



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 321 568**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99201558 .6**

96 Fecha de presentación : **18.05.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1054018**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.11.2000**

54

Título: **Bibliotecas de fragmentos Fab y procedimientos para su uso.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.06.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.06.2009

73

Titular/es: **Dyax Corp.**
300 Technology Square
Cambridge, Massachusetts 02139, US

72

Inventor/es: **Hoogenboom, Hendricus Renerus**
Jacobus Mattheus

74

Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 321 568 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

Bibliotecas de fragmentos Fab y procedimientos para su uso.

- 5 Esta invención se refiere en general a bibliotecas de exhibición sobre fagos de fragmentos Fab humanos, y a procedimientos para usar las bibliotecas de fragmentos Fab para aislar anticuerpos con elevada afinidad. Especialmente, la invención se refiere a aislar polinucleótidos que codifican una biblioteca Fab, varias bibliotecas Fab, y a procedimientos para diseñar y construir bibliotecas Fab y a seleccionar a partir éstas.
- 10 La exhibición sobre fago filamentoso en combinación con la selección forma una herramienta potente para la identificación de fármacos basados en péptidos o proteínas (Winter *et al.*, 1994; Clackson *et al.*, 1994). De éstas, son especialmente interesantes los anticuerpos, debido a su capacidad para reconocer una variedad de dianas con elevada especificidad y afinidad. En concreto, el uso de anticuerpos humanos parciales o completos, los cuales no eliciten ninguna o sólo una mínima respuesta inmune cuando se administran a pacientes, está generando una lista creciente
- 15 de fármacos basados en proteínas y aprobados por la FDA (Holliger *et al.* 1998). La tecnología de exhibición sobre fago permite la generación de repertorios extensos de anticuerpos humanos (Marks *et al.*, 1991, Hoogenboom *et al.*, 1992; Griffiths *et al.*, 1993; Vaughan *et al.*, 1996), y los procesos de biocribado permiten la selección de anticuerpos individuales con una especificidad deseada.
- 20 La clave del éxito de la tecnología fueron dos observaciones críticas: (i) la expresión de fragmentos funcionales de anticuerpo mediante la secreción en el periplasma de *E. coli* (Better *et al.*, 1988; Skerra *et al.*, 1988), y, (ii) el acceso rápido a los grupos de genes de la región variable mediante la reacción en cadena de la polimerasa (Larrick *et al.*, 1989; Ward *et al.*, 1989; Marks *et al.*, 1991). Para la construcción de las bibliotecas de anticuerpos, se amplificaron los genes V a partir de ADNc de células B, y los genes de las cadenas pesada y ligera se combinaron aleatoriamente y
- 25 se clonaron para codificar una biblioteca combinatoria de fragmentos de anticuerpo Fv de cadena simple (scFv) o Fab (Marks *et al.*, 1991; Clackson *et al.* 1991; Persson *et al.*, 1991; Orum *et al.*, 1993). El repertorio natural de anticuerpos primarios (no seleccionado) dentro de las células B contiene una gran colección de anticuerpos que reconocen una variedad de antígenos; esta colección puede clonarse como un repertorio “ingenuo” de genes reorganizados mediante la recolección de genes V a partir del ARNm de IgM de células B de donantes humanos inmunizados; aislados de linfocitos de sangre periférica (Marks *et al.*, 1991), de médula ósea o amígdalas (Vaughan *et al.*, 1996), o de
- 30 fuentes animales similares (Gram *et al.*, 1992). Este procedimiento proporciona acceso a anticuerpos que aún no han encontrado antígeno, aunque la frecuencia de estos anticuerpos “de línea germinal” genuinos dependerá mucho de la fuente de células B (Klein *et al.*, 1997). Una única biblioteca “ingenua”, si es lo suficientemente grande y diversa, puede de hecho usarse para generar anticuerpos contra un panel extenso de antígenos, incluyendo autoantígenos, antígenos no inmunogénicos, y antígenos relativamente tóxicos (Griffiths *et al.*, 1993; Marks *et al.*, 1991). En una
- 35 estrategia diferente, los anticuerpos pueden construirse artificialmente, mediante el ensamblado *in vitro* de segmentos del gen V y segmentos D/J, rindiendo anticuerpos sintéticos (Hoogenboom *et al.*, 1992). Una desventaja importante de estos procedimientos es que, a partir de bibliotecas iniciales “ingenuas” o “sintética”, sólo se aislaron anticuerpos con afinidad moderada (Marks *et al.*, 1991; Nissim *et al.*, 1994). A lo largo de los últimos años se han desarrollado técnicas
- 40 más eficientes para construir grandes bibliotecas de fragmentos de anticuerpo, usando sofisticados procedimientos de recombinación *in vivo* (Griffiths *et al.*, 1993) o procedimientos de clonación mediante fuerza bruta (Vaughan *et al.*, 1996; Sheets *et al.*, 1998). Tales grandes bibliotecas han proporcionado un número mayor de anticuerpos humanos por antígeno ensayado, con una afinidad promedio mucho mayor (hasta subnanomolar). No obstante, las restricciones técnicas al tamaño de las bibliotecas que pueden obtenerse o gestionarse en la selección, la pérdida de diversidad
- 45 de la biblioteca a partir de la amplificación de la biblioteca, y el análisis consiguiente relativamente prolijo de los anticuerpos seleccionados, es decir, el análisis de afinidad a gran escala, han limitado la expansión de estas bibliotecas como herramientas genéricas en la generación de anticuerpos.
- La mayoría de las bibliotecas construidas hasta la fecha usan el formato de cadena simple para la exhibición
- 50 sobre fago (Vaughan *et al.*, 1996; Sheets *et al.* 1998). Un informe describió el uso de una biblioteca de Fab ingenuos humanos sobre fago (que no permitía el examen inmediato de fragmentos Fab solubles seleccionados) (Griffiths *et al.*, 1994). Los scFv tiene tendencia a formar dímeros y multímeros de orden superior de forma dependiente del clon y relativamente impredecible (Weidner, *et al.* 1992; Holliger, *et al.* 1993; Marks *et al.*, 1993). En consecuencia, el ensayo de afinidad usado (tal como el análisis mediante BIAcore) a menudo precisa de la purificación de los
- 55 fragmentos de anticuerpo seleccionados. Por ejemplo, la clasificación según las velocidades de disociación (off-rates) usando BIAcore no es posible fácilmente con fragmentos scFv no purificados; la fracción monomérica de los clones de scFv seleccionados debe purificarse primero mediante cromatografía de afinidad y filtración en gel (Sheets *et al.*, 1998; Schier *et al.*, 1996).
- 60 Tal y como fue propuesto y observado por Griffiths y colaboradores (Griffiths *et al.*, 1994), el tamaño de la biblioteca de anticuerpos dicta la probabilidad de selección de anticuerpos de elevada afinidad por el antígeno. La comparación del primer repertorio de scFv ingenuos que contenía $2,9 \times 10^7$ clones (Marks *et al.*, 1991), con un repertorio de scFv construido recientemente de aproximadamente 10^{10} clones (Vaughan *et al.*, 1996; Sheets *et al.* 1998), confirma esta
- 65 propuesta: el incremento del tamaño de la biblioteca en 500 veces resultó en afinidades aproximadamente 100 veces superiores. Este incremento está causado por la disminución de las velocidades de disociación desde 10^{-1} - 10^{-2} s⁻¹ para los fragmentos seleccionados de la biblioteca de menor tamaño, hasta 10^{-3} - 10^{-4} s⁻¹ para los procedentes de la biblioteca mayor.

ES 2 321 568 T3

EP0844306 describe la presentación de una biblioteca Fab de combinación de unas cadenas H y L, en donde ambas cadenas se incluyeron en el mismo vector. Sin embargo, una de las cadenas se mantiene fija, y se inserta en el mismo vector una biblioteca de la cadena complementaria.

5 Es un objeto de la invención crear una biblioteca Fab que sea una fuente valiosa de anticuerpos para muchas dianas diferentes, la cual desempeñará una papel vital en el descubrimiento y validación de dianas en el área de la genómica funcional.

10 Una pluralidad de polinucleótidos codifican una biblioteca Fab, comprendiendo la biblioteca una pluralidad de vectores, en donde cada vector comprende:

- una primera y segunda región de clonación, en donde

15 - cada región de clonación comprende, para el vector único, al menos un sitio de corte con enzima de restricción,

- cada región de clonación está flanqueada en 5' por un sitio de unión a ribosoma y una secuencia de señal,

- un polinucleótido que codifica una región de anclaje, ubicada 3' respecto la segunda región de clonación,

20 - un miembro de una primera pluralidad de polinucleótidos variables, codificando dicha primera pluralidad de polinucleótidos variables una primera pluralidad de polipéptidos variables,

- un miembro de una segunda pluralidad de polinucleótidos variables, codificando dicha segunda pluralidad de polinucleótidos variables una segunda pluralidad de polipéptidos variables,

25 - los polipéptidos de la primera pluralidad de polipéptidos variables y los polipéptidos de la segunda pluralidad de polipéptidos se seleccionan del grupo consistente en una región variable de anticuerpo completa, una región variable de anticuerpo completa seguida por una región constante de anticuerpo completa, una región variable de anticuerpo completa seguida por una parte de una región constante de anticuerpo, una parte de una región variable de anticuerpo, 30 una parte de una región variable de un anticuerpo seguida por una región constante de anticuerpo completa, y una parte de una región variable de anticuerpo seguida por una parte de una región constante de anticuerpo,

- estando ubicado el miembro de la primera pluralidad de polinucleótidos variables en la primera región de clonación,

35 - estando ubicado el miembro de la segunda pluralidad de polinucleótidos variables en la segunda región de clonación, y

- un polinucleótido que codifica una etiqueta.

40 Se sobreentiende que el término "para el único sitio de corte con enzima de restricción del vector" se refiere a la presencia de uno de tales sitios de restricción en la secuencia del vector, sin tomar en consideración la posible presencia de un sitio semejante en los polinucleótidos primero y segundo mencionados más arriba, los cuales codifican una región variable de anticuerpo completa o una parte de una región variable de anticuerpo, seguida posiblemente 45 por una región constante de anticuerpo completa o parte de una región constante de anticuerpo. Los mencionados polinucleótidos primero y segundo pueden comprender sitios de restricción idénticos al sitio "único". Esto quiere decir que dicho sitio de restricción fue "único" antes de que ambas secuencias de polinucleótidos primero y segundo se clonaran en el vector.

50 Los polinucleótidos variables primero y segundo se clonan preferiblemente en la región de clonación en una orientación predeterminada. Por tanto, en caso de que la región de clonación comprenda un único sitio de restricción único, este sitio es preferiblemente de un tipo tal que se generan extremos de restricción no idénticos, tales como, por ejemplo, los generados por el enzima de restricción SfiI. Sin embargo, la región de clonación puede comprender dos o más sitios de restricción únicos, de forma que los polinucleótidos variables pueden clonarse convenientemente como un 55 fragmento de restricción que tiene los extremos correspondientes.

Preferiblemente, en el vector según la invención, las regiones de clonación primera y segunda, ambos sitios de unión de ribosomas, las secuencias de señal, y la secuencia de anclaje, son parte de una misma secuencia de policonector. Por tanto, ambas regiones de clonación pueden ser parte de un casete simple que comprende la primera región 60 de clonación, flanqueada en 5' por un sitio de unión a ribosomas y una secuencia señal, que es adyacente a la segunda región de clonación, también flanqueada en 5' por su correspondiente sitio de unión a ribosomas y una secuencia señal, y flanqueada en 3' por la secuencia de anclaje.

65 Preferiblemente, la primera pluralidad de polinucleótidos variables está formada por polinucleótidos de V_L , y la segunda pluralidad de polinucleótidos variables está formada por polinucleótidos de V_H . Más preferiblemente, los polinucleótidos V_L son polinucleótidos V_K , polinucleótidos $V_K C_K$, polinucleótidos V_L , polinucleótidos $V_L C_L$, una mezcla de polinucleótidos V_K y V_L , o una mezcla de polinucleótidos $V_K C_K$ y $V_L C_L$.

El vector puede comprender además una etiqueta para la purificación o detección de un anticuerpo, preferiblemente comprendiendo dicha etiqueta para la purificación del anticuerpo una cola polihistidina; la etiqueta para la detección del anticuerpo es preferiblemente una etiqueta derivada de c-myc.

5 En otra realización de los polinucleótidos según la invención, el vector comprende además una codón de terminación Ámbar ubicado entre el segundo polinucleótido variable y la proteína de anclaje.

En aún otra realización de los polinucleótidos según la invención, el vector comprende además un dominio C_{HI} ubicado entre el segundo polinucleótido variable y la proteína de anclaje, siendo el dominio C_{HI} preferiblemente un
10 dominio C_{HI} de gamma-1 humana.

La "proteína de anclaje" se define como una proteína o parte de la misma que puede, al menos parcialmente, acomodarse en la cubierta externa de una partícula generada por un organismo que expresa la biblioteca, tal como una partícula de fago o virus, o en la cubierta exterior del propio organismo, en caso de que el organismo exprese la
15 biblioteca. La cubierta exterior se define en la presente invención como la estructura de una célula, partícula de virus o fago, que define la superficie exterior del mismo. En el caso de un fago o fagómido que exprese la biblioteca, la proteína de anclaje puede ser una proteína de cubierta, tal como el producto del gen III. No obstante, pueden usarse otros sistemas, conocidos por el especialista capacitado, para obtener una biblioteca según la presente invención. De modo que puede contemplarse el uso, por ejemplo, de una proteína transmembrana, o del dominio transmembrana
20 de la misma, como proteína de anclaje en sistemas de expresión eucariotas. En esta invención, la proteína de anclaje puede fusionarse a la región variable de un anticuerpo o a parte de la misma, lo que resulta en la presentación de dicha región variable al entorno exterior del organismo, estando anclada la región en su cubierta exterior. En una realización preferida de los polinucleótidos según la invención, la proteína de anclaje es una proteína III de cubierta menor de un fago filamentoso fd.

En una realización de la invención, los polinucleótidos según la invención y, por tanto, la biblioteca Fab, codifica la menos 10⁹ Fab diferentes. En aún otra realización de la invención, la biblioteca Fab de la invención codifica al menos 10¹⁰ Fab diferentes. En aún otra realización de la invención, la biblioteca Fab codifica al menos 3,7 × 10¹⁰ Fab diferentes. En aún otra realización de la invención, la biblioteca Fab codifica de 10⁹ a 3,7 × 10¹⁰ Fab dife-
30 rentes.

Además, la invención proporciona una biblioteca Fab que comprende,

35 - una pluralidad de vectores, en donde cada vector comprende:

- una primera y segunda región de clonación, en donde

40 - cada región de clonación comprende, para el vector único, al menos un sitio de corte con enzima de restricción,

- cada región de clonación está flanqueada en 5' por un sitio de unión a ribosoma y una secuencia de señal,

- un polinucleótido que codifica una región de anclaje, ubicada 3' respecto la segunda región de clonación,

45 - un miembro de una primera pluralidad de polinucleótidos variables, codificando dicha primera pluralidad de polinucleótidos variables una primera pluralidad de polipéptidos variables,

50 - un miembro de una segunda pluralidad de polinucleótidos variables, codificando dicha segunda pluralidad de polinucleótidos variables una segunda pluralidad de polipéptidos variables,

55 - los polipéptidos de la primera pluralidad de polipéptidos variables y los polipéptidos de la segunda pluralidad de polipéptidos se seleccionan del grupo consistente en una región variable de anticuerpo completa, una región variable de anticuerpo completa seguida por una región constante de anticuerpo completa, una región variable de anticuerpo completa seguida por una parte de una región constante de anticuerpo, una parte de una región variable de anticuerpo, una parte de una región variable de un anticuerpo seguida por una región constante de anticuerpo completa, y una parte de una región variable de anticuerpo seguida por una parte de una región constante de anticuerpo,

60 - estando ubicado el miembro de la primera pluralidad de polinucleótidos variables en la primera región de clonación,

65 - estando ubicado el miembro de la segunda pluralidad de polinucleótidos variables en la segunda región de clonación, para formar una pluralidad de polinucleótidos de fusión que codifican una pluralidad de proteínas de fusión,

- un polinucleótido que codifica una etiqueta,

- una pluralidad de partículas de cápside, en donde la pluralidad de dichos vectores se empaqueta dentro de las partículas de cápside, en donde

- al menos algunas de las partículas de cápside muestran la proteína de fusión, codificada por el vector empaquetado dentro de la cápside, sobre la cápside.

