4474; y Pratt, J.M., et al., Transcription and Translation: A Practical Approach, Hames and Higgins (eds.), 179-209, IRL Press, 1984). Desarrollos adicionales de la síntesis de proteínas libre de células se informan en los documentos US 5.478.730, US 5.571.690, EP 0 932 664, WO 99/50436, WO 00/58493 y WO 00/55353. Los sistemas de expresión libres de células eucariotas se informan por, por ejemplo, Skup, D. y Millward, S., Nucleic Acids Research 4 (1977) 3581-3587; Fresno, M., et al., Eur. J. Biochem. 68 (1976) 355-364; Pelham, H.R. y Jackson, R.J., Eur. J. Biochem. 67 (1976) 247-256 y en el documento WO 98/31827.

Se ha encontrado que basándose en la amplificación de ácido nucleico que codifica HC de IgG (cadena pesada de inmunoglobulina G) y LC de IgG (inmunoglobulina G cadena ligera) relacionadas de una inmunoglobulina de isotipo IgG a partir de una única célula y la posterior traducción *in vitro* del ácido nucleico obtenido para proporcionar fragmentos Fab de dicha inmunoglobulina se proporciona un método altamente sensible de obtención de información sobre una inmunoglobulina producida por una única célula a partir de las cantidades mínimas de ARNm obtenible. El método según la invención permite la investigación de la inmunoglobulina expresada a partir de un único linfocito B, proporcionando así mayor diversidad a diferencia de la tecnología de hibridomas. Además, como los dominios variables de inmunoglobulina relacionados o cadenas de inmunoglobulina se obtienen de linfocitos B maduros después del contacto con antígeno, puede obtenerse selectivamente el ácido nucleico que codifica inmunoglobulinas altamente específicas y correctamente ensambladas.

Por tanto, un aspecto de la presente invención es un método de producción de un fragmento Fab de inmunoglobulina que comprende las siguientes etapas:

- proporcionar una célula única productora de inmunoglobulina,
- obtener a partir de la célula el ácido nucleico que codifica los dominios variables de la cadena ligera y pesada de inmunoglobulina, que opcionalmente también codifican una parte del dominio constante de la cadena ligera y una parte del dominio C_H1 de la cadena pesada,
- generar una matriz de expresión lineal que comprende el ácido nucleico obtenido,
- traducir *in vitro* el ácido nucleico y producir así el fragmento Fab de inmunoglobulina.

50

55

En una realización, el ácido nucleico que codifica los dominios variables de inmunoglobulina se obtiene con un método según los aspectos previos de la presente invención. En una realización del método según la invención, la obtención del ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena ligera y pesada de inmunoglobulina de una única célula comprende una reacción en cadena de la polimerasa múltiplex según la invención para la amplificación de HC de IgG y LC de IgG relacionadas (isotipo IgG humana) de un único linfocito B. Para la caracterización de las características de unión de la inmunoglobulina codificada por el ácido nucleico obtenido, el ácido nucleico se traduce posteriormente *in vitro* en un lisado de *E. coli* con un fragmento Fab de inmunoglobulina.

En general, en el presente documento se informa de un método que emplea las siguientes etapas i) aislar con microperlas magnéticas recubiertas con los linfocitos B CD 19 humanos de sangre periférica, ii) depositar células individuales por dilución limitada o FACS, iii) extraer el ARNm de los linfocitos B individualizados, iv) obtener el ácido nucleico que codifica al menos los dominios variables de la inmunoglobulina producidos por el linfocito B individualizado, v) traducir *in vitro* el molde de ARNm lineal, y opcionalmente vi) caracterizar las propiedades de unión de la inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina.

Para la producción recombinante de una inmunoglobulina que comprende los dominios variables obtenidos a partir de una única célula con un método según la invención, los ácidos nucleicos obtenidos que codifican el dominio variable de la cadena ligera y pesada de inmunoglobulina se modifican adicionalmente. Al principio, el ácido nucleico que codifica el dominio variable se combina con un ácido nucleico que codifica una región constante de inmunoglobulina. El ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena ligera puede combinarse con un ácido nucleico que codifica el dominio constante de la cadena ligera kappa humana de SEQ ID NO: 03 o con un ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena ligera lambda humana de SEQ ID NO: 04. El ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena pesada puede combinarse con un ácido nucleico que codifica la región constante de la inmunoglobulina G1 humana (IgG1) de SEQ ID NO: 01 o con un ácido nucleico que codifica la región constante de la inmunoglobulina G4 humana (IgG4) de SEQ ID NO: 02. El ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena pesada se combina con un ácido nucleico que codifica la región constante 1 (C_{H1}) de la inmunoglobulina G1 humana (IgG1).

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina completa o un fragmento de la misma se denominan a continuación genes estructurales. Pueden localizarse sobre el mismo plásmido de expresión o alternativamente pueden localizarse sobre diferentes plásmidos de expresión. El ensamblaje de la inmunoglobulina o fragmento Fab tiene lugar antes de la secreción de la inmunoglobulina al medio de cultivo y, así, dentro de la célula que se expresa. Por tanto, las moléculas de ácidos nucleicos que codifican las cadenas de inmunoglobulina se expresan en la misma célula huésped. Si después de la expresión recombinante se obtiene una mezcla de inmunoglobulinas, ésta puede separarse y purificarse por métodos conocidos para un experto en la materia. Estos métodos están bien establecidos y se usan generalizadamente para la purificación de inmunoglobulinas y se emplean tanto solos como en combinación. Tales métodos son, por ejemplo, cromatografía de afinidad usando proteínas derivadas de microbio (por ejemplo, cromatografía de afinidad por proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, intercambio catiónico (resinas de carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de aminoetilo) y cromatografía de intercambio de modo mixto), adsorción tiófila (por ejemplo, con beta-mercaptopetanol y otros ligandos de SH), cromatografía por interacción hidrófoba o adsorción aromática (por ejemplo, con fenil-Sepharose, resinas aza-arenófilas, o ácido m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad por quelato metálico (por ejemplo, con material de afinidad por Ni(II) y Cu(II)), cromatografía de exclusión por tamaño y métodos electroforéticos preparativos (tales como electroforesis en gel, electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102).

Con métodos de ingeniería recombinante conocidos para un experto en la materia, los conjugados pueden confeccionarse a medida al nivel de ácido nucleico/génico. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina son conocidas y pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de bases de datos genómicas. Los elementos requeridos para la construcción de un plásmido de expresión para la expresión de la inmunoglobulina obtenida con un método según la invención son, por ejemplo, un casete de expresión para la cadena ligera de la inmunoglobulina, un casete de expresión para la cadena pesada de la inmunoglobulina (alternativamente los genes estructurales de la cadena ligera y la cadena pesada pueden estar contenidos en el mismo casete de expresión, por ejemplo, como elemento de expresión bicistrónico), un marcador de selección y una replicación de *E. coli*, además de unidad de selección. Un casete de expresión comprende en general un promotor, un segmento de ADN que codifica una secuencia señal de la secreción, el gen estructural y un terminador/señal de poliadenilación. Los elementos se ensamblan en una forma operativamente ligada tanto sobre un plásmido que codifica todas las cadenas de la inmunoglobulina, como sobre dos plásmidos que codifican cada uno una cadena de la inmunoglobulina. Para la expresión de los genes estructurales, el (los) plásmido(s) se introduce(n) en una célula huésped adecuada. Las proteínas se producen en células de mamífero tales como células CHO, células NS0, células Sp2/0, células COS, células HEK, células K562, células BHK, células PER.C6@ y similares. En una realización, el conjugado se expresa en una célula CHO, o una célula BHK, o una célula HEK, o célula NS0. Los elementos reguladores del plásmido tienen que seleccionarse de una forma que sean funcionales en la célula huésped seleccionada. Para la expresión, la célula huésped se cultiva en condiciones adecuadas para la expresión de la inmunoglobulina, que son conocidas para un experto en la materia. Las cadenas de inmunoglobulina expresadas se ensamblan funcionalmente y la inmunoglobulina completamente procesada se secreta en el medio.

Un "plásmido de expresión" es un ácido nucleico que proporciona todos los elementos requeridos para la expresión del (de los) gen(es) estructural(es) comprendido(s) en una célula huésped. Normalmente, un plásmido de expresión comprende una unidad de propagación de plásmido procariota, por ejemplo, para *E. coli*, que comprende un origen de replicación, y un marcador de selección, un marcador de selección eucariota, y uno o más casetes de expresión para la expresión del (de los) gen(es) estructural(es) de interés que comprende cada uno un promotor, un gen estructural y un terminador de la transcripción que incluye una señal de poliadenilación. La expresión génica se pone normalmente bajo el control de un promotor, y un gen estructural tal se dice que está "operativamente ligado a" un promotor. Similarmente, un elemento regulador y un promotor central están operativamente ligados si el elemento regulador modula la actividad del promotor central.

"Operativamente ligado" se refiere a una yuxtaposición de dos o más componentes, en la que los componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar en su manera prevista. El término "enlazar ... en forma operable" indica la combinación de dos o más ácidos nucleicos individuales en una forma tal que los ácidos nucleicos individuales estén operativamente ligados en el ácido nucleico final. Por ejemplo, un promotor y/o potenciador están operativamente ligados a una secuencia codificante, si actúa en cis para controlar o modular la transcripción de la secuencia ligada. Generalmente, pero no necesariamente, las secuencias de ADN que están "operativamente ligadas" están contiguas y, si es necesario unir dos regiones que codifican proteína tales como primer dominio y un segundo dominio, por ejemplo, un dominio variable de inmunoglobulina y un dominio constante o región constante de inmunoglobulina, contiguas y en marco (de lectura). Un sitio de poliadenilación está operativamente ligado a una secuencia codificante si se localiza en el extremo en dirección 3' de la secuencia codificante de forma que la transcripción avance a través de la secuencia codificante en la secuencia de poliadenilación. Un codón de terminación de la traducción está operativamente ligado a una secuencia de ácidos nucleicos exónica si se localiza en el extremo en dirección 3' (extremo 3') de la secuencia codificante de forma que la traducción avance a través de la secuencia codificante hacia el codón de terminación y termine allí. El enlace se lleva a cabo por métodos recombinantes conocidos en la técnica, por ejemplo, usando metodología de PCR y/o por ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen sitios de restricción convenientes, entonces se usan adaptadores o conectores de oligonucleótidos sintéticos según la práctica convencional.

Así, en el presente documento se informa de un método de producción de una inmunoglobulina que comprende las siguientes etapas:

- proporcionar una célula única productora de inmunoglobulina,
- obtener a partir de esta célula el ácido nucleico que codifica los dominios variables de la cadena ligera y pesada de inmunoglobulina,
- enlazar el ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena ligera con un ácido nucleico que codifica un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 03 o SEQ ID NO: 04 en forma operable y enlazar el ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena pesada con un ácido nucleico que codifica una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina de SEQ ID NO: 01 o SEQ ID NO: 02 en forma operable,
- transfectar una célula eucariota o procariota con los ácidos nucleicos de la etapa previa,
- cultivar la célula transfectada en condiciones adecuadas para la expresión de la inmunoglobulina,
- recuperar la inmunoglobulina de la célula o el medio de cultivo y producir así una inmunoglobulina.

El término "en condiciones adecuadas para la expresión de" indica condiciones que se usan para el cultivo de una célula capaz de expresar un polipéptido heterólogo y que son conocidas por o pueden determinarse fácilmente por un experto en la materia. Es sabido para un experto en la materia que estas condiciones pueden variar dependiendo del tipo de célula cultivada y el tipo de polipéptido expresado. En general, la célula se cultiva a una temperatura, por ejemplo, entre 20 °C y 40 °C, y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la producción eficaz del conjugado, por ejemplo, durante de 4 días a 28 días, en un volumen de 0,01 litros a 10⁷ litros.

Los siguientes ejemplos, listado de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar en el entendimiento de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción del listado de secuencias

SEQ ID NO: 01	región constante de la cadena pesada de IgG1 humana
SEQ ID NO: 02	región constante de la cadena pesada de IgG4 humana
SEQ ID NO: 03	dominio constante de la cadena ligera kappa de IgG humana
SEQ ID NO: 04	dominio constante de la cadena ligera lambda de IgG humana
SEQ ID NO: 05	cebador V _H L-1 variante 1
SEQ ID NO: 06	cebador V _H L-1 variante 2
SEQ ID NO: 07	cebador V _H L-2 variante 1
SEQ ID NO: 08	cebador V _H L-2 variante 2

ES 2 570 460 T3

SEQ ID NO: 09	cebador V _H L-3
SEQ ID NO: 10	cebador V _H L-4 variante 1
SEQ ID NO: 11	cebador V _H L-4 variante 2
SEQ ID NO: 12	cebador V _H L-5
SEQ ID NO: 13	cebador V _H L-6
SEQ ID NO: 14	cebador huC _H -II variante 1
SEQ ID NO: 15	cebador huC _H -II variante 2
SEQ ID NO: 16	cebador V _k L-1
SEQ ID NO: 17	cebador V _k L-2
SEQ ID NO: 18	cebador V _k L-3
SEQ ID NO: 19	cebador V _k L-4
SEQ ID NO: 20	cebador huC _k -II
SEQ ID NO: 21	cebador V ₁ L-1
SEQ ID NO: 22	cebador V ₁ L-2
SEQ ID NO: 23	cebador V ₁ L-3 variante 1
SEQ ID NO: 24	cebador V ₁ L-3 variante 2
SEQ ID NO: 25	cebador V ₁ L-3 variante 3
SEQ ID NO: 26	cebador V ₁ L-3 variante 4
SEQ ID NO: 27	cebador huC ₁ -II variante 1
SEQ ID NO: 28	cebador huC ₁ -II variante 2
SEQ ID NO: 29	cebador V _H L-1a variante 1
SEQ ID NO: 30	cebador V _H L-1a variante 2
SEQ ID NO: 31	cebador V _H L-1b
SEQ ID NO: 32	cebador V _H L-1c variante 1
SEQ ID NO: 33	cebador V _H L-1c variante 2
SEQ ID NO: 34	cebador V _H L-1d variante 1
SEQ ID NO: 35	cebador V _H L-1d variante 2
SEQ ID NO: 36	cebador V _H L-2a
SEQ ID NO: 37	cebador V _H L-2b variante 1
SEQ ID NO: 38	cebador V _H L-2b variante 2
SEQ ID NO: 39	cebador V _H L-3a variante 1
SEQ ID NO: 40	cebador V _H L-3a variante 2
SEQ ID NO: 41	cebador V _H L-3b
SEQ ID NO: 42	cebador V _H L-3c
SEQ ID NO: 43	cebador V _H L-4a variante 1
SEQ ID NO: 44	cebador V _H L-4a variante 2
SEQ ID NO: 45	cebador V _H L-4b
SEQ ID NO: 46	cebador V _H L-5a variante 1
SEQ ID NO: 47	cebador V _H L-5a variante 2
SEQ ID NO: 48	cebador V _H L-6a
SEQ ID NO: 49	cebador V _H L-7a variante 1
SEQ ID NO: 50	cebador V _H L-7a variante 2
SEQ ID NO: 51	cebador huC _H -III variante 1
SEQ ID NO: 52	cebador huC _H -III variante 2
SEQ ID NO: 53	cebador V _k L-1a variante 1
SEQ ID NO: 54	cebador V _k L-1a variante 2
SEQ ID NO: 55	cebador V _k L-1b variante 1
SEQ ID NO: 56	cebador V _k L-1b variante 2
SEQ ID NO: 57	cebador V _k L-1c variante 1
SEQ ID NO: 58	cebador V _k L-1c variante 2
SEQ ID NO: 59	cebador V _k L-1d
SEQ ID NO: 60	cebador V _k L-2a
SEQ ID NO: 61	cebador V _k L-2b variante 1
SEQ ID NO: 62	cebador V _k L-2b variante 2
SEQ ID NO: 63	cebador V _k L-3a variante 1
SEQ ID NO: 64	cebador V _k L-3a variante 2
SEQ ID NO: 65	cebador V _k L-3b
SEQ ID NO: 66	cebador V _k L-3c
SEQ ID NO: 67	cebador V _k L-4a
SEQ ID NO: 68	cebador V _k L-5a
SEQ ID NO: 69	cebador V _k L-6a
SEQ ID NO: 70	cebador V _k L-6b
SEQ ID NO: 71	cebador huC _k -III
SEQ ID NO: 72	cebador V _l L-1a
SEQ ID NO: 73	cebador V _l L-1b variante 1
SEQ ID NO: 74	cebador V _l L-1b variante 2
SEQ ID NO: 75	cebador V _l L-1c

