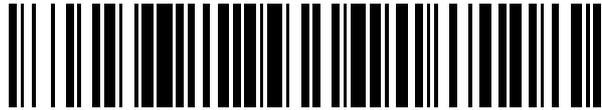


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 311**

21 Número de solicitud: 201131152

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

06.07.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

11.02.2013

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (100.0%)
Serrano, 117
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**FRAILE DE PAZ, Sofia;
ZAFRA AMORÓS, Olga;
JIMÉNEZ ZARCO, José Ignacio y
DE LORENZO PRIETO, Víctor**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Procedimiento para la obtención de anticuerpos monoclonales a partir de muestras complejas de antígenos.**

57 Resumen:

Procedimiento para la obtención de anticuerpos monoclonales a partir de muestras complejas de antígenos.

La presente invención se refiere a un proceso de selección, en un solo paso, de dominios variables de anticuerpos, preferiblemente de camello, unidos a fagos, de gran afinidad y especificidad para un antígeno concreto o diversas proteínas que comparten epítomos comunes. Además el procedimiento incluye de forma preferente una amplificación de los fagos que comprenden los dominios variables de interés, mediante la infección de bacterias por dichos fagos, lo que permite la obtención de un elevado número de copias del mismo anticuerpo, lo que permite su utilización en diferentes campos.

ES 2 395 311 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la obtención de anticuerpos monoclonales a partir de muestras complejas de antígenos.

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biotecnología.

5 Específicamente, se refiere a un proceso de selección, en un solo paso, de dominios variables de anticuerpos unidos a fagos, preferiblemente de camello, de gran afinidad y especificidad para un antígeno concreto o diversas proteínas que comparten epítomos comunes. Dicho método incluye preferiblemente una amplificación de los fagos obtenidos mediante

10 la infección de bacterias para obtener gran número de copias del mismo anticuerpo.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

15 La producción de anticuerpos se ha convertido en uno de los elementos más estudiados y con mayor número de aproximaciones experimentales debido a la variedad de antígenos existentes y la necesidad de encontrar anticuerpos con alta afinidad para su reconocimiento. La mayor parte de las investigaciones se han centrado en el desarrollo de hibridomas para la

20 producción de anticuerpos monoclonales frente a un antígeno concreto.

De forma más reciente, y de forma alternativa a la formación de hibridomas, se han empezado a utilizar las librerías de DNA para generar anticuerpos. Las librerías derivadas de genes de cadenas pesadas y

25 ligeras permiten por recombinación, la generación de múltiples anticuerpos diferentes con diferentes afinidades lo que permite, si la biblioteca es suficientemente amplia, encontrar anticuerpos con alta afinidad frente al antígeno de interés. De cualquier forma cabe indicar que, si bien las librerías de anticuerpos que se pueden obtener cubren un amplio abanico

30 de antígenos, el número de anticuerpos que se puede obtener contra un antígeno de interés, así como su afinidad, aumenta sensiblemente cuando

se realiza la inmunización previa del animal con el antígeno purificado en presencia de un coadyuvante (Nguyen *et al.* 2001. *Adv Immunol.* 79:261-296).

5 Existen múltiples ejemplos en los cuales se demuestra que para obtener fragmentos capaces de unirse a un antígeno no es necesaria la producción del anticuerpo completo, sino únicamente expresar de forma recombinante regiones del anticuerpo que comprenden los dominios variables de la cadena pesada (VH) y ligera (VL) (Sundberg & Mariuzza, 2002. *Adv. Protein Chem.*, 61:119-160) de forma que generen un fragmento monovalente (Fab) o dominios variables de cadena sencilla (scFV) que combinan fragmentos VH y VL unidos covalentemente por una secuencia polipeptídica (Harmsen & De Haard. 2007, *Appl Microbiol. Biotechnol.*, 77:13-22).

15

A partir de estas bibliotecas, se ha desarrollado la producción recombinante en bacterias de fragmentos pequeños de anticuerpos que conservan la capacidad de unir antígenos de las inmunoglobulinas completas. Esta producción bacteriana ha expandido de forma notable las aplicaciones biotecnológicas de los anticuerpos recombinantes en diversos campos que van desde el diagnóstico y la terapia a la proteómica (Cartes & Merchant, 20 1997. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8:449-454).

Los fragmentos pequeños de anticuerpos previamente mencionados, 25 presentan diversas limitaciones como por ejemplo, la escasa solubilidad o la baja afinidad por el antígeno (Ward *et al.* 1989, *Nature*, 341: 544-546). Sin embargo, el descubrimiento posterior de anticuerpos que carecen de cadenas ligeras por parte de miembros de la familia de los camélidos (Hamers-Casterman *et al.* 1993, *Nature*, 363:446-448) supuso un punto de inflexión en la producción recombinante de dominios variables (VHH o 30 nanobodies) con capacidad de unir antígenos. Los VHH procedentes de

camellos son más estables y por lo tanto más fáciles de producir, por lo que se han desarrollado diferentes estrategias para aislar anticuerpos que reconozcan específicamente un antígeno a partir de diferentes librerías (Harmsen & De Haard. 2007, *Appl Microbiol. Biotechnol.*, 77:13-22).

5

Uno de los procedimientos más comunes para el análisis de extensas librerías de anticuerpos es el conocido como *phage-display*. Mediante esta técnica, que relaciona el fenotipo y el genotipo de una proteína, los anticuerpos de interés son expresados como una fusión a la proteína (PIII) del fago M13 lo que permite la identificación y aislamiento de genes que codifican para VHH que reconocen específicamente un antígeno dentro de una librería (Dufner *et al.* 2006, *Trends Biotechnol.* 24:523-529).

10

Esta técnica, a pesar de encontrarse ampliamente extendida, es un proceso lento y laborioso que limita considerablemente las aplicaciones biotecnológicas que se le pueden dar a las librerías de nanobodies.

15

Por todo ellos, sigue existiendo la necesidad de obtener anticuerpos frente a multitud de antígenos con una alta afinidad, y un método de selección sencillo rápido y fiable que acorte los procesos de producción y permita la obtención de anticuerpos mejores mediante métodos sencillos y baratos.

20

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para la selección de anticuerpos de bibliotecas denominado *western-panning*, el cual permite una selección rápida de anticuerpos con elevada especificidad y afinidad por el antígeno de interés. Dicha selección permite seleccionar anticuerpos tanto frente a las proteínas utilizadas para la obtención del anticuerpo como frente a proteínas que no han sido utilizadas para la obtención de los anticuerpos pero que presentan epítomos comunes como por ejemplo,

30

aunque sin limitarse enzimas que catalizan reacciones similares.

En la presente invención se demuestra como los inventores han desarrollado un método para la selección de anticuerpos unidos a fagos, y para su amplificación de forma fácil y sencilla. Además de la selección de anticuerpos frente a una proteína de interés, se demuestra que la presente invención también permite la selección de anticuerpos frente a antígenos que presentan epítomos comunes con una proteína de interés. Además, como se observa en los ejemplos, el método descrito presenta como ventaja frente a métodos de selección convencionales como el *panning*, una mayor especificidad de los anticuerpos seleccionados llevando a cabo un menor número de rondas de selección.