Además la invención se refiere a un procedimiento para construir una pluralidad de polinucleótidos que codifican una biblioteca de Fab, el cual comprende los pasos de:

- amplificar una primera pluralidad de polinucleótidos variables con un primer conjunto de cebadores,

- amplificar una segunda pluralidad de polinucleótidos variables con un segundo conjunto de cebadores,

- en donde cada conjunto de cebadores comprende oligonucleótidos diseñados para ser homólogos de los extremos 5' y 3' de los polinucleótidos variables que codifican las regiones variables de anticuerpo o partes de las mismas, de tal forma que puedan usarse para amplificar grupos de polinucleótidos variables procedentes de fuentes naturales o sintéticas de genes, mientras que retienen la totalidad o parte del sitio de combinación del anticuerpo con el antígeno;

- clonar la primera y segunda pluralidad de polinucleótidos variables en una pluralidad de vectores,

- en donde cada vector comprende:

- una primera y segunda región de clonación, en donde cada región de clonación comprende, para el vector único, un sitio de corte con enzima de restricción, estando flanqueada cada región de clonación en 5' por un sitio de unión a ribosoma y una secuencia de señal,

- un polinucleótido que codifica una región de anclaje, ubicada 3' respecto la segunda región de clonación, y

- un polinucleótido que codifica una etiqueta,

- en donde un miembro de la primera pluralidad de polinucleótidos variables se clona en el sitio o sitios de corte con enzima de restricción de la primera región de clonación del vector, y un miembro de la segunda pluralidad de polinucleótidos variables se clona en el sitio o sitios de corte con enzima de restricción de la segunda región de clonación del vector

En una realización, el procedimiento de construcción de la biblioteca Fab comprende los pasos de: amplificar una pluralidad de grupos de genes variables con un conjunto de los cebadores, en donde los cebadores comprenden oligonucleótidos diseñados para ser homólogos de los extremos 5' y 3' de los polinucleótidos variables que codifican las regiones variables de anticuerpo o partes de las mismas, de tal forma que puedan usarse para amplificar grupos de polinucleótidos variables procedentes de fuentes naturales o sintéticas de genes, mientras que retienen la totalidad o parte del sitio de combinación del anticuerpo con el antígeno; clonar los grupos de genes variables amplificados en un vector con un procedimiento en dos pasos para obtener una biblioteca de Fab; en donde el vector comprende un vector de fago o fagómido, el cual acomodará la expresión de los polinucleótidos variables de anticuerpo clonados como fragmentos Fab de anticuerpo, en donde uno de las dos cadenas de anticuerpo se fusiona a una de las proteínas de cubierta del fago (por ejemplo, el producto del gen III).

En una realización, los cebadores hacia atrás (BACK) se diseñaron para tener como mucho tres mutaciones en un total de veintiuno a veintitrés nucleótidos cuando se comparan con la región segmento del gen de la línea germinal humana a la cual tendrían que unirse, pero con al menos 3 residuos homólogos hacia el extremo 3' del oligonucleótido. Este conjunto de oligonucleótidos reconocerá aproximadamente el 90% de los segmentos de genes de la línea germinal humana y, como tales, proporcionarán acceso a la mayoría de la diversidad actual de las células B en fuentes no inmunizadas. En una realización, los cebadores de la cadena pesada deben terminar con "GG" para garantizar una unión estable a las elevadas temperaturas de hibridación (al menos 55°C). De forma similar, los cebadores V κ BACK y la mayoría de los cebadores V λ BACK se diseñarán para terminar preferiblemente en "CC". En una realización alternativa, los cebadores consisten en las secuencias de la Figura 2.

La invención también describe procedimientos para obtener anticuerpos específicos contra un antígeno de la biblioteca de Fab. En ciertas realizaciones, los procedimientos de la invención permiten un examen inicial rápido de la velocidad de disociación usando las bibliotecas de Fab de la invención. En realizaciones alternativas, los procedimientos de la patente se usan para examinar velocidades de disociación para una serie amplia de Fab específicos de antígeno usando las bibliotecas de Fab de la invención.

La presente invención describe también anticuerpos aislados específicos para un antígeno escogido, y sus correspondientes ácidos nucleicos, que se aíslan de las bibliotecas de Fab de la invención. Alternativamente, estos anticuerpos aislados son anticuerpos de elevada afinidad. Los anticuerpos pueden usarse como reactivos de investigación o como productos terapéuticos. Los anticuerpos serán ideales para investigar la naturaleza y ubicación de sus dianas, y los

anticuerpos pueden usarse para purificar la diana. Por tanto, los anticuerpos serán importantes para la validación de dianas y para el descubrimiento de dianas en el área de la genómica funcional.

La invención también se refiere a un vector según se definió más arriba, que comprende uno de la primera y uno de la segunda pluralidad de polinucleótidos variables clonados respectivamente en la primera y segunda región de clonación.

La presente invención describe además células huéspedes que contienen las bibliotecas de Fab de la invención o los polinucleótidos que codifican las bibliotecas de Fab de la invención.

En un aspecto, la invención implica unir el miembro del par de unión específica deseado, tal como una molécula de anticuerpo, a una proteína de cubierta de fago. Mediante el enriquecimiento a continuación en el miembro del par de unión específica, tal como, por ejemplo, mediante técnicas de afinidad, también se enriquece en el ADN que codifica el miembro del par de unión específica, y puede entonces aislarse. El ADN obtenido de este modo puede clonarse a continuación y expresarse en otros sistemas, rindiendo potencialmente cantidades elevadas del miembro del par de unión específica deseado, o puede someterse a secuenciación y ulterior clonación y manipulaciones genéticas antes de su expresión.

Típicamente, se conoce la diana para el miembro del par de unión específica, por ejemplo, un antígeno o hapteno cuando el miembro del par de unión específica es un anticuerpo, y los procedimientos en la presente invención proporcionan un medio para crear y/o identificar un miembro de un par de unión específica que una específicamente la diana de interés. Por tanto, cuando la proteína es un anticuerpo, la presente invención proporciona un medio novedoso para producir anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales, con especificidad para dianas predeterminadas, evitando de ese modo el proceso laborioso, que requiere mucho tiempo, y a menudo es impredecible, de la tecnología convencional de anticuerpos monoclonales.

Descripción resumida de las figuras

Figura 1. Vector de fagómido pCES1 para la exhibición de fragmentos Fab de anticuerpo. Representación esquemática (A) y región del policonector (B) del pCES1. La región del policonector comprende dos secuencias de señal ("S"; pelB y la secuencia líder del geneIII), el dominio C_k , el sitio de unión a ribosomas (rbs), el dominio C_{H1} , la etiqueta hexahistidina (H6) y una secuencia derivada de c-myc. Los genes del dominio variable pueden clonarse como fragmentos ApaLI-XhoI o ApaLI-Asc (respectivamente para V_L o $V_L C_L$) y fragmentos SfiI/PstI-BstEII o SfiI-NotI (respectivamente para V_H o $V_H C_H1$). El codón de terminación Ámbar (*) entre los genes del anticuerpo y el gen III del bacteriófago permite la producción de fragmentos Fab solubles en una cepa de *E. coli* no supresora. La expresión del operón bicistrónico está bajo el control del promotor LacZ (pLacZ).

Figura 2. Esta figura describe los oligonucleótidos usados en una realización para la amplificación de las regiones V de la cadena pesada y cadena ligera humana.

El término "activo" se refiere a aquellas formas del polipéptido que retienen las actividades biológicas y/o inmunológicas de cualquier polipéptido que ocurra de forma natural.

El término células "activadas" tal y como se utiliza en esta solicitud se refiere a las que están implicadas en el tráfico extracelular o intracelular de membrana, incluyendo la exportación de moléculas neurosecretoras o enzimáticas como parte de un proceso normal o morboso.

El término "anticuerpo" significa una inmunoglobulina, sea natural o producida parcial o completamente de forma sintética. El término abarca también cualquier proteína o polipéptido que tenga un dominio de unión que es homólogo de un dominio de unión de inmunoglobulina. Estas proteínas pueden derivarse de fuentes naturales, o producirse parcial o totalmente de forma sintética. Son ejemplo de anticuerpo los isotipos de inmunoglobulina y los fragmentos Fab, scFv, Fv, daub, VHH, y Fd.

El término "dímero de polipéptido de anticuerpo" significa una asociación de dos componentes de cadena polipeptídica de un anticuerpo, capaz de unir un antígeno. Por tanto, puede ser un brazo de un anticuerpo consistente en una cadena pesada y una cadena ligera, puede ser un fragmento Fab consistente en dominios de anticuerpo V_L , V_H , C_L y C_{H1} , o un fragmento Fv consistente en un dominio V_L y un dominio V_H .

El término "cápside" significa un paquete de exhibición genética replicable, con o sin la información genética. Las cápsides exhiben un miembro de un par de unión específica sobre su superficie. El paquete puede ser una población de bacteriófagos, los cuales exhiben un dominio unificador de antígeno, por ejemplo, un Fab, sobre la superficie de algunas o la totalidad de las cápsides de la población. Este tipo de paquete se ha denominado un anticuerpo de fago (pAb).

El término "dominio C_{H1} " significa la primera región constante de la cadena pesada de un anticuerpo, o parte de la misma, o prolongada con aminoácidos de las regiones gozne para permitir el emparejamiento del fragmento $(V_H)C_{H1}$ expresado con la cadena ligera del anticuerpo, y la posible formación de puentes disulfuro. Este puede ser el dominio C_{H1} de un anticuerpo humano del isotipo gamma-1.

Una “parte componente de un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo” puede ser o corresponde a un componente de la cadena polipeptídica, por ejemplo, un dominio V_H o V_L . No obstante, puede ser una CDR, o una secuencia de V_L más el CDR de una V_H , una secuencia de V_H más el CDR de una V_L , una V_H más una secuencia de V_L que carece sólo de un CDR, etcétera. La condición es que la primera y segunda partes componentes de un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo deben formar en combinación (juntas) un sitio de unión a antígeno. Por tanto, si la parte que es el segundo componente de un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo no humano específico para un antígeno de interés es una CDR, entonces la parte que es el primer componente de un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo humano comprenderá el resto de un región V_H y V_L requerida para formar un sitio de unión a antígeno (con o sin dominios constantes de anticuerpo asociados (en un formato Fab), o con o sin secuencia peptídica conectora (en un formato Fv). La parte que es el segundo componente de un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo no humano puede comprender un dominio V_L más parte de un dominio V_H , siendo esta parte uno o más CDR, por ejemplo, tal vez el CDR3. En tal caso, la parte que es el primer componente de un anticuerpo humano comprenderá el resto de una secuencia V_H , la cual, en combinación con la parte que es el segundo componente, forma un sitio de unión a antígeno. Por supuesto, la situación opuesta también es correcta, y la persona experta en la materia será capaz de imaginarse otras combinación de partes componentes primera y segunda que juntas forman un sitio de unión a antígeno.

El término “condicionalmente defectuoso” significa un gen que no expresa un polipéptido particular bajo un conjunto de condiciones, pero que lo expresa bajo otro conjunto de condiciones. Un ejemplo es un gen que contiene una mutación ámbar expresado respectivamente en huéspedes no supresores o supresores. Alternativamente, un gen puede expresar una proteína o polipéptido que es defectuoso bajo un conjunto de condiciones, pero no bajo otro conjunto. Un ejemplo es un gen con una mutación sensible a la temperatura.

El término “derivado” se refiere a polipéptidos químicamente modificados mediante técnicas tales como la ubiquitinación, el etiquetado (por ejemplo, con radionúcleos o varios enzimas), pegilación (derivación con polietilenglicol), e inserción o sustitución mediante síntesis química de aminoácidos tales como la ornitina, la cual no ocurre de forma normal en proteínas humanas.

El término “dominio” significa una parte de una proteína o polipéptido que está plegada en sí misma e independientemente de otras partes de la misma proteína o polipéptido, e independientemente de un miembro de unión complementario.

El término “eluyente” significa una solución usada para romper el enlace entre dos moléculas. El enlace puede ser un enlace o enlaces no covalente o covalente. Las dos moléculas pueden ser miembros de un par de unión específica (sbp).

El término “fragmento modulador de la expresión”, EMF, significa una serie de nucleótidos que modulan la expresión de un ORF operativamente unido o de otro EMF.

Tal como se usa en la presente invención, se dice que una secuencia “modula la expresión de una secuencia operativamente unida” cuando la expresión de la secuencia se ve alterada por la presencia del EMF. Los EMF incluyen, pero no se limitan a, los promotores, y las secuencias moduladores del promotor (elementos inducibles). Una clase de EMF son fragmentos que inducen la expresión o un ORF operativamente unido en respuesta a un factor regulador o suceso fisiológico específico.

El término “Fab” se refiere a fragmentos de anticuerpos que incluyen fragmentos que comprenden dos porciones N-terminales del polipéptido de la cadena pesada, unidas por al menos un puente disulfuro en la región gozne, y dos polipéptidos de cadena ligera completa, en donde cada cadena ligera está complejada con una porción N-terminal de una cadena pesada. Los Fab incluyen también los fragmentos Fab que comprenden la totalidad o una porción grande de un polipéptido de cadena ligera (por ejemplo, $V_L C_L$) complejada con la porción N-terminal de un polipéptido de cadena pesada (por ejemplo, $V_H C_{H1}$).

El término “biblioteca Fab” se refiere a una colección de secuencias de polinucleótidos de Fab dentro de clones; o a una colección genéticamente diversa de polipéptidos Fab exhibidos sobre rgdps capaz de selección o examen para proporcionar un polipéptido Fab individual o una población mixta de polipéptidos Fab.

El término “unidad plegada” significa una combinación específica de una estructura de hélice-alfa y/o hoja-beta y/o giro-beta. Los dominios y las unidades plegadas contienen estructuras que aproximan aminoácidos que no están adyacentes en la estructura primaria.

El término “población genéticamente diversa” significa anticuerpo o componentes polipeptídicos de los mismos, refiriéndose esto no solo a la diversidad que puede existir en la población natural de células u organismos, sino también a la diversidad que puede crearse mediante mutación artificial *in vitro* o *in vivo*. La mutación *in vitro* puede, por ejemplo, implicar la mutagénesis aleatoria usando oligonucleótidos que tienen mutaciones aleatorias de la secuencia que se desea variar. La mutación *in vivo* puede, por ejemplo, usar cepas mutadoras de microorganismos huéspedes para albergar el ADN (consultar el Ejemplo 38 de WO 92/01047). Las palabras “población única” pueden usarse para denotar una pluralidad de, por ejemplo, cadenas polipeptídicas, las cuales pueden no ser genéticamente diversas, es decir, todas ellas pueden ser la misma. Una población restringida es aquella que es diversa pero menos que el

repertorio completo de un animal. La diversidad puede haberse reducido mediante selección previa, por ejemplo, usando la especificidad de unión a antígeno.

El término “fago auxiliar” significa un fago que se usa para infectar células que contienen un genoma de fago defectuoso y el cual funciona para complementar el defecto. El genoma de fago defectuoso puede ser un fagómido o un fago con alguna función que codifica las secuencias de genes eliminadas. Son ejemplo de fagos auxiliares el M13KO7, M13K07 gen III nº 3; y los fagos que exhiben o codifican una molécula unidora fusionada a una proteína de la cápside.

El término “homólogos” significa polipéptidos que tienen el mismo residuo o residuos conservados en una posición correspondiente en su estructura primaria, secundaria o terciaria. El término se extiende también a dos o más secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos homólogos. Los isotipos de inmunoglobulina son ejemplo de péptidos homólogos.

El término “célula huésped” se refiere a una célula procariota o eucariota en la cual se introducen, expresan y/o propagan los vectores de la invención. Las células huésped procariotas típicas incluyen varias cepas de *E. coli*. Las células huéspedes eucariotas típicas son las levaduras o los hongos filamentosos, o las células de mamífero, tales como las células ováricas de hámster chino, los fibroblastos NIH 3T3 muridos, o las células 193 renales embrionarias humanas.

El término “superfamilia inmunoglobulina” significa una familia de polipéptidos, cuyos miembros tienen al menos un dominio con una estructura relacionada con la del dominio variable o constante de las moléculas de inmunoglobulina. El dominio contiene dos hojas-beta y un enlace disulfuro usualmente conservado (consultar A. F. Williams y A. N. Barclay, Ann. Rev Immunol. 6:381-405 (1988)). Los miembros de ejemplo de la superfamilia inmunoglobulina son el CD4, el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), la molécula de adhesión intercelular (ICAM). Excepto cuando el contexto dicta lo contrario, las referencias a las inmunoglobulinas y homólogos de inmunoglobulina en esta solicitud incluyen los miembros de la superfamilia inmunoglobulina y los homólogos de los mismos.

El término “infección” se refiere a la introducción de ácidos nucleicos en una célula huésped apropiada mediante el uso de un virus o vector viral.

El término “fragmento intermedio” significa un ácido nucleico de entre 5 y 1000 bases de longitud, y preferiblemente entre 10 y 40 p.b. de longitud.