ES 2 570 460 T3

SEQ ID NO: 76	cebador V _L -2a
SEQ ID NO: 77	cebador V _L -3a variante 1
SEQ ID NO: 78	cebador V _L -3a variante 2
SEQ ID NO: 79	cebador V _L -3b
SEQ ID NO: 80	cebador V _L -3c
SEQ ID NO: 81	cebador V _L -3d
SEQ ID NO: 82	cebador V _L -4 variante 1
SEQ ID NO: 83	cebador V _L -4 variante 2
SEQ ID NO: 84	cebador V _L -5 variante 1
SEQ ID NO: 85	cebador V _L -5 variante 2
SEQ ID NO: 86	cebador V _L -6
SEQ ID NO: 87	cebador V _L -7 variante 1
SEQ ID NO: 88	cebador V _L -7 variante 2
SEQ ID NO: 89	cebador V _L -8
SEQ ID NO: 90	cebador V _L -4/9 variante 1
SEQ ID NO: 91	cebador V _L -4/9 variante 2
SEQ ID NO: 92	cebador V _L -10
SEQ ID NO: 93	cebador huC _I -III
SEQ ID NO: 94	cebador huV _H -1
SEQ ID NO: 95	cebador huV _H -2
SEQ ID NO: 96	cebador huV _H -3 variante 1
SEQ ID NO: 97	cebador huV _H -3 variante 2
SEQ ID NO: 98	cebador huV _H -3 variante 3
SEQ ID NO: 99	cebador huV _H -3 variante 4
SEQ ID NO: 100	cebador huV _H -4 variante 1
SEQ ID NO: 101	cebador huV _H -4 variante 2
SEQ ID NO: 102	cebador huV _H -4 variante 3
SEQ ID NO: 103	cebador huV _H -4 variante 4
SEQ ID NO: 104	cebador huC _H -2 variante 1
SEQ ID NO: 105	cebador huC _H -2 variante 2
SEQ ID NO: 106	cebador huC _H -2 variante 3
SEQ ID NO: 107	cebador huV _k -1 variante 1
SEQ ID NO: 108	cebador huV _k -1 variante 2
SEQ ID NO: 109	cebador huV _k -1 variante 3
SEQ ID NO: 110	cebador huV _k -1 variante 4
SEQ ID NO: 111	cebador huV _k -2 variante 1
SEQ ID NO: 112	cebador huV _k -2 variante 2
SEQ ID NO: 113	cebador huV _k -3
SEQ ID NO: 114	cebador huV _k -4
SEQ ID NO: 115	cebador huC _k -2
SEQ ID NO: 116	cebador huV _I -1
SEQ ID NO: 117	cebador huV _I -2
SEQ ID NO: 118	cebador huV _I -3 variante 1
SEQ ID NO: 119	cebador huV _I -3 variante 2
SEQ ID NO: 120	cebador huC _I -2 variante 1
SEQ ID NO: 121	cebador huC _I -2 variante 2
SEQ ID NO: 122	cebador huC _I -2 variante 3
SEQ ID NO: 123	cebador huC _I -2 variante 4
SEQ ID NO: 124	cebador huC _I -2 variante 5
SEQ ID NO: 125	cebador huC _I -2 variante 6
SEQ ID NO: 126	cebador LTGS-lfp
SEQ ID NO: 127	cebador LTGS-rfp
SEQ ID NO: 128	cebador V _H -1a
SEQ ID NO: 129	cebador V _H -1b
SEQ ID NO: 130	cebador V _H -1c
SEQ ID NO: 131	cebador V _H -1d
SEQ ID NO: 132	cebador V _H -2a
SEQ ID NO: 133	cebador V _H -2b
SEQ ID NO: 134	cebador V _H -3a
SEQ ID NO: 135	cebador V _H -3b
SEQ ID NO: 136	cebador V _H -3c
SEQ ID NO: 137	cebador V _H -4a
SEQ ID NO: 138	cebador V _H -4b
SEQ ID NO: 139	cebador V _H -5a
SEQ ID NO: 140	cebador V _H -6a
SEQ ID NO: 141	cebador V _H -7a
SEQ ID NO: 142	cebador V _H -lfp

SEQ ID NO: 143 cebador V_H-rfp
 SEQ ID NO: 144 cebador VL(k)-lfp
 SEQ ID NO: 145 cebador VL(k)-rfp

Descripción de las figuras

- 5 Figura 1 Localización cromosómica del locus de la cadena pesada de inmunoglobulina G humana (A), el locus de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana (B) y del locus de la cadena ligera lambda de inmunoglobulina humana (C).
- Figura 2 Esquema para la reacción en cadena de la polimerasa para la cadena ligera de la inmunoglobulina con un primer y un segundo conjunto de cebadores.
- 10 Figura 3 Análisis en gel de agarosa del ácido nucleico amplificado después de la primera (A) y la segunda (B) reacción en cadena de la polimerasa con diferentes conjuntos de cebadores; (A) 1 - HC de IgG y LC(κ) de IgG 55 °C; 2 - LC(κ) de IgG 55 °C; 3 - HC de IgG 55 °C; 4 - HC de IgG y LC(κ) de IgG 50 °C; 5 - LC(κ) de IgG 50 °C; 6 - HC de IgG 50 °C; 7 - H₂O PCR I; (B) 1 - LC(κ) de IgG 55 °C; 2 - HC de IgG y LC(κ) de IgG 55 °C; 3 - HC de IgG 55 °C; 4 - HC de IgG y LC(κ) de IgG 50 °C; 5 - LC(κ) de IgG 50 °C; 6 - HC de IgG 50 °C; 7 - PCR II de H₂O; 8 - PCR I de H₂O.
- 15 Figura 4 Esquema para la reacción en cadena de la polimerasa para la cadena pesada de la inmunoglobulina con un segundo conjunto de cebadores diferente en las dos reacciones en cadena de la polimerasa.
- Figura 5 Análisis en gel de agarosa del ácido nucleico amplificado después de la primera (A) y la segunda (B) reacción en cadena de la polimerasa con diferentes conjuntos de cebadores; (A) 1 - HC de IgG y LC(κ) de IgG 55 °C; 2 - LC(κ) de IgG 55 °C; 3 - HC de IgG 55 °C; 4 - HC de IgG y LC(κ) de IgG 50 °C; 5 - LC(κ) de IgG 50 °C; 6 - HC de IgG 50 °C; 7 - PCR I de H₂O; (B) 1 - HC de IgG y LC(κ) de IgG 55 °C; 2 - LC(κ) de IgG 55 °C; 3 - HC de IgG 55 °C; 4 - HC de IgG y LC(κ) de IgG 50 °C; 5 - LC(κ) de IgG 50 °C; 6 - HC de IgG 50 °C; 7 - PCR II de H₂O; 8 - PCR I de H₂O.
- 20 Figura 6 Esquema para la reacción en cadena de la polimerasa para la cadena pesada de la inmunoglobulina con conjunto de cebadores idéntico en las dos reacciones en cadena de la polimerasa.
- Figura 7 Análisis en gel de agarosa del ácido nucleico amplificado después de la primera (A) y la segunda (B) reacción en cadena de la polimerasa con diferentes conjuntos de cebadores; (A) 1 - HC de IgG y LC(κ) de IgG 55 °C; 2 - LC(κ) de IgG 55 °C; 3 - HC de IgG 55 °C; 4 - HC de IgG y LC(κ) de IgG 50 °C; 5 - LC(κ) de IgG 50 °C; 6 - HC de IgG 50 °C; 7 - PCR I de H₂O; (B) 1 - LC(κ) de IgG 55 °C; 2 - HC de IgG y LC(κ) de IgG 55 °C; 3 - HC de IgG 55 °C; 4 - HC de IgG y LC(κ) de IgG 50 °C; 5 - LC(κ) de IgG 50 °C; 6 - HC de IgG 50 °C; 7 - PCR II de H₂O; 8 - PCR I de H₂O.
- 30 Figura 8 Esquema de PCR de extensión por solapamiento ejemplificado con una marca de HA del extremo C.
- 35 Figura 9 Análisis en gel de agarosa de las construcciones de expresión lineales de las tres reacciones en cadena de la polimerasa diferentes de los Ejemplos 1 a 3.
- Figura 10 Comparación del resultado de las tres reacciones en cadena de la polimerasa según la invención después de traducción *in vitro* (determinación a 450 nm, longitud de onda de referencia a 620 nm, fondo restado).
- 40 Figura 11 Análisis en gel de agarosa del ácido nucleico amplificado después de la primera la segunda reacción en cadena de la polimerasa con dos conjuntos idénticos de cebadores; 1 - sin RT, 2 - 37 células individuales, 38 - ADNc de H₂O, 39 - ARNm de control, 40 - ARNm de control de H₂O, 41 - PCR II de H₂O, 42 - HC de IgG/ LC(κ) de IgG, 43 - HC de IgG, 44 - LC(κ) de IgG, 45 - PCR I de H₂O, 46 - GFP, 46 - GFP de H₂O.
- 45 Figura 12 Análisis en gel de agarosa del ácido nucleico amplificado después de la segunda reacción en cadena de la polimerasa con un conjunto de cebadores variable y uno fijo.
- Figura 13 Análisis en gel de agarosa de las construcciones de expresión lineales obtenidas a partir de ácido nucleico después de la segunda reacción en cadena de la polimerasa con un conjunto de cebadores variable y uno fijo.
- 50 Figura 14 Resultado de la traducción *in vitro* de una reacción en cadena de la polimerasa de dos etapas específica de IgG de una única célula con un conjunto fijo de cebadores y un conjunto variable de cebadores.
- Figura 15 Fragmentos de inmunoglobulina Fab humanos después de la reacción en cadena de la polimerasa de célula única y traducción *in vitro*; 1-8 fragmentos Fab después de la traducción *in vitro* de HC de IgG y LC(κ) de IgG obtenidas a partir de una única célula y adición de muestra de control de HC de IgG, 9-11 fragmentos Fab humanos después de la traducción *in vitro* de HC de IgG y LC(κ) de IgG obtenidas a partir de una única célula, 12 fragmentos Fab humanos después de la traducción *in vitro* de HC de IgG y LC(λ) de IgG obtenidas a partir de una única célula.
- 55 Figura 16 Análisis de transferencia Western después de una reacción en cadena de la polimerasa de dos etapas con un conjunto de cebadores fijo y un conjunto de cebadores variable y traducción *in vitro*; (A) 1 - HC de IgG / LC de IgG a partir de una única célula combinada con HC de IgG, 2 - 4 HC de IgG/LC de IgG a partir de una única célula, 5 - 7 control de HC de IgG/ LC(κ) de IgG, 8 - control de HC de IgG y LC(κ) de IgG, 9 - control negativo, 10 - Fab estándar 0,5 ng/ml, 11 - Fab estándar 50 ng/ml, 12 - Fab estándar 5 µg/ml; (B) 1 - Fab estándar 5 µg/ml, 2 - Fab estándar 50 ng/ml, 3 - Fab
- 60

estándar 0,5 ng/ml, 3 - control negativo, 5 - 12 HC de IgG/LC de IgG a partir de una única célula combinada con HC de IgG.

Ejemplos

5

Materiales y métodos

Linfocitos B y células plasmáticas

10 Las muestras usadas en este enfoque son linfocitos B y células plasmáticas aisladas de la sangre periférica de donante y tejido sano (bazo, médula ósea) de ratones transgénicos para IgG humana. El tejido sólido se desagrega manualmente antes que nada en DMEM en tubos separados. En las etapas posteriores, la manipulación suave y la baja temperatura minimizan la lisis de células, que es importante para el futuro aislamiento positivo de las células de interés y para mantener la fuente de ARNm intacta. El tejido desagregado se suspende por la delicada adición de medios de separación de células para preparar un gradiente de tipo de célula diferente (tubos Leucosep (Greiner Bio-One) con gradiente de densidad de Ficoll). Las células en suspensión se purifican por centrifugación sobre el medio de separación en frío durante 20 min a 800 x g y 22 °C en una centrifuga sin rotura con el fin de enriquecer en células plasmáticas (PBMC) y linfocitos. Las células se lavan en tampón frío (PBS (solución salina tamponada con fosfato), 0,1 % (peso/volumen) de BSA (albúmina de suero bovino), EDTA 2 mM (tetraacetato de etilendiamina)) y el sobrenadante se desecha cuidadosamente para mantener solo los linfocitos. Los linfocitos se resuspenden entonces en PBS y se mezclan pipeteando cuidadosamente. La centrifugación se efectúa durante 5 min a 800 x g y 22 °C para sedimentar las células. Los linfocitos B y las células plasmáticas se pretratan con bloqueante de FC murino y humano para bloquear la unión no específica de Ab sobre su superficie celular. Las células se lavan una vez con tampón (PBS, 0,1 % (peso/volumen) de BSA, EDTA 2 mM), se centrifugan y se resuspenden en PBS. Solo se usaron los linfocitos B CD19+ y las células plasmáticas CD138+. Para prevenir la degradación de ARNm se añade un inhibidor de RNasa. El aislamiento positivo de los linfocitos B CD 19+ (DynaL Biotech Dynabeads CD 19 Pan B) a partir del bazo de ratón se ha llevado a cabo según las instrucciones del fabricante. La selección de las células plasmáticas CD138+ (StemCell Technologies EasySep Human CD138 Selection Kit) se ha llevado a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

30

Separación en célula única por el principio del cultivo de dilución limitante o clasificación por FACS:

35 Se cuentan células y, por el principio del cultivo de dilución limitante, se depositan como célula individual en los pocillos de placas de PCR de 96 pocillos o placas de 384 pocillos. Las placas se tapan con película de PCR y se colocan inmediatamente sobre hielo. Las células clasificadas pueden usarse inmediatamente en RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) o guardarse a -20 °C para uso a corto plazo o -80 °C para uso a largo plazo. La clasificación de células individuales se realizó en un sistema de clasificación de células FACSaria (Becton Dickinson). Las células que se tiñeron positivas para CD19, altamente positivas para CD38 e intermedias positivas para CD45 se recogieron y se designaron células plasmáticas (PC). Se incluyeron puertas adicionales sobre la dispersión frontal / dispersión lateral y anchura de dispersión lateral / altura de dispersión lateral para seleccionar linfocitos vivos y singletes, respectivamente. Las células individuales se distribuyeron directamente en los pocillos de placas de PCR de 96 pocillos (Eppendorf), que contenían todos los reactivos de PCR necesarios en un volumen de 10 µl, excepto transcriptasa inversa, ADN polimerasa, tampón y dNTP y se congelaron a -80 °C para el procesamiento posterior.

45

Lisis de células y transcripción inversa:

Para ser capaz de amplificar el ARNm en una reacción en cadena de la polimerasa, linfocitos B y células plasmáticas deben lisarse antes de la reacción de transcripción inversa.

50

Tabla 22: Componentes usados para la lisis clásica.

Componente	Volumen (µl)	Concentración final
Agua, calidad para PCR	1,75	
5x tampón de reacción de RT	1,00	
Inhibidor de RNasa (40 U/µl)	0,25	5 U
Cebador de sentido contrario específico de gen	1,00	0,02 µM
Igepal 0,01 %	1,00	0,01 %
Volumen final	5,00	

Tabla 23: Programa del ciclador de bloque para la lisis celular.

Temperatura (°C)	Tiempo (s)
65	60
55	30

ES 2 570 460 T3

45	30
35	20
23	120
4	∞

5 Placas con células lisadas se centrifugan brevemente en la centrifuga durante 30 s para recoger líquido y células en el fondo de los pocillos. La reacción de RT (transcriptasa inversa), además de toda la reacción de PCR, se hizo en una placa de 96 pocillos. A cada pocillo que contenía 5 µl de molde se añaden 2,5 µl de agua, 1 µl de tampón de reacción de RT frío, 1 µl de dNTP, 0,25 µl de inhibidor de RNasa (40 U/µl), 0,25 µl de transcriptasa inversa (20 U/µl), todos del kit First Strand cDNA Synthesis (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) para un volumen total de 10 µl. Las placas de RT se centrifugan brevemente y se ponen en hielo a 55 °C durante 60 min (con tapa calentada), se calientan a 85 °C durante 2 min (para inactivar la transcriptasa inversa), en un ciclador de bloque (LightCycler 480, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Se almacenó ADNc monocatenario a -20 °C poco después de la reacción de transcripción inversa para evitar la degradación del ADNc. Se realizó simultáneamente una reacción de síntesis de control sin células para probar la contaminación.

Tabla 24: Componentes usados para la reacción de transcripción inversa.

Componente	Volumen (µl)	Concentración final
Agua, calidad para PCR	6,8	
PCR Master	10	
HC de IgG de cebador semi-anidado	0,4	0,02 µM
LC(k) de IgG de cebador semi-anidado	0,4	0,02 µM
LC(λ) de IgG de cebador semi-anidado	0,4	0,02 µM
Molde de ADNc a partir de la reacción de RT	2	
Volumen final	20	

15 Lisis de células y transcripción inversa:

Para ser capaz de amplificar el ARNm en una reacción en cadena de la polimerasa, linfocitos B y células plasmáticas deben lisarse antes de la reacción de transcripción inversa.

20 Primera PCR:

Tabla 25: Programa del ciclador de bloque para la primera PCR.

Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
95	2 min	1
94	15 s	35
55	30 s	
72	1 min	
72	10 min	1
4	∞	

Tabla 26: Cebadores usados para la primera PCR.

Cebador de la cadena pesada de Ig	Cebador de la cadena ligera (κ) de Ig	Cebador de la cadena ligera (λ) de Ig
V _H L-1	V _κ L-1	V _λ L-1
V _H L-2	V _κ L-2	V _λ L-2
V _H L-3	V _κ L-3	V _λ L-3
V _H L-4	V _κ L-4	huC _λ -II
V _H L-5	huC _λ -II	
V _H L-6		
huC _H -II		

25 Segunda PCR:

Las cadenas ligeras κ y λ y las cadenas pesadas se amplificaron posteriormente con una PCR de segunda ronda según el siguiente protocolo. Usando el cebador semi-anidado, la segunda PCR se realizó para aumentar la

ES 2 570 460 T3

5 cantidad de copias de ADNc y para amplificar solo a partir de la parte variable de la cadena ligera (LC) y la cadena pesada (HC) hasta la región C_H1. La amplificación de HC se realizó usando 16 cebadores, la LC kappa usando 17 cebadores y la LC lambda usando 14 cebadores. Los genes se amplificaron en un volumen total de 20 µl usando 2 µl del primer producto de PCR, 10 µl de High Fidelity PCR Master (que contiene 0,4 µM de cada dNTP, tampón de reacción concentrado doble (con MgCl₂ 3 mM), 0,02 µM de cada cebador, todos del kit High Fidelity PCR Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) usando el siguiente segundo programa de PCR: 2 min a 95 °C, 45 ciclos de 94 °C durante 15 s, 55 °C durante 30 s, 72 °C durante 1 min, siguiendo 10 min a 72 °C.