Por todo ello un primer aspecto de la invención se refiere a un método de selección de anticuerpos (de ahora en adelante método de la invención) que comprende:

- a) fijar al menos una proteína de interés a una membrana,
- b) poner en contacto una librería de dominios variables de anticuerpos unidos a fagos con la membrana del paso (a),
- c) recoger la región de la membrana que contiene los dominios variables de los anticuerpos del paso (b) unidos a la proteína de (a), y
- d) eluir los dominios variables de los anticuerpos unidos a la proteína de interés.

Se entiende por anticuerpo en la presente invención a glicoproteínas de la familia de las inmunoglobulinas, caracterizadas porque tienen propiedades de unión a antígenos. Este término "anticuerpo" incluye anticuerpos tanto monoclonales como policlonales que pertenecen a cualquier clase de anticuerpos, por ejemplo, IgG, IgD, IgM, IgA, IgE o derivados de los mismos. El término anticuerpo no pretende limitarse a una fuente particular del anticuerpo o a la forma en que se produce. El anticuerpo puede ser

obtenido de un ser humano o animal o mediante técnicas de DNA recombinante o síntesis química de genes.

5 Se entiende por “dominios variables” a las regiones dentro de los anticuerpos que participan en el reconocimiento específico del antígeno. Son conocidas como variables puesto que su naturaleza y secuencia varían en cada anticuerpo en función de su especificidad mientras que el resto de la proteína conserva una estructura constante.

10 Se entiende por “fago” en la presente invención aquellos virus que presentan capacidad infectiva y que aprovechan la maquinaria de la célula infectada para llevar a cabo su propia replicación.

15 La proteína del paso (a) se puede encontrar tanto en forma nativa como desnaturalizada, en función de lo que se requiera en cada caso, ya que algunos anticuerpos solo reconocen regiones de la proteína en conformaciones específicas mientras que otros reconocen regiones expuestas tanto en forma nativa como desnaturalizada. La proteína desnaturalizada presenta más regiones expuestas que pueden permitir la
20 selección de un mayor número de anticuerpos frente a diversos epítomos. Por todo ello, en una realización preferida del método de la invención la proteína se encuentra desnaturalizada.

25 Se entiende por “conformación nativa” en la presente invención, aquella conformación tridimensional de la proteína cuando se encuentra en su estado natural y que es responsable de la actividad de la proteína.

30 El término “proteína desnaturalizada” se refiere en la presente invención, a aquella proteína que pierde su estructura tridimensional característica y que por tanto solo mantiene su estructura primaria la cual está determinada por la secuencia de aminoácidos. Esta desnaturalización se puede realizar por

ejemplo, aunque sin limitarse, mediante calor o el uso de detergentes. Dicha desnaturalización puede ser tanto reversible como irreversible en función bien de las características de la proteína o bien del tratamiento aplicado.

5

En los ejemplos de la presente invención se demuestra que el método es útil para múltiples proteínas con diferentes características como por ejemplo, aunque sin limitarse, BphC (2,3-dihidroxibiphenil-1,2-dioxigenasa) o ArsC (arseniato reductasa). Sin embargo el método de la invención es extrapolable a cualquier tipo de proteínas en función de las necesidades de cada caso. En una realización preferida del método de la invención la proteína del paso (a) se seleccione de la lista que comprende NicX (2,5-dihidroxipiridina dioxigenasa), NBDO (Nitrobenzeno dioxigenasa), BPDO (Bifenil dioxigenasa), BphC, Benzilsuccinato sintasa, Benzoil-CoA reductasa, Lacasa, n-alkano monooxigenasa p-450, LinB (haloalkano dehalogenasa), ArsC o OaGST (glutación-S-transferasa).

10
15

Para llevar a cabo el método de la invención es necesario fijar bien la proteína de interés o bien una proteína que presente epítomos comunes a la proteína de interés, frente a la que se quiere seleccionar el anticuerpo. Esta fijación se puede llevar a cabo sobre cualquier tipo de membrana que presente una alta capacidad de adsorción de proteínas como por ejemplo, aunque sin limitarse, membranas de nitrocelulosa o membranas de PVDF (Polifluoruro de vinilideno). Esta fijación se puede llevar a cabo mediante diversos sistemas conocidos por el experto en la materia, y que serán utilizados en función de las características de las proteínas a fijar. Ejemplos de métodos de fijación son por ejemplo, aunque sin limitarse, la aplicación directa de la proteína sobre la membrana o la aplicación de una solución que contenga la proteína. También se puede llevar a cabo mediante otros métodos más complejos como por ejemplo electrotransferencia desde un gel previamente sometido a una electroforesis. Este segundo sistema

20
25
30

- permite la separación de diversas proteínas de una mezcla en función de diversos parámetros como por ejemplo el tamaño o la carga, para seleccionar la proteína de interés y posteriormente llevar a cabo la selección de los anticuerpos unidos a fagos frente a dicha proteína o
- 5 proteínas que contengan epítomos comunes. Por todo ello, en otra realización preferida del método de la invención, la fijación de la proteína se lleva a cabo mediante electrotransferencia. En otra realización preferida la fijación va precedida de electroforesis.
- 10 En la actualidad existen multitud de fagos conocidos por el experto en la materia que presentan utilidad para llevar a cabo técnicas como el *phage-display*. Los fagos han de presentar la capacidad de integrar en su material genético la secuencia codificante para la fracción de anticuerpo de interés. Esta secuencia se ha de integrar de tal forma que el anticuerpo resultante
- 15 quede unido a una proteína de membrana de forma que quede expuesto hacia el exterior del fago y permita su unión a la proteína de interés sin alterar la estructura del fago de forma que permita su posterior replicación. Además, estos fagos han de presentar preferiblemente la capacidad de infectar bacterias y reproducirse dentro de ellas bien mediante ciclo lítico o
- 20 lisogénico para de esta forma aumentar fácilmente su número y reproducir la fracción de anticuerpo que llevan unida. Dentro de estos fagos se encuentran por ejemplo, aunque sin limitarse, los fagos M13, fd, T4, T7 o lambda. Por todo ello, en una realización preferida de este aspecto de la invención, los fagos a los que se encuentran unidos los dominios variables
- 25 se seleccionan de la lista que comprende fagos M13, fd, T4, T7 y lambda. En una realización aun más preferida de este aspecto de la invención, los fagos a los que se encuentran unidos los dominios variables son fagos M13.
- 30 Los anticuerpos de las familias de los camélidos presentan como ventaja frente a los anticuerpos habitualmente utilizados, que carecen de las

cadenas ligeras. Esto hace que los dominios variables con capacidad de unir antígenos procedentes de anticuerpos de camellos sean mucho más estables y por tanto su manejo y utilización resulte mucho más sencilla que en el caso de utilizar anticuerpos convencionales. Esto hace que sea
5 recomendable el uso de dominios variables de este origen a la hora de la producción recombinante de los anticuerpos. Por todo ello, en una realización preferida del método de la invención, los dominios variables del paso (b) del método de la invención provienen de anticuerpos de un individuo de la familia *camelidae*. En una realización más preferida, el
10 individuo de la familia *camelidae* es *Camellus dromedarius*.

