

REIVINDICACIONES

1. Un método para fabricar una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una secuencia que codifica un elemento de cadena pesada (elemento de HC) de una región variable de cadena pesada (HCVR) de anticuerpo y un elemento de cadena ligera (elemento de LC) de una región variable de cadena ligera (LCVR) de anticuerpo, y en el que las HCVR y LCVR están emparejadas, caracterizado porque el método comprende:

a) adquirir un sitio de reacción de producción aislado, que comprende:

i) una hebra de cadena pesada (HC), en donde la hebra de HC es una hebra de un cADN de doble hebra de cadena pesada (cADN ds de HC) que comprende un segmento que codifica el elemento de HC de la HCVR de una célula; y

ii) una hebra de cadena ligera (LC), en donde la hebra de LC es una hebra de un cADN de doble hebra de cadena ligera (cADN ds de LC) que comprende un segmento que codifica el elemento de LC de la LCVR de la célula,

donde la HC es de hebra sencilla y la LC es de hebra sencilla; y

b) enlazar covalentemente la HC de hebra sencilla a la LC de hebra sencilla en presencia de un oligonucleótido puente, en el que el oligonucleótido puente se hibrida con una secuencia que comprende la unión de la HC de hebra sencilla y la LC de hebra sencilla para formar una región duplicada en el sitio de unión, en donde la HC de hebra sencilla y la LC de hebra sencilla están unidas covalentemente para producir una secuencia de ácido nucleico de hebra sencilla;

en el que el sitio de reacción de producción aislado no comprende un ácido nucleico que codifica una HCVR o una LCVR de una célula diferente a la célula,

fabricando de este modo la secuencia de ácido nucleico.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque:

(a) el elemento de HC comprende, o consiste de, una secuencia de región variable de cadena pesada (HCVRS), o un fragmento de unión al antígeno de la misma, y el elemento de LC comprende, o consiste de, una secuencia de región variable de cadena ligera (LCVRS), o un fragmento de unión al antígeno de la misma.; o

(b) la secuencia de ácido nucleico está configurada de manera que, cuando se expresa, el elemento de HC y el elemento de LC forman una molécula de unión al antígeno funcional *in vitro* o *ex vivo*.

3. El método de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque:

(a) adquirir el sitio de reacción de producción aislado comprende:

1) adquirir un sustrato de captura unido a:

(i) un primer cADN de doble hebra (cADN ds) que comprende una hebra que es complementaria al primer mRNA que codifica la HCVR de la célula; y

(ii) un segundo cADN ds que comprende una hebra complementaria a un segundo mRNA que codifica la LCVR de la célula, para producir un sustrato de captura cargado, y

2) mantener el sitio de reacción de producción aislado bajo condiciones que permiten la amplificación del primero y segundo cADN ds, para producir:

una pluralidad de cADNs ds de HC que comprende el segmento que codifica el elemento de HC de la HCVR de la célula; y

una pluralidad de cADNs ds de LC que comprende el segmento que codifica un elemento de LC de la LCVR de la célula;

(b) el sustrato de captura comprende una microesfera y una porción que enlaza al cADN; o

(c) el sitio de reacción de producción aislado comprende una mezcla de reactivos idónea para producir, del primer y segundo mARNs, un primer cADN ds que comprende el segmento que codifica el elemento de HC de la HCVR de la célula, y un segundo cADN ds que comprende un segmento que codifica el elemento de LC de la LCVR de la célula.

4. El método de conformidad con la reivindicación 3, en el que:

(A) el primer y el segundo cADNs ds se amplifican en la presencia de cebadores, en donde al menos uno de los cebadores comprende un primer miembro, un segundo miembro, y una modificación de nucleótidos entre el primero y el segundo miembros, en donde la modificación de nucleótido reduce la síntesis de ADN;

(B) el primer miembro es capaz de combinarse en sus pares de bases con el segundo miembro en el mismo cebador o un cebador diferente, formando una estructura de doble hebra que comprende una región dúplex de

4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más pares de bases; o

(C) al menos uno de los cebadores es fosforilado y comprende una secuencia que codifica al menos una parte de una secuencia enlazadora, o una secuencia complementaria de la misma.

5. El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque la modificación de nucleótidos comprende una inserción de un espaciador entre dos nucleótidos adyacentes o una modificación de una ribosa.

6. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque:

(a) el cADN ds de HC comprende un saliente 5' y un extremo romo y el cADN ds de LC comprende un saliente 5' y un extremo romo;

(b) las hebras HC y LC son ambas hebras sentido o son ambas hebras antisentido;

(c) el enlace covalente ocurre en un sitio de reacción de enlace aislado que comprende una ligasa; o

(d) en donde el oligonucleótido puente comprende una modificación que inhibe la síntesis de ADN.

7. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizado además porque comprende;

(a) antes de adquirir el sitio de reacción de producción aislado, adquirir un sustrato de captura cargado de mRNA que comprende:

1) adquirir un sitio de reacción celular aislado, que comprende:

i) una célula; y

ii) un sustrato de captura capaz de unir un primer mRNA que codifica una HCVR de la célula y un segundo mRNA que codifica una LCVR de la célula; y

2) mantener el sitio de reacción celular aislado bajo condiciones que permiten la lisis de la célula y la unión del sustrato de captura con el primer mRNA y el segundo mRNA para formar el sustrato de captura cargado de mRNA,

en donde el sitio de reacción celular aislado no incluye un ácido nucleico que codifica una HCVR o una LCVR de una célula diferente a la célula.

8. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque además comprende liberar el sustrato de captura cargado de mRNA del

sitio de reacción celular aislado en la presencia de un poli(dA) o poli(dT) oligonucleótido;

- (b) amplificar la secuencia de ácido nucleico;
- (c) secuenciar toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico;
- (d) insertar toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico en un vector; o
- (e) expresar la secuencia de ácido nucleico para producir un polipéptido que comprende el segmento que codifica el elemento de HC de la HCVR, y el segmento que codifica el elemento de LC de la LCVR.

9. El método de conformidad 8, caracterizado porque además comprende poner en contacto el polipéptido con un antígeno y determinar si el polipéptido se une al antígeno.

10. Un método para fabricar una genoteca que comprende una pluralidad de miembros únicos, caracterizado porque el método comprende:

fabricar la pluralidad de miembros por el método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9,

en donde cada uno de los miembros comprende una secuencia que codifica un elemento de cadena pesada (elemento de HC) de una región variable de cadena pesada (HCVR) y un elemento de cadena ligera (elemento de LC) de una región variable de cadena ligera (LCVR), en donde la HCVR y la LCVR están emparejadas, y en donde cada secuencia de ácido nucleico única de la pluralidad comprende un elemento de HC y un elemento de LC de una célula única diferente,

fabricando de este modo la genoteca,

opcionalmente, en donde la genoteca comprende una, dos, tres o todas de las siguientes propiedades:

a) la pluralidad de miembros únicos comprende al menos 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , o 10^9 miembros únicos;

b) la pluralidad de miembros únicos comprende 10^4 a 10^9 , 10^4 a 10^8 , 10^4 a 10^7 , 10^4 a 10^6 , 10^4 a 10^5 , 10^8 a 10^9 , 10^7 a 10^9 , 10^6 a 10^9 , 10^5 a 10^9 , 10^5 a 10^8 , 10^6 a 10^7 , 10^4 a 10^5 , 10^5 a 10^6 , 10^6 a 10^7 , 10^7 a 10^8 , o 10^8 a 10^9 miembros únicos;

c) al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%, de los miembros en la genoteca son miembros únicos; o

d) menos de 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, o 1%, de los miembros en la genoteca son miembros únicos.

11. Una genoteca que comprende una pluralidad de miembros únicos, caracterizada porque la biblioteca está hecha por el método de conformidad con la reivindicación 10, en donde la pluralidad de miembros únicos comprende al menos 10^7 , 10^8 o 10^9 miembros únicos, o en donde al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de los miembros en la genoteca son miembros únicos, opcionalmente, en donde la genoteca es una genoteca de exhibición.

12. Un método para fabricar un polipéptido de unión, caracterizado porque el método comprende:

- a) adquirir una genoteca de conformidad con la reivindicación 11; y
- b) expresar un polipéptido codificado por un ácido nucleico único de la genoteca,

opcionalmente, además comprende poner en contacto el polipéptido con un antígeno y obtener un ácido nucleico que codifica un polipéptido que se une al antígeno.