Tabla 27: Componentes usados para la segunda PCR.

Componente	Volumen (µl)	Concentración final
Agua, calidad para PCR	7,8	
High Fidelity PCR Master	10	MgCl ₂ 1,8 mM
HC de IgG de cebador de dos etapas	0,4	0,02 µM
LC(κ) de IgG de cebador de dos etapas	0,4	0,02 µM
LC(λ) de IgG de cebador de dos etapas	0,4	0,02 µM
Primer producto de PCR	2	
Volumen final	20	

10

Tabla 28: Programa de cicladore de bloque para la segunda PCR.

Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
95	2 min	1
94	15	
55	30 s	45
72	1 min	
72	10 min	1
4	∞	

Tabla 29: Cebadores usados para la segunda PCR

Cebador de cadena pesada de IgG	Cebador de cadena ligera (κ) de IgG	Cebador de cadena ligera (λ) de IgG
V _H 1a	V _{κ} 1a	V _{λ} 1a
V _H 1b	V _{κ} 1b	V _{λ} 1b
V _H 1c	V _{κ} 1c	V _{λ} 1c
V _H 1d	V _{κ} 1d	V _{λ} 2
V _H 2a	V _{κ} 2a	V _{λ} 3a
V _H 2b	V _{κ} 2b	V _{λ} 3b
V _H 3a	V _{κ} 3a	V _{λ} 3c
V _H 3b	V _{κ} 3b	V _{λ} 3d
V _H 3c	V _{κ} 3c	V _{λ} 4
V _H 4a	V _{κ} 4a	V _{λ} 5
V _H 4b	V _{κ} 5a	V _{λ} 6
V _H 5a	V _{κ} 6a	V _{λ} 7
V _H 6a	V _{κ} 6b	V _{λ} 8
V _H 7a	C _{κ} III	V _{λ} 4/9
C _H III		V _{λ} 10
		C _{λ} III

Reacción de RT-GSP (cebador específico de gen)-PCR múltiplex de una etapa:

- 5 Para ser capaz de amplificar el ARNm en una reacción en cadena de la polimerasa, linfocitos B y células plasmáticas deben distribuirse directamente en los pocillos de placas de PCR de 96 pocillos (Eppendorf), que contienen todos los reactivos de PCR necesarios en un volumen de 10 μ l, excepto transcriptasa inversa, ADN polimerasa, tampón y dNTP y se congelan a -80 °C para el procesamiento posterior.

10 Etapa de RT:

Se realizaron transcripción inversa y PCR en una etapa (RT-PCR múltiplex de una etapa). Las células aisladas, clasificadas y guardadas se usaron como material de partida para la transcripción inversa o RT-PCR. Todos los reactivos necesarios se descongelaron a temperatura ambiente. Todos los cebadores se sintetizaron en los laboratorios MOLBIOL TIB GmbH. Las placas y todos los otros reactivos se mantuvieron sobre hielo durante el procedimiento entero. Para las síntesis de ADNc se usaron directamente cebadores específicos de gen con extensiones. El complejo enzimático consiste en dos transcriptasas inversas Sensiscript y una polimerasa Omniscript (Qiagen OneStep RT PCR). La re-escritura del ARNm en ADNc se realizó por el complejo Sensiscript (Qiagen OneStep RT PCR) y la amplificación del ADNc se realizó usando la ADN polimerasa HotStarTaq (Qiagen OneStep RT PCR), que es la forma química de una ADN polimerasa de 94 kDa recombinante (desoxinucleósido-trifosfato: ADN desoxinucleotidiltransferasa, EC 2.7.7.7), originalmente aislada de *Thermus aquaticus* expresado en *E. coli*. Las células se clasificaron en una placa de PCR de 96 pocillos y se guardaron en un volumen de 10 μ l, que contenía 5 μ l de H₂O de calidad para PCR, 1 μ l de cebador 0,1 μ M para V_H y V_L, 1 μ l de inhibidor de RNasa 20 U/reacción y 3 μ l de Tris 1,5 mM. Antes de añadir los otros 10 μ l para realizar la reacción de PCR, las guardadas a -60 °C se centrifugaron brevemente (20 s a 1400 rpm) para recoger el líquido y células sobre el fondo de los pocillos.

Tabla 30: Mezcla maestra 1 usada para la RT-PCR.

Mezcla maestra 1	Concentración final/pocillo	volumen/pocillo (μ l)
H ₂ O		5
cebador V _H / V _L (k)	0,1 μ M	1
Inhibidor de RNasa	20 U/reacción	1
Tampón Tris	1,5 mM	3
Linfocitos B/células plasmáticas		
volumen final		10

Tabla 31: Mezcla maestra 2 usada para la RT-PCR.

Mezcla maestra 2	Concentración final/pocillo	volumen/pocillo (μ l)
H ₂ O	1x	2,2
5x Tampón	1x	4

dNTP 10 mM cada uno	400 µM cada uno	0,8
5x disolución Q	0,25x	1
Mezcla de enzimas de RT PCR de una etapa		1,2
Inhibidor de RNasa	20U	1
volumen final		10

Se añadieron 10 µl por pocillo de mezcla maestra 2 a las células. La segunda mezcla maestra contuvo 2,2 µl de H₂O calidad para PCR, 4 µl de 1x tampón, 0,8 µl de dNTP 400 µM cada uno, 1 µl de disolución Q 0,25x, 1,2 µl del complejo enzimático y 1 µl de inhibidor de RNasa 20 U.

5

Tabla 32: Cebadores usados para la RT-PCR.

Cebador de la cadena pesada de Ig		Cebador de la cadena ligera (κ) de Ig	
V _H -I _{fp}	SEQ ID NO: 142	VL(k)-I _{fp}	SEQ ID NO: 144
V _H -r _{fp}	SEQ ID NO: 143	VL(k)-r _{fp}	SEQ ID NO: 145

Tabla 33: Programa del cicladore de bloque para la RT-GSP-PCR.

Temperatura	Tiempo	Etapas	Ciclos
50 °C	30 min	transcripción inversa	1
95 °C	15 min	desnaturalización	1
94 °C	40 s	desnaturalización	11
Temperatura	Tiempo	Etapas	Ciclos
52 °C	1 min	hibridación	29
72 °C	1 min	extensión	
94 °C	41 s	desnaturalización	
60 °C	1 min	hibridación	
72 °C	1 min	extensión	
72 °C	10 min	final extensión	1
4 °C	∞	enfriamiento	

10 Purificación de productos de PCR:

Para mejorar la eficiencia de la generación de molde lineal para la traducción *in vitro* en la siguiente PCR por solapamiento (tercera PCR), la purificación de los productos de PCR previamente amplificados se realizó eliminando el cebador sin incorporar, dNTP, ADN polimerasas y sales usadas durante la amplificación por PCR con el fin de evitar la interferencia en las aplicaciones en la dirección 3'. Se usó Agencourt AMPure. El tampón se optimiza para unir selectivamente amplicones de PCR de 100 pb y mayores a perlas paramagnéticas. El exceso de oligonucleótidos, nucleótidos, sales y enzimas puede eliminarse usando un único procedimiento. El producto de PCR purificado resultante está esencialmente libre de contaminantes y puede usarse en las siguientes aplicaciones: secuenciación de ADN fluorescente (que incluye electroforesis capilar), impresión de micromatrices, clonación y genotipado por extensión de cebadores. El flujo de trabajo para el formato de 96 pocillos empezó agitando las perlas guardadas en tampón para resuspender cualquier partícula magnética que pudiera haber sedimentado. El volumen correcto de 36 µl de disolución de perlas se añadió a los 20 µl de muestra y la mezcla se pipeteó 10 veces arriba y abajo. La siguiente etapa fue incubar durante 10 minutos y después la placa de reacción se colocó sobre una placa magnética durante 10 minutos para separar las perlas de la disolución. La disolución clarificada (sobrenadante) se aspiró de la placa de reacción y se desechó. Para el lavado de perlas-ADNc, 200 µl de etanol al 70 % se dispersaron por pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante al menos 30 segundos. El etanol se separó por aspiración y se desechó. La etapa de lavado se realizó dos veces y a continuación la placa de reacción se dejó secar al aire durante 20 minutos a temperatura ambiente. Siguió con la adición de 40 µl de tampón de elución y la mezcla se pipeteó de nuevo 10 veces arriba y abajo. Después de la disociación del ADNc de las perlas magnéticas, el ADN purificado se transfirió a una nueva placa.

35 Tercera PCR:

El ADN amplificado de la segunda PCR se ligó después por un método de PCR de extensión por solapamiento con los siguientes componentes, necesarios para la etapa de transcripción/traducción: un sitio de unión a ribosoma (RBS), una secuencia de promotor T7 y de terminador T7. Para esta PCR, se tomaron 2 µl de la segunda PCR a un volumen final de 20 µl que contenía: 10,7 µl de agua, 2 µl de 10x tampón de reacción con MgCl₂ (10 mM), 0,8 µl de DMSO, 0,5 µl de dNTP (10 mM cada uno), 1,6 µl de cebador de promotor y terminador T7 (6 µM cada uno), 0,4 µl de cebador de marca de HA del extremo C y 0,4 µl de mezcla de enzimas, todos del conjunto de generación de molde

Mezcla	Componente	Volumen (µl)
Mezcla 2:	Mezcla de alimentación	640
	Mezcla de aminoácidos	140
	Metionina	20
	H ₂ O	200
	Volumen final	1000
Mezcla 3:	Mezcla de reacción	7
	Mezcla de aminoácidos	7
	Metionina	1
	Mezcla 1	25
	Suplemento GroE	5
	Inhibidor de RNasa	1
	Producto de PCR 3	4
	Volumen final	50

ELISA:

5 Se recubrió una placa de 384 pocillos (Nunc GmbH & Co. KG, Thermo Fisher Scientific, Langensfeld, Alemania) con 50 µl (1:1000 en PBS) de fragmento Fab de cabra anti-IgG humana (producido por Bethyl Laboratories Inc., obtenido de Biomol GmbH, Hamburgo, Alemania, 1 mg/ml) incubado a 4 °C durante la noche. La placa se lavó tres veces con disolución de lavado (100 µl de PBST (solución salina tamponada con fosfato Tween-20)) y se añadieron 60 µl de disolución de bloqueo (0,25 % de CroteinC (peso/volumen)/0,5 % de Tween (peso/volumen)/PBS), se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizó otra etapa de lavado (3 x 100 µl de PBST) y se transfirieron 10 37,5 µl de muestra, además de 37,5 ml de control negativo (control negativo de la transcripción/traducción *in vitro*) y 37,5 µl de control positivo, que contenía 0,75 µl de fragmento Fab recombinante humano (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Las muestras se valoraron a una dilución 1:3. La placa se incubó durante 1,5 h a temperatura ambiente. Después de una etapa de lavado (3 x 100 µl de PBST), se añadieron 25 µl de F(ab')₂ de cabra anti-IgG humana (Dianova, Hamburgo Alemania; 0,8 mg/ml (diluido 1:2000 en disolución de bloqueo)) y se incubó durante 1 15 h a temperatura ambiente. Se realizó la última etapa de lavado (3 x 100 µl de PBST) y se pipetearon 25 µl de TMB (sustrato POD, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Art. N.º: 1 484 281) en cada pocillo. Después de 2-3 minutos la señal de absorción se detectó a 405 nm y 495 nm (Tecan, Safire 2; Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Alemania).

20 Análisis de citometría de flujo y clasificación de células:

Para el análisis de FACS y la clasificación de células se usaron anticuerpos monoclonales, tanto biotinilados como conjugados con tanto FITC (isotiocianato de fluoresceína), PE (Ficoeritrina) como APC (aloficocianina) contra los siguientes antígenos: CD3 (UCHT1), CD4 (13B8,2), CD8 (B9,11), CD40 (MAB89), CD80 (MAB104), CD83 (HB15a), CD86 (HA5.2B7) (todos disponibles de Immunotech/Beckman Coulter, Marsella, Francia), CD19 (HIB19), CD20 (2H7), CD34(581), IL-3Ra/CD123 (9F5), CD11c (B-ly6) CD14 (M5E2), CD24, CD22a, CD38, CD138 (todos disponibles de BD Pharmingen, San Diego, CA, EE.UU.), CD45 (HI30), CD45RA (MEM56), HLA-DR (TU36) (todos disponibles de Caltag, Burlingame, CA, EE.UU.), TLR2 (TL2.1), TLR4 (HTA125), TCRab (IP26) (todos disponibles de Bioscience, San Diego, CA), BDCA-1, BDCA-2, BDCA-4, CD25 (4E3) (todos disponibles de Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), IgM (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, EE.UU.), CCR7 (3D12, proporcionado por M. Lipp, Berlín, Alemania). Se usó IOTest Beta Mark para el análisis de Vb (Immunotech/Beckman Coulter). Se usaron FITC conjugado con estreptavidina, PE o APC (todos de BD Pharmingen) para la visualización de anticuerpos biotinilados. Se excluyeron células muertas por tinción con yoduro de propidio. Se usaron mAb de control irrelevantes del mismo isotipo apropiados para determinar el nivel de tinción de fondo. Las células se analizaron usando un FACSCalibur y se clasificaron usando un FACSaria (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View, CA, EE.UU.).

Ejemplo 1

40 Amplificación de genes IgG de linfocito B individual de ratones inmunizados humanizados por una reacción en cadena de la polimerasa con un conjunto de cebadores fijo y un conjunto de cebadores cambiado

Se han obtenido linfocitos B individuales de un ratón que tiene un locus de inmunoglobulina humana como se explica resumidamente anteriormente. Los cebadores 3' del primer y segundo conjunto de cebadores empleado en la reacción en cadena de la polimerasa fueron idénticos. Los cebadores 5' del primer y segundo conjunto de cebadores

son diferentes en tanto que el cebador del primer conjunto de cebadores 5' se unió en la región que codifica el péptido conductor y el cebador del segundo conjunto de cebadores 5' se unió en la región FR1. Un esquema de esta reacción en cadena de la polimerasa se facilita en la Figura 2.

- 5 Los conjuntos empleados de cebadores para la primera reacción en cadena de la polimerasa se indican en la siguiente lista:

Cebador de la cadena pesada de Ig	Cebador de la cadena (κ) de Ig	Cebador de la cadena ligera (λ) de Ig
V _H L-1	V _{κ} L-1	V _{λ} L-1
V _H L-2	V _{κ} L-2	V _{λ} L-2
V _H L-3	V _{κ} L-3	V _{λ} L-3
V _H L-4	V _{κ} L-4	huC _{λ} -III
V _H L-5	huC _{κ} -II	
V _H L-6		
huC _H -II		

- 10 Los conjuntos empleados de cebadores para la segunda reacción en cadena de la polimerasa se indican en la siguiente lista:

Cebador de la cadena pesada de IgG		Cebador de la cadena ligera (κ) de IgG		Cebador de la cadena ligera (λ) de IgG	
V _H -1a	SEQ ID NO: 128	V _{κ} L-1a	SEQ ID NO: 53, 54	V _{λ} L-1a	SEQ ID NO: 72
V _H -1b	SEQ ID NO: 129	V _{κ} L-1b	SEQ ID NO: 55, 56	V _{λ} L-1b	SEQ ID NO: 73, 74
V _H -1c	SEQ ID NO: 130	V _{κ} L-1c	SEQ ID NO: 57, 58	V _{λ} L-1c	SEQ ID NO: 75
V _H -1d	SEQ ID NO: 131	V _{κ} L-1d	SEQ ID NO: 59	V _{λ} L-2	SEQ ID NO: 76
V _H -2a	SEQ ID NO: 132	V _{κ} L-2a	SEQ ID NO: 60	V _{λ} L-3a	SEQ ID NO: 77, 78
V _H -2b	SEQ ID NO: 133	V _{κ} L-2b	SEQ ID NO: 61, 62	V _{λ} L-3b	SEQ ID NO: 79
V _H -3a	SEQ ID NO: 134	hV _{κ} L-3a	SEQ ID NO: 63, 64	V _{λ} L-3c	SEQ ID NO: 80
V _H -3b	SEQ ID NO: 135	V _{κ} L-3b	SEQ ID NO: 65	V _{λ} L-3d	SEQ ID NO: 81
V _H -3c	SEQ ID NO: 136	V _{κ} L-3c	SEQ ID NO: 66	V _{λ} L-4	SEQ ID NO: 82, 83
V _H -4a	SEQ ID NO: 137	V _{κ} L-4a	SEQ ID NO: 67	V _{λ} L-5	SEQ ID NO: 84, 85
V _H -4b	SEQ ID NO: 138	V _{κ} L-5a	SEQ ID NO: 68	V _{λ} L-6	SEQ ID NO: 86
V _H -5a	SEQ ID NO: 139	V _{κ} L-6a	SEQ ID NO: 69	V _{λ} L-7	SEQ ID NO: 87, 88
V _H -6a	SEQ ID NO: 140	V _{κ} L-6b	SEQ ID NO: 70	V _{λ} L-8	SEQ ID NO: 89
V _H -7a	SEQ ID NO: 141	huC _{κ} -2	SEQ ID NO: 115	V _{λ} L-4/9	SEQ ID NO: 90, 91
huC _H -2	SEQ ID NO: 104, 105, 106			V _{λ} L-10	SEQ ID NO: 92
				huC _{λ} -2	SEQ ID NO: 120, 121, 122, 123, 124, 125

- 15 En la Figura 3 se muestra el gel de agarosa de los fragmentos de ácido nucleico amplificados obtenidos en esta reacción en cadena de la polimerasa. Las muestras se analizaron después de 40 ciclos de amplificación con una temperatura de hibridación de 50 °C y 55 °C, respectivamente. Los blancos (agua) fueron negativos y el tamaño de los fragmentos se correlacionó bien con los tamaños esperados de 750 pb (HC de IgG) y 665 pb (LC de IgG), respectivamente, después de la primera reacción en cadena de la polimerasa y de 711 pb y 688 pb, respectivamente, después de la segunda reacción en cadena de la polimerasa.