La elución de los anticuerpos unidos a la membrana para su obtención, se puede realizar mediante diversos métodos conocidos en el estado de la técnica como pueden ser por ejemplo, aunque sin limitarse mediante
15 métodos físicos o químicos. Uno de los métodos más comunes es mediante la adición de un tampón que presente una fuerza iónica y un pH adecuados que permita la separación del anticuerpo de la proteína unida a la membrana. Dentro de estos métodos, se encuentran por ejemplo, aunque sin limitarse, la adición de glicina a un pH ácido o la adición directa
20 de ácido clorhídrico. La glicina puede ser aplicada de forma puntual para eluir todos los anticuerpos o bien ir aplicando un gradiente de concentración o fuerza iónica para ir recogiendo los anticuerpos unidos en función de su fuerza de interacción con la proteína unida a la membrana. De estas dos formas de añadir la glicina lo más adecuado es el uso de
25 glicina de forma puntual para eluir los anticuerpos ya que la unión del anticuerpo a la proteína de interés es de elevada especificidad y por tanto muy fuerte, por lo que es necesario aplicar unas condiciones muy agresivas de tratamiento para poder romper dicha unión. Por todo ello, en una realización preferida del método de la invención, la elución del paso (d) se
30 lleva a cabo mediante la adición de glicina. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la elución del paso (d) se lleva a cabo

mediante un gradiente de glicina. En otra realización preferida la elución del paso (d) se lleva a cabo mediante la adición de ácido clorhídrico.

5 El uso de fagos para la expresión en su superficie de los anticuerpos, permite que estos contengan la información genética para la expresión de estos anticuerpos. Esto permite que la replicación de los fagos provoque la replicación también de los anticuerpos y por tanto poder disponer de una gran cantidad de los mismos. Para conseguir esta amplificación de los fagos, el mejor método es la infección de bacterias por parte de los
10 mismos, dentro de las cuales se replican amplificándose lo que provoca la obtención de grandes cantidades de los mismos. Por ello, es necesario que los fagos seleccionados presenten la capacidad de infectar bacterias, o al menos, las bacterias que se vayan a utilizar después para la replicación. Por tanto, en una realización preferida del método de la invención, el
15 método de la invención comprende un paso adicional (e) donde los dominios variables de los anticuerpos unidos a fagos eluidos en el paso (d) se amplifican mediante la infección de bacterias.

20 Existen multitud de bacterias que pueden ser infectadas por fagos. Resulta ventajoso que estas bacterias sean fáciles de conseguir y que su manejo no sea laborioso. Es aconsejable por tanto utilizar bacterias comúnmente utilizadas en los laboratorios como por ejemplo, aunque sin limitarse *E. coli*. Por ello, en una realización preferida del método de la invención las bacterias infectadas por fagos del paso (e) son *E. coli*.

25 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la
30 descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras

y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

5 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. *Western-blot* para la identificación de BphC empleando la librería de *nanobodies* obtenida tras dos rondas de *panning*. En los pocillos se cargaron las siguientes muestras: 1, proteína BphC pura (5 µg);
10 2, extracto de *E. coli* CC118 que lleva el plásmido pBphC10; 3, extracto de *E. coli* CC118 que lleva el plásmido pCK01; 4, 5 y 6, extracto de *Burkholderia* sp. LB400 creciendo respectivamente en citrato (0,2%), benzoato (5 mM) y bifenilo (5 mM). Excepto en el pocillo 1, siempre se emplearon 15 µg de proteína total.

15

Figura 2. *Western-blot* para la identificación de BphC empleando la librería de *nanobodies* y que es empleado para el aislamiento de fagos mediante *western-panning*. En los pocillos se cargaron las siguientes muestras: 1, proteína BphC pura (5 µg); 2, extracto de *E. coli* CC118 que
20 lleva el plásmido pBphC10 (15µg de proteína total). El recuadro blanco muestra la región de la membrana recortada y empleada para aislar fagos que portan anticuerpos que reconocen específicamente la proteína BphC en *western-blot*.

Figura 3. *Western-blot* para la identificación de BphC empleando anticuerpos monoclonales obtenidos tras la selección mediante *western-panning*. En los pocillos se cargaron las siguientes muestras: 1, proteína BphC pura (5 µg); 2, extracto de *E. coli* CC118 que lleva el plásmido pBphC10; 3, extracto de *E. coli* CC118 que lleva el plásmido
30 pCK01; 4, 5 y 6, extracto de *Burkholderia* sp. LB400 creciendo respectivamente en citrato (0,2%), benzoato (5 mM) y bifenilo (5 mM).

Excepto en el pocillo 1, siempre se emplearon 15 µg de proteína total.

Figura 4. Western-blot para la identificación de ArsC empleando anticuerpos monoclonales obtenidos tras la selección mediante western-panning. En los pocillos se cargaron las siguientes muestras: 1, proteína ArsC pura de *B. subtilis* (5 µg); 2, proteína ArsC pura de *S. melloti* (5 µg); 3, extracto de *P. putida* KT2440 cultivada en ausencia de arsénico; 4, extracto de *P. putida* KT2440 cultivado en presencia de As (V) (panel superior) o As (III) (panel inferior). Para los extractos proteicos siempre se emplearon 15 µg de proteína total.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1-. Obtención de sueros de camellos inmunizados con mezclas de proteínas.

Se selecciona un macho joven de camello (*Camellus dromedarius*) que es sometido a cinco inyecciones subcutáneas para su inmunización con una diferencia de una semana entre cada una de ellas. Cada inyección consiste en 5 ml de una solución compuesta de 2,5 ml del adyuvante Gerbu Vaccine Adjuvant y 2,5 ml de la mezcla de 12 proteínas. La mezcla de proteínas

consiste a su vez en 1 mg de cada proteína en un buffer Tris 100 mM pH 7,5 con NaCl 50 mM.

5 Las proteínas empleadas en la mezcla fueron generosamente donadas por diferentes grupos de investigación y esta constituida por las referidas en la tabla 1.

Estas proteínas fueron seleccionadas como marcadores de actividad biológica en el medio ambiente dada su participación en distintos procesos. 10 Algunas de ellas están involucradas en el metabolismo, tanto aeróbico como anaeróbico, de compuestos hidrocarbonados potencialmente contaminantes incluyendo derivados halogenados, otras en procesos de resistencia a metales pesados y también se incluyó un marcador de estrés como referente de procesos globales que afectan a los microorganismos.