El término “aislado” tal y como se utiliza en la presente invención se refiere a un ácido nucleico o polipéptido separado, no sólo de otros ácidos nucleicos o polipéptidos que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico o polipéptido, sino también de [otros] polipéptidos, y preferiblemente se refiere a un ácido nucleico o polipéptido hallado en presencia de (si de algo) sólo un solvente, tampón, ion, y otro componente normalmente presente en una solución del mismo. Los términos “aislado” y “purificado” no abarcan los ácidos nucleicos o polipéptidos presentes en su fuente natural.

El término “cepa mutadora” significa una célula huésped que tiene un defecto genético que causa que el ADN replicado en ella esté mutado con respecto a su ADN progenitor. Son ejemplos de cepas mutadoras la NR9046mutD5 y la NR9046mutT1 (Ver el Ejemplo 38 de WO 92/01047).

El término “polipéptido que ocurre de forma natural” se refiere a polipéptidos producidos por células que no se han manipulado genéticamente, y contempla específicamente varios polipéptidos que se originan a partir de modificaciones de postraducción del polipéptido, incluyendo, pero no limitándose, a la acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación.

El término “secuencia de nucleótidos” se refiere a un heteropolímero de nucleótidos o a la secuencia de estos nucleótidos. Los términos “ácido nucleico” y “polinucleótido” se usan también de forma intercambiable en la presente invención para referirse a un heteropolímero de nucleótidos. Generalmente, los segmentos de ácido nucleico proporcionados por esta invención pueden ensamblarse a partir de fragmentos del genoma y de enlaces cortos de oligonucleótidos, o a partir de una serie de oligonucleótidos, o a partir de nucleótidos individuales, para proporcionar un ácido nucleico sintético que es capaz de expresarse en una unidad transcripcional recombinante que comprende elementos reguladores derivados de un operón microbiano o vírico, o de un gen eucariota.

Los términos “fragmento de oligonucleótido” o un “fragmento de polinucleótido”, “porción” o “segmento” es un tramo de residuos nucleótidos de polipéptido que es lo bastante largo como para usarlo en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o en varios procedimientos de hibridación, para identificar o amplificar partes idénticas o relacionadas de moléculas de ARNm o ADN.

Los términos “oligonucleótidos” o “sondas de ácido nucleico” se preparan en base a secuencias de polinucleótidos proporcionadas en la presente invención. Los oligonucleótidos comprenden porciones de tales secuencias de polinucleótidos que tienen al menos aproximadamente 15 nucleótidos, y usualmente al menos 20 nucleótidos. Las sondas de ácidos nucleicos comprenden porciones de semejante secuencia de polinucleótidos que tienen menor nucleótidos de

aproximadamente 6 kb, usualmente menos de aproximadamente 1 kb. Después de ensayos apropiados para eliminar los falsos positivos, estas sondas pueden usarse, por ejemplo, para determinar si moléculas de ARNm específicas están presentes en una célula o tejido, o para aislar secuencias de ácidos nucleicos similares a partir de ADN cromosómico según describieron Walsh *et al.* (Walsh, P.S. *et al.*, 1992, PCR Methods Appl 1:241-250).

5 El término “pauta de lectura abierta”, ORF, significa una serie de tripletes nucleotídicos que codifican aminoácidos sin cualesquier codones de terminación, y es una secuencia traducible en proteína.

10 El término “vector de fago” significa un vector derivado mediante modificación del genoma de un fago, que contiene un origen de replicación para un bacteriófago, pero no uno para un plásmido.

El término “vector de fagómido” significa un vector derivado mediante modificación del genoma de un plásmido, que contiene un origen de replicación para un bacteriófago, así como el origen de replicación del plásmido.

15 El término “fenotipo” se refiere a una propiedad física (por ejemplo, un pigmento, o la forma de la célula) y/o metabólica de una célula, la cual puede medirse o explotarse de alguna forma, y la cual es llevada a cabo por el gen indicador.

20 El término “región polienlace” significa un polinucleótido que contiene al menos dos sitios para enzimas de restricción que son únicos en el vector que contienen la región polienlace, es decir, estos sitios de restricción son sitios de clonación usados fácilmente en el vector.

25 Un “fragmento”, “porción”, o “segmento” de polipéptidos es un tramo de residuos aminoácidos de al menos 5 aminoácidos, a menudo al menos aproximadamente 7 aminoácidos, típicamente al menos aproximadamente de 9 a 13 aminoácidos, y, en varias realizaciones, al menos aproximadamente 17 o más aminoácidos. Para ser activo, cualquier polipéptido debe tener una longitud suficiente para presentar actividad biológica y/o inmunológica.

30 El término “sondas” incluye ácidos nucleicos de hebra simple o doble, que ocurren de forma natural o se han sintetizado de forma recombinante o química. Pueden etiquetarse mediante traducción con muesca, reacción de relleno con Klenow, PCR u otros procedimientos bien conocidos en el estado de la técnica. Las sondas de la presente invención, su preparación y/o su etiquetado se elaboran en Sambrook, J. *et al.*, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY; o en Ausubel, F.M. *et al.*, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY, ambas de las cuales se incorporan en la presente invención por referencia en su totalidad.

35 El término “purificado” tal y como se utiliza en la presente invención denota que el ácido nucleico o polipéptido indicado está presente con ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas, por ejemplo, polinucleótidos, proteínas y similares. En una realización, el polinucleótido o polipéptido se purifica de tal forma que constituye al menos el 95% en peso, más preferiblemente al menos el 99,8% en peso, de las macromoléculas biológicas indicadas presentes (sin embargo, pueden estar presentes el agua, tampones, y otras moléculas pequeñas, especialmente moléculas que tienen un peso molecular de menos de 1000 dalton).

40 El término “recombinante”, cuando se usa en la presente invención para referirse a un polipéptido o proteína, significa que un polipéptido o proteína se deriva de sistemas de expresión recombinante (por ejemplo, microbiano o mamífero). “Microbiano” se refiere a polipéptidos o proteínas recombinantes preparados en sistemas de expresión bacterianos o fúngicos (por ejemplo, levaduras). Como producto, “microbiano recombinante” define un polipéptido o proteína esencialmente libre de sustancias endógenas nativas, y no acompañado por la glicosilación nativa asociada. Los polipéptidos o proteínas expresados en la mayoría de los cultivos bacterianos, por ejemplo, de *E. coli*, estarán libres de modificaciones por glicosilación; los polipéptidos o proteínas expresados en levadura tendrán un patrón de glicosilación en general diferente de los expresados en células de mamífero.

50 El término “vehículo o vector de expresión recombinante” se refiere a un plásmido o fago o virus o vector, para la expresión de un polipéptido a partir de una secuencia de ADN (ARN). Un vehículo de expresión puede comprender una unidad de transcripción que comprende un ensamblaje de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión del gen, por ejemplo, promotores o potenciadores, (2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe en ARNm y se traduce en proteína, y (3) secuencias apropiadas de inicio de la transcripción y terminación. Las unidades estructurales destinadas a usarse en sistemas de expresión de levadura o eucariotas preferiblemente incluyen una secuencia líder, la cual permite la secreción extracelular de la proteína traducida por parte de una célula huésped. Alternativamente, cuando la proteína recombinante se expresa sin una secuencia líder o de transporte, puede incluir un residuo metionina N-terminal. Este residuo puede o no cortarse a continuación de la proteína o polipéptido expresados de forma recombinante para proporcionar un producto final.

65 El término “sistema de expresión recombinante” significa células huésped que tienen integrado establemente una unidad transcripcional recombinante en su ADN cromosómico, o llevan la unidad transcripcional recombinante de forma extracromosómica. Los sistemas de expresión recombinante tal y como se definen en la presente invención expresarán polipéptidos o proteínas heterólogos a partir de la inducción de los elementos reguladores unidos al segmento de ADN o gen sintético a expresarse. Este término también significa células huésped que tienen integrado establemente un elemento o elementos genéticos recombinantes que tienen un papel regulador en la expresión del gen, por ejemplo, los promotores o potenciadores. Los sistemas de expresión recombinante tal y como se definen en la presente inven-

ción expresarán polipéptidos o proteínas endógenos de la célula a partir de la inducción de los elementos reguladores unidos al segmento de ADN o gen endógenos que deben expresarse. Las células pueden ser procariotas o eucariotas.

El término “variante recombinante” se refiere a cualquier polipéptido que difiera de los polipéptidos que ocurren de forma natural mediante inserciones, supresiones, y sustituciones de aminoácidos, creadas usando técnicas de ADN recombinante. La guía para determinar qué residuo aminoácido puede remplazarse, añadirse o suprimirse sin suprimir actividades de interés, tales como el tráfico celular, puede hallarse comparando la secuencia del polipéptido concreto con la de péptidos homólogos, y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos hechos en regiones de elevada homología.

Preferiblemente, las “sustituciones” de aminoácidos son el resultado de sustituir un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, es decir, sustituciones de aminoácidos conservadoras. Las sustituciones de aminoácidos pueden hacerse en base a la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrofóbicos) incluyen la alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano, y metionina; los aminoácidos polares neutros incluyen la glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, y glutamina; los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen la arginina, lisina, e histidina; y los aminoácidos negativamente cargados (ácidos) incluyen el ácido aspártico y el ácido glutámico.

Las “inserciones” o “supresiones” se hallan típicamente en el rango de 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse experimentalmente haciendo sistemáticamente inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos en una molécula de polipéptido, usando técnicas de ADN recombinante y ensayando las variantes recombinantes en busca de actividad.

Alternativamente, cuando se desea la alteración de la función, pueden diseñarse inserciones, supresiones o alteraciones no conservadoras para producir polipéptidos alterados. Tales alteraciones pueden, por ejemplo, alterar una o más de las funciones biológicas o características bioquímicas de los polipéptidos de la invención. Por ejemplos, tales alteraciones pueden cambiar características del polipéptidos tales como las afinidades ligando-ligando, afinidades intercatenarias, o tasa de degradación/recambio. Además, tales alteraciones pueden seleccionarse para generar polipéptidos que son más apropiados para la expresión, el aumento de escala, y similares, en las células huéspedes escogidas para la expresión. Por ejemplo, los residuos de cisteína pueden suprimirse o sustituirse con otro residuo aminoácido con objeto de eliminar los puentes disulfuro.

Alternativamente, pueden sintetizarse o seleccionarse variantes recombinantes, que codifican estos mismos polipéptidos o similares, haciendo uso de la “redundancia” en el código genético. Pueden introducirse varias sustituciones de codones, tales como los cambios silenciosos que producen varios sitios de restricción, para optimizar la clonación en un plásmido o vector viral, o la expresión en un sistema eucariota o procariota determinado. Las mutaciones en la secuencia de polinucleótidos pueden reflejarse en el polipéptido, o en dominios de otros polipéptidos añadidos al polipéptidos para modificar las propiedades de cualquier parte del polipéptido, para cambiar características tales como las afinidades de unión a ligando, las afinidades intercatenarias, o la tasa de degradación/recambio.

El término “repertorio de genes de inmunoglobulina artificialmente reorganizados” significa una colección de secuencias de nucleótidos, por ejemplo ADN, derivadas total o parcialmente de una fuente distinta de las secuencias de inmunoglobulina reorganizadas de un animal. Esto puede incluir, por ejemplo, secuencias de ADN que codifican dominios V_H mediante la combinación de segmentos V no reorganizados con segmentos D y J y secuencias de ADN que codifican dominios V_L mediante la combinación de segmentos V y J. Parte o la totalidad de las secuencias de ADN pueden derivarse mediante síntesis de oligonucleótidos.

El término “repertorio de genes de inmunoglobulina reorganizados” significa una colección de secuencias de nucleótidos, por ejemplo ADN, que ocurren de forma natural, las cuales codifican genes de inmunoglobulina expresados en un animal. Las secuencias se generan mediante la reordenación *in vivo* de, por ejemplo, segmentos V, D y J para las cadenas H, y, por ejemplo, los segmentos V y J para las cadenas L. Alternativamente, las secuencias pueden generarse a partir de una línea celular inmunizada *in vitro*, y en la cual la reorganización en respuesta a la inmunización ocurre intracelularmente. La palabra “repertorio” se usa para indicar diversidad genética.

El término “paquete de exhibición genética replicable” (rgdp) significa una partícula biológica que tiene información genética que proporciona a la partícula la capacidad de replicarse. La partícula puede exhibir sobre su superficie al menos parte de un polipéptido. El polipéptido puede estar codificado por información genética propia de las partículas, y/o colocada artificialmente en la partícula o en un ancestro de la misma. El polipéptido exhibido puede ser cualquier miembro de un par de unión específica, por ejemplo, dominios de cadena pesada o ligera basados en una molécula de inmunoglobulina, un enzima o un receptor, etcétera. La partícula puede ser un virus, por ejemplo, un bacteriófago tal como el fd o el M13.

El término “gen indicador” se refiere a un ácido nucleico que codifica una proteína o polipéptido que produce un cambio fenotípico en la célula huésped, el cual puede medirse y/o usarse para separar células huésped. Por ejemplo, el gen indicador puede codificar una proteína o polipéptido que tiene propiedades fluorescentes, por ejemplo, la β -galactosidasa, la proteína GFB auto-fluorescente, etcétera; o el gen indicador puede codificar un marcador seleccionable, por ejemplo, la resistencia a antibióticos; o un epítipo que se expresa sobre la superficie de la célula huésped.

El término “sitio de unión de ribosoma” significa un polinucleótido que permite a un ribosoma seleccionar el codón de iniciación apropiado durante el inicio de la traducción. En algunos procariota, este polirribonucleótido se denomina la secuencia de Shine-Dalgarno, y las bases de la secuencia de Shine-Dalgarno se emparejan con el ARN de 16S del ribosoma.

El término proteína o polipéptido “secretado” se refiere a una proteína o polipéptido que es transportado al otro lado de una membrana o a través de ella, incluyendo el transporte a resultas de secuencias de señal en su secuencia de aminoácidos cuando se expresa en una célula huésped apropiada. Las proteínas o polipéptidos “secretados” incluyen sin limitación proteínas o polipéptidos secretados completamente (por ejemplo, proteínas solubles) o parcialmente (por ejemplo, receptores) a partir de las células en la que se expresan. Las proteínas o polipéptidos “secretados” incluyen también sin limitación las proteínas o polipéptidos que se transportan a través de la membrana del retículo endoplásmico.

El término “secuencia de señal” significa una secuencia de aminoácidos que se halla en el extremo amino terminal de un polipéptido y dirige el transporte del polipéptido al otro lado de una membrana o a través de ella. Las secuencias de señal incluyen los polipéptidos amino terminales que tiene 13-36 residuos de longitud, y tienen un núcleo hidrofóbico de 7 a 13 residuos, flanqueado por varios residuos hidrofílicos que usualmente incluyen uno o más residuos básicos cerca del extremo N-terminal.

El término “riguroso” se usa para referirse a condiciones que son consideradas comúnmente en la técnica como rigurosas. Un conjunto de condiciones ilustrativo incluye una temperatura de 60-70°C (preferiblemente aproximadamente 65°C) y una concentración de sal de 0,70 M a 0,80 M (preferiblemente aproximadamente 0,75 M). Otras condiciones de ejemplo incluyen, condiciones de hibridación que (1) emplean fuerza iónica baja y temperatura elevada para el lavado, por ejemplo, NaCl 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/0,1% de SDS a 50°C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturalizante tal como la formamida, por ejemplo, 50% (vol/vol) de formamida con 0,1% de albúmina de suero bovina/0,1% de Ficoll/0,1% de polivinilpirrolidona/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con NaCl 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) emplean formamida al 50%, 5× SSC (NaCl 0,75 M, pirofosfato sódico 0,075 M, 5× solución de Denhardt, ADN sonificado de esperma de salmón (50 g/ml), 0,1% de SDS, y 10% de dextrano sulfato a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2× SSC y 0,1% SDS.

En los casos concernientes a la hibridación de desoxioligonucleótidos, las condiciones de hibridación rigurosas de ejemplo incluyen el lavado en 6× SSC/0,05% de pirofosfato sódico a 37°C (para oligonucleótidos de 14-bases), 48°C (para oligonucleótidos de 17-bases), 55°C (para oligonucleótidos de 20-bases), y 60°C (para oligonucleótidos de 23-bases).