20 Ejemplo 2

Amplificación de genes IgG de linfocito B individual de ratones inmunizados humanizados por una reacción en cadena de la polimerasa con dos conjuntos de cebadores cambiados

- 25 Se han obtenido linfocitos B individuales de un ratón que tiene un locus de inmunoglobulina humana como se explica resumidamente anteriormente. Los cebadores 5' y los cebadores 3' del primer y segundo conjunto de cebadores fueron diferentes entre sí en tanto que el cebador de cada uno de los segundos conjuntos se uniera en una región más hacia adentro del ácido nucleico. Un esquema de esta reacción en cadena de la polimerasa se facilita en la Figura 4.

30

Los conjuntos empleados de cebadores para la primera reacción en cadena de la polimerasa se indican en la siguiente lista:

Cebador de la cadena pesada de Ig		Cebador de la cadena ligera (κ) de Ig		Cebador de la cadena ligera (λ) de Ig	
V _H L-1	SEQ ID NO: 05, 06	V _κ L-1	SEQ ID NO: 16	V _λ L-1	SEQ ID NO: 21
V _H L-2	SEQ ID NO: 07, 08	V _κ L-2	SEQ ID NO: 17	V _λ L-2	SEQ ID NO: 22
V _H L-3	SEQ ID NO: 09	V _κ L-3	SEQ ID NO: 18	V _λ L-3	SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26
V _H L-4	SEQ ID NO: 10, 11	V _κ L-4	SEQ ID NO: 19	huC _λ -II	SEQ ID NO: 27, 28
V _H L-5	SEQ ID NO: 12	huC _κ -II	SEQ ID NO: 20		
V _H L-6	SEQ ID NO: 13				
huC _H -II	SEQ ID NO: 14, 15				

5 Los conjuntos empleados de cebadores para la segunda reacción en cadena de la polimerasa se indican en la siguiente lista:

Cebador de la cadena pesada de IgG		Cebador de la cadena ligera (κ) de IgG		Cebador de la cadena ligera (λ) de IgG	
V _H L-1a	SEQ ID NO: 29, 30	V _κ L-1a	SEQ ID NO: 53, 54	V _λ L-1a	SEQ ID NO: 72
V _H L-1b	SEQ ID NO: 31	V _κ L-1b	SEQ ID NO: 55, 56	V _λ L-1b	SEQ ID NO: 73, 74
V _H L-1c	SEQ ID NO: 32, 33	V _κ L-1c	SEQ ID NO: 57, 58	V _λ L-1c	SEQ ID NO: 75
V _H L-1d	SEQ ID NO: 34, 35	V _κ L-1d	SEQ ID NO: 59	V _λ L-2a	SEQ ID NO: 76
V _H L-2a	SEQ ID NO: 36	V _κ L-2a V _κ L-2a	SEQ ID NO: 60	V _λ L-3a V _λ L-3a	SEQ ID NO: 77, 78
V _H L-2b	SEQ ID NO: 37, 38	V _κ L-2b	SEQ ID NO: 61, 62	V _λ L-3b	SEQ ID NO: 79
V _H L-3a	SEQ ID NO: 39, 40	V _κ L-3a	SEQ ID NO: 63, 64	V _λ L-3c	SEQ ID NO: 80
V _H L-3b	SEQ ID NO: 41	V _κ L-3b	SEQ ID NO: 65	V _λ L-3d	SEQ ID NO: 81
V _H L-3c	SEQ ID NO: 42	V _κ L-3c	SEQ ID NO: 66	V _λ L-4a	SEQ ID NO: 82, 83
V _H L-4a	SEQ ID NO: 43, 44	V _κ L-4a	SEQ ID NO: 67	V _λ L-5a	SEQ ID NO: 84, 85
V _H L-4b	SEQ ID NO: 45	V _κ L-5a	SEQ ID NO: 68	V _λ L-6a	SEQ ID NO: 86
V _H L-5a	SEQ ID NO: 46, 47	V _κ L-6a	SEQ ID NO: 69	V _λ L-7a	SEQ ID NO: 87, 88
V _H L-6a	SEQ ID NO: 48	V _κ L-6b	SEQ ID NO: 70	V _λ L-8a	SEQ ID NO: 89
V _H L-7a	SEQ ID NO: 49, 50	huC _κ -III	SEQ ID NO: 71	V _λ L-4/9a	SEQ ID NO: 90, 91
huC _H -III	SEQ ID NO: 51, 52			V _λ L-10a	SEQ ID NO: 92
				huC _λ -III	SEQ ID NO: 93

10 En la Figura 5 se muestra el gel de agarosa de los fragmentos de ácido nucleico amplificados obtenidos en esta reacción en cadena de la polimerasa. Las muestras se analizaron después de 40 ciclos de amplificación con una temperatura de hibridación de 50 °C y 55 °C, respectivamente. Los blancos (agua) fueron negativos y el tamaño de los fragmentos se correlacionó bien con los tamaños esperados de 471 pb (HC de IgG) y 413 pb (LC de IgG), respectivamente, después de la primera reacción en cadena de la polimerasa y de 442 pb y 399 pb, respectivamente, después de la segunda reacción en cadena de la polimerasa.

15 Ejemplo 3

Amplificación de genes IgG de linfocito B individual de ratones inmunizados humanizados por una reacción en cadena de la polimerasa con dos conjuntos de cebadores idénticos

20 Se han obtenido linfocitos B individuales de un ratón que tiene un locus de inmunoglobulina humana como se explica resumidamente anteriormente. Los cebadores 5' y los cebadores 3' del primer y segundo conjunto de cebadores fueron idénticos. Un esquema de esta reacción en cadena de la polimerasa se facilita en la Figura 6.

25 Los conjuntos empleados de cebadores para la primera y segunda reacción en cadena de la polimerasa se indican en la siguiente lista:

Cebador de la cadena pesada de Ig		Cebador de la cadena ligera (κ) de Ig		Cebador de la cadena ligera (λ) de Ig	
huV _H -1	SEQ ID NO: 94	huV _κ -1	SEQ ID NO: 107, 108, 109, 110	huV _λ -1	SEQ ID NO: 116
huV _H -2	SEQ ID NO: 95	huV _κ -2	SEQ ID NO:	huV _λ -2	SEQ ID NO: 117

			111,112		
huV _H -3	SEQ ID NO: 96,97,98,99	huV _K -3	SEQ ID NO: 113	huV _λ -3	SEQ ID NO: 118,119
huV _H -4	SEQ ID NO: 100, 101, 102, 103	huV _K -4	SEQ ID NO: 114	huC _λ -2	SEQ ID NO: 120, 121, 122, 123, 124, 125
huC _H -2	SEQ ID NO: 104, 105, 106	huC _K -2	SEQ ID NO: 115		

En la Figura 7 se muestra el gel de agarosa de los fragmentos de ácido nucleico amplificados obtenidos en esta reacción en cadena de la polimerasa. Las muestras se analizaron después de 40 ciclos de amplificación con una temperatura de hibridación de 50 °C y 55 °C, respectivamente. Los blancos (agua) fueron negativos y el tamaño de los fragmentos se correlacionó bien con los tamaños esperados de 711 pb (HC de IgG) y 688 pb (LC de IgG), respectivamente, después de la primera y segunda reacción en cadena de la polimerasa.

Ejemplo 4

10 Generación de molde lineal para la traducción *in vitro*

Para la primera reacción en cadena de la polimerasa se han diseñado cebadores específicos de gen que comprenden las secuencias de solapamiento necesarias para las regiones de ADN reguladoras del fago T7. Para la segunda reacción en cadena de la polimerasa el producto de la primera PCR se combinó con fragmentos de ácido nucleico que comprenden las secuencias reguladoras y que codifican las secuencias de marca, respectivamente. Se logró una extensión del extremo 3' por hibridación con los fragmentos de ácido nucleico que comprenden los elementos reguladores. Esta construcción de expresión lineal se amplifica adicionalmente con la ayuda de dos cebadores terminales. Estos cebadores comprenden la siguiente secuencia: 5'-CTTTAAGAAGGAGATATACC+ATG+15-20 pb de la secuencia específica de genes (cebador 5', SEQ ID NO: 126) o 5'-ATCGTATGGGTAGCTGGTCCC+TTA+15-20 pb de la secuencia específica de genes (cebador 3', SEQ ID NO: 127).

En la Figura 9 los carriles 1, 5 y 9 representan los controles de agua de blanco. Los ácidos nucleicos de la cadena pesada están contenidos en los carriles 4, 8 y 12, y las cadenas ligeras kappa en los carriles 3, 7 y 11. Los carriles 2, 6 y 10 muestran muestras combinadas de ambas cadenas. Todos los ácidos nucleicos tienen el tamaño esperado (véase la Tabla 38).

Tabla 38: Tamaño de las construcciones de expresión lineales.

cadena de inmunoglobulina	dos conjuntos de cebadores fijos	un conjunto de cebadores fijo	dos conjuntos de cebadores variables
HC de IgG	~ 1110 pb	~ 1110 pb	~ 822 pb
LC(κ) de IgG	~ 1089 pb	~ 1089 pb	- 799 pb

Ejemplo 5

30 Traducción *in vitro* y ELISA específico de huFab

La traducción *in vitro* se lleva a cabo como se explica resumidamente anteriormente.

35 Como puede observarse de la Figura 10, los ácidos nucleicos obtenidos con una reacción en cadena de la polimerasa de dos etapas con dos conjuntos de cebadores variables no proporcionan una construcción de expresión lineal que permita la producción *in vitro* del fragmento de inmunoglobulina Fab codificado. A diferencia de la reacción en cadena de la polimerasa de dos etapas con un conjunto fijo y uno variable de cebadores empleados en reacciones en cadena de la polimerasa sucesivas separadas, permite la posterior provisión de una construcción de expresión lineal y la traducción *in vitro* del fragmento Fab de inmunoglobulina que comprende HC de IgG y LC de IgG.

40 A diferencia de esto, la reacción en cadena de la polimerasa de dos etapas que comprende un conjunto fijo de cebadores es más eficaz en el formato de múltiplex que la reacción en cadena de la polimerasa que emplea dos conjuntos fijos de cebadores. Empleando solo un conjunto fijo de cebadores pueden lograrse densidades ópticas hasta 5 veces mayores.

Ejemplo 6

50 Traducción *in vitro* y ELISA específico de huFab con un ácido nucleico obtenido de una única célula Reacción en cadena de la polimerasa de dos etapas con conjuntos de cebadores idénticos

Como puede apreciarse de la Figura 11, las muestras de control no dieron señal en un gel de agarosa. Los linfocitos B depositados individuales tampoco mostraron señal. Podrían amplificarse HC de IgG y LC(κ) de IgG a partir de muestras de control.

55

Reacción en cadena de la polimerasa de dos etapas con un conjunto fijo de cebadores y un conjunto variable de cebadores

5 Como puede apreciarse de la Figura 13, todos los ácidos nucleicos, excepto la muestra 2, se obtuvieron con una reacción en cadena de la polimerasa de dos etapas con un conjunto fijo de cebadores y un conjunto variable de cebadores que permitió proporcionar una construcción de expresión lineal para la producción de HC de IgG y LC de IgG. Así, estas reacciones en cadena de la polimerasa múltiplex son muy adecuadas.

10 Las concentraciones de los fragmentos de inmunoglobulina Fab kappa humana obtenidos son entre 100 y 550 ng/ml. Los carriles 9 a 11 de la Figura 16 muestran HC de IgG y LC(κ) de IgG obtenidas a partir de una única célula sin la adición de control positivo de HC de IgG. Aquí, la cantidad obtenida de fragmento de inmunoglobulina Fab humana fue entre 180 y 330 ng/ml.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> F. Hoffmann-La Roche AG
- <120> Método de obtención de ácido nucleico que codifica inmunoglobulina
- 20 <130> 25241 WO
- <150> EP09002396.1
<151> 20-02-2009
- 25 <160> 145
- <170> PatentIn versión 3.5
- 30 <210> 1
<211> 330
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
- <400> 1

ES 2 570 460 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

ES 2 570 460 T3

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 2
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

ES 2 570 460 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

ES 2 570 460 T3

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 3
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

10

ES 2 570 460 T3

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

5 <210> 4
<211> 104
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
1 5 10 15

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
20 25 30

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
35 40 45

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
50 55 60

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
65 70 75 80

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
85 90 95

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100

10 <210> 5
<211> 21
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 5
tcaccatgga ctgcacctgg a 21

20 <210> 6
<211> 21
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 6
tcaccatgga ctggacctgg a 21

<210> 7
<211> 22
<212> ADN

ES 2 570 460 T3

	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 7	
5	ccatggacac acttgctcc ac	22
	<210> 8	
	<211> 22	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 8	
	ccatggacac acttgctcc ac	22
	<210> 9	
15	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 9	
20	tcacatgga gttgggctg agc	23
	<210> 10	
	<211> 25	
	<212> ADN	
25	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 10	
	agaacatgaa acacctgtgg ttctt	25
30	<210> 11	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 11	
	agaacatgaa acatctgtgg ttctt	25
	<210> 12	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 12	
45	atggggtaa ccgcatcct	20
	<210> 13	
	<211> 23	
	<212> ADN	
50	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 13	
	acaatgtctg tctcttct cat	23
	<210> 14	
55	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> huCH-II	
	<400> 14	
	gccaggggga agaccgatg	19
65	<210> 15	
	<211> 19	
	<212> ADN	

ES 2 570 460 T3

	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 15		
5	gccaggggga agacggatg	19	
	<210> 16		
	<211> 21		
	<212> ADN		
10	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 16		
	gctcagctcc tggggctcct g	21	
	<210> 17		
15	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 17		
20	ctggggctgc taatgctctg g		21
	<210> 18		
	<211> 21		
	<212> ADN		
25	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 18		
	ttcctcctgc tactctggct c		21
30	<210> 19		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
35	<400> 19		
	cagacccagg tctcatttc t		21
	<210> 20		
40	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 20		
45	ttcaactgc tcatcagatg gcgg		24
	<210> 21		
	<211> 20		
	<212> ADN		
50	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 21		
	cctctcctcc tcacctcct		20
	<210> 22		
55	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 22		
60	ctcctcactc agggcaca	18	
	<210> 23		
	<211> 19		
	<212> ADN		
65	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 23		

ES 2 570 460 T3

	atggcctgga tccctctcc	19
5	<210> 24 <211> 19 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 24 atggcctgga cccctctcc	19
15	<210> 25 <211> 19 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 25 atggcctgga tcgctctcc	19
25	<210> 26 <211> 19 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 26 atggcctgga ccgctctcc	19
35	<210> 27 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 27 agctcctcag aggagggcgg	20
45	<210> 28 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 28 agctcctcag aggaggggtgg	20
55	<210> 29 <211> 38 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 29 ctttaagaag gagatatacc atggtgcagc tggcgcag	38
65	<210> 30 <211> 38 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
70	<400> 30 ctttaagaag gagatatacc atggtgcagc tggcgcag	38
75	<210> 31 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
80	<400> 31 ctttaagaag gagatatacc atgcaggtcc agcttgca g	41
	<210> 32	

ES 2 570 460 T3

	<211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
5	<400> 32 cttaagaag gagatatacc atggaggtcc agctggtaca g	41
10	<210> 33 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 33 cttaagaag gagatatacc atgcaggtcc agctggtaca g	41
20	<210> 34 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 34 cttaagaag gagatatacc atgcaaatgc agctggtgca g	41
30	<210> 35 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 35 cttaagaag gagatatacc atgcagatgc agctggtgca g	41
40	<210> 36 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 36 cttaagaag gagatatacc atgcagatca cctgaagga g	41
50	<210> 37 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<400> 37 cttaagaag gagatatacc atgcaggtca cctgaagga g	41
60	<210> 38 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
65	<400> 38 cttaagaag gagatatacc atgcaggtca cctgagggga g	41
	<210> 39 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 39 cttaagaag gagatatacc atggaagtgc agctggtgga g	41
	<210> 40 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 570 460 T3

	<400> 40 ctttaagaag gagatatacc atggaggtgc agctggtgga g	41
5	<210> 41 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 41 ctttaagaag gagatatacc atgcaggtgc agctggtgga g	41
15	<210> 42 <211> 41 <212> ADN	
20	<400> 42 ctttaagaag gagatatacc atggaggtgc agctggtgga g	41
25	<210> 43 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 43 ctttaagaag gagatatacc atgcagctgc agctgcagga g	41
35	<210> 44 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 44 ctttaagaag gagatatacc atgcaggtgc agctgcagga g	41
45	<210> 45 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 45 ctttaagaag gagatatacc atgcaggtgc agctacagca g	41
55	<210> 46 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 46 ctttaagaag gagatatacc atggaaggtgc agctggtgca g	41
65	<210> 47 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
70	<400> 47 ctttaagaag gagatatacc atggaggtgc agctggtgca g	41
75	<210> 48 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
80	<400> 48 ctttaagaag gagatatacc atgcaggtac agctgcagca g	41
85	<210> 49	