15 Finalmente, una semana después de la última inoculación se extrajeron 50 ml de sangre del animal.

Tabla 1-. Proteínas empleadas en este estudio

Proteína	Organismo de origen
NicX (2,5-dihidroxipiridina dioxigenasa)	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440
NBDO (Nitrobenzeno dioxigenasa)	<i>Comamomas</i> sp. JS765
BPDO(Bifenil dioxigenasa)	<i>Sphingomonas yanoikuyae</i> B1
BphC (2,3-dihidroxibiphenil-1,2-dioxigenasa)	<i>Burkholderia</i> sp. LB400
Benzilsuccinato sintasa	<i>Azoarcus evansii</i>
Benzoil-CoA reductasa	<i>Thauera aromatica</i>
Lacasa	<i>Pycnopus cinnabarinus</i>
<i>n</i> -alkano monooxigenasa p-450	<i>Mycobacterium</i> sp.

LinB (haloalkano monooxigenasa)	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> UT26
ArsC (arseniato reductasa)	<i>Bacillus subtilis</i>
ArsC (arseniato reductasa)	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
OaGST (glutación-S-transferasa)	<i>Ochrobactrum anthropi</i>

Ejemplo 2-. Construcción de librerías de genes que codifican dominios variables de anticuerpos procedentes de los camellos inoculados.

La muestra de 50 ml de sangre extraída de camellos inmunizados referida en el ejemplo 1 se mezcla con 50 ml de medio RPMI (Sigma). Los linfocitos de sangre periférica presentes en esta muestra se aíslan empleando Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) y se lavan dos veces con el medio RPMI.

La mitad de los linfocitos extraídos son procesados para la extracción de su RNA. Para ello, se emplea un método basado en la lisis celular con Trizol (Invitrogen) y el RNA se purifica mediante un protocolo convencional de precipitación. En primer lugar se elimina el DNA de la solución resultante de la lisis mediante centrifugación y se separa la fase acuosa. A continuación el RNA se precipita mediante la adición de acetato sódico 0,3 M a pH 5 seguido de alcohol isoamílico frío. El RNA precipitado se aísla mediante centrifugación y se resuspende en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) para evitar la actividad de posibles RNasas en la preparación. Después de este tratamiento el mRNA es purificado usando el procedimiento basado en Poli-A y detallado en Oligo tex mRNA Mini kit (Qiagen). Para la reacción de retrotranscripción se emplearon entre 2,5 y 5 µg de mRNA como molde (Biorad, iScript cDNA synthesis kit).

Los extremos 5' de todos los genes que codifican cadenas pesadas de inmunoglobulina en el camello fueron amplificados mediante PCR

empleando dos oligonucleótidos específicos que hibridan en la secuencia líder del gen y en el exón CH2: oligonucleótidos CALL001 SEQ ID NO:1 (5'-GTCCTGGCTCTCTTCTACAAGG-3') y CALL002 SEQ ID NO:2 (5'-GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC-3'). Para ello se emplean 0,2 µg como molde total en la reacción. Los fragmentos de DNA generados de un tamaño de 600 pb se corresponden con la parte de los genes que codifican los dominios variables de las cadenas pesadas de los anticuerpos (VHH-CH2). Estas bandas fueron purificadas y se emplearon posteriormente como molde en una nueva reacción de PCR en la que se emplearon cebadores modificados con sitios de restricción *Sfi*I y *Not*I necesarios para el posterior clonaje de los fragmentos VHH. Esos cebadores son VHH*Sfi*I SEQ ID NO:3 y VHH*Not*I SEQ ID NO:4). Después de esta amplificación, los fragmentos de DNA generados, de 600 pb, fueron digeridos con las enzimas de restricción mencionadas y clonados en el plásmido derivado del pCANTAB-5E (Amersham Pharmacia Biotech) empleando la cepa *E. coli* TG1 (Stratagene) como receptora de la librería generada.

Ejemplo 3-. Amplificación de librerías de anticuerpos expresadas en fagos M13.

Las librerías obtenidas en el ejemplo anterior son empaquetadas en fagos M13. Para ello, se emplean estas células para inocular un cultivo de 50 ml de *E. coli* TG1 en medio LB suplementado con glucosa al 2% y ampicilina (150 µg/ml) y se incuban a 30°C y con agitación suave (170 rpm) hasta que alcanzan una A_{600} de 0,2 (equivalente a una cantidad de células entre 10^9 y 10^{10}).

A continuación se añaden 10^{10} unidades formadoras de placas del virus M13 empleado para empaquetar y se incuba la mezcla durante una hora con agitación suave.

Tras este periodo se recogen las células mediante centrifugación a 4000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos y se resuspenden en 250 ml de medio LB al que se añaden los antibióticos ampicilina (150 µg/ml) y
5 kanamicina (50 µg/ml) para seleccionar sólo aquellas bacterias que han sido infectadas con el fago M13. Estos cultivos se incuban durante toda la noche a 30°C con agitación (170 rpm).

El cultivo es centrifugado a 4000 rpm, a 4 °C, durante 10 minutos. Se toma
10 el sobrenadante del cultivo (200 ml) evitando cualquier tipo de contaminación por las bacterias del fondo. Una vez separado se añaden 50 ml de una solución de polietilenglicol (PEG) al 20% en agua que además contiene NaCl 2,5 M. Esta mezcla se incuba durante 45 min. a 4°C para precipitar los fagos presentes en el sobrenadante.

15 Los fagos se recuperan mediante centrifugación a 8000 rpm, a 4°C, y durante un periodo de 15 min. En esta ocasión se descarta el sobrenadante y los pellets que contienen los fagos se resuspenden en 2 ml de TE.

20

Ejemplo 4-. Selección de anticuerpos mediante *panning* de librerías en fagos M13.

Los anticuerpos son seleccionados por su capacidad de unión al antígeno
25 una vez que éste se encuentra adsorbido en una superficie sólida. Para ello se depositan 10 µg/ml de cada proteína en PBS en los pocillos de inmunoplasmas Maxisorp (Nunc). Se incuban 16 pocillos por cada proteína durante una noche y a 4 °C de temperatura. A continuación se descarta la solución que contiene la proteína y los pocillos son bloqueados mediante la
30 adición de 200 µl de una solución en PBS que contiene tween20 al 20% (v/v), leche en polvo al 3% y albúmina de suero bovino al 1%. Después de

2h de incubación a temperatura ambiente la solución se reemplaza por la librería de fagos obtenida en el ejemplo 4 (2×10^{11} fagos empaquetados que contienen los dominios VHH). La unión de los fagos se lleva a cabo durante una hora a temperatura ambiente y aquellos fagos no unidos al antígeno se eliminan de las placas mediante 20 lavados de un minuto en los que se emplean 200 μ l de una solución de PBS con tween20 al 0,1% (v/v) por pocillo, seguidos de otros 20 lavados de 1 minuto en los que se usan 200 μ l de PBS.

Los fagos que poseen *nanobodies* que se han unido al antígeno son eluidos desestabilizando las interacciones entre proteínas modificando el pH del medio, lo que se consigue añadiendo 50 μ l en cada pocillo de una solución de glicina 0,1M a pH 2,5 e incubando durante 5 min. Esta disolución es neutralizada posteriormente mediante la adición del mismo volumen de una disolución de Tris-HCl 1M a pH 7,5.