Tal y como se utiliza en la presente invención, “sustancialmente equivalente” puede referirse tanto a secuencias de nucleótidos como a secuencias de aminoácidos, por ejemplo, una secuencia mutante, que varía respecto una secuencia referencia en una o más sustituciones, supresiones, o adiciones, el efecto neto de las cuales no resulta en una disimilitud funcional perjudicial entre las secuencias de referencia y la de interés. Típicamente, semejante secuencia sustancialmente equivalente varía respecto una de las listadas en la presente invención en no más de aproximadamente el 20% (es decir, el número de sustituciones, adiciones, y/o supresiones de residuos individuales es una secuencia sustancialmente equivalente, en comparación con la correspondiente secuencia de referencia, dividido por el número total de residuos en la secuencia sustancialmente equivalente es aproximadamente de 0,2 o inferior). Semejante secuencia se dice que tiene un 80% de identidad de secuencia con la secuencia listada. En una realización, una secuencia sustancialmente equivalente, por ejemplo, una secuencia mutante de la invención, varía respecto una secuencia listada en no más del 10% (90% de identidad de secuencia); en una variación de esta realización, en no más del 5% (95% de identidad de secuencia); y en una variación adicional de esta realización, en no más del 2% (98% de identidad de secuencia). Las secuencias de aminoácidos sustancialmente equivalente, por ejemplo, mutantes, de la invención generalmente tienen al menos un 95% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos listada, mientras que la secuencia de nucleótidos sustancialmente equivalente de la invención puede tener porcentajes más bajos de identidad de secuencia, tomando en consideración, por ejemplo, la redundancia o degeneración del código genético. Para los propósitos de la presente invención, las secuencias que tienen una actividad biológica sustancialmente equivalente y características de expresión sustancialmente equivalentes se consideran sustancialmente equivalentes. Para los propósitos de determinar la equivalencia, debe descartarse la truncación de la secuencia madura (por ejemplo, a través de una mutación que crea un codón de detención espurio).

Las secuencias de ácido nucleico que codifican tales secuencias sustancialmente equivalentes, por ejemplo, secuencias con los porcentajes de identidad mencionados, pueden aislarse rutinariamente e identificarse a través de procedimientos de hibridación estándares bien conocidos por los especialistas en la técnica.

El término “codón de detención de la traducción suprimible” significa un codón que permite la traducción de las secuencias de nucleótidos cadena abajo del codón bajo un conjunto de condiciones, pero bajo otro conjunto de condiciones la traducción finaliza en el codón. Son ejemplo de codones de detención de la traducción suprimibles los codones ámbar, ocre y ópalo.

El término “etiqueta” significa una extensión de fragmento Fab de anticuerpo, por ejemplo, expresado en el extremo carboxi terminal de la cadena pesada, que comprende al menos un aminoácido, pero más típicamente de cinco a quince aminoácidos, y que puede ser reconocido específicamente por un anticuerpo u otro ligando de unión o matriz de unión

para la secuencia. Las etiquetas pueden combinarse en el mismo Fab. Los ejemplos son una tira de cinco residuos histidina que puede reconocerse mediante anticuerpos específicos y mediante iones metálicos inmovilizados, y una tirada de los siguientes 12 aminoácidos (EQKLISEEDLN) que es reconocida por el anticuerpo 9E10 (Marks *et al.*, 1991).

El término “diana” significa cualquier molécula que es antigénica, por ejemplo, puede ser reconocida con especificidad razonable por un anticuerpo de la biblioteca Fab.

El término “elemento diana” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que altera la expresión del gen diana. Los elementos diana incluyen, pero no se limitan a, los promotores, y las secuencias moduladores del promotor (elementos inducibles). Una clase de elementos diana son fragmentos que inducen la expresión en respuesta a un factor regulador específico o suceso fisiológico.

El término “transfección” se refiere a la captura de un vector de expresión por parte de una célula huésped, sin importar si de hecho se expresa alguna de las secuencias codificantes.

El término “transformación” significa introducir ADN en una célula huésped apropiada de tal forma que el ADN es replicable, bien como un elemento extracromosómico o mediante integración cromosómica.

El término “conjunto universal” se refiere a un conjunto de ácidos nucleicos, más preferiblemente a un conjunto de oligonucleótidos, los cuales representan todas las posibles combinaciones de secuencia para una determinada longitud de nucleótidos, por ejemplo, la totalidad de los 4096 insertos de oligonucleótidos de seis nucleótidos de longitud. En una realización preferida, el término universal se refiere al conjunto de todos los oligonucleótidos posibles de una determinada longitud, en donde una o más posiciones en los oligonucleótidos se mantienen constantes (es decir, el mismo nucleótido está presente en esa posición en todos los miembros del conjunto).

Tal y como se utiliza en la presente invención, un “fragmento modulador de la captación”, UMF, significa una serie de nucleótidos que median la captación de un fragmento de ADN enlazado al interior de una célula. Los UMF pueden identificarse fácilmente, usando UMF conocidos como una secuencia diana o motivo diana, con los sistemas basados en ordenador descritos más adelante.

La presencia y actividad de un UMF puede confirmarse uniéndolo al UMF sospechado a una secuencia marcadora. La molécula de ácido nucleico resultante se incuba a continuación con un huésped apropiado en condiciones apropiadas, y se determina la captación de la secuencia marcadora. Tal y como se describió más arriba, un UMF incrementará la frecuencia de captación de una secuencia marcadora enlazada.

El término “vector” se refiere a un plásmido o fago o virus o vector, para la expresión de un polipéptido a partir de una secuencia de ADN (ARN). El vector puede comprender una unidad de transcripción que comprende un ensamblaje de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión del gen, por ejemplo, promotores o potenciadores, (2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe en ARNm y se traduce en proteína, y (3) secuencias apropiadas de inicio de la traducción y terminación. Las unidades estructurales destinadas a usarse en sistemas de expresión de levadura o eucariotas pueden incluir una secuencia líder que permite la secreción extracelular de la proteína traducida por parte de una célula huésped.

El término “polinucleótidos de V_L ” significa polinucleótidos que codifican los dominios contenedores de CDR de algunos o la totalidad de los genes de la cadena ligera de las familias V_κ y/o V_λ .

El término “polinucleótidos de V_H ” significa polinucleótidos que codifican los dominios contenedores de CDR de algunos o la totalidad de los genes de la cadena ligera de las familias del gen de la cadena pesada.

Cada uno de los términos anteriores se pretende que abarque todo lo que está descrito para cada uno de ellos, a menos que el contexto indique lo contrario.

Las construcciones recombinantes de la presente invención comprenden un vector, tal como un vector plasmídico o viral, en el cual puede insertarse un ácido nucleico o ácidos nucleicos de interés. El vector puede comprender además secuencias reguladoras, incluyendo, por ejemplo, un promotor, preferiblemente unido al ácido nucleico o ácidos nucleicos de interés. Hay un gran número de vectores y promotores apropiados conocidos por los especialistas en la técnica, y que están disponibles comercialmente para generar las construcciones recombinantes de la presente invención. A modo de ejemplo se proporcionan los siguientes vectores. Bacteriano: pBs, Phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia). Eucariota: pWLeo, pSV2cat, pOG44, PXTI, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia).

Pueden usarse procedimientos, que son bien conocidos por los expertos en la materia, para construir vectores que contienen un polinucleótido de la invención y señales apropiadas de control de la transcripción/traducción. Estos procedimientos incluyen las técnicas del ADN recombinante, las técnicas sintéticas, y la recombinación *in vivo*/recombinación genética. Consultar, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis *et al.*, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989) y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989).

Las regiones promotoras pueden seleccionarse a partir de cualquier gen deseados usando vectores CAT (cloranfenicol transferasa) u otros vectores con marcadores seleccionables. Dos vectores apropiados son pKK232-8 y pCM7. Los promotores bacterianos concretos con nombre incluyen los lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda P, y trc. Los promotores eucariotas incluyen el temprano inmediato del CMV, la timidina quinasa del HSV, el temprano y el tardío de SV40, los LTR de retrovirus, y la metalotioneína-I del ratón.

Generalmente, los vectores de expresión recombinante incluirán orígenes de replicación y marcadores seleccionables que permitan la transformación de la célula huésped, por ejemplo, el gen de la resistencia a la ampicilina de *E. coli* y el gen TRP1 de *S. cerevisiae*, y un promotor derivado de un gen altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural situada cadena abajo. Tales promotores pueden derivarse de operones que codifican enzimas glicolíticos, tales como la 3-fosfoglicerato quinasa (PGK), el α -factor, la fosfatasa ácida, o la proteína de choque térmico, entre otros. El polinucleótido de la invención se ensambla en fase apropiada con las secuencias de inicio y terminación de la traducción, y preferiblemente, una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida al espacio periplásmico o al medio extracelular. Opcionalmente, el polinucleótido de la invención puede codificar una proteína de fusión incluyendo un péptido de identificación N-terminal que confiere características deseadas, por ejemplo, la estabilización o la purificación simplificada del producto recombinante expresado.

Los vectores de expresión útiles para bacterias se construyen insertando un polinucleótido de la invención junto con señales apropiadas de inicio y terminación de la traducción, opcionalmente en fase de lectura operable con un promotor funcional. El vector comprenderá uno o más marcadores fenotípicos seleccionables y un origen de replicación para garantizar el mantenimiento del vector y para, si se desea, proporcionar amplificación dentro del huésped. Los huéspedes procariotas apropiados para la transformación incluyen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y varias especies de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*, aunque también pueden emplearse otras tratándose de un asunto de libre elección.

Como ejemplo representativo pero no limitante, los vectores de expresión útiles para bacterias pueden comprender un marcador seleccionable y un origen de replicación bacteriano, derivado de plásmidos disponibles comercialmente, que comprende elementos genéticos del vector de clonación bien conocido pBR322 (ATCC 37017). Tales vectores comerciales incluyen, por ejemplo, el pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) y el GEM 1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA). Estas secciones "estructurales" del pBR322 se combinan con un promotor apropiado y la secuencia estructural a expresar.

La presente invención describe además células huéspedes que contienen los vectores de la presente invención, en donde el ácido nucleico se ha introducido en la célula huésped usando procedimientos de transformación, transfección o infección conocidos. La célula huésped puede ser una célula huésped eucariota superior, tal como una célula de mamífero, una célula huésped eucariota inferior, tal como una célula de levadura, o la célula huésped puede ser una célula procariota, tal como una célula bacteriana. La introducción de la construcción recombinante en la célula huésped puede efectuarse, por ejemplo, mediante la transfección con fosfato cálcico, DEAE, la transfección mediada con dextrano, o la electroporación (Davis, L. *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology (1986)).

Puede usarse cualquier sistema huésped/vector para identificar uno o más de los elementos diana de la presente invención. Estos incluyen, pero no se limitan a, huéspedes eucariotas tales como las células HeLa, la célula Cv-1, las células COS, y las células Sf9, así como las células procariotas tales como *E. coli* y *B. subtilis*. Las células más preferidas son aquellas que normalmente no expresan el polipéptido o proteína indicadores concretos, o que expresan el polipéptido o proteína indicadores a un nivel natural bajo.

El huésped usado en la presente invención puede ser también una levadura u otro hongo. En la levadura pueden usarse un cierto número de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles. Para una revisión consultar Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, editores Ausubel *et al.*, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, capítulo 13 (1988); Grant *et al.*, "Expression and Secretion Vectors for Yeast", en Methods in Enzymology, editores Wu & Grossman, Acad. Press, N.Y. 153: 516-544 (1987); Glover, DNA Cloning, Vol. II, IRL Press, Wash., D.C., capítulo 3 (1986); Bitter, "Heterologous Gene Expression in Yeast", en Methods in Enzymology, editores Berger & Kimmel, Acad. Press, N.Y. 152:673-684 (1987); y The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, editores Strathern *et al.*, Cold Spring Harbor Press, Vols. I y II (1982).

El huésped usado en la invención puede ser también una célula procariota tal como *E. coli*, otras enterobacterias tales como *Serratia marcescens*, bacilos, varias *Pseudomonas*, u otros procariotas que pueden transformarse, transfectarse, infectarse, etcétera (es decir, existe un procedimiento para introducir ácidos nucleicos dentro de la célula huésped).

La presente invención describe además células huésped genéticamente manipuladas para contener los polinucleótidos de la invención. Por ejemplo, tales células huéspedes pueden contener ácidos nucleicos de la invención introducidos en la célula huésped usando procedimientos conocidos de transformación, transfección o infección. La presente invención describe además células huéspedes genéticamente manipuladas para contener los polinucleótidos de la invención, en donde tales polinucleótidos están en asociación operativa con una secuencia reguladora heteróloga de la célula huésped, la cual dirige la expresión de los polinucleótidos en la célula.

La célula huésped puede ser una célula huésped eucariota superior, tal como una célula de mamífero, una célula huésped eucariota inferior, tal como una célula de levadura, o la célula huésped puede ser una célula procariota, tal como una célula bacteriana. La introducción de la construcción recombinante en la célula huésped puede efectuarse mediante transfección con fosfato cálcico, DEAE, transfección mediada con dextrano, o electroporación (Davis, L. *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology (1986)). Las células huésped que contienen uno de los polinucleótidos de la invención pueden usarse de forma convencional para producir el producto del gen codificado por el fragmento aislado (en el caso de un ORF), o puede usarse para producir una proteína heteróloga bajo el control del EMF.

Puede usarse cualquier sistema huésped/vector para expresar uno o más de los ORF de la presente invención. Estos incluyen, pero no se limitan a, huéspedes eucariotas tales como las células HeLa, la célula Cv-1, las células COS, y las células Sf9, así como las células procariotas tales como *E. coli* y *B. subtilis*. Las células más preferidas son aquellas que normalmente no expresan el polipéptido o proteína concretos, o que expresan el polipéptido o proteína a un nivel natural bajo. Las proteínas maduras pueden expresarse en células de mamífero, en levaduras, en bacteria, o en otras células bajo el control de los promotores apropiados. También pueden usarse sistemas de traducción sin células para producir tales proteínas usando ARN derivados de las construcciones de ADN de la presente invención. Sambrook *et al.* describen vectores de clonación y expresión apropiados para su uso con huéspedes procariotas y eucariotas "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición, Cold Spring Harbor, New York (1989), sus descubrimientos se incorporan en la presente invención por referencia.

También pueden emplearse varios sistemas de cultivo de células de mamífero para expresar la proteína recombinante. Los ejemplos de sistemas de expresión de mamíferos incluyen las líneas COS-7 de fibroblastos renales de mono descritas por Gluzman, Cell 23: 175 (1981), y otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible, por ejemplo, las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamíferos comprenderán un origen de replicación, una promotor apropiado, y también cualesquier sitios de unión de ribosoma necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios de ajuste donantes y aceptores, secuencias de terminación de la transcripción, y secuencias no transcritas flanqueadoras en 5'. Las secuencias de ADN derivadas del genoma viral del SV40, por ejemplo, el origen del SV40, el promotor temprano, el potenciador, el ajuste, y los sitios de poliadenilación pueden usarse para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos. Los polipéptidos y proteínas recombinantes producidos en cultivos bacterianos usualmente se aíslan mediante extracción inicial a partir de precipitados celulares, seguida por uno o más pasos de remoción de sales, intercambio iónico acuoso, o cromatografía por exclusión de tamaño. Los pasos de plegado de la proteína pueden usarse, según sea necesarios, para completar la configuración de la proteína madura. Finalmente, la cromatografía líquida de elevadas prestaciones (HPLC) puede emplearse para los pasos de purificación final. Las células microbianas empleadas en la expresión de las proteínas pueden romperse mediante cualquier procedimiento apropiado, incluyendo los ciclos de congelación-descongelación, la sonicación, la rotura mecánica, o el uso de agentes de lisado de células.

Un cierto número de tipos celulares pueden actuar como células huésped apropiadas para la expresión de la proteína. Las células huésped de mamíferos incluyen, por ejemplo, las células COS de mono, las células ováricas de hámster chino (CHO), las células 293 renales humanas, las células A431 epidérmicas humanas, las células Colo205 humanas, las células 3T3, las células CV-1, otras líneas celulares de primate transformadas, las células diploides normales, las cepas de células derivadas del cultivo *in vitro* de tejido primario, los explantes primarios, las células HeLa, las células L del ratón, las células BHK, HL-60, U937, HaK o Jurkat.

Alternativamente, puede ser posible producir la proteína en eucariotas inferiores tales como las levaduras, o en procariotas tales como las bacterias. Las cepas de levadura potencialmente apropiadas incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, cepas de *Kluyveromyces*, *Candida*, o cualquier cepa de levadura capaz de expresar proteínas heterólogas. La cepas bacterianas potencialmente apropiadas incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, o cualquier cepa bacteriana capaz de expresar proteínas heterólogas. Si la proteína se produce en levadura o bacteria, puede ser necesario modificar la proteína producida en las mismas, por ejemplo, mediante la fosforilación o glicosilación de los sitios apropiados, para obtener la proteína funcional. Tales uniones covalentes pueden realizarse usando procedimientos químicos o enzimáticos conocidos.