ES 2 570 460 T3

	<211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
5	<400> 49 cttaagaag gagatatacc atgcaggtcc agctggtgca a	41
10	<210> 50 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 50 cttaagaag gagatatacc atgcaggtgc agctggtgca a	41
20	<210> 51 <211> 45 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 51 atcgtatggg tagctggtcc ctagaccga tgggcccttg gtgga	45
30	<210> 52 <211> 45 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 52 atcgtatggg tagctggtcc ctagacgga tgggcccttg gtgga	45
40	<210> 53 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 53 cttaagaag gagatatacc atgaacatcc agatgaccca g	41
50	<210> 54 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<400> 54 cttaagaag gagatatacc atggacatcc agatgaccca g	41
60	<210> 55 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
65	<400> 55 cttaagaag gagatatacc atggacatcc agtgaccca g	41
	<210> 56 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 56 cttaagaag gagatatacc atggccatcc agtgaccca g	41
	<210> 57 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 570 460 T3

	<400> 57 ctttaagaag gagatatacc atggccatcc agatgaccca g	41
5	<210> 58 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 58 ctttaagaag gagatatacc atggccatcc ggatgaccca g	41
15	<210> 59 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 59 ctttaagaag gagatatacc atggcatct ggatgaccca g	41
25	<210> 60 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 60 ctttaagaag gagatatacc atggatattg tgatgaccca g	41
35	<210> 61 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 61 ctttaagaag gagatatacc atggatattg tgatgactca g	41
45	<210> 62 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 62 ctttaagaag gagatatacc atggatgttg tgatgactca g	41
55	<210> 63 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 63 ctttaagaag gagatatacc atggaaattg tgtgacaca g	41
65	<210> 64 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
70	<400> 64 ctttaagaag gagatatacc atggaaattg tgtgacgca g	41
75	<210> 65 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
80	<400> 65 ctttaagaag gagatatacc atggaaatag tgatgacgca g	41

ES 2 570 460 T3

	<210> 66	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
5	<400> 66	
	ctttaagaag gagatatacc atggaaattg taatgacaca g	41
	<210> 67	
10	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 67	
15	ctttaagaag gagatatacc atggacatcg tgatgaccca g	41
	<210> 68	
	<211> 41	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 68	
	ctttaagaag gagatatacc atggaaacga cactcacgca g	41
25	<210> 69	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 69	
30	ctttaagaag gagatatacc atggaaattg tgctcactca g	41
	<210> 70	
	<211> 41	
	<212> ADN	
35	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 70	
	ctttaagaag gagatatacc atggatgttg tgatgacaca g	41
40	<210> 71	
	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 71	
	atcgtatggg tagctggtcc cttaaagatg aagacagatg gtgc	44
	<210> 72	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 72	
	ctttaagaag gagatatacc atgcagtctg tgctgactca g	41
55	<210> 73	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 73	
	ctttaagaag gagatatacc atgcagtctg tgctgacgca g	41
65	<210> 74	
	<211> 41	
	<212> ADN	

ES 2 570 460 T3

	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 74	
5	ctttaagaag gagatatacc atgcagtctg tgttgacgca g	41
	<210> 75	
	<211> 41	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 75	
	ctttaagaag gagatatacc atgcagtctg tcgtgacgca g	41
	<210> 76	
15	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 76	
20	ctttaagaag gagatatacc atgcagtctg ccctgactca g	41
	<210> 77	
	<211> 41	
	<212> ADN	
25	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 77	
	ctttaagaag gagatatacc atgtcctatg agctgactca g	41
30	<210> 78	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 78	
	ctttaagaag gagatatacc atgtcctatg tgctgactca g	41
	<210> 79	
40	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 79	
45	ctttaagaag gagatatacc atgtcctatg agctgacaca g	41
	<210> 80	
	<211> 41	
	<212> ADN	
50	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 80	
	ctttaagaag gagatatacc atgtcttctg agctgactca g	41
	<210> 81	
55	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 81	
60	ctttaagaag gagatatacc atgtcctatg agctgatgca g	41
	<210> 82	
	<211> 41	
	<212> ADN	
65	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 82	
	ctttaagaag gagatatacc atgcagcctg tgctgactca a	41

ES 2 570 460 T3

5	<210> 83 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 83 ctttaagaag gagatatacc atgcagcttg tgctgactca a	41
10	<210> 84 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 84 ctttaagaag gagatatacc atgcagcctg tgctgactca g	41
20	<210> 85 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 85 ctttaagaag gagatatacc atgcaggctg tgctgactca g	41
30	<210> 86 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 86 ctttaagaag gagatatacc atgaatttta tgctgactca g	41
35	<210> 87 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 87 ctttaagaag gagatatacc atgcagactg tgggactca g	41
45	<210> 88 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 88 ctttaagaag gagatatacc atgcaggctg tgggactca g	41
50	<210> 89 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<400> 89 ctttaagaag gagatatacc atgcagactg tgggaccaca g	41
60	<210> 90 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 90 ctttaagaag gagatatacc atgcagcctg tgctgactca g	41
65	<210> 91 <211> 41 <212> ADN	

ES 2 570 460 T3

	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 91	
5	cttaagaag gagatatacc atgctgcctg tgctgactca g	41
	<210> 92	
	<211> 41	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 92	
	cttaagaag gagatatacc atgcaggcag ggctgactca g	41
	<210> 93	
15	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 93	
20	atcgtatggg tagctgtcc cttaggaac agagtgaccg	40
	<210> 94	
	<211> 43	
25	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 94	
	cttaagaag gagatatacc atgcaggtgc agctggtgca gtc	43
30	<210> 95	
	<211> 46	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 95	
	cttaagaag gagatatacc atgcaggtca acttaaggga gtctgg	46
	<210> 96	
40	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 96	
45	cttaagaag gagatatacc atgaggtgca gctgctgcag tc	42
	<210> 97	
	<211> 42	
	<212> ADN	
50	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 97	
	cttaagaag gagatatacc atgaggtgca gctgctggag tc	42
	<210> 98	
55	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 98	
60	cttaagaag gagatatacc atgaggtgca gctgctgcag tc	42
	<210> 99	
	<211> 42	
	<212> ADN	
65	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 99	

	ctttaagaag gagatatacc atgaggtgca gctggtggag tc	42
5	<210> 100 <211> 43 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 100 ctttaagaag gagatatacc atgcaggtac agctgcagca gtc	43
15	<210> 101 <211> 43 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 101 ctttaagaag gagatatacc atgcaggtac agctgcagga gtc	43
25	<210> 102 <211> 43 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 102 ctttaagaag gagatatacc atgcaggtgc agctgcagca gtc	43
35	<210> 103 <211> 43 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 103 ctttaagaag gagatatacc atgcaggtgc agctgcagga gtc	43
45	<210> 104 <211> 67 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 104 atcgtatggg tagctgtcc cttagtgtg gtggtgtgg tgaactctct tgtccacct ggtgtg 67	60
55	<210> 105 <211> 67 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 105 atcgtatggg tagctgtcc cttagtgtg gtggtgtgg tgaactgtct tgtccacct ggtgtg 67	60
65	<210> 106 <211> 67 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 106 atcgtatggg tagctgtcc cttagtgtg gtggtgtgg tgaacttct tgtccacct ggtgtg 67	60
	<210> 107 <211> 44 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 570 460 T3

	<400> 107 ctttaagaag gagatatacc atggacatcc agatgaccca gtct	44
5	<210> 108 <211> 44 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 108 ctttaagaag gagatatacc atggacatcg agatgaccca gtct	44
15	<210> 109 <211> 44 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 109 ctttaagaag gagatatacc atggacatcg agatgaccca gtct	44
25	<210> 110 <211> 44 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 110 ctttaagaag gagatatacc atggacatcg tgatgaccca gtct	44
35	<210> 111 <211> 46 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 111 ctttaagaag gagatatacc atggatattg tgatgactca gtctcc	46
45	<210> 112 <211> 46 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 112 ctttaagaag gagatatacc atggatattg tctgactca gtctcc	46
55	<210> 113 <211> 46 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 113 ctttaagaag gagatatacc atggaaattg tgtgacgca gtctcc	46
65	<210> 114 <211> 45 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 114 ctttaagaag gagatatacc atggaaacga cactcagca gtctc	45
	<210> 115 <211> 46 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 115 atcgtatggg tagctgtcc cttaacactc tcccctgtg aagctc	46

ES 2 570 460 T3

5	<210> 116 <211> 43 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 116 ctttaagaag gagatatacc atgcagtctg tgctgactca gcc	43
10	<210> 117 <211> 43 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 117 ctttaagaag gagatatacc atgcagtctg ccctgactca gcc	43
20	<210> 118 <211> 43 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 118 ctttaagaag gagatatacc atgtcctatg agctgacaca gcc	43
30	<210> 119 <211> 43 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 119 ctttaagaag gagatatacc atgtcctatg agctgactca gcc	43
35	<210> 120 <211> 46 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 120 atcgtatggg tagctgtgcc cttatgaaca ttccgcaggg gcaact	46
45	<210> 121 <211> 46 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 121 atcgtatggg tagctgtgcc cttatgaaca ttctgcaggg gcaact	46
50	<210> 122 <211> 46 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<400> 122 atcgtatggg tagctgtgcc cttatgaaca ttccgtaggg gcaact	46
60	<210> 123 <211> 46 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
65	<400> 123 atcgtatggg tagctgtgcc cttatgaaca ttccgcaggg gctact	46
	<210> 124 <211> 46	

ES 2 570 460 T3

	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
5	<400> 124 atcgtatggg tagctggtcc cttatgaaca ttctgtaggg gcaact	46
	<210> 125	
	<211> 46	
10	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 125 atcgtatggg tagctggtcc cttatgaaca ttctgtaggg gctact	46
15	<210> 126	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 126 ctttaagaag gagatatacc atg	23
	<210> 127	
	<211> 24	
25	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 127 atcgtatggg tagctggtcc cttatgaaca	24
30	<210> 128	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 128 ctttaagaag gagatatacc atgcaggtkc agctggtgca g	41
	<210> 129	
40	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 129 ctttaagaag gagatatacc atgcaggtkc agctggtgca g	41
	<210> 130	
	<211> 41	
50	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 130 ctttaagaag gagatatacc atgsagggtcc agctggtgaca g	41
55	<210> 131	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 131 ctttaagaag gagatatacc atgcaratgc agctggtgca g	41
	<210> 132	
	<211> 41	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 570 460 T3

	<400> 132 ctttaagaag gagatatacc atgcagatca ccttgaagga g	41
5	<210> 133 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 133 ctttaagaag gagatatacc atgcaggtca ccttgargga g	41
15	<210> 134 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 134 ctttaagaag gagatatacc atggargtgc agctggtgga g	41
25	<210> 135 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 135 ctttaagaag gagatatacc atgcaggtgc agctggtgga g	41
35	<210> 136 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 136 ctttaagaag gagatatacc atggaggtgc agctgttga g	41
45	<210> 137 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 137 ctttaagaag gagatatacc atgcagstgc agctgcagga g	41
55	<210> 138 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 138 ctttaagaag gagatatacc atgcaggtgc agctacagca g	41
65	<210> 139 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 139 ctttaagaag gagatatacc atggargtgc agctggtgca g	41
	<210> 140 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 140 ctttaagaag gagatatacc atgcaggtac agctgcagca g	41
	<210> 141	

ES 2 570 460 T3

	<211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
5	<400> 141 cttaagaag gagatatacc atgcaggtac agctggtgca a	41
10	<210> 142 <211> 48 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> VH-lfp	
	<400> 142 cttaagaag gagatatacc atgaactbtc ttgtccacct tgggtgtg	48
20	<210> 143 <211> 49 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> VH-rfp	
	<400> 143 atcgtatggg tagctgtgcc ctaaactbt ctgtccacc tgggtgtg	49
30	<210> 144 <211> 45 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> VL(k)-lfp	
40	<400> 144 cttaagaag gagatatacc atgacactct ccctgttga agctc	45
45	<210> 145 <211> 46 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> VL(k)-rfp	
50	<400> 145 atcgtatggg tagctgtgcc ctaacactc tcccctgtg aagctc	46

REIVINDICACIONES

1. Método de producción de un fragmento Fab de inmunoglobulina que comprende las siguientes etapas:

- 5 - proporcionar una célula única productora de inmunoglobulina,
- obtener a partir de dicha célula el ácido nucleico que codifica los dominios variables de la cadena ligera y pesada de inmunoglobulina, que también codifica una parte del dominio constante de la cadena ligera y una parte del dominio C_H1 de la cadena pesada, con un método que comprende las siguientes etapas:
- 10 - realizar una primera reacción en cadena de la polimerasa con cuatro a seis cebadores 5' y un cebador 3',
- realizar con el producto de la primera reacción en cadena de la polimerasa una segunda reacción en cadena de la polimerasa con trece a quince cebadores 5' y un cebador 3',
- 15 por el cual en la segunda reacción en cadena de la polimerasa el cebador 3' es el mismo que en la primera reacción en cadena de la polimerasa y al menos un cebador 5' se cambia, y
por el cual en la segunda reacción en cadena de la polimerasa el número de nucleótidos entre el extremo 5' de cada uno de los cebadores 5' y el extremo 3' del cebador 3' se reduce en comparación con el número de nucleótidos entre el extremo 5' de cada uno de los cebadores 5' y el extremo 3' del cebador 3' en la primera reacción en cadena de la polimerasa, cuando se une al ácido nucleico que va a amplificarse,
- 20 - generar una matriz de expresión lineal que comprende el ácido nucleico obtenido,
- traducir *in vitro* dicho ácido nucleico y así producir el fragmento Fab de inmunoglobulina.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que los cebadores 5' empleados en la primera reacción en cadena de la polimerasa se unen en la región codificante para el péptido conductor de la inmunoglobulina.
- 25 3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que los cebadores 5' empleados en la segunda reacción en cadena de la polimerasa se unen en la región codificante para la primera región estructural de la inmunoglobulina.
- 30 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que los cebadores empleados en la segunda reacción en cadena de la polimerasa proporcionan nucleótidos protuberantes que codifican el codón de iniciación de la traducción ATG para el cebador 5' y/o el codón de terminación de la traducción TTA para el cebador 3'.
- 35 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que dicho método comprende la primera etapa de:
- proporcionar una única célula y obtener el ARNm de dicha célula.
- 40 6. Método según la reivindicación 5, caracterizado por que dicho método comprende la siguiente segunda etapa:
- obtener ADNc de dicho ARNm con una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.
- 45 7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que seis cebadores 5' y un cebador 3' se emplean en la primera reacción en cadena de la polimerasa.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que cuatro cebadores 5' y un cebador 3' se emplean en la primera reacción en cadena de la polimerasa.