Los fagos obtenidos en esta etapa se pueden amplificar tal y como se detalla en el ejemplo 3 y pueden ser empleados para generar nuevas librerías repitiendo el proceso de selección referido en este mismo ejemplo.

Ejemplo 5-. *Western-blot* para la identificación de la proteína BphC empleando librerías de anticuerpos contenidas en fagos M13 que son obtenidas mediante *panning*.

En este ejemplo de invención se detalla el empleo de las librerías de anticuerpos obtenidas en el ejemplo anterior para la detección de proteínas mediante un protocolo convencional de *western-blot*. Este ejemplo se centrará en el análisis de la capacidad de estos anticuerpos para unirse a la proteína BphC que fue incluida en el pool inicial de proteínas inoculadas al camello (ver tabla 1). La proteína BphC es una dioxigenasa que participa

en la degradación del bifenilo, un compuesto especialmente nocivo y recalcitrante en el medio ambiente, por lo que la presencia de esta enzima en los ecosistemas está directamente relacionada con la capacidad de eliminar este compuesto en nichos ambientales.

5

Se estudia la presencia de la proteína BphC en varios extractos proteicos. Para ello se preparan las muestras indicadas en la figura 1, que incluyen 5 µg de la proteína BphC pura, y 15 µg de extractos de las bacterias *E. coli* CC118, que contiene un plásmido que expresa de forma heteróloga la enzima BphC (pBphC10), y *E. coli* CC118 que contiene el mismo plásmido vacío como control (pCK01). Además, se empleó la cepa de donde fue aislado el gen, *Burkholderia* sp. LB400, y que expresa la enzima de forma natural dependiendo de las condiciones de cultivo. Los extractos de *E. coli* se obtuvieron tras crecer las cepas en LB, mientras que para la obtención de los extractos de *Burkholderia* sp. LB400 se empleó el medio mínimo M9 suplementado con los compuestos que se indican en la figura 1 como única fuente de carbono. Cuando los cultivos alcanzan una A_{600} de 0,8 se toma 1 ml de los mismos, y tras recuperar las células mediante centrifugación se resuspenden en un volumen de 100 µl de buffer de carga de proteínas. Los cultivos son lisados mediante sonicación durante 10 s. y se incuban durante 10 min. a 100 °C. A continuación, las muestras son cargadas en un gel de poliacrilamida-SDS y las proteínas presentes son separadas mediante electroforesis. Posteriormente las proteínas son inmovilizadas en una membrana de nitrocelulosa mediante electroblotting, en una transferencia en la que el gel se pone en contacto con la membrana de PVDF o nitrocelulosa en presencia de un buffer compuesto de Tris (50 mM), glicina (40 mM), SDS (0,04%) y metanol (20% v/v). Las proteínas son transferidas a la membrana durante 20 min estableciendo una diferencia de potencial de 8-12 V. Una vez llevado a cabo, la membrana es bloqueada durante 1 h a temperatura ambiente mediante la adición de 30 ml de una disolución de leche en polvo 5%, BSA 1% y Tween20 0,1% en PBS.

30

Transcurrido ese periodo de tiempo la membrana se pone en contacto con la librería de *nanobodies* empaquetados en las cápsides de los fagos M13. Para ello se preparan 30 ml de la misma solución de bloqueo y se les
5 añade una dilución 1/2000 de la librería obtenida en el ejemplo 4. La membrana se incuba con esta preparación durante un periodo de 45 min. a temperatura ambiente.

Los fagos no unidos a las proteínas presentes en la membrana son
10 eliminados tras cuatro lavados de 5 min. con 30 ml cada uno de disolución de PBS 1x que contiene Tween20 al 0,1% y deoxicolato sódico al 0,1%.

La detección de las partículas fágicas adheridas requiere del empleo de un anticuerpo secundario que es el anti-M13-POD (Amersham pharmacia
15 biotech) que reconoce la cápside de los fagos presentes y además lleva acoplada una peroxidasa que permite su detección en el revelado posterior. El anticuerpo se prepara como una dilución 1/5000 en 30 ml de la propia disolución de bloqueo. Se deja incubar la membrana con esta disolución durante una hora a temperatura ambiente.

20 Tras la incubación con el anticuerpo secundario se procede a descartar los que no se han adherido mediante cuatro lavados idénticos a los anteriores y se lleva a cabo el revelado de las membranas empleando una mezcla de luminol, luciferina y agua oxigenada presente en cualquier kit comercial de
25 revelado quimioluminiscente como por ejemplo el rutinariamente empleado BM Chemiluminescence Blotting Substrate-POD (Roche).

En la figura 1 se puede apreciar que tras realizar dos rondas de selección de anticuerpos *in vitro* estos sólo reconocen de forma evidente la proteína
30 BphC en *western-blot* cuando se encuentra pura en grandes cantidades (pocillo 1). La librería muestra una alta inespecificidad cuando es empleada

para la identificación de BphC en mezclas complejas de proteínas (pocillos 2 a 6).

5 **Ejemplo 6-. Selección de anticuerpos contra BphC mediante *western-blot* (*western-panning*).**

En este ejemplo se detalla el proceso de selección de anticuerpos específicos para su empleo en *western-blot* y que constituye el avance
10 fundamental referido en esta patente, ya que permite mediante un solo paso la obtención de anticuerpos de gran utilidad como se podrá comprobar en los ejemplos 7 y 8.

Para llevar a cabo este proceso de selección se requiere en primer lugar la
15 obtención y amplificación de una librería de anticuerpos procedentes de un camello inmunizado con la proteína de interés (ejemplos 1 a 3).

A continuación se emplea dicha librería de anticuerpos empaquetados en fagos en un *western-blot* frente a la proteína que se quiere detectar, en
20 este caso BphC. Para ello se realiza un protocolo idéntico al referido en el ejemplo 5, pero en el que únicamente es necesario procesar la muestra correspondiente a la proteína BphC pura (figura 2).

Se identifica la banda de reconocimiento presente en la película obtenida
25 tras el revelado sobre la superficie de la membrana, se corta esta región y se transfiere a un tubo eppendorf (figura 2). En esta pequeña zona de nitrocelulosa es donde se fijó la proteína BphC y parte de la población de los fagos que la reconocen lo están haciendo de manera específica gracias a los *nanobodies* procedentes de la librería que llevan fusionados.

30

Los fagos presentes en la región de membrana aislada son eluidos mediante la adición de 50 μ l de glicina (100 mM; pH 2,5) e incubando durante 5 min. a temperatura ambiente mientras se agita fuertemente la preparación con un vórtex.

5

Transcurrido ese tiempo se neutraliza la disolución añadiendo 50 μ l de tampón Tris-HCl (1 M; pH 7,5). La preparación contiene ahora los fagos eluidos de la membrana.