Pueden manipularse células y tejidos para expresar un gen endógeno, que comprende los polinucleótidos de la invención, bajo el control de elementos reguladores inducibles, en cuyo caso las secuencias reguladoras de los genes endógenos pueden sustituirse mediante recombinación homóloga. Tal y como se describe en la presente invención, la modificación génica dirigida puede usarse para sustituir una región reguladora existente en un gen por una secuencia reguladora aislada de un gen diferente, o una secuencia reguladora nueva sintetizada mediante procedimientos de ingeniería genética. Tales secuencias reguladoras pueden estar formadas por promotores, potenciadores, regiones de unión a la matriz, elementos reguladores negativos, sitios de inicio de la transcripción, sitios de unión de proteínas reguladoras, o por la combinación de dichas secuencias. Alternativamente, las secuencias que afectan a la estructura o estabilidad del ARN o proteína producidos pueden sustituirse, eliminarse, añadirse, o modificarse de otra forma mediante modificación génica dirigida, incluyendo las señales de poliadenilación, los elementos de estabilidad del ARNm, los sitios de ajuste, las secuencias líderes para potenciar o modificar el transporte o las propiedades de secreción de la proteína, u otras secuencias que alteran o mejoran la función o estabilidad de las moléculas de proteína o ARN.

El suceso de modificación génica dirigida puede ser una inserción simple de la secuencia reguladora, colocando el gen bajo el control de la nueva secuencia reguladora, por ejemplo, insertando un promotor o potenciador nuevos,

o ambos, cadena arriba respecto de un gen. Alternativamente, el suceso de modificación génica dirigida puede ser una simple supresión de un elemento regulador, tal como la supresión de un elemento regulador negativo específico de un tejido. Alternativamente, el suceso de modificación génica dirigida puede remplazar un elemento existente; por ejemplo, un potenciador específico de un tejido puede remplazarse con un potenciador que tiene una especificidad más amplia, o para un tipo celular diferente, que los elementos que ocurren de forma natural. En este caso, se suprimen las secuencias que ocurren de forma natural y se añaden nuevas secuencias. En todos los casos, la identificación del suceso de modificación génica dirigida pueden facilitarse mediante el uso de uno o más marcadores seleccionables que son contiguos al ADN apuntado, permitiendo la selección de células en las que el ADN exógeno se ha integrado en el genoma de la célula huésped. La identificación del suceso de modificación génica puede facilitarse también mediante el uso de uno o más genes indicadores que presentan la propiedad de selección negativa, de tal forma que el marcador seleccionable negativamente está unido al ADN exógeno, pero configurado de tal forma que el marcador seleccionable negativamente flanquea la secuencia diana, y de tal forma que un suceso de recombinación homóloga correcta con secuencias del genoma de la célula huésped no resulta en la integración estable del marcador seleccionable negativamente. Los marcadores útiles para este propósito incluyen el gen de la timidina quinasa (TK) del virus Herpes Simplex, o el gen bacteriano de la xantina-guanina fosforribosil transferasa (TK).

Las técnicas de modificación génica dirigida o de activación génica que pueden usarse se describen más concretamente en la patente estadounidense nº 5.272.071 para Chappel; en la patente estadounidense nº 5.578.461 para Sherwin *et al.*; en la solicitud internacional nº PCT/US92/09627 (WO93/09222) de Selden *et al.*; y en la solicitud internacional nº PCT/US90/06436 (WO91/06667) de Skoultchi *et al.*

En general, las técnicas para preparar anticuerpos policlonales y monoclonales, así como hibridomas capaces de producir el anticuerpo deseado, son bien conocidas en el estado de la técnica (Campbell, A.M., *Monoclonal Antibodies Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1984); St. Groth *et al.*, *J. Immunol.* 35:1-21 (1990); Kohler y Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975)) (la técnica del trioma, la técnica del hibridoma con células B humanas); Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4:72 (1983); Cole *et al.*, en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985), pp. 77-96).

Los procedimientos de inmunización son bien conocidos en la técnica. Tales procedimientos incluyen la inyección subcutánea o interperitoneal del polipéptido. Un experto en la materia reconocerá que la cantidad de proteína codificada por el gen indicador usado para la inmunización, variará en base al animal inmunizado, la antigenicidad del péptido, y el sitio de inyección.

El polipéptido o proteína que se usa como un inmunogén puede modificarse o administrarse en un adyuvante para incrementar la antigenicidad del polipéptido o proteína. Los procedimientos para incrementar la antigenicidad de un polipéptido o proteína son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, el acoplamiento del antígeno con una proteína heteróloga (tal como la globulina o β -galactosidasa), o a través de la inclusión de un adyuvante durante la inmunización.

Para los anticuerpos monoclonales, se extraen las células de bazo procedentes animales inmunizados, se fusionan con células de mieloma, tales como las células SP2/0-Ag14 de mieloma, y se deja que se conviertan en células de hibridoma productoras de anticuerpos monoclonales.

Para identificar la célula hibridoma que produce un anticuerpo con las características deseadas puede usarse cualquiera de un cierto número de procedimientos bien conocidos en el estado de la técnica. Estos incluyen el examen de los hibridomas con un ensayo ELISA, un análisis de transferencia Western, o un radioinmunoensayo (Lutz *et al.*, *Exp. Cell Research*. 175:109-124 (1988)).

Los hibridomas que secretan los anticuerpos deseados se clonan, y la clase y subclase se determinan usando procedimientos conocidos en el estado de la técnica (Campbell, A.M., *Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Países Bajos (1984)).

Para los anticuerpos policlonales, el antisuero que contiene el anticuerpo se aísla del animal inmunizado, y se examina para verificar la presencia de anticuerpos con la especificidad deseada usando uno de los procedimientos descritos más arriba.

La presente invención describe además los anticuerpos descritos más arriba en forma etiquetada detectablemente. Los anticuerpos pueden etiquetarse detectablemente a través del uso de radioisótopos, etiquetas de afinidad (tales como la biotina, avidina, etcétera), etiquetas enzimáticas (tales como la peroxidasa de rábano silvestre, la fosfatasa alcalina, etcétera), etiquetas fluorescentes (tales como la FITS o la rodamina, etcétera), átomos paramagnéticos, etcétera. Los procedimientos para realizar tales etiquetados son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, consultar (Sternberger, L.A. *et al.*, *J. Histochem. Cytochem.* 18:15 (1970); Bayer, E.A. *et al.*, *Meth. Enzym.* 62:308 (1979); Engval, E. *et al.*, *Immunol.* 109:129 (1972); Goding, J.W. *J. Immunol. Meth.* 13:215 (1976)).

Los anticuerpos etiquetados descritos por la presente invención pueden usarse para ensayos *in vitro*, *in vivo*, e *in situ* para identificar células o tejidos en los que se expresan el polipéptido o la proteína de la invención.

La presente invención describe además los anticuerpos descritos más arriba inmovilizados sobre un soporte sólido. Los ejemplos de tales soportes sólidos incluyen los plásticos tales como el policarbonato, los carbohidratos complejos, tales como la agarosa y la Sepharose, las resinas acrílicas y parecidas como la poliacrilamida y las cuentas de látex. Las técnicas para acoplar anticuerpos tales soportes sólidos son bien conocidas en el estado de la técnica (Weir, D.M. *et al.*, “Handbook of Experimental Immunology”, 4ª edición, Blackwell Scientific Publications, Oxford, Inglaterra, Capítulo 10 (1986); Jacoby, W.D. *et al.*, Meth. Enzym. 34 Academic Press, N.Y. (1974)). Los anticuerpos inmovilizados de la presente invención pueden usarse para la purificación mediante inmuoafinidad de las células huésped que están expresando el polipéptido o proteína.

Las células huéspedes se transfectan o preferiblemente infectan o transforman con los vectores descritos más arriba, y se cultivan en medios nutritivos apropiados para seleccionar transductores o transformadores que contienen el vector.

Las células huéspedes que expresan el polipéptido o proteína pueden identificarse mediante al menos cuatro estrategias generales; (a) la hibridación ADN-ADN o ADN-ARN; (b) la presencia o ausencia de funciones del gen; (c) verificando el nivel de transcripción según se mide por la expresión de transcripto de ARNm en la célula huésped; y (d) la detección del producto del gen según se mide mediante inmunoensayo o mediante actividad biológica.

En la primera estrategia, la presencia del polipéptido o proteína de la invención insertado en el vector puede detectarse mediante hibridación ADN-ADN o ADN-ARN usando sonda que comprenden secuencias de nucleótidos que son homólogos respectivamente de las del polipéptido o proteína de la invención, o porciones o derivadas de las mismas.

En la segunda estrategia, el sistema de expresión vector/huésped recombinante puede identificarse y seleccionarse en base a la presencia o ausencia de ciertas funciones del gen “indicador” (por ejemplo, la actividad timidina quinasa, la resistencia a antibióticos, la resistencia al metotrexato, la transformación del fenotipo, la formación de cuerpos de occlusión en baculovirus, etcétera). Por ejemplo, si el polipéptido o proteína se inserta dentro de una secuencia de gen marcador del vector, las células recombinantes que contienen el polipéptido o proteína pueden identificarse por la ausencia de la función del gen marcador. Alternativamente, puede colocarse un gen marcador en tándem con el polipéptido o proteína bajo el control del mismo o diferente promotor que se usa para controlar la expresión del polipéptido o proteína de la invención. La expresión del marcador en respuesta a la inducción o selección indica la expresión del polipéptido o proteína.

En la tercera estrategia, la actividad de transcripción del polipéptido o proteína puede verificarse mediante ensayos de hibridación. Por ejemplo, puede aislarse el ARN y analizarse mediante transferencia Northern usando una sonda homóloga al polipéptido o proteína o a determinadas porciones suyas. Alternativamente, pueden extraerse los ácidos nucleicos totales de la célula huésped y ensayarse su hibridación a tales sondas.

En la cuarta estrategia, la expresión de un producto del polipéptido o proteína puede verificarse inmunológicamente, por ejemplo, mediante transferencias Western, inmunoensayos tales como la radioinmunoprecipitación, inmunoensayos ligados a enzimas, y similares.

Los polinucleótidos de la invención proporcionan también polinucleótidos que incluyen secuencias de nucleótidos que son sustancialmente equivalentes a los polinucleótidos de la invención. Los polinucleótidos acordes con la invención pueden tener al menos aproximadamente el 80%, más típicamente al menos aproximadamente el 90%, y aún más típicamente al menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencia con un polinucleótido de la invención. La invención proporciona también el complemento de los polinucleótidos que incluyen una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 80%, más típicamente al menos aproximadamente el 90%, y aún más típicamente al menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencia con un polinucleótido que codifica un polipéptido mencionado más arriba. Los polinucleótidos pueden ser ADN (genómico, ADNc, amplificado o sintético) o ARN. Los procedimientos y algoritmos para obtener semejantes polinucleótidos son bien conocidos por los especialistas en la técnica, y pueden incluir, por ejemplo, procedimientos para determinar las condiciones de hibridación que pueden aislar rutinariamente polinucleótidos con las identidades de secuencia deseadas.

Un polinucleótido según la invención puede ser unido a una variedad de otras secuencias de nucleótidos mediante técnicas de ADN recombinante bien establecidas (consultar, Sambrook J *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY). Las secuencias de nucleótidos útiles para unir los polipéptidos incluyen un surtido de vectores, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, derivados del fago lambda, fagómidos, y similares, que son bien conocidos en el estado de la técnica. En consecuencia, la invención proporciona también un vector que incluye un polinucleótido de la invención y una célula huésped que contiene el polinucleótido. En general, el vector contiene un origen de replicación funcional en la menos un organismo, sitios apropiados para endonucleasas de restricción, y un marcador seleccionable para la célula huésped. Los vectores según la invención incluyen los vectores de expresión, los vectores de replicación, los vectores para generación de sondas, y los vectores de secuenciación. Una célula huésped como la descrita en la invención, puede ser una célula procariota o eucariota, y puede ser un organismo unicelular o parte de un organismo multicelular.

Las secuencias que se hallan dentro del ámbito de la presente invención no están limitadas por las secuencias específicas descritas en ella, sino que también incluyen un fragmento representativo de las mismas, o una secuencia de

nucleótidos al menos el 99,9% idéntica con un ácido nucleico de la invención. Además, para acomodar la variabilidad del codón, la invención incluye moléculas de ácido nucleico que codifican las secuencias de polipéptidos de la invención. En otras palabras, se contempla de forma expresa la sustitución de un codón por otro que codifica el mismo aminoácido en la región codificante de una secuencia polipeptídica de la invención. Cualquier secuencia específica descrita en la presente invención puede examinarse fácilmente en busca de errores mediante resecuenciación de un fragmento concreto, tal como un ORF, en ambas direcciones (es decir, la secuencia de ambas hebras).

La presente invención proporciona además construcciones recombinantes que comprenden un ácido nucleico de la invención, o un fragmento del mismo. Las construcciones recombinantes de la presente invención comprenden un vector, tal como un vector plasmídico o viral, en el se inserta un ácido nucleico de la invención, o un fragmento del mismo, en una orientación hacia adelante o invertida. En el caso de un vector que comprende uno de los ORF de la presente invención, el vector puede comprender además secuencias reguladoras, incluyendo por ejemplo, un promotor, unido operativamente al ORF. Para vectores que comprenden los EMF y UMF de la presente invención, el vector puede comprender además una secuencia marcadora u ORF unida operativamente al EMF o UMF. Hay un gran número de vectores y promotores apropiados conocidos por los especialistas en la técnica, y que están disponibles comercialmente para generar las construcciones recombinantes de la presente invención. A modo de ejemplo se proporcionan los siguientes vectores. Bacteriano: pBs, Phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene); pTrc99A, pKK223-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia). Eucariota: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXTI, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia).

El polinucleótido aislado de la invención puede unirse operativamente a una secuencia de control de la expresión tal como los vectores de expresión pMT2 o pED descritos por Kaufman *et al.*, Nucleic Acids Res. 19, 4485-4490 (1991), con objeto de producir recombinantemente la proteína o polipéptido. En el estado de la técnica se conocen muchas secuencias apropiadas de control de la expresión. Los procedimientos generales de expresión recombinante de proteína son también conocidos y se ilustran en R. Kaufman, Methods in Enzymology 185:537-566 (1990). Tal y como se define en la presente invención "operativamente unido" significa que el polinucleótido aislado de la invención y una secuencia de control de la expresión se sitúan dentro de un vector o célula de tal forma que la proteína o polipéptido son expresados por una célula huésped que ha sido transformada (transfectada) con el polinucleótido/secuencia de control de la expresión ligados.

Las regiones promotoras pueden seleccionarse a partir de cualquier gen deseado usando vectores CAT (cloranfenicol transferasa) u otros vectores con marcadores seleccionables. Dos vectores apropiados son pKK232-8 y pCM7. Los promotores bacterianos concretos con nombre incluyen los lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda PR, y trc. Los promotores eucariotas incluyen el temprano inmediato del CMV, la timidina quinasa del HSV, el temprano y el tardío de SV40, los LTR de retrovirus, y la metalotioneína-I del ratón. La selección del vector y promotor apropiados se halla claramente dentro del nivel de conocimientos ordinarios de la técnica. Generalmente, los vectores de expresión recombinante incluirán orígenes de replicación y marcadores seleccionables que permitan la transformación de las células huésped, por ejemplo, el gen de la resistencia a la ampicilina de *E. coli* y el gen TRP1 de *S. cerevisiae*, y un promotor derivado de un gen altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural situada cadena abajo. Tales promotores pueden derivarse de operones que codifican enzimas glicolíticas, tales como la 3-fosfoglicerato quinasa (PGK), el α -factor, la fosfatasa ácida, o las proteínas de choque térmico, entre otros. La secuencia estructural heteróloga se ensambla en la fase apropiada con las secuencias de inicio y terminación de la traducción, y preferiblemente, una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida al espacio periplásmico o al medio extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión incluyendo un péptido de identificación N-terminal que confiere características deseadas, por ejemplo, la estabilización o la purificación simplificada del producto recombinante expresado. Los vectores de expresión útiles para uso en bacterias se construyen insertando una secuencia de ADN estructural, que codifica una proteína o polipéptido deseados, junto con señales apropiadas de inicio y terminación de la traducción, en fase de lectura operable con un promotor funcional. El vector comprenderá uno o más marcadores fenotípicos seleccionables y un origen de replicación para garantizar el mantenimiento del vector y para, si se desea, proporcionar amplificación dentro del huésped. Los huéspedes procariotas apropiados para la transformación incluyen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y varias especies de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*, aunque también pueden emplearse otras tratándose de un asunto de libre elección.