Fig. 1A

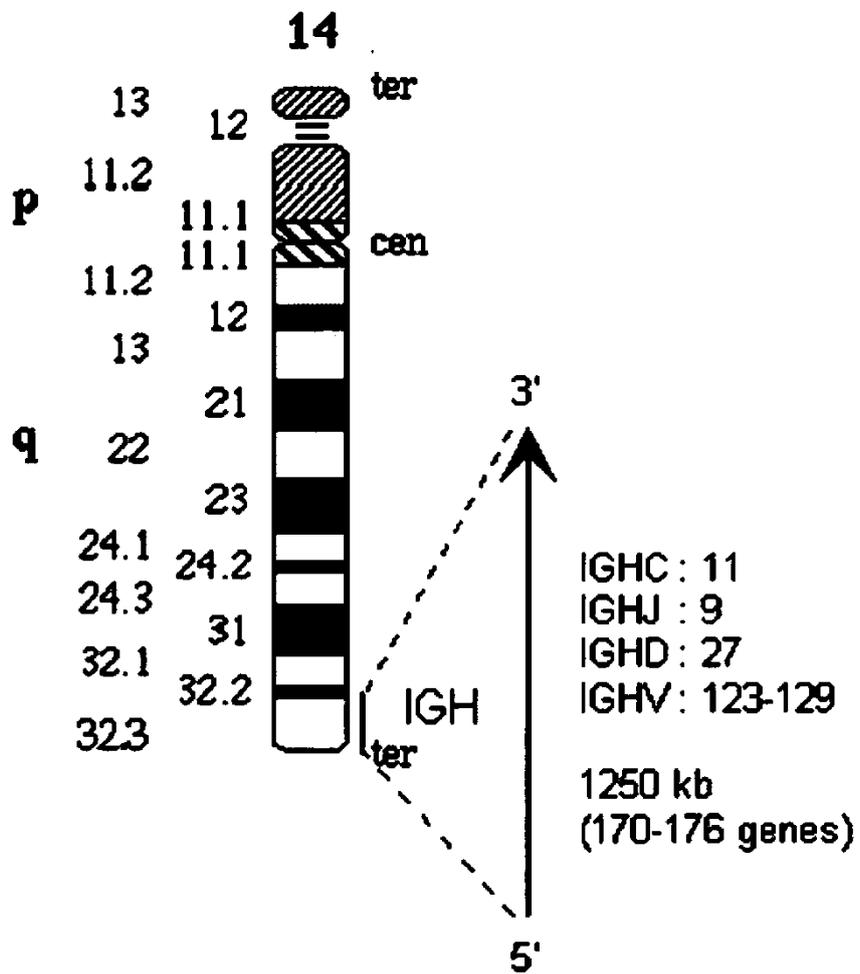


Fig. 1B

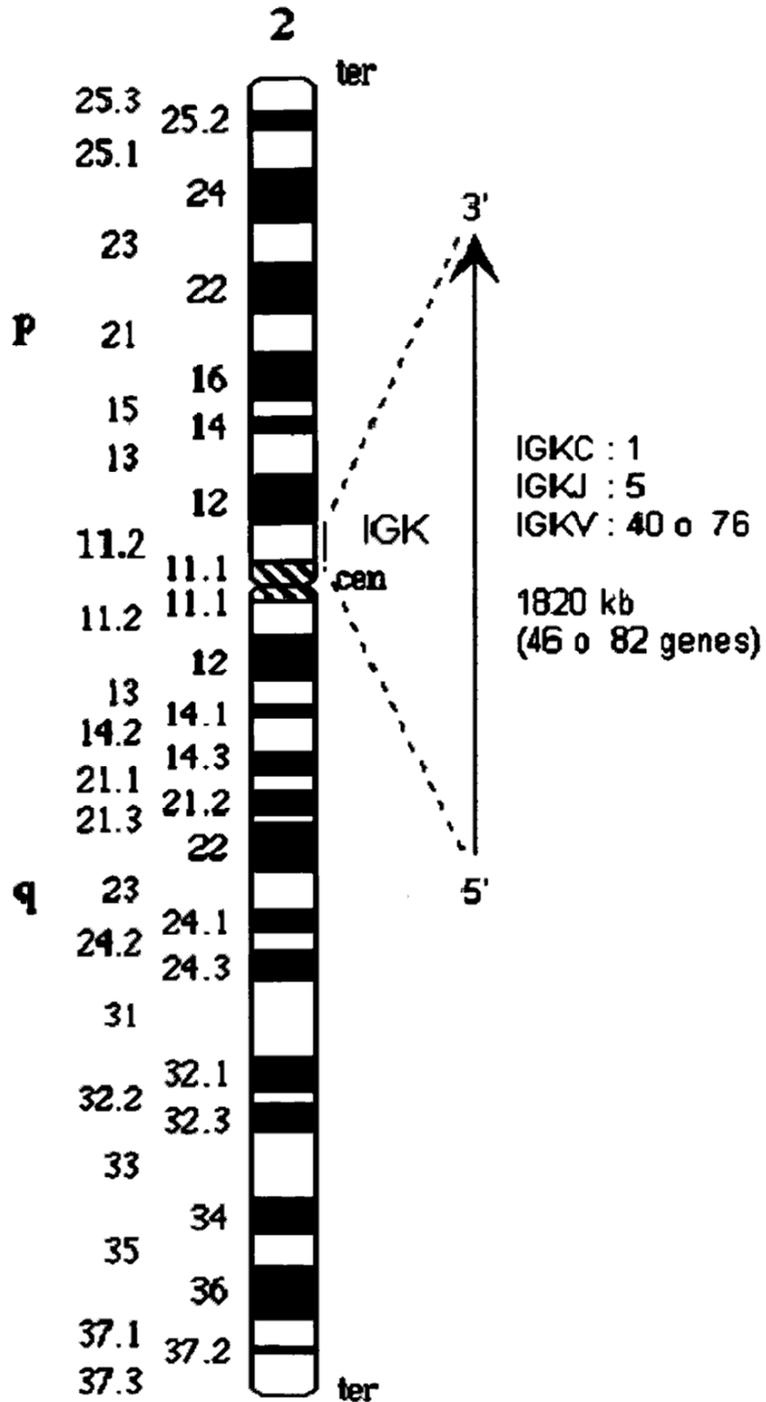
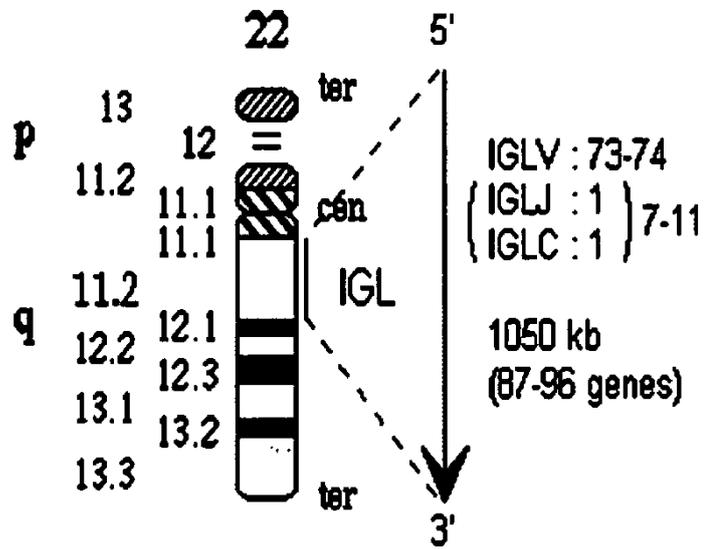


Fig. 1C



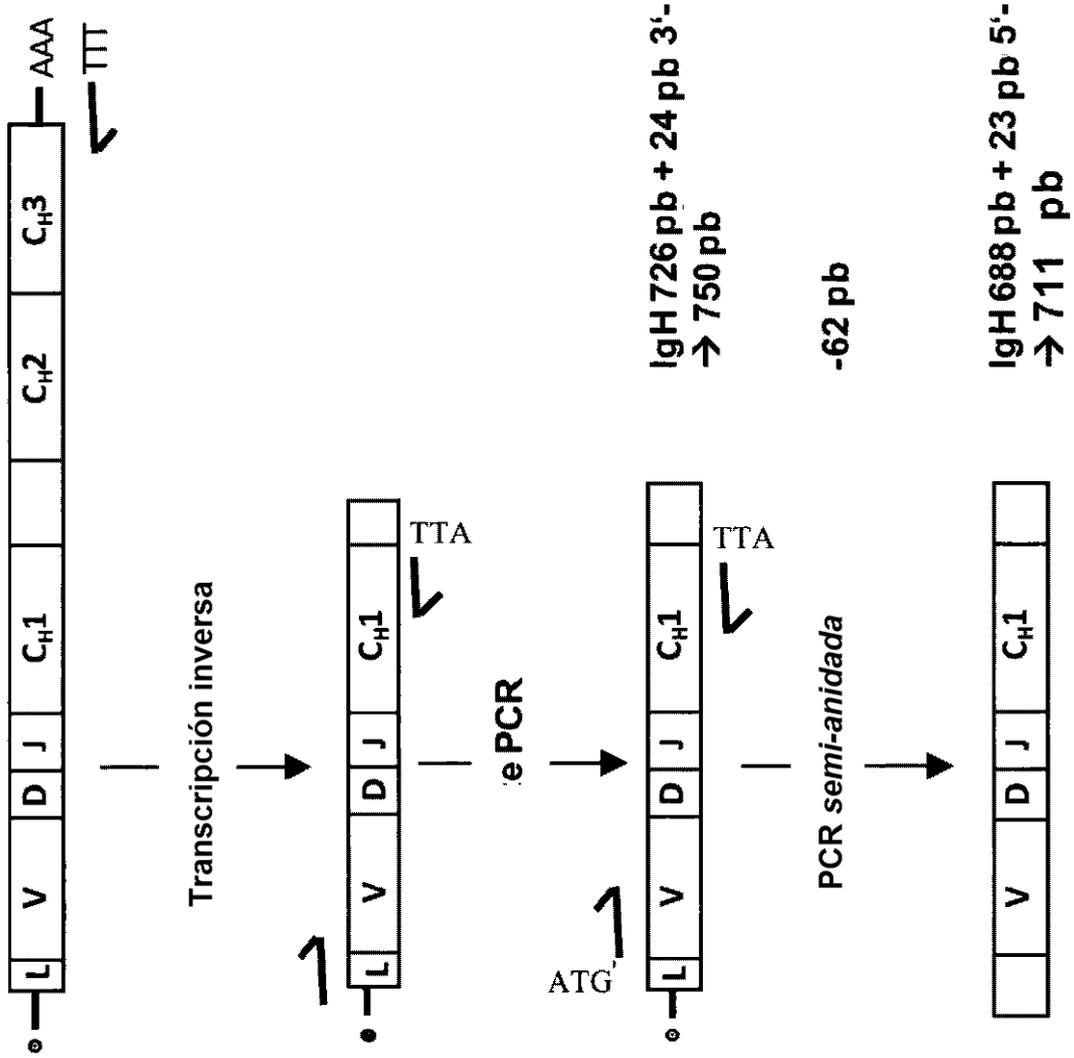
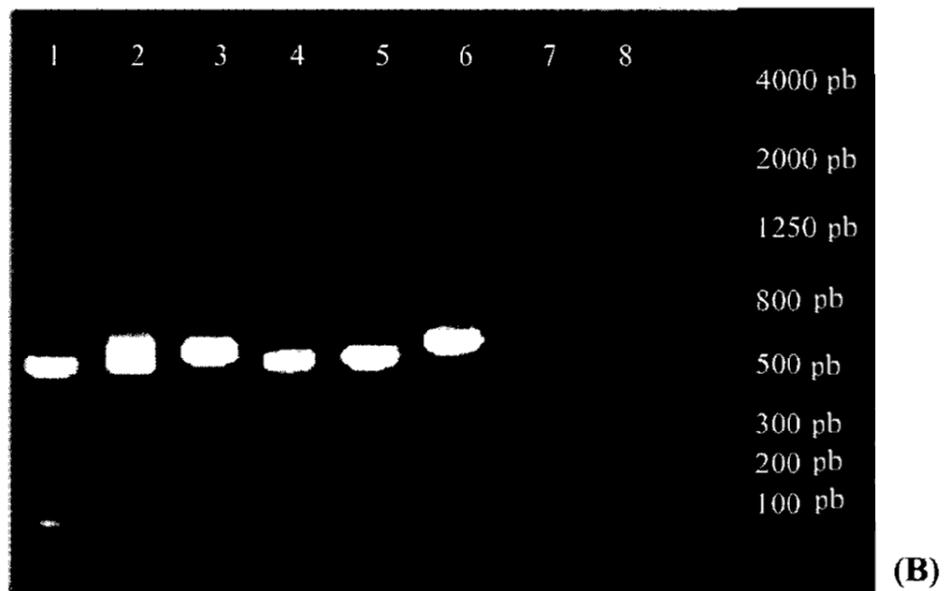
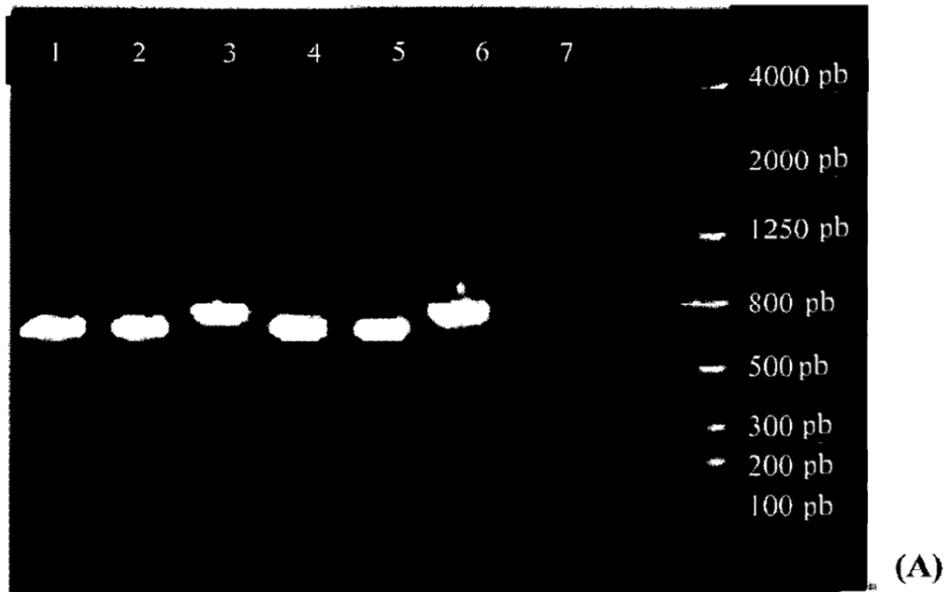


Fig. 2

Fig. 3



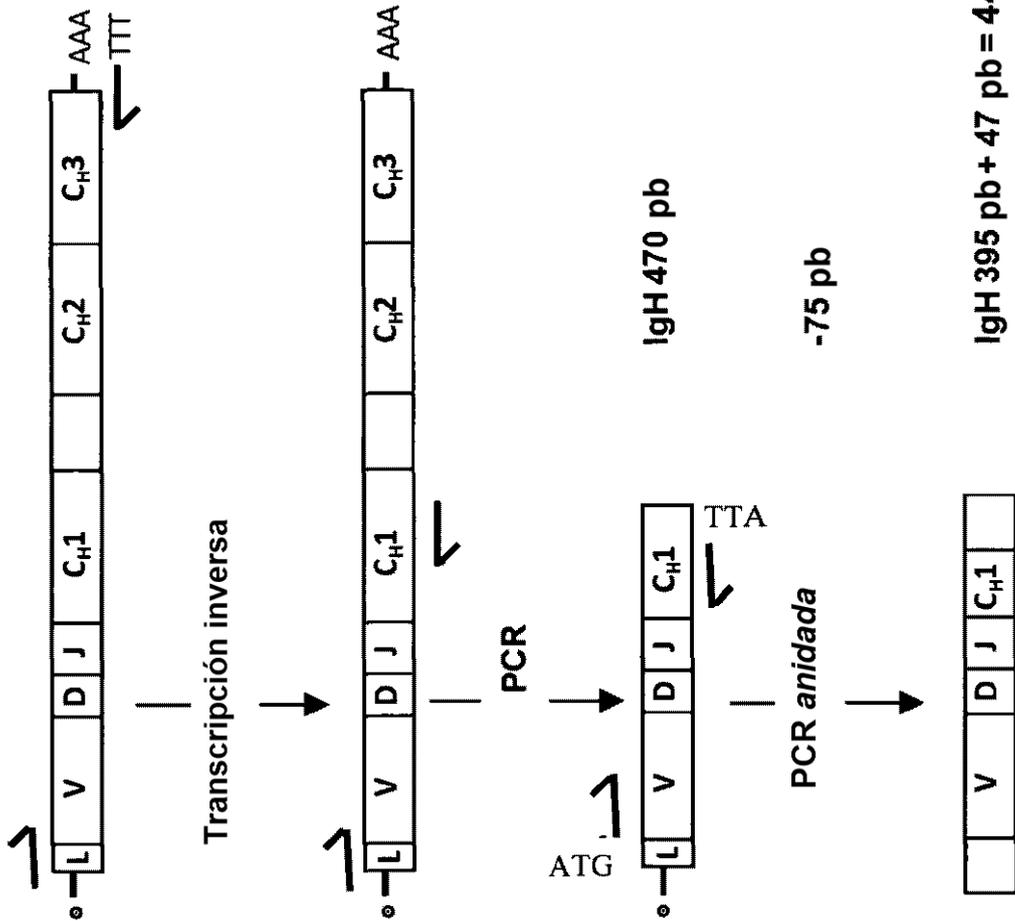
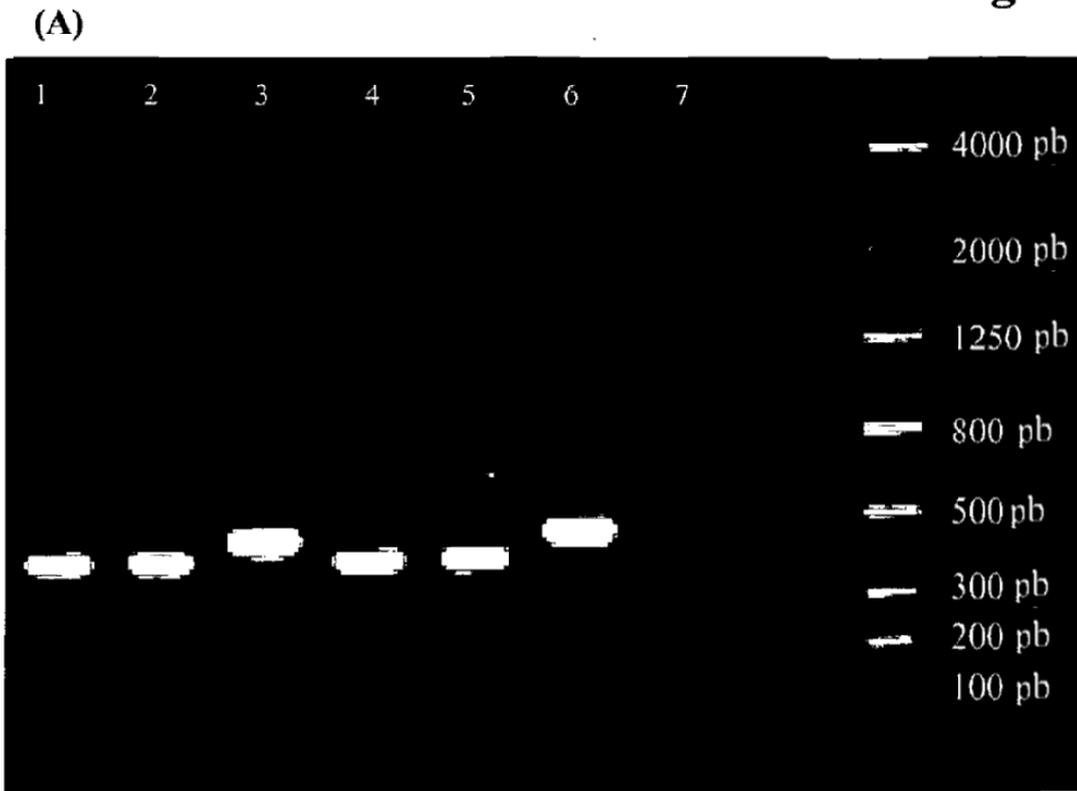