10 Por último los fagos son aislados mediante la infección de un cultivo de *E. coli* TG1. Para ello se crece un cultivo de 10 ml de esta cepa en LB hasta que alcanza una A_{600} de 0,2, momento en el que se toman diferentes alícuotas de 200 μ l de cultivo y se ponen en contacto con 20 μ l de la disolución que contiene los fagos eluidos, o bien el mismo volumen de diluciones seriadas de estos mismos fagos. La incubación se mantiene durante una hora a 37 °C sin agitación. Posteriormente se plaquean 100 μ l de cada muestra en placas de LB que contienen ampicilina (150 μ g/ml) y glucosa al 2%. Las colonias obtenidas de esta forma son el resultado de la infección de un fago que porta un único dominio variable de un anticuerpo de camello y que es capaz de reconocer a la proteína BphC mediante *western-blot* dado que fue éste el protocolo empleado para su selección. Estas colonias se pueden emplear para la producción masiva de fagos idénticos que forma que cada clon se puede empaquetar y amplificar por separado generando baterías de fagos que portan el mismo *nanobody*.

25

Ejemplo 7-. Western-blot para la identificación de la proteína BphC empleando librerías de anticuerpos contenidas en fagos M13 que son obtenidas mediante *western-panning*.

30

Uno de los clones obtenidos en el apartado anterior se emplea para el empaquetamiento y amplificación de fagos tal y como se describe en el ejemplo 3.

- 5 Una vez obtenidos se emplean para detectar la presencia de la proteína BphC en un experimento de *western-blot* idéntico al que se describe en el ejemplo 5 con la salvedad de que en lugar de emplear como anticuerpo primario una dilución 1/2000 de una librería de fagos que portan diferentes *nanobodies*, se emplea una dilución 1/2000 del conjunto de fagos que
10 proceden de un clon de los obtenidos en el apartado anterior y que por lo tanto, portan el mismo *nanobody* en todos ellos.

Los resultados, empleando exactamente las mismas muestras que en el ejemplo 5 son los que se muestran en la figura 3.

15

- En esta ocasión se puede observar claramente que el anticuerpo obtenido empleando como proceso de selección el protocolo de *western-panning*, que se detalla en el ejemplo 6, es específico y reconoce la presencia de la proteína BphC, tanto en la muestra que contiene la enzima pura (pocillo 1),
20 cómo en los extractos procedentes de las cepas que están expresando la enzima, ya sea de forma heteróloga (pocillo 2), o en la cepa natural (pocillos 4 a 6), mientras que no aparece banda de reconocimiento en la cepa control que no posee el gen (pocillo 3). Además de esto, gracias a este *nanobody* se puede observar que la expresión de BphC es claramente
25 inducible en la cepa *Burkholderia* sp. LB400 puesto que la cantidad de proteína que se puede detectar es mayor en presencia del sustrato de la ruta de degradación en la que toma parte BphC (bifenilo; pocillo 6) mientras que es menor en presencia de un inductor “gratuito” (benzoato; pocillo 5) y mucho menor en la condición control en la que estos genes no están
30 inducidos (citrato; pocillo 4).

Ejemplo 8-. Identificación de proteínas homologas a ArsC de *Bacillus subtilis* que no han sido empleadas para inocular un camello mediante anticuerpos obtenidos por *western-panning*.

5

En este ejemplo se detalla la aplicación de anticuerpos obtenidos mediante *western-panning* para la detección de proteínas similares a alguna de las empleadas para inmunizar al camello. Este ejemplo se centra en el estudio de la enzima arseniato reductasa, ArsC, que cataliza la conversión de arseniato a arsenito. Esta proteína está directamente relacionada con la capacidad de los microorganismos para resistir contaminaciones por este metal pesado. El ejemplo refleja como mediante este procedimiento es posible obtener un *nanobody* que reconoce epítomos de ArsC de *Bacillus subtilis*. Además, este anticuerpo puede ser utilizado para la detección de proteínas relacionas con ésta, aunque no hayan sido empleadas para inmunizar al camello, como es el caso de la enzima ArsC de *Pseudomonas putida*, que comparte similitud de secuencia con la de *B. subtilis*, además de poseer el mismo mecanismo catalítico puesto que ambas requieren de un centro activo similar en el que es necesaria la presencia de tiorredoxina. El anticuerpo, sin embargo, no reconoce epítomos en la proteína ArsC de *Shinorhizobium meliloti* que cataliza la misma reacción pero emplea para ello un mecanismo diferente en el que toma parte la glutarredoxina.

10

15

20

El aislamiento de un *nanobody* que reconoce la proteína ArsC de *B. subtilis* se realiza siguiendo un protocolo de *western-panning* idéntico al mostrado en el ejemplo 6 a partir de la librería de *nanobodies* obtenida de la forma que se muestra en los ejemplos 1, 2 y 3.

25

El clon recuperado que contiene el VHH para detectar ArsC es empaquetado y amplificado dando lugar a un gran número de fagos que portan el *nanobody* tal y como se muestra en el ejemplo 3. Estos fagos se

emplean para el análisis de extractos proteicos de cepas de *P. putida* KT2440 que son obtenidas de tres cultivos independientes de la bacteria en 10 ml de LB. A uno de ellos se le añade arseniato, As (III) a una concentración de 50 mM, al segundo arsenito, As (II) a una concentración de 2 mM, y el tercero es el cultivo control que no se expone a la presencia del metal pesado. Cuando las bacterias alcanzan una A_{600} de 0,8 se toma 1ml de cada uno de los cultivos y se procesan resuspendiendo las células en 100 μ l de buffer de carga de proteínas y calentando la preparación a 100 °C durante 10 min. La detección de las proteínas se realiza mediante *western-blot* idéntico al de los ejemplos 5 y 7 con la salvedad de que como anticuerpo primario se emplea una dilución 1/2000 de los fagos obtenidos tras el *western-panning* de ArsC. Los resultados se muestran en la figura 4. En la figura se puede apreciar que el *nanobody* es capaz de reconocer las dos isoformas (oxidada y reducida) de la proteína ArsC purificada de *B. subtilis*, así como la presencia de las proteínas homólogas de *P. putida* KT2440, que sólo se expresan cuando la bacteria se enfrenta al estrés provocado por la presencia del metal pesado en las dos condiciones analizadas, mientras que no se observa expresión del gen en la condición control. Por último, la enzima purificada de *S. meliloti* que cataliza la misma reacción pero posee un mecanismo diferente, no presenta epítomos comunes y no pertenece a la familia de las anteriores, no se puede detectar empleando este *nanobody*.

REIVINDICACIONES

1. Método de selección de anticuerpos que comprende:
 - a) fijar al menos una proteína de interés a una membrana,
 - 5 b) poner en contacto una librería de dominios variables de anticuerpos unidos a fagos con la membrana del paso (a),
 - c) recoger la región de la membrana que contiene los dominios variables de los anticuerpos del paso (b) unidos a la proteína de (a), y
 - d) eluir los dominios variables de los anticuerpos unidos a la proteína
- 10 de interés.