Como ejemplo representativo pero no limitante, los vectores de expresión útiles para uso en bacterias pueden comprender un marcador seleccionable y un origen de replicación bacteriano, derivados de plásmidos disponibles comercialmente que comprenden elementos genéticos del vector de clonación bien conocido pBR322 (ATCC 37017). Tales vectores comerciales incluyen, por ejemplo, el pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) y el GEM 1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA). Estas secciones "estructurales" del pBR322 se combinan con un promotor apropiado y la secuencia estructural a expresar. A continuación de la transformación de una cepa huésped apropiada, y del cultivo de la cepa huésped hasta una densidad celular apropiada, el promotor seleccionado se induce o suprime por medios apropiados (por ejemplo, el cambio de temperatura o la inducción química) y las células se cultivan durante un período adicional. Las células típicamente se recolectan mediante centrifugación, se rompen por medios físicos o químicos, y el extracto crudo resultante se retiene para purificación adicional.

Se incluyen en el ámbito de las secuencias de ácido nucleico de la solicitud las secuencias de ácido nucleico que se hibridan, en condiciones rigurosas, con un polinucleótido de la invención, polinucleótido que es mayor de 10 p.b., preferiblemente de 20-50 p.b., e incluso mayor de 100 p.b. De acuerdo con la invención, las secuencias de

polinucleótidos de la invención, o los equivalentes funcionales de las mismas, pueden usarse para generar moléculas de ADN recombinante que dirigen la expresión de ese polinucleótido, o un equivalente funcional de las mismas, en células huéspedes apropiadas.

5 Los polinucleótidos de la solicitud están dirigido además contra secuencias que codifican variantes de los polipéptidos o proteínas de la invención. Estas variantes de la secuencia de aminoácidos pueden prepararse mediante procedimientos conocidos en la técnica introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en un polinucleótido nativo o variante. Hay dos variables en la construcción de las variantes de la secuencia de aminoácidos: la ubicación de la mutación y la naturaleza de la mutación. Las variantes de la secuencia de aminoácidos de los ácidos nucleicos se construyen preferiblemente mutando el polinucleótido para rendir una secuencia de aminoácidos que no ocurre en la naturaleza. Estas alteraciones de aminoácidos pueden hacerse en sitio que difieren en los ácidos nucleicos procedentes de diferentes especies (posiciones variables) o en regiones altamente conservadas (regiones constantes). Los sitios en tales ubicaciones típicamente se modificarán en serie, por ejemplo, sustituyendo primero con elecciones conservadores (por ejemplo, un aminoácido hidrofóbico con un aminoácido hidrofóbico diferente) y a continuación con elecciones más distantes (por ejemplo, un aminoácido hidrofóbico con un aminoácido cargado), y a continuación pueden hacerse supresiones o inserciones en el sitio diana. Las supresiones en la secuencia de aminoácidos generalmente oscilan desde aproximadamente 1 hasta 30 residuos, preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta 10 residuos, y típicamente son contiguas. Las inserciones de aminoácidos incluyen las fusiones amino- y/o carboxi-terminales que oscilan en longitud desde uno hasta un centenar o más residuos, así como las inserciones intrasecuencia de un único residuo o múltiples residuos aminoácidos. Las inserciones intrasecuencia pueden oscilar generalmente desde aproximadamente 1 hasta 10 residuos aminoácidos, preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta 5 residuos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen las secuencias de señal heterólogas necesarias para la secreción o para la modificación génica dirigida intracelular en células huéspedes diferentes.

25 Las supresiones en la secuencia de aminoácidos generalmente oscilan desde aproximadamente 1 hasta 30 residuos, preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta 10 residuos, y típicamente son contiguas. Las inserciones de aminoácidos incluyen las fusiones amino- y/o carboxi-terminales que oscilan en longitud desde uno hasta un centenar o más residuos, así como las inserciones intrasecuencia de un único residuo o múltiples residuos aminoácidos. Las inserciones intrasecuencia pueden oscilar generalmente desde aproximadamente 1 hasta 10 residuos aminoácidos, preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta 5 residuos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen las secuencias de señal heterólogas necesarias para la secreción o para la modificación génica dirigida intracelular en células huéspedes diferentes.

35 La PCR puede usarse también para crear variantes de la secuencia de aminoácidos de los polinucleótidos de la invención. Cuando pequeñas cantidades de ADN plantilla se usan como material de partida, los cebadores que difieren ligeramente en su secuencia respecto la región correspondiente en el ADN plantilla pueden generar la variante de aminoácidos deseada. La amplificación de la PCR resulta en una población de fragmentos de ADN producto de la PCR que difieren respecto la plantilla de polinucleótido que codifica el polipéptido o proteína en la posición especificada por el cebador. Los fragmentos de ADN que son producto de la PCR remplazan la región correspondiente en el plásmido, y éste proporciona la variante de aminoácidos deseada.

45 En un procedimiento preferido, los polinucleótidos que codifican los polinucleótidos de la invención se cambian mediante mutagénesis dirigida a un sitio. Este procedimiento usa secuencias de oligonucleótidos que codifican la secuencia de polinucleótido de la variante de aminoácidos deseada, así como una cantidad suficiente de nucleótidos adyacentes en ambos extremos de los aminoácidos cambiados para formar un dúplex estable a cualquier lado del sitio cambiado. En general, las técnicas de la mutagénesis son bien conocida por los especialistas en el campo, y esta técnica se ilustra mediante publicaciones tales como, Edelman *et al.*, DNA 2:183 (1983). Zoller and Smith, Nucleic Acids Res. 10:6487-6500 (1982), publicaron un procedimiento versátil y eficiente para producir cambios específicos en un sitio en una secuencia polinucleótidos. La PCR puede usarse también para crear variantes de la secuencia de aminoácidos de los nuevos ácidos nucleicos. Cuando pequeñas cantidades de ADN plantilla se usan como material de partida, los cebadores que difieren ligeramente en su secuencia respecto la región correspondiente en el ADN plantilla pueden generar la variante de aminoácidos deseada. La amplificación de la PCR resulta en una población de fragmentos de ADN producto de la PCR que difieren respecto la plantilla de polinucleótido que codifica el polipéptido en la posición especificada por el cebador. Los fragmentos de ADN que son producto de la PCR remplazan la región correspondiente en el plásmido, y éste proporciona la variante de aminoácidos deseada.

Una técnica adicional para generar variantes de aminoácidos es la técnica de la mutagénesis por inserción de un casete descrita en Wells *et al.*, Gene 34:315 (1985); y otras técnicas de mutagénesis bien conocidas en el estado de la técnicas tales como, por ejemplo, las técnicas en Sambrook *et al.*, ver más arriba, y en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel *et al.* Debido a la degeneración inherente del código genético, otras secuencias de ADN que codifican sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos, o una funcionalmente equivalente, pueden usarse en la práctica de la invención para la clonación y expresión de estos nuevos ácidos nucleicos. Tales secuencias de ADN incluyen las que son capaces de hibridarse a la secuencia de ácido nucleico novedosa apropiada en condiciones rigurosas.

65 La invención describe polipéptidos o proteínas codificadas por los polinucleótidos de la invención. Los fragmentos de los polipéptidos o proteínas de la presente invención que son capaces de exhibir actividad biológica son abarcados también por la presente invención. Los fragmentos de la proteína o polipéptido pueden estar en forma lineal, o pueden anillarse usando procedimientos conocidos, por ejemplo, según se describe en H.U. Saragovi, *et al.*, Bio/Technology

10:773-778 (1992) y en R.S. McDowell, *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. 114:9245-9253 (1992), las cuales se incorporan en la presente invención por referencia.

La presente invención también describe tanto la forma de longitud completa como la forma madura de los polipéptidos o proteínas de la invención. La forma de longitud completa de tales polipéptidos o proteínas puede identificarse mediante traducción de las secuencias de nucleótidos de cada polinucleótido de la invención. La forma madura de semejante polipéptido o proteína puede obtenerse mediante expresión del polinucleótido de longitud completa en una célula de mamífero apropiada o en otra célula huésped. La secuencia de la forma madura del polipéptido o proteína puede determinarse también a partir de la secuencia de aminoácidos de la forma de longitud completa.

Cuando la proteína o el polipéptido están unidos a membrana (por ejemplo, es un receptor), ellos pueden ser formas solubles de tal proteína o polipéptido. En semejantes formas parte o la totalidad de los dominios intracelular y transmembrana de la proteína o polipéptido se suprimen, de tal forma que la proteína o polipéptido se secreta completamente de la célula en la que se expresas. Los dominios intracelular y transmembrana de las proteínas o polipéptidos de la invención pueden identificarse de acuerdo con técnicas conocidas para la determinación de tales dominios a partir de la información de la secuencia.

La invención describe también procedimientos para producir un polipéptido o proteína que comprenden hacer crecer un cultivo de las células en un medio de cultivo apropiado, y purificar la proteína o el polipéptido del cultivo. Por ejemplo, los procedimientos incluyen un proceso para producir un polipéptido o proteína en el que una célula huésped conteniendo un vector de expresión apropiado, que incluye un polipéptido o proteína de la invención, se cultiva en condiciones que permiten la expresión del polipéptido o proteína codificado. El polipéptido o proteína puede recuperarse del cultivo, convenientemente del medio de cultivo, y purificarse aún más.

La invención describe adicionalmente un polipéptido o proteína de la invención que incluye una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente equivalente a una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido de la invención. Los polinucleótidos o proteínas pueden tener al menos aproximadamente el 95%, y más típicamente al menos aproximadamente el 98%, de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido de la invención.

La presente invención describe además polipéptidos o proteínas aislados codificados por los polinucleótidos de la presente invención, o por variantes degeneradas de los polinucleótidos de la presente invención. Por "variante degenerada" se quiere indicar polinucleótidos que difieren de un fragmento de ácido nucleico de la presente invención (por ejemplo, un ORF) en la secuencia de nucleótidos pero que, debido a la degeneración del código genético, codifican una secuencia polipeptídica idéntica. Los polinucleótidos preferidos de la presente invención son los ORF que codifican proteínas o polipéptidos. Una variedad de metodologías conocidas en el estado de la técnica pueden utilizarse para obtener uno cualquiera de los polipéptidos o proteínas aislados de la presente invención. Al nivel más sencillo, la secuencia de aminoácidos puede sintetizarse usando sintetizadores de péptidos disponibles comercialmente. Esto es particularmente útil para producir péptidos pequeños y fragmentos de polipéptidos mayores. Los fragmentos son útiles, por ejemplo, para generar anticuerpos contra el polipéptido nativo. En un procedimiento alternativo, el polipéptido o proteína se purifica a partir de células bacterianas, las cuales producen de forma natural el polipéptido o proteína. Alguien experto en la materia puede seguir fácilmente procedimientos conocidos para aislar polipéptidos y proteínas con objeto de obtener uno de los polipéptidos o proteínas aislados. Estos incluyen, pero no se limitan a la inmunocromatografía, la HPCL, la cromatografía de exclusión por tamaño, la cromatografía de intercambio iónico, y la cromatografía de inmovilización. Consultar, por ejemplo, Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag (1994); Sambrook, *et al.*, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology.

Los polipéptidos y proteínas pueden alternativamente purificarse a partir de células que se han alterado para expresar el polipéptido o proteína deseado. Tal y como se usa en la presente invención, se dice que una célula está alterada para expresar un polipéptido o proteína deseada cuando la célula, a través de la manipulación genética, se modifica para producir un polipéptido o proteína que normalmente no produce, o que la célula normalmente produce a un nivel inferior. Un experto en la materia puede adaptar fácilmente procedimientos para introducir y purificar tanto secuencias recombinantes como sintéticas en células eucariotas o procariotas con objeto de generar una célula que produce uno de los polipéptidos o proteínas. Los polipéptidos o proteínas purificados pueden usarse en ensayos de unión *in vitro*, los cuales son bien conocidos en el estado de la técnica, para identificar moléculas que se unen a los polipéptidos o proteínas. Estas moléculas incluyen pero no se limitan a, por ejemplo, las moléculas pequeñas, las moléculas procedentes de bibliotecas combinatorias, los anticuerpos, u otras proteínas o polipéptidos. Las moléculas identificadas en el ensayo de unión se ensayan a continuación en busca de actividad antagonista o agonista en cultivo de tejidos *in vivo* o en modelos animales que son bien conocidos en el estado de la técnica. De forma resumida, las moléculas se valoran en una pluralidad de cultivos celulares o animales, y entonces se verifica tanto la muerte de la célula/animal como la supervivencia prolongada del animal/célula.

Además, las moléculas unidoras pueden completarse con toxinas, por ejemplo, de ricina o del cólera, o con otros compuestos que son tóxicos para las células. El complejo molécula unidora-toxina se dirige a continuación contra el tumor u otra célula mediante la especificidad de la molécula unidora.

La proteína o polipéptido puede expresarse también como un producto de animales transgénicos, por ejemplo, como un componente de la leche de vacas, cabras, cerdos u ovejas transgénicos, los cuales se caracterizan por tener células somáticas o germinales que contienen un polinucleótido que codifica la proteína o polipéptido de la invención.

5 La proteína o polipéptido puede producirse también mediante síntesis química convencional conocida. Los procedimientos para construir las proteínas o polipéptidos de la presente invención mediante medios sintéticos son conocidos por los expertos en la materia. Los proteínas o polipéptidos contruidos sintéticamente, gracias compartir características estructurales primarias, secundarias o terciarias y/o conformacionales con las proteínas o polipéptidos pueden poseer propiedades biológica en común con los mismos, incluyendo la actividad proteica. Por tanto, pueden
10 emplearse como sustitutos biológica o inmunológicamente activos de proteínas o polipéptidos naturales, purificados, en el examen de compuestos terapéuticos y en procesos inmunológicos para el desarrollo de anticuerpos.

Las proteínas o polipéptidos proporcionados en la presente invención incluyen también las proteínas o polipéptidos caracterizados por secuencias de aminoácidos similares a las de las proteínas o polipéptidos purificados de la invención, pero en los cuales se proporcionan modificaciones de forma natural o mediante manipulación deliberada. Por
15 ejemplo, los expertos en la materia pueden hacer modificaciones en las secuencias peptídicas o de ADN usando técnicas conocidas. Las modificaciones de interés en las secuencias de proteínas pueden incluir la alteración, sustitución, reemplazo, inserción o supresión en la secuencia codificante de un residuo aminoácido seleccionado. Por ejemplo, uno o más de los residuos cisteína puede suprimirse o sustituirse con otro aminoácido para alterar la conformación de la
20 molécula. Las técnicas para semejante alteración, sustitución, reemplazo, inserción o supresión, son bien conocidas por los expertos en la materia (consultar, por ejemplo, la patente estadounidense nº 4.518.584). Preferiblemente, tal alteración, sustitución, reemplazo, inserción o supresión retiene la actividad deseada de la proteína o polipéptido.

Otros fragmentos y derivados de los polipéptidos o proteínas que se espera que retengan la actividad proteica
25 completamente o en parte, y que pueden ser útiles para examinar o para otras metodologías inmunológicas, pueden ser preparados fácilmente por parte de los expertos en la materia a partir de los descubrimientos en la presente invención.

La proteína o polipéptido pueden producirse también uniendo operativamente un polinucleótido de la invención a secuencias de control apropiadas en uno o más vectores de expresión en insectos, y empleando un sistema de
30 expresión en insecto. Los materiales y procedimientos para los sistemas de expresión en baculovirus/células de insecto están disponibles comercialmente en forma de equipo en, por ejemplo, Invitrogen, San Diego, California, EE.UU. (el equipo MaxBat™), y tales procedimientos son bien conocidos en el estado de la técnica, según se describe en Summers y Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987), incorporada en la presente invención por referencia. Tal y como se usa en la presente invención, una célula de insecto capaz de expresar un polinucleótido de la
35 presente invención está “transformada”.

La proteína o polipéptido de la invención puede prepararse cultivando células huéspedes transformadas en condiciones de cultivo apropiadas para expresar la proteína o polipéptido recombinante. La proteína o polipéptido expresado resultante puede entonces purificarse a partir de semejante cultivo (es decir, a partir del medio de cultivo o de los ex-
40 tractos celulares) usando procesos de purificación conocidos, tales como la filtración en gel y la cromatografía de intercambio iónico. La purificación de la proteína o polipéptido puede incluir también una columna de afinidad que contiene agentes que se unen a la proteína o polipéptido; uno o más pasos de columna sobre resinas de afinidad tales como la concanavalina A-agarosa, heparina-Toyopearl™ o Cibacrom Blue 3GA Sepharose™; uno o más pasos que implican la cromatografía de interacción hidrofóbica usando resinas tales como el feniléter, butiléter, o propiléter; o la
45 cromatografía de inmunoafinidad.