Fig. 4

Fig. 5



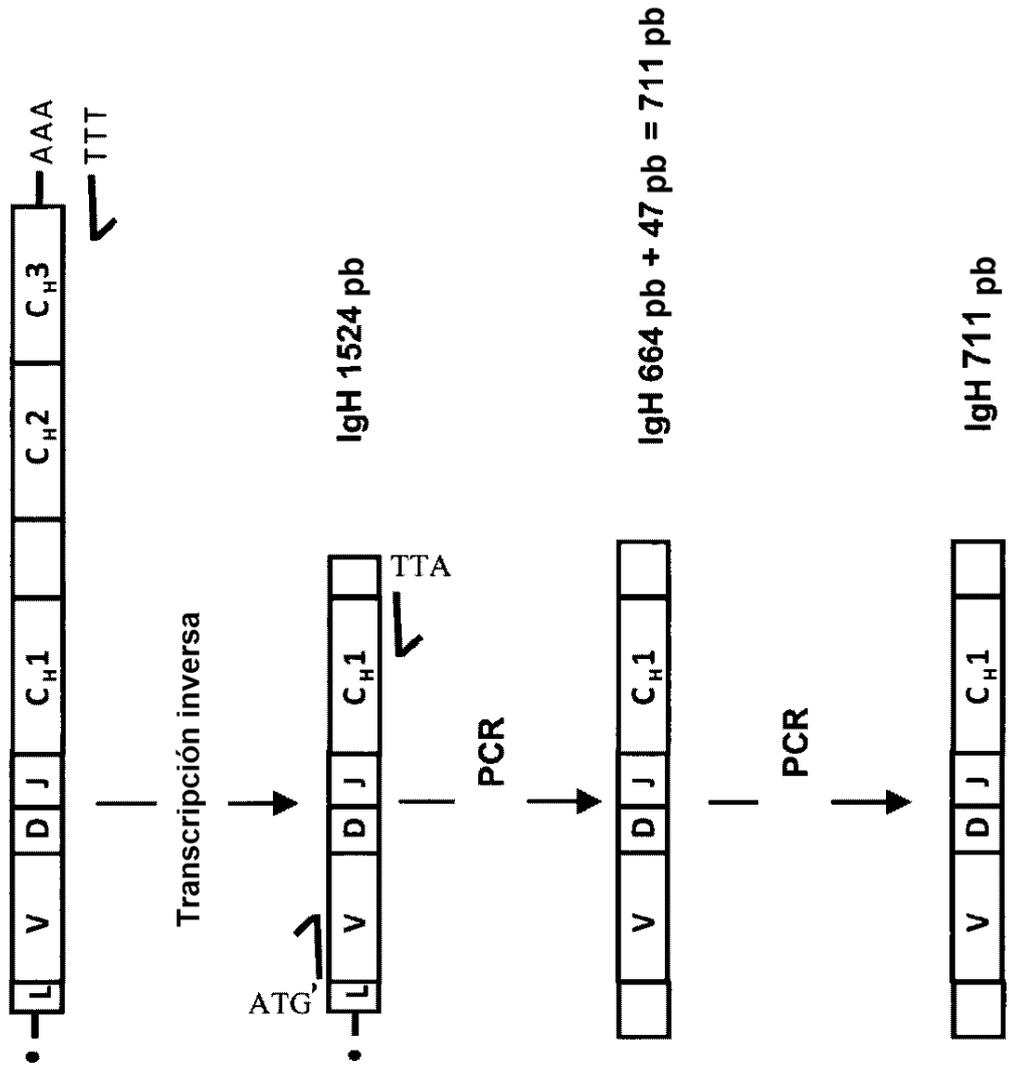


Fig. 6

Fig. 7

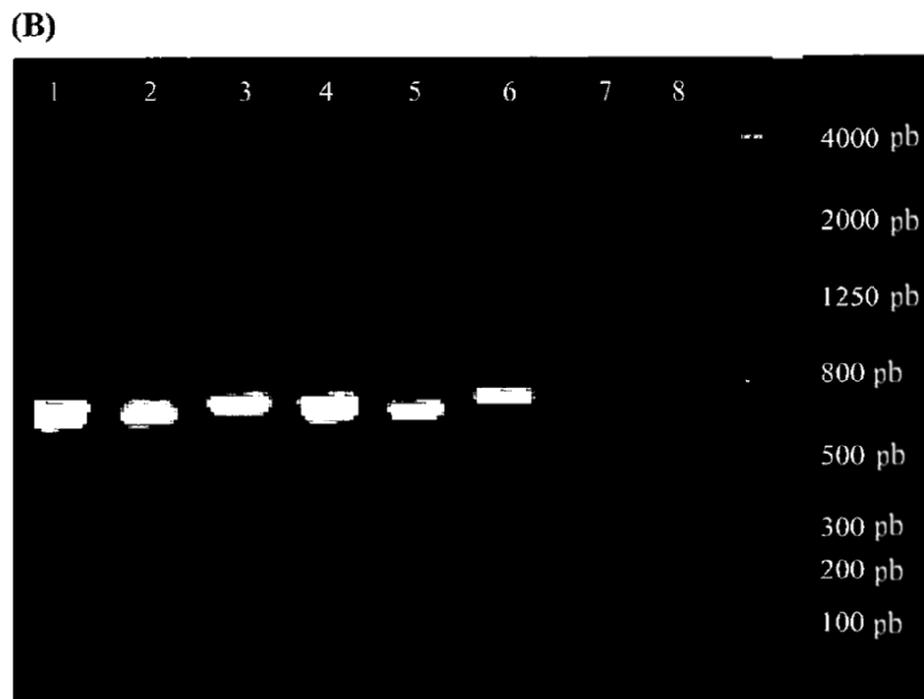
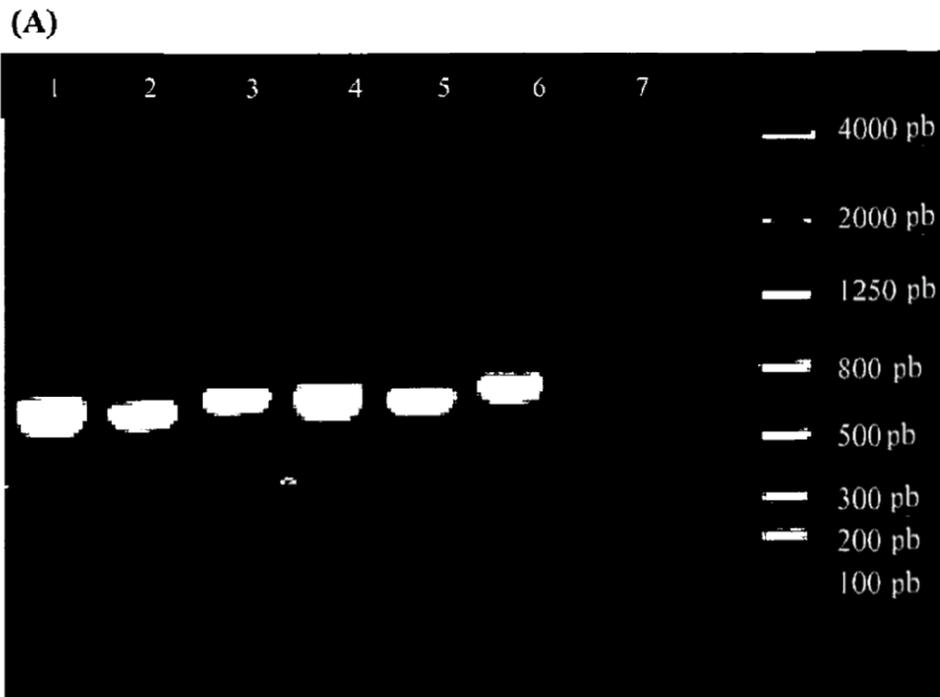