2. Método según la reivindicación 1 donde la proteína se encuentra desnaturalizada.

- 15 3. Método cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde la proteína de interés del paso (a) se selecciona de la lista que comprende: NicX, NBDO, BPDO, BphC, Benzilsuccinato sintasa, Benzoil-CoA reductasa, Lacasa, n-alkano monooxigenasa p-450, LinB, ArsC o OaGST.

- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la fijación de la proteína del paso (a) se lleva a cabo mediante electrotransferencia.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde la fijación de una proteína a la membrana está precedida por una electroforesis.
- 25 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde los fagos a los que se encuentran unidos los dominios variables se seleccionan de entre fagos M13, fd, T4, T7 y lambda.

- 30 7. Método según la reivindicación 6 donde los fagos son fagos M13.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde los dominios variables del paso (b) provienen de anticuerpos procedentes de un individuo de la familia *camelidae*.

5 9. Método según la reivindicación 8 donde el individuo de la familia *camelidae* es *Camellus dromedarius*.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde la elución del paso (d) se lleva a cabo mediante la adición de glicina.

10

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 que además comprende un paso (e) donde los dominios variables de los anticuerpos unidos a fagos eluidos en (d) se amplifican mediante la infección de bacterias.

15

12. Método según la reivindicación 11 donde las bacterias infectadas en el paso (e) son *E. coli*.

FIG. 1

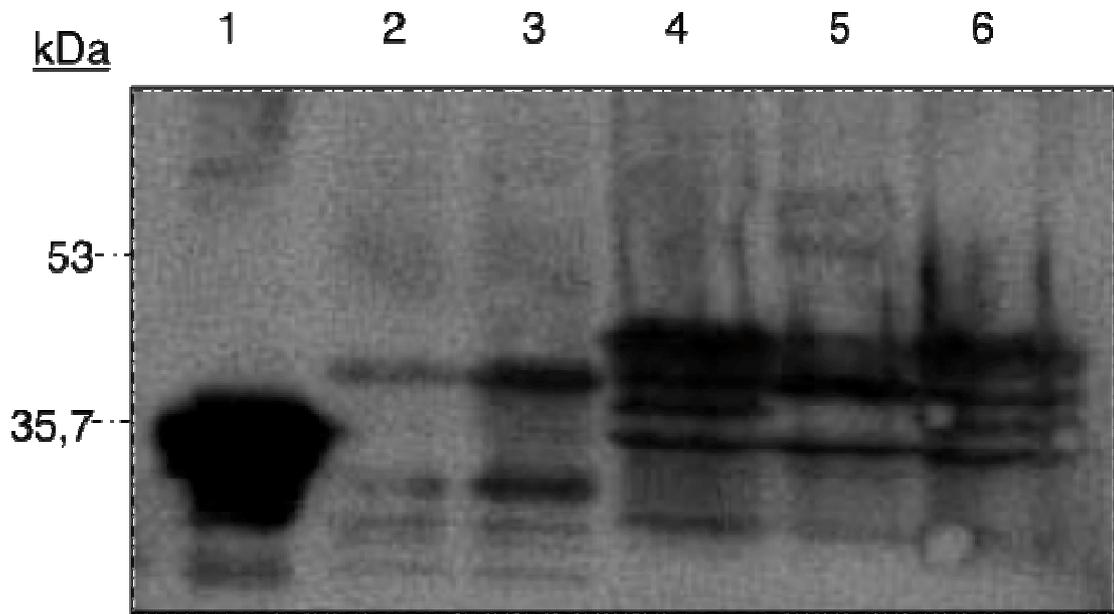


FIG. 2

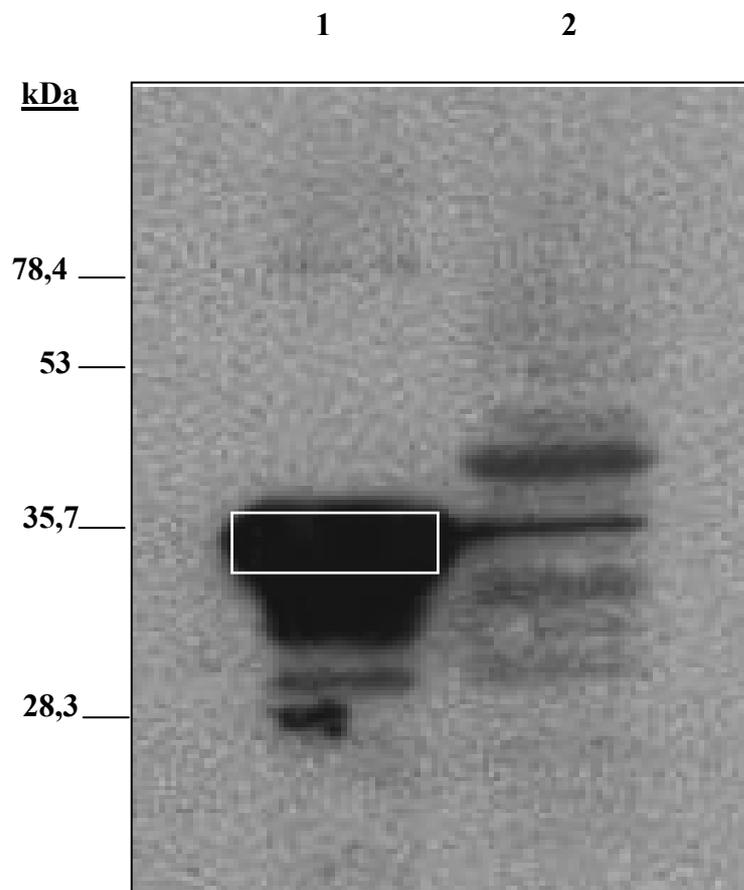


FIG. 3

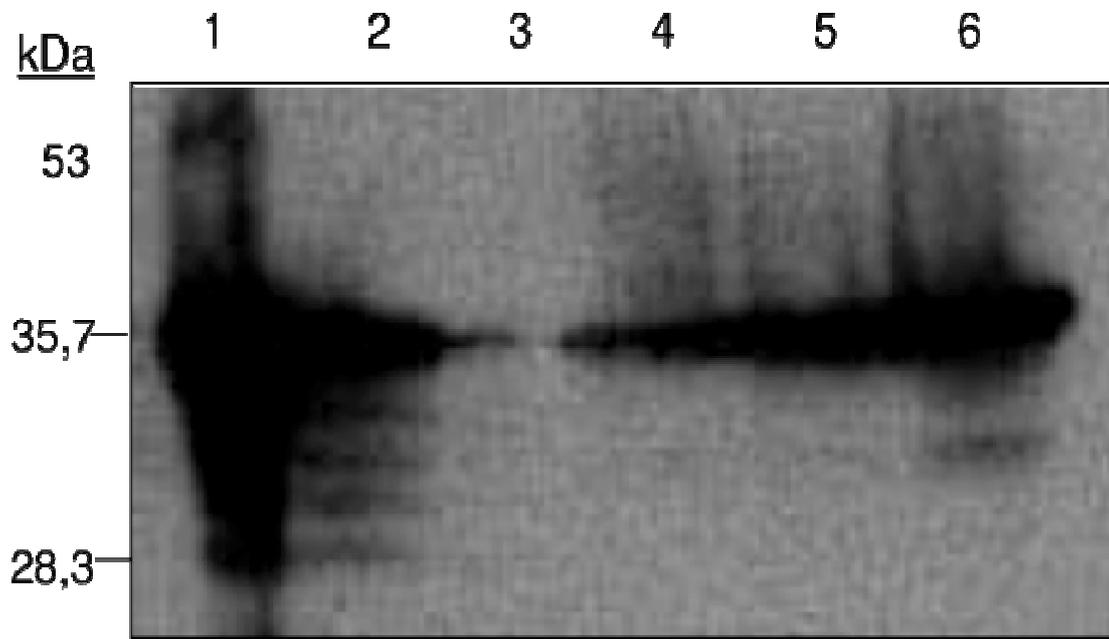
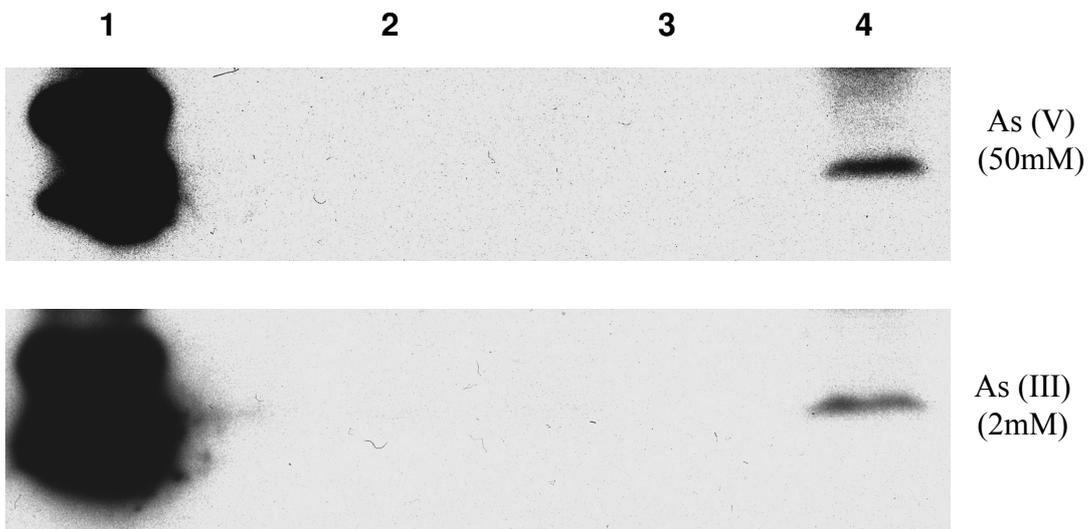


FIG. 4



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas
 <120> Procedimiento para la obtención de anticuerpos monoclonales a partir de muestras complejas de antígenos
 <130> ES1641.649
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador CALL001
 <400> 1
 gtcctggctc tcttctacaa gg 22
 <210> 2
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador CALL002
 <400> 2
 ggtacgtgct gttgaactgt tcc 23
 <210> 3
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador VHHSfiI
 <400> 3
 gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcccaggtgc agctggtgga 50
 <210> 4
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador VHHNotI
 <400> 4
 ggactagtgc ggccgctgag gagacggtga cctgggt 37



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201131152

②② Fecha de presentación de la solicitud: 06.07.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ZAFRA, O. et al. "Monitoring biodegradative enzymes with nanobodies raised in Camelus dromedarius with mixtures of catalytic proteins". EN ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. 01.04.2011. Vol. 13, N.º. 4, páginas 960-974; todo el documento.	1-12
X	SAERENS, D. et al. "Parallel selection of multiple anti-infectome Nanobodies without access to purified antigens". JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS. 01.01.2008. Vol. 329, N.º. 1-2, páginas 138-150; todo el documento, especialmente apartados 2.7 y 3.3.	1,6-9,11,12