Alternativamente, la proteína o polipéptido pueden expresarse también en una forma que facilitará la purificación. Por ejemplo, puede expresarse como una proteína de fusión, tal como las de la proteína unidora de maltosa (MBP), la glutatión-S-transferasa (GST) o la tioredoxina (TRX). Los equipos para la expresión y purificación de tales proteínas
50 de fusión están disponibles comercialmente respectivamente en New England BioLab (Beverly, Mass.), Pharmacia (Piscataway, N.J.) y en Invitrogen. La proteína o polipéptido puede etiquetarse también con un epítipo y purificarse subsiguientemente usando un anticuerpo específico dirigido contra ese epítipo. Un de tales epítipos (“Flag”) está disponible comercialmente en Kodak (New Haven, Conn.).

Finalmente, pueden emplearse uno o más pasos de cromatografía líquida de elevadas prestaciones en fase inversa (RP-HPLC) usando medio de RP-HPLC hidrofóbico, por ejemplo, gel de sílice que tenga colgando metilos u otros
55 grupos alifáticos, para purificar adicionalmente la proteína o polipéptido. Algunos o la totalidad de los pasos de purificación precedentes, en varias combinaciones, pueden emplearse también para proporcionar una proteína o polipéptido recombinante aislado sustancialmente homogéneo. La proteína o polipéptido purificado de este modo está sustancialmente libre de otras proteínas de mamífero, y se define de acuerdo con la presente invención como una “proteína
60 aislada”.

Los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención se espera que exhiban uno o más de los usos o actividades biológicas (incluyendo los asociados con ensayos citados en la presente invención) identificados más adelante. Los
65 usos o actividades descritos para los polipéptidos o proteínas de la presente invención pueden proporcionarse mediante la administración o uso de tales proteínas o polipéptidos, o mediante la administración o uso de polinucleótidos que codifican tales proteínas o polipéptidos (tales como, por ejemplo, en terapias génicas o en vectores apropiados para la introducción de ADN).

Los polinucleótidos proporcionados por la presente invención pueden ser usados por la comunidad investigadora para varios propósitos. Los polinucleótidos pueden usarse para expresar proteína o polipéptido recombinante para su análisis, caracterización, uso diagnóstico o terapéutico; como marcadores para tejidos en los que la proteína diana se expresa anormalmente o de forma normal (por ejemplo, de forma constitutiva o en un estadio determinado de la diferenciación del tejido o del desarrollo o en estados morbosos); como marcadores de peso molecular en geles de Southern; como marcadores o etiquetas cromosómicos (cuando están marcados) para identificar cromosomas o para mapear posiciones de genes relacionados; para comparar con secuencias de ADN endógenas en pacientes para identificar trastornos genéticos potenciales; como sondas para hibridar y de ese modo descubrir secuencias de nuevas ADN relacionadas; como una fuente de información para derivar cebadores de la PCR para huellas genéticas; como una sonda para “eliminar mediante sustracción” secuencias conocidas en el proceso de descubrir otros polinucleótidos novedosos; para seleccionar y construir oligonucleótidos para la unión a un “chip de genes” u otro soporte, incluyendo para el examen de patrones de expresión; para la unión a un sustrato para preparar un chip de anticuerpos para examinar patrones de expresión de proteínas (dianas) o los niveles de expresión de la diana, o la presencia de la diana, y como un antígeno para generar anticuerpos antiidiotipos. Cuando la proteína diana se une o potencialmente se une a otra proteína u otro factor, los polinucleótidos de la invención pueden usarse también en ensayos para atrapar interacción (tal como, por ejemplo, el descrito en Gyuris *et al.*, Cell 75:791-803 (1993)) para identificar polinucleótidos que codifican la otra proteína o factor con el cual ocurre la unión, o para identificar otros factores o proteínas implicadas en la interacción de unión.

Las proteínas o polipéptidos descritos por la presente invención pueden usarse igualmente para determinar la actividad biológica, incluyéndolos en un grupo de múltiples proteínas o polipéptidos para examen de elevado rendimiento; como un reactivo (incluyendo el reactivo etiquetado) en ensayos diseñados para determinar cuantitativamente niveles de la proteína diana en muestras biológicas; como marcadores para tejidos en los cuales la proteína diana de la invención está expresada normalmente o anormalmente (bien constitutivamente o en una etapa particular de la diferenciación del tejido, o del desarrollo, o en una etapa de una enfermedad); y, por supuesto, para aislar receptores o ligandos correlativos. Cuando la proteína diana se une o potencialmente se une a otra proteína o factor (tal como, por ejemplo, en una interacción receptor-ligando), el polipéptido puede usarse para identificar la otra proteína o factor con el cual ocurre la unión, o para identificar inhibidores de la interacción de unión. Las proteínas implicadas en estas interacciones de unión pueden usarse también para examinar en busca de péptidos o moléculas pequeñas inhibidores o agonistas de la interacción de unión.

Cualquiera o la totalidad de estas utilidades en investigación son capaces de ser desarrollada en un formato del tipo reactivo o equipo para su comercialización como productos de investigación.

Los procedimientos para realizar los usos listados más arriba son bien conocidos por los expertos en la materia. Las referencias que describen tales procedimientos incluyen, sin limitación, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Sambrook, J., editores E.F. Fritsch y T. Maniatis, 1989, y “Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques”, Academic Press, editores Berger, S.L. y A.R. Kimmel, 1987.

Los polinucleótidos, proteínas y polipéptidos de la presente invención pueden usarse también como fuentes o suplementos nutricionales. Tales usos incluyen sin limitación el uso como un suplemento proteico o de polipéptido o de aminoácidos, el uso como una fuente de carbono, el uso como una fuente de nitrógeno, y el uso como una fuente de carbohidratos. En tales casos, las proteínas, polipéptido o polinucleótido de la invención puede añadirse al alimento de un determinado organismo, o puede administrarse como una preparación sólida o líquida separada, tal como en forma de polvo, píldoras, soluciones, suspensiones o cápsulas. En el caso de los microorganismos, la proteína, el polipéptido, o el polinucleótido de la invención pueden añadirse al medio en el cual o sobre el cual se cultiva el microorganismo.

Una proteína o polipéptido puede exhibir actividad de citocina, de proliferación celular (induciendo o inhibiendo), o de diferenciación celular (induciendo o inhibiendo), o puede inducir la producción de otras citocinas en ciertas poblaciones celulares, o puede ser un antagonista o agonista de cualquiera de los anteriores. Un polinucleótido de la invención puede codificar un polipéptido que exhiba tales atributos. Muchos factores proteicos descubiertos hasta la fecha, incluyendo todas las citocinas conocidas, han exhibido actividad en uno o más ensayos de proliferación celular dependiente de factor, y, por tanto, los ensayos sirven como una confirmación conveniente de la actividad agonista o antagonista de las citocinas. La actividad de una proteína o polipéptido de la presente invención está evidenciada por uno cualquiera de un cierto número de ensayos rutinarios de proliferación celular dependientes de factor para líneas celulares, incluyendo, sin limitación, los 32D, DA2, DA1G, T10, B9, B9/11, BaF3, MC9/G, M+(preB M+), 2E8, RB5, DA1, 123, T1165, HT2, CTLL2, TF-1, Mo7e y CMK.

La actividad de una proteína o polipéptido descrito por la invención puede, entre otros medios, medirse con los procedimientos siguientes:

Ensayos de proliferación de células T o timocitos, incluyen sin limitación los descritos en: Current Protocols in Immunology, editado por J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates y Wiley-Interscience (capítulo 3, “*In Vitro* assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19;” capítulo 7, “Immunologic studies in Humans”); Takai *et al.*, J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Bertagnolli *et al.*, J. Immunol. 145:1706-1712, 1990; Bertagnolli *et al.*, Cellular Immunology 133:327-341, 1991; Bertagnolli, *et al.*, I. Immunol. 149: 3778-3783, 1992; Bowman *et al.*, I. Immunol. 152:1756-1761, 1994.

Ensayos para la producción de citocinas y/o proliferación de células del bazo, células del nódulo linfático, o timocitos, incluye, sin limitación, los descritos en: Polyclonal T cell stimulation, Kruisbeek, A.M. y Shevach, E.M. en *Current Protocols in Immunology*. Editores J.E. Coligan *et al.*, volumen 1 pp. 3.12.1-3.12.14, John Wiley and Sons, Toronto. 1994; y "Measurement of mouse and human interleukin- γ ", Schreiber, R. D. en *Current Protocols in Immunology*. editores J.E. Coligan *et al.*, volumen 1 pp. 6.8.1-6.8.8, John Wiley and Sons, Toronto. 1994.

Ensayos para la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas y linfopoyéticas, incluyen, sin limitación, los descritos en: "Measurement of Human and Murine Interleukin 2 and Interleukin 4", Bottomly, K., Davits, L.S. y Lipsky, P.E. en *Current Protocols in Immunology*. Editores J.E. Coligan *et al.*, volumen 1 pp. 6.3.1-6.3.12, John Wiley and Sons, Toronto. 1991; deVries *et al.*, *J. Exp. Med.* 173:1205-1211, 1991; Moreau *et al.*, *Nature* 336:690-692, 1988; Greenberger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:2931-2938, 1983; "Measurement of mouse and human interleukin 6", Nordan, R. en *Current Protocols in Immunology*. Editores J.E. Coligan *et al.*, volumen 1 pp. 6.6.1-6.6.5, John Wiley and Sons, Toronto. 1991; Smith *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:1857-1861, 1986; "Measurement of human Interleukin 11", Bennett, F., Giannotti, J., Clark, S.C. y Turner, K.J. en *Current Protocols in Immunology*. Editores J.E. Coligan *et al.*, volumen 1 pp. 6.15.1 John Wiley and Sons, Toronto. 1991; "Measurement of mouse and human Interleukin 9", Ciarletta, A., Giannotti, J., Clark, S.C. y Turner, K.J. en *Current Protocols in Immunology*. Editores J.E. Coligan *et al.*, volumen 1 pp. 6.13.1, John Wiley and Sons, Toronto. 1991.

Ensayos para respuestas de clones de células T a antígenos (los cuales identificarán, entre otros, las proteínas que afectan las interacciones APC-células T, así como los efectos directos sobre células T, midiendo la proliferación y la producción de citocina), incluyen, sin limitación, los descritos en: *Current Protocols in Immunology*, editado por J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (capítulo 3, "In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function;" capítulo 6, "Cytokines and their cellular receptors;" capítulo 7, "Immunologic studies in Humans"); Weinberger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6091-6095, 1980; Weinberger *et al.*, *Eur. J. Immun.* 11: 405-411, 1981; Takai *et al.*, *J. Immunol.* 137:3494-3500, 1986; Takai *et al.*, *J. Immunol.* 140:508-512, 1988.

En todos los ensayos anteriores, el polipéptido o proteína se añade al sistema de ensayo y se determina la actividad de una citocina diana en presencia y ausencia del polipéptido o proteína.

Además, los polipéptidos pueden usarse para examinar el nivel de expresión o la presencia de una citocina. En realizaciones alternativas, la detección de una citocina o del nivel de una citocina será diagnóstica de un estado morbooso o enfermedad.

Una proteína o polipéptido puede exhibir también actividad estimuladora inmune o supresora inmune, o puede ser antagonista o agonista de cualquiera actividad, incluyendo, sin limitación, las actividades para las que se describieron ensayos más arriba. Un polinucleótido de la invención puede codificar un polipéptido o proteína que exhiba tales actividades. Una proteína o polipéptido puede ser útil en el tratamiento y/o detección (por ejemplo, un diagnóstico) de varias deficiencias y trastornos inmunitarios (incluyendo la inmunodeficiencia combinada severa (SCID)), por ejemplo, en la regulación (al alza o a la baja) del crecimiento y proliferación de linfocitos T y/o B, así como afectando la actividad citolíticas de las células NK y otras poblaciones celulares. Estas deficiencias inmunitarias pueden ser genéticas o estar causadas por infecciones víricas (por ejemplo, del VIH) así como bacterianas o fúngicas, o puede resultar en trastornos autoinmunitarios. Más específicamente, las enfermedades infecciosas causadas por infecciones víricas, bacterianas, fúngicas u otras infecciones pueden ser tratables o detectables (por ejemplo, con un ensayo diagnóstico) usando una proteína o polipéptido, incluyendo las infecciones por el VIH, los virus de la hepatitis, los herpesvirus, las micobacterias, las especies de *Leishmania*, las especies de malaria, y varias infecciones fúngicas, tales como la candidiasis. Por supuesto, en relación a esto, una proteína o polipéptido de la presente invención puede ser útil también cuando generalmente sea deseable un estímulo del sistema inmunitario, es decir, en el tratamiento del cáncer.

Los trastornos autoinmunitarios que pueden tratarse o detectarse usando una proteína o polipéptido incluyen, por ejemplo, la enfermedad del tejido conectivo, la esclerosis múltiple, el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, la inflamación pulmonar autoinmunitaria, el síndrome de Guillain-Barre, la tiroiditis autoinmunitaria, la diabetes mellitus dependiente de insulina, la *miastenia gravis*, la enfermedad injerto contra huésped, y la enfermedad ocular autoinmunitaria. Semejante proteína o polipéptido puede ser útil también en el tratamiento de reacciones y condiciones alérgicas, tales como el asma (particularmente el asma alérgica) u otros problemas respiratorios. Otras enfermedades en las que se desea la supresión inmunitaria (incluyendo, por ejemplo, el trasplante de órganos) puede ser tratable también usando una proteína o polipéptido de la presente invención.

Usando las proteína o polipéptidos puede ser posible modular también respuestas inmunitarias de un cierto número de formas. La regulación a la baja puede darse en forma de inhibición o bloqueo de una respuesta inmunitaria ya en marcha, o puede implicar la prevención de la inducción de una respuesta inmunitaria. Las funciones de las células T activadas puede inhibirse suprimiendo las respuestas de las células T, o induciendo tolerancia específica en las células T, o ambas. La inmunosupresión de las respuestas de células T generalmente es un proceso activo, no específico del antígeno, que requiere la exposición continuada de las células T al agente supresor. La tolerancia, que implica inducir una no-respuesta o anergia de las células T, puede distinguirse de la inmunosupresión en que generalmente es específica del antígeno y persiste una vez ha cesado la exposición al agente causante de la tolerancia. Operacionalmente, la tolerancia puede demostrarse por la ausencia de una respuesta de las células T a partir de la reexposición al antígeno específico en ausencia del agente causante de la tolerancia.

La regulación a la baja o la prevención de una o más funciones del antígeno (incluyendo, sin limitación, las funciones del antígeno del linfocito B (tales como, por ejemplo, el B7)), por ejemplo, impidiendo la síntesis de linfocina a nivel elevado por parte de células T activadas, puede ser útil en situaciones de trasplante de tejido, piel y órgano, y en la enfermedad injerto contra huésped (GVHD). Por ejemplo, el bloqueo de la función de las células T debería resultar en una destrucción del tejido reducida en el trasplante de tejidos. Típicamente, en los trasplantes de tejido, el rechazo del trasplante se inicia a través de su reconocimiento como ajeno por parte de las células T, seguido por una reacción inmunitaria que destruye el trasplante. La administración de una molécula que inhibe o bloquea la interacción de un antígeno de linfocito B7 con su ligando o ligandos naturales sobre células inmunitarias (tales como una forma monomérica soluble de un péptido que tiene actividad B7-2, sola o conjuntamente con una forma monomérica de un péptido que tiene una actividad de otro antígeno de linfocito B (por ejemplo, el B7-1, el B7-3), o bloqueando el anticuerpo) antes del trasplante puede conducir a la unión de la molécula al ligando o ligandos naturales sobre las células inmunitarias sin transmitir la correspondiente señal coestimuladora. El bloqueo de la función del antígeno del linfocito B es este asunto previene la síntesis de citocinas por parte de las células inmunitarias, tales como las células T, y por tanto actúa como un inmunosupresor. Además, la ausencia de coestimulación puede ser suficiente también para anergizar las células T, induciendo de ese modo la tolerancia en un sujeto. La inducción de tolerancia a largo plazo por parte de reactivos que bloquean el antígeno de linfocito B puede evitar la necesidad de una administración repetida de estos reactivos bloqueadores. Para conseguir una inmunosupresión o tolerancia suficientes en un sujeto, puede ser necesario también bloquear la función de una combinación de antígenos de linfocito B.

La eficacia de reactivos bloqueadores específicos en la prevención del rechazo del trasplante de órganos o GVHD puede verificarse usando modelos animales que son predictivos de la eficacia en humanos. Los ejemplos de sistemas apropiados que pueden usarse incluyen los trasplantes cardíacos alogénicos en ratas y los trasplantes xenogénicos de células de islotes pancreáticos en ratones, los cuales se han usado para examinar *in vivo* los efectos inmunosupresores de las proteínas de fusión CTLA4Ig según se describe en Lenschow *et al.*, Science 257:789-792 (1992) y Turka *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89:11102-11105 (1992). Además, los modelos murinos de la GVHD (consultar, editor W.E. Paul, Fundamental Immunology, Raven Press, Nueva York, 1989, pp. 846-847) puede usarse para determinar *in vivo* el efecto de bloquear la función del antígeno del linfocito B sobre el desarrollo de esa enfermedad. Además, los polipéptidos de la invención pueden usarse para detectar la GVHD después del trasplante del órgano.

El bloqueo de la función antígeno puede ser también terapéuticamente útil para tratar enfermedades autoinmunitarias. Muchos trastornos autoinmunitarios son el resultado de la activación inapropiada de células T que reaccionan contra el propio tejido y que promueven la producción de citocinas y autoanticuerpos implicados en la patología de las enfermedades. Prevenir la activación de las células T autorreactivas puede reducir o eliminar los síntomas de la enfermedad. La administración de reactivos que bloquean la coestimulación de las células T interrumpiendo las interacciones receptor:ligando de los antígenos de linfocito B puede usarse para inhibir la activación de las células T y prevenir la producción de autoanticuerpos o citocinas derivadas de célula T, los cuales pueden estar implicados en el proceso de la enfermedad. Adicionalmente, los reactivos de bloqueo pueden inducir tolerancia específica de antígeno de las células T autorreactivas, los que puede conducir al alivio a largo plazo de la enfermedad. La eficacia de los reactivos de bloqueo en la prevención o alivio de los trastornos autoinmunitarios puede determinarse usando un cierto número de modelos animales bien caracterizados de enfermedades autoinmunitarias humanas. Los ejemplos incluyen la encefalitis autoinmunitaria experimental murina, el lupus eritematoso sistémico en ratones MRL/lpr/lpr o en ratones híbridos NZB, la artritis del colágeno autoinmunitaria murina, la diabetes mellitus en ratones NOD y ratas BB, y la *miastenia gravis* experimental murina (consultar, editor W.E. Paul, Fundamental Immunology, Raven Press, Nueva York, 1989, pp. 840-856). Además, los polipéptidos de la invención pueden usarse para diagnosticar un trastorno inmunitario y/o la susceptibilidad de un organismo hacia un trastorno inmunitario.

La regulación al alza de una función de antígeno (preferiblemente una función de antígeno de linfocito B) como un medio para regular al alza las respuestas inmunitarias, puede ser útil en la terapia. La regulación de las respuestas inmunitarias puede darse en forma de potenciación de una respuesta inmunitaria existente o elicitar una respuesta inmunitaria inicial. Por ejemplo, potenciar una respuesta inmunitaria a través de la estimulación de la función antígeno de linfocito B puede ser útil en casos de infección vírica. Además, las enfermedades víricas sistémicas tales como la gripe, el resfriado común, y la encefalitis pueden aliviarse mediante la administración sistémica de formas estimuladoras de los antígenos de linfocito B.

Alternativamente, las respuestas inmunitarias antivíricas pueden potenciarse en un paciente infectado extrayendo las células T del paciente, coestimulando las células T *in vitro* con antígeno vírico-APC pulsada, bien expresando un péptido de la presente invención o junto con una forma estimulador de un péptido soluble, y reintroduciendo las células T activadas *in vitro* en el paciente. Otro procedimiento para potenciar las respuestas inmunitarias antivíricas sería aislar células infectadas a partir de un paciente, transfectarlas con un ácido nucleico que codificara una proteína o polipéptido de la presente invención como se describe en ésta, de tal forma que las células expresen la totalidad o una porción de la proteína o polipéptido sobre su superficie, y reintroducir las células transfectadas en el paciente. Las células infectadas serían ahora capaces de proporcionar una señal coestimuladora a las células T *in vivo* y por tanto activarlas.

La presencia de un polipéptido o proteína que tiene la actividad de un antígeno de linfocito B sobre la superficie de la célula tumoral proporciona la señal de coestimulación necesaria para las células T para inducir una respuesta inmunitaria mediada por células T contra las células tumorales transfectadas. Además, las células tumorales que carecen de moléculas del MHC de clase I o MHC de clase II, o que no consiguen expresar de nuevo cantidades suficientes de

moléculas del MHC de clase I o MHC de clase II, pueden transfectarse con ácido nucleico que codifica la totalidad o una porción (por ejemplo, una porción truncada del dominio citoplasmático) de una proteína de la cadena α del MHC de clase I y la proteína β microglobulina, o una proteína de la cadena α del MHC de clase II y una proteína de la cadena β del MHC de clase II, para de ese modo expresar proteínas del MHC de la clase I o del MHC de la clase II sobre la superficie celular. La expresión del MHC de la clase I o clase II apropiado en conjunción con un péptido que tenga la actividad de un antígeno de linfocito B (por ejemplo, los B7-1, B7-2, B7-3) induce una respuesta inmunitaria mediada por células T contra la células tumoral transfectada. Opcionalmente, un gen que codifica una construcción antisentido que bloquea la expresión de una proteína asociada al MHC de clase II, tal como la cadena invariante, puede cotransfectarse también con un ADN que codifica un péptido que tiene la actividad de un antígeno de linfocito B para promover la presentación de antígenos asociados a tumor e inducir inmunidad específica del tumor. Por tanto, la inducción de una respuesta inmunitaria mediada por células T en un sujeto humano puede ser suficiente para superar una tolerancia específica de tumor en el sujeto.

La actividad de una proteína o polipéptido puede, entre otros medios, medirse con los procedimientos siguientes:

Los ensayos apropiados para la citotoxicidad de timocitos o esplenocitos incluyen, sin limitación, los descritos en Current Protocols in Immunology, editores, J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates y Wiley- Interscience (capítulo 3, “*In Vitro* assays for Mouse Lymphocyte Function”, pp. 3.1-3.19; capítulo 7, “Immunologic studies in Humans”); Herrmann *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2488-2492, 1981; Herrmann *et al.*, J. Immunol. 128:1968-1974, 1982; Handa *et al.*, J. Immunol. 135:1564-1572, 1985; Takai *et al.*, J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Takai *et al.*, J. Immunol. 140:508-512, 1988; Herrmann *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2488-2492, 1981; Herrmann *et al.*, J. Immunol. 128:1968-1974, 1982; Handa *et al.*, J. Immunol. 135:1564-1572, 1985; Takai *et al.*, J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Bowman *et al.*, J. Virology 61:1992-1998; Takai *et al.*, J. Immunol. 140:508-512, 1988; Bertagnolli *et al.*, Cellular Immunology 133:327-341, 1991; Brown *et al.*, J. Immunol. 153:3079-3092, 1994.

Los ensayos de respuestas de inmunoglobulina dependientes de células T y el cambio de isotipo (el cual identificará, entre otras, las proteínas que modulan las respuestas de anticuerpos dependientes de células T y que afectan los perfiles Th1/Th2) incluyen, sin limitación, los descritos en: Maliszewski, J. Immunol. 144:3028-3033, 1990; y “Assays for B cell function: *In vitro* antibody production”, Mond, J.J. y Brunswick, M., en Current Protocols in Immunology. Editores J.E. Coligan *et al.*, volumen 1, pp. 3.8.1-3.8.16, John Wiley and Sons, Toronto. 1994.

Los ensayos de la reacción de linfocitos mezclados (MLR) (que identificarán, entre otras, las proteínas que generan predominantemente las respuestas Th1 y CTL) incluyen, sin limitación, los descritos en: Current Protocols in Immunology, editores, J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates y Wiley-Interscience (capítulo 3, “*In Vitro* assays for Mouse Lymphocyte Function”, pp. 3.1-3.19; capítulo 7, “Immunologic studies in Humans”); Takai *et al.*, J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Takai *et al.*, J. Immunol. 140:508-512, 1988; Bertagnolli *et al.*, J. Immunol. 149:3778-3783, 1992.

Los ensayos dependientes de células dendríticas (que identificarán, entre otras, las proteínas expresadas por las células dendríticas que activan las células T ingenuas) incluyen, sin limitación, los descritos en: Guery *et al.*, J. Immunol. 134:536-544, 1995; Inaba *et al.*, Journal of Experimental Medicine 173:549-559, 1991; Macatonia *et al.*, Journal of Immunology 154:5071-5079, 1995; Porgador *et al.*, Journal of Experimental Medicine 182:255-260, 1995; Nair *et al.*, Journal of Virology 67:4062-4069, 1993; Huang *et al.*, Science 264:961-965, 1994; Macatonia *et al.*, Journal of Experimental Medicine 169:1255-1264, 1989; Bhardwaj *et al.*, Journal of Clinical Investigation 94:797-807, 1994; e Inaba *et al.*, Journal of Experimental Medicine 172:631-640, 1990.

Los ensayos para la supervivencia/apoptosis de linfocitos (que identificará, entre otras, las proteínas que previenen la apoptosis después de la inducción del superantígeno, y las proteínas que regulan la homeostasis de linfocito) incluyen, sin limitación, los descritos en: Darzynkiewicz *et al.*, Cytometry 13:795-808, 1992; Gorczyca *et al.*, Leukemia 7:659-670, 1993; Gorczyca *et al.*, Cancer Research 53:1945-1951, 1993; Itoh *et al.*, Cell 66:233-243, 1991; Zacharchuk, Journal of Immunology 145: 4037-4045, 1990; Zamai *et al.*, Cytometry 14:891-897, 1993; Gorczyca *et al.*, International Journal of Oncology 1:639-648, 1992.

Los ensayos para proteínas que influyen en los pasos tempranos del compromiso y desarrollo de las células T incluyen, sin limitación, los descritos en: Antica *et al.*, Blood 84:111-117, 1994; Fine *et al.*, Cellular Immunology 155:111-122, 1994; Galy *et al.*, Blood 85:2770-2778, 1995; Toki *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88:7548-7551, 1991.

Una proteína o polipéptido puede ser útil en la regulación de la hematopoyesis (como un antagonista o agonista) y, consecuentemente, en el tratamiento y/o dedicación (por ejemplo, un diagnóstico) de las deficiencias de la células mieloides o linfoides. Incluso una actividad biológica marginal en apoyo de las células formadoras de colonias, o de las líneas celulares dependientes de factor, indican implicación en la regulación de la hematopoyesis, por ejemplo, en apoyo del crecimiento y proliferación de células progenitoras eritroides, solos o en combinación con otras citoquinas, indicando de ese modo la utilidad, por ejemplo, para tratar y/o detectar (por ejemplo, un diagnóstico) varias anemias, o para su uso conjunto con irradiación/quimioterapia para estimular la producción de precursores eritroides y/o células eritroides; en apoyo del crecimiento y proliferación de células mieloides tales como los granulocitos y monocitos/macrófagos (es decir, actividad CSF tradicional), por ejemplo, conjuntamente con la quimioterapia para

prevenir o tratar la supresión mieloide consiguiente; en apoyo del crecimiento y proliferación de megacariocitos y en consecuencia de plaquetas, permitiendo de ese modo la prevención y tratamiento de varios trastornos de plaquetas tales como la trombocitopenia, y generalmente para su uso en lugar de o de forma complementaria a las transfusiones de plaquetas; y/o en apoyo del crecimiento y proliferación de células madre hematopoyéticas, las cuales son capaces de madurar hasta cualquiera y la totalidad de las células hematopoyéticas mencionadas más arriba y, por tanto, hallan utilidad terapéutica en varios trastornos de células madre (tales como los tratados usualmente con trasplantes, incluyendo, sin limitación, las anemia anaplásica, y la hemoglobinuria paroxística nocturna), así como en la repoblación de compartimiento de células madre después de la irradiación/quimioterapia, tanto *in vivo* como *ex vivo* (es decir, en conjunción con el trasplante de médula ósea o con el trasplante de células progenitoras periféricas (homólogas o heterólogas)) como células normales o genéticamente manipuladas para terapia génica.

La actividad de una proteína o polipéptido puede, entre otros medios, medirse con los procedimientos siguientes:

Los ensayos apropiados para la proliferación y diferenciación de varias líneas hematopoyéticas se citan más arriba.

Los ensayos para la diferenciación de células madre embrionarias (que identificarán, entre otras, las proteínas que influyen en la hematopoyesis y diferenciación embrionaria) incluyen, sin limitación, los descritos en: Johansson *et al.* Cellular Biology 15:141-151, 1995; Keller *et al.*, Molecular and Cellular Biology 13:473-486, 1993; McClanahan *et al.*, Blood 81: 2903-2915, 1993.

Los ensayos para la supervivencia y diferenciación de células madre (que identificarán, entre otras, las proteínas que regulan la linfohematopoyesis) incluyen, sin limitación, los descritos en: "Methylcellulose colony forming assays", Freshney, M.G. en Culture of Hematopoietic Cells. Editores R.I. Freshney, *et al.*, pp. 265-268, Wiley-Liss, Inc., Nueva York, N.Y. 1994; Hirayama *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5907-5911, 1992; "Primitive hematopoietic colony forming cells with high proliferative potential", McNiece, I.K. y Briddell, R.A. en Culture of Hematopoietic Cells. Editores R.I. Freshney, *et al.*, pp. 23-39, Wiley-Liss, Inc., Nueva York, N.Y. 1994; Neben *et al.*, Experimental Hematology 22:353-359, 1994; "Cobblestone area forming cell assay", Ploemacher, R.E. en Culture of Hematopoietic Cells. Editores R.I. Freshney, *et al.*, pp. 1-21, Wiley-Liss, Inc., Nueva York, N.Y. 1994; "Long term bone marrow cultures in the presence of stromal cells", Spooncer, E., Dexter, M. y Allen, T. en Culture of Hematopoietic Cells. Editores R.I. Freshney, *et al.*, pp. 163-179, Wiley-Liss, Inc., Nueva York, N.Y. 1994; "Long term culture initiating cell assay", Sutherland, H.J. en Culture of Hematopoietic Cells. Editores R.I. Freshney, *et al.*, pp. 139-162, Wiley-Liss, Inc., Nueva York, N.Y. 1994.

Una proteína o polipéptido también puede tener utilidad en composiciones usadas para el crecimiento o regeneración del tejido óseo, cartilaginoso, de tendones, de ligamentos, y/o nervioso, así como en la curación de heridas y la reparación y sustitución de tejido, y en el tratamiento de quemaduras, incisiones y úlceras (como un antagonista o agonista).

Una proteína o polipéptido que actúa como un antagonista o agonista del crecimiento del cartílago y/o hueso tiene aplicación en la curación de las fracturas óseas y de las lesiones o defectos del cartílago en humanos y otros animales. Una preparación semejante que emplea una proteína o polipéptido de la invención puede tener un uso profiláctico en la reducción de fracturas cerradas y abiertas, y también en la fijación mejorada de articulaciones artificiales. La formación de novo de hueso inducida por un agente osteogénico contribuye a la reparación de defectos craneofaciales congénitos, inducidos por trauma, o inducidos por resección oncológica, y es útil también en la cirugía plástica cosmética.

Una proteína o polipéptido puede ser útil también en el tratamiento y/o detección (por ejemplo, diagnóstico) de la enfermedad periodontal, y en otros procesos de reparación dentales. Tales agentes pueden proporcionar un entorno para atraer las células formadoras de hueso, para estimular el crecimiento de las células formadoras de hueso, o para inducir la diferenciación de los progenitores de las células formadoras de hueso. Una proteína o polipéptido de la invención puede ser útil también en el tratamiento de la osteoporosis u osteoartritis, tal como a través de la estimulación de la reparación del hueso y/o cartílago, o bloqueando la inflamación o los procesos de destrucción del tejido (actividad colagenasa, actividad de osteoclastos, etc.) mediados por procesos de inflamación.

Otra categoría de actividad regeneradora de tejido que puede ser atribuible a la proteína o polipéptido de la presente invención es la formación de tendón/ligamento. Una proteína o polipéptido de la presente invención que induce la formación de tejido parecido a tendón/ligamento, u otro tejido, en circunstancias en las que normalmente no se forma tal tejido, tiene aplicación en la curación de roturas de tendón y ligamento, de deformidades, y otros defectos del ligamento en humanos y en otros animales. Una preparación de ese tipo, que emplea una proteína (como un antagonista o agonista) inductora de tejido parecido a tendón/ligamento puede tener un uso profiláctico en la prevención de lesiones del tejido del tendón o ligamento, así como un uso en la fijación mejorada del tendón o ligamento al hueso u otros tejidos, y en la reparación de los defectos del tejido del tendón o ligamento. La formación de novo de tejido parecido a tendón/ligamento inducida por una composición contribuye a la reparación de defectos congénitos, inducidos por trauma, u otros defectos de tendones o ligamentos con otras causas, y es útil también en la cirugía plástica cosmética para la unión o reparación de tendones y ligamentos. Las composiciones pueden proporcionar un entorno para atraer las células formadoras de tendones o ligamentos, para estimular el