Fig. 8

PCR de extensión por solapamiento

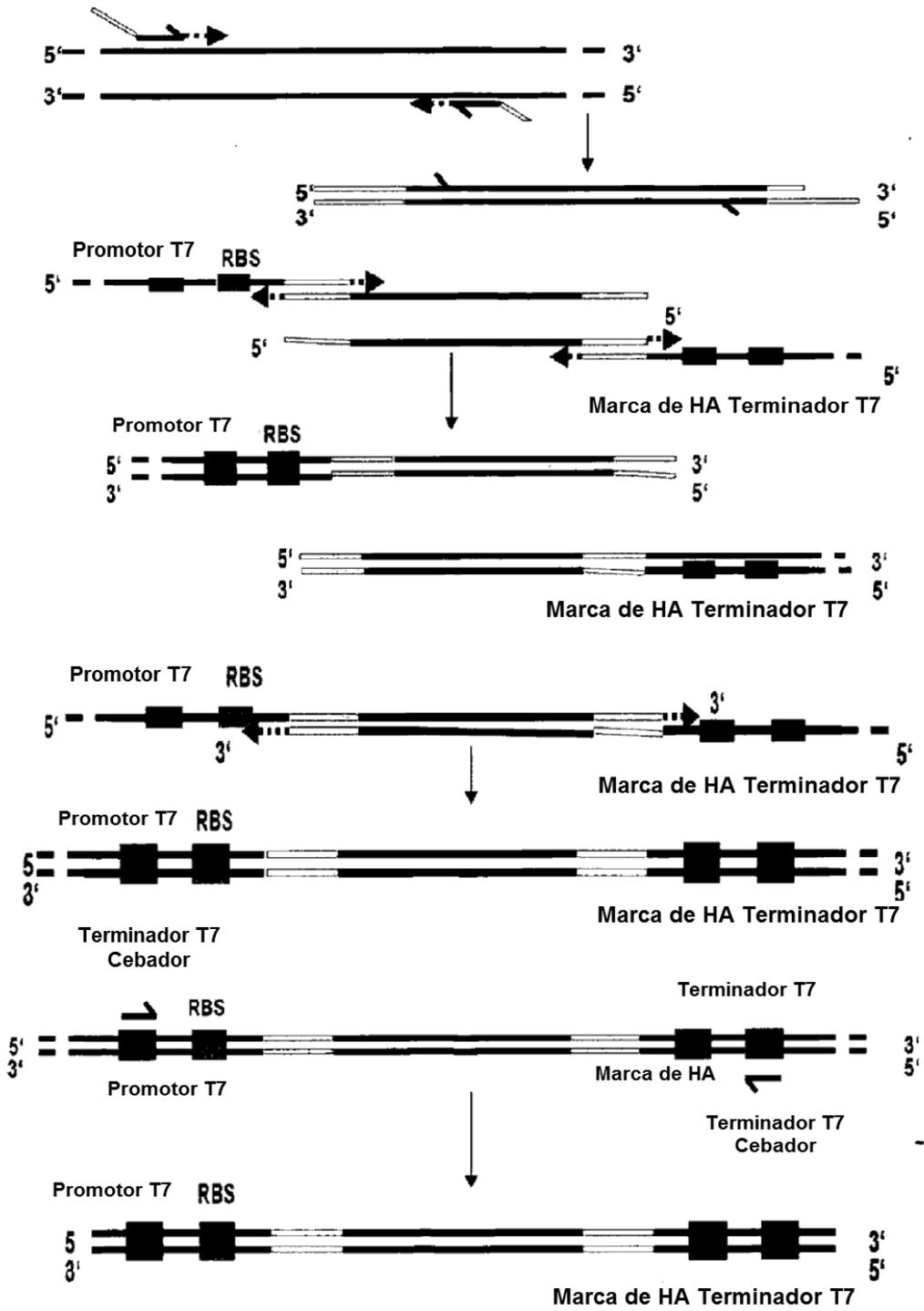


Fig. 9

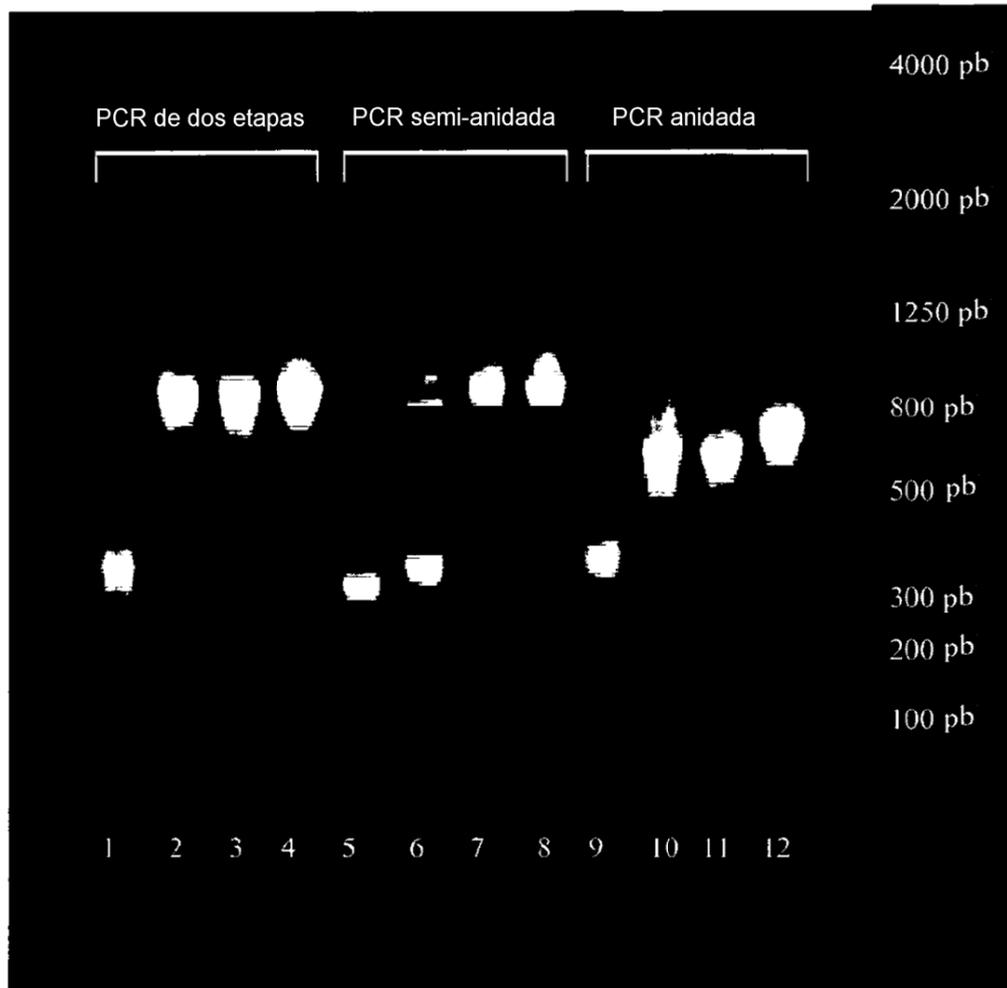


Fig. 10

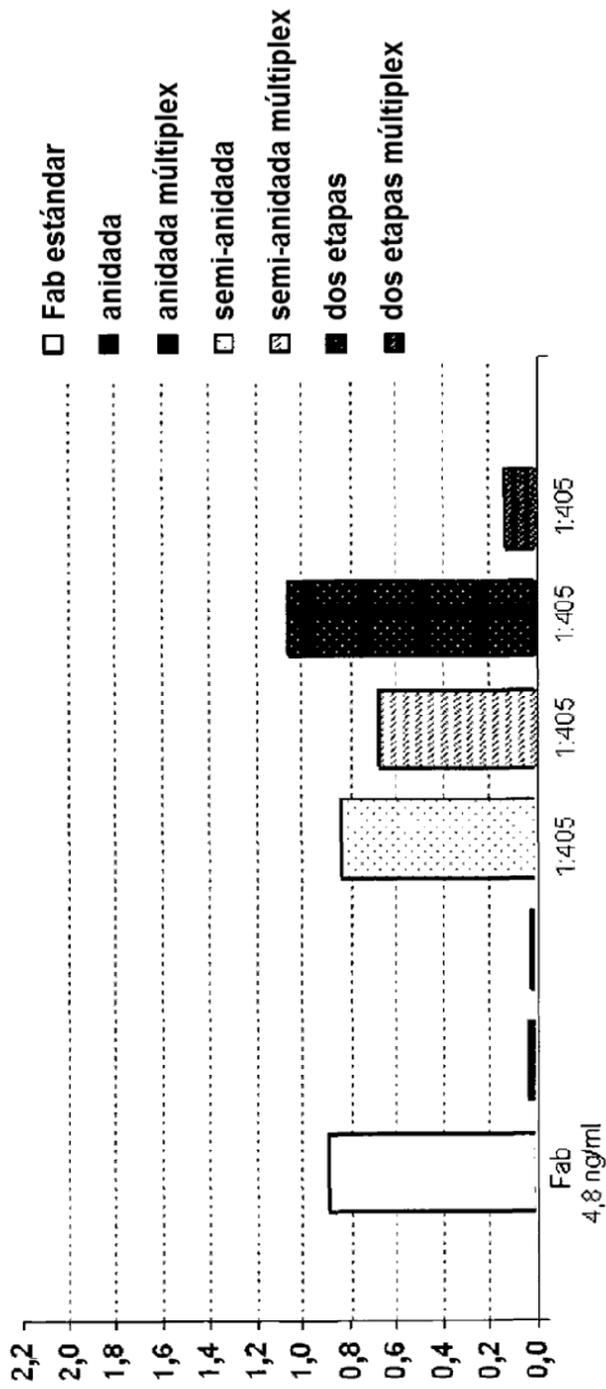


Fig. 11

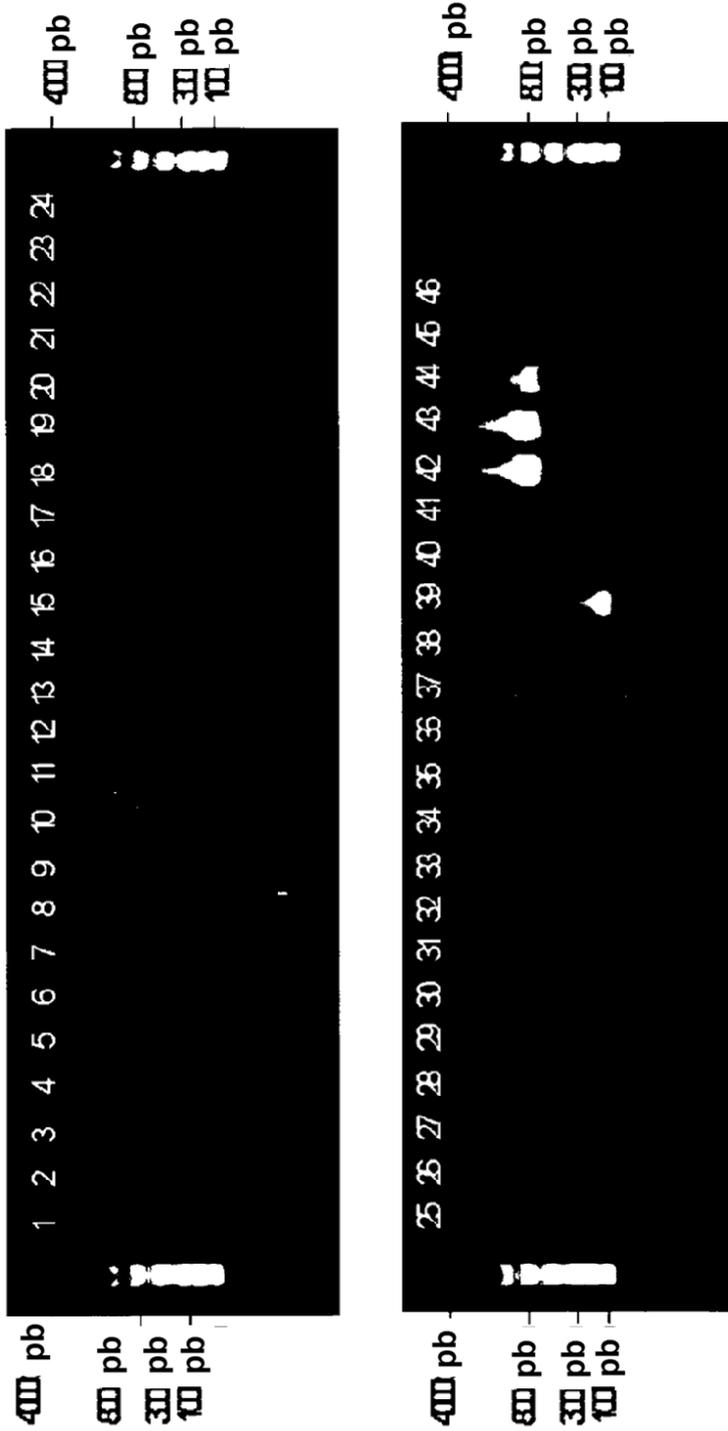


Fig. 12

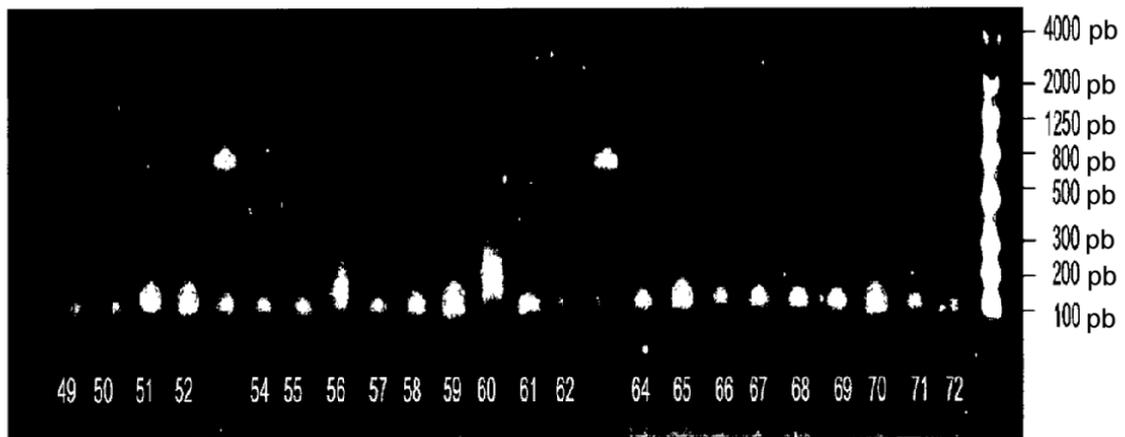
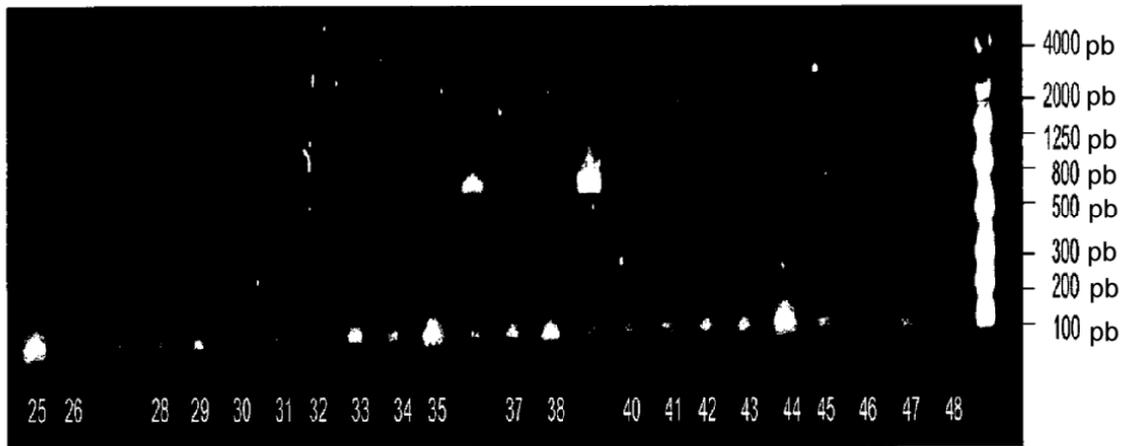
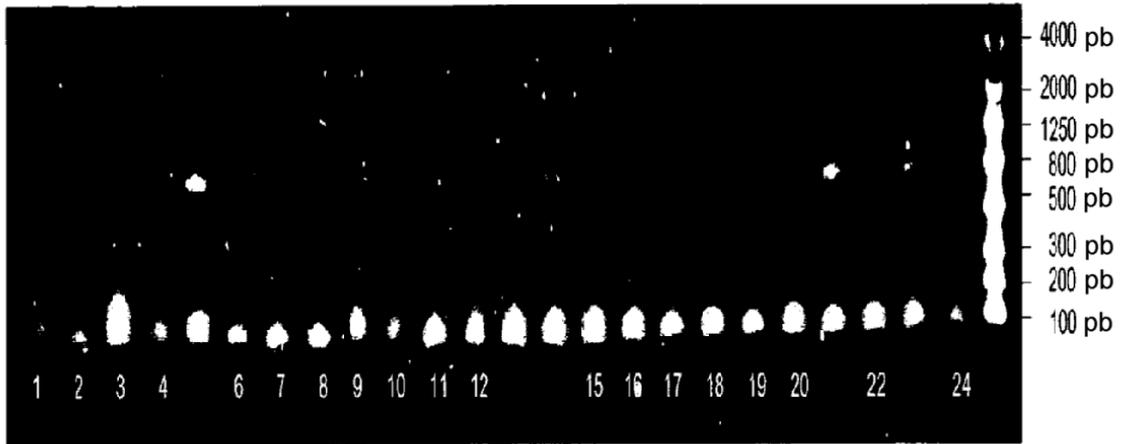


Fig. 13

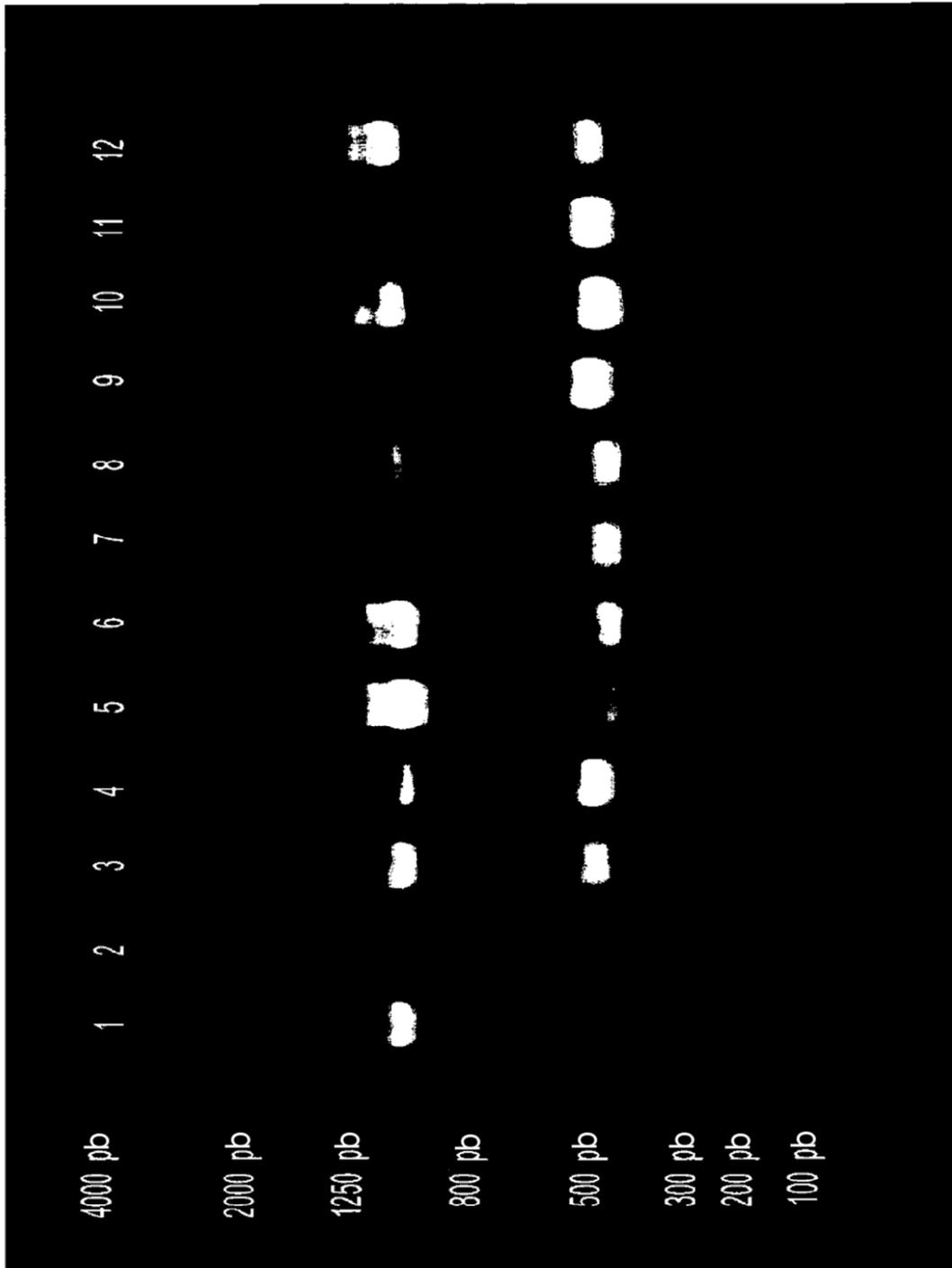


Fig. 14

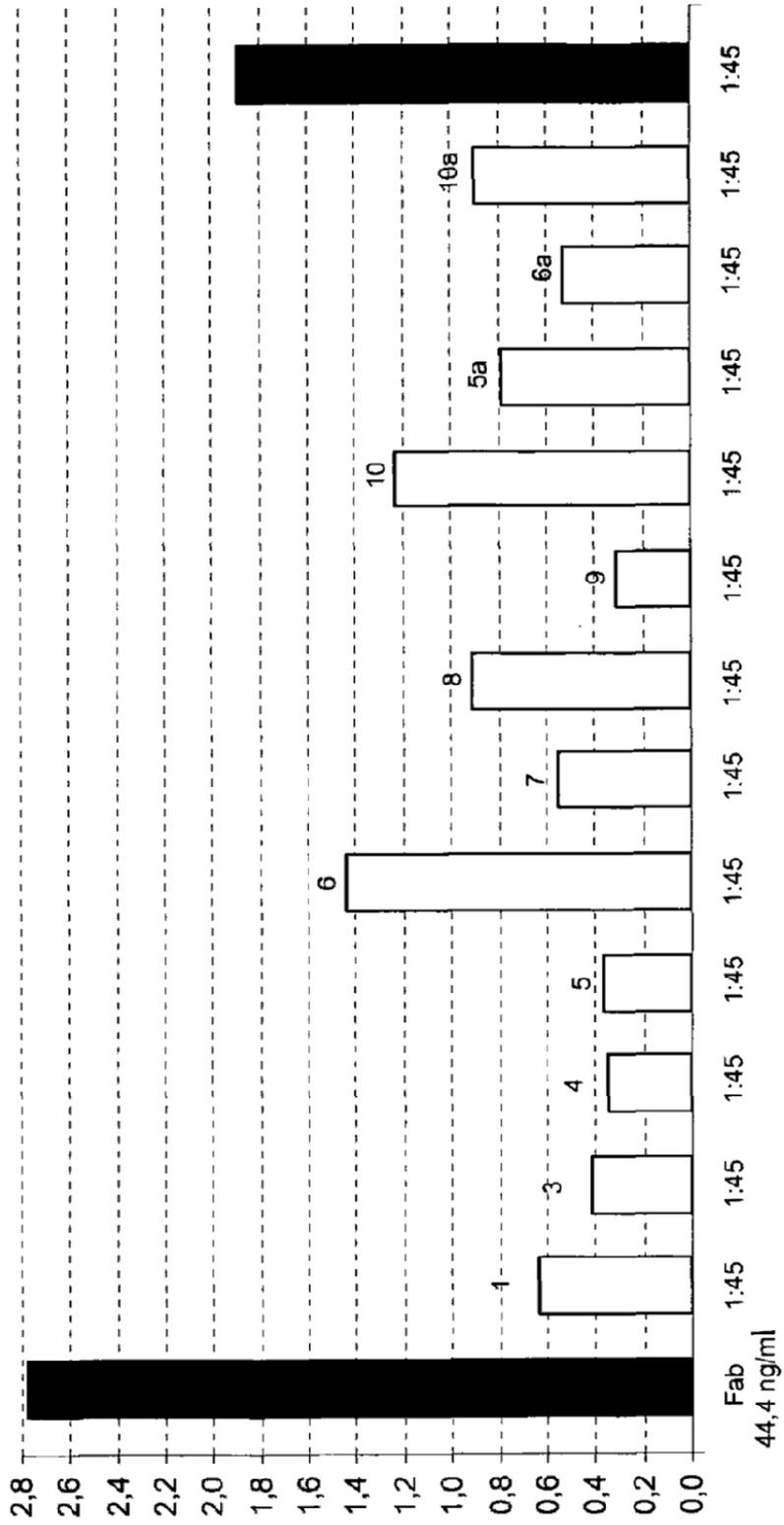


Fig. 15

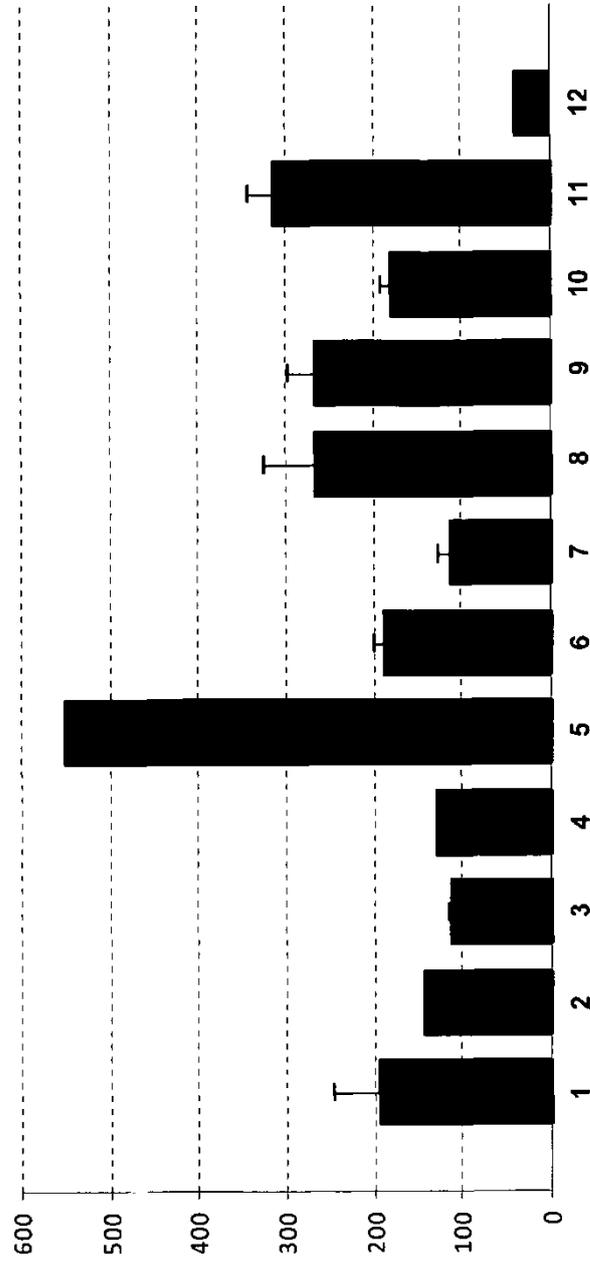


Fig. 16