A	DUFNER, P. et al. "Harnessing phage and ribosome display for antibody optimisation". TRENDS IN BIOTECHNOLOGY. Vol. 24, N.º. 11, páginas 523-529; todo el documento.	1-12
A	HARMSSEN, M. M. et al. "Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments". APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL. 18.08.2007. Vol. 77, N.º. 1, páginas 13-22; todo el documento.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
22.10.2012

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K16/00 (2006.01)

C12N15/10 (2006.01)

C12P21/08 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, C12N, C12P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.10.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-12	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-12	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

La invención consiste en un proceso de selección de anticuerpos de camello obtenidos a partir de muestras complejas de antígenos. Los anticuerpos están unidos a fagos y pueden obtenerse grandes cantidades de los mismos mediante la infección de bacterias. Los anticuerpos tienen afinidad por proteínas con las que comparten epítopos, que en el proceso de selección están fijadas a membranas.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ZAFRA, O. et al. "Monitoring biodegradative enzymes with nanobodies raised in Camelus dromedarius with mixtures of catabolic proteins". ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. 01.04.2011. Vol. 13, N°. 4, páginas 960-974; todo el documento.	
D02	SAERENS, D. et al. "Parallel selection of multiple anti-infectome Nanobodies without access to purified antigens". JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS. 01.01.2008. Vol. 329, N°. 1-2, páginas 138-150; todo el documento, especialmente a partados 2.7 y 3.3.	
D03	DUFNER, P. et al. "Harnessing phage and ribosome display for antibody optimisation". TRENDS IN BIOTECHNOLOGY. Vol. 24, N°. 11, páginas 523-529; todo el documento.	
D04	HARMSSEN, M.M. et al. "Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments". APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL. 18.08.2007. Vol. 77, N°. 1, páginas 13-22; todo el documento.	

El documento D01, es la publicación científica del proceso de la invención. La publicación es anterior a la fecha de presentación de la solicitud de patente.

El documento D02, describe la obtención de una biblioteca de nanoanticuerpos al infectar un dromedario con el parásito Trypanosoma evansi. Los nanoanticuerpos obtenidos se seleccionan en un procedimiento muy similar al de la presente solicitud.

El documento D03, presenta una revisión sobre la obtención de anticuerpos utilizando fagos que los expresan en su superficie (tecnología de "phage display").

El documento D04- El documento D04, revisa las características y utilidades de los anticuerpos (nanoanticuerpos) obtenidos de camélidos, que se caracterizan por tener un único dominio y ser mucho más pequeños que los anticuerpos humanos.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

Reivindicaciones 1-12

El procedimiento de selección de anticuerpos reivindicado en la presente solicitud, ha sido descrito previamente en el estado de la técnica en el documento D01. Las reivindicaciones 1-12, no cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo a los Artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes 11/1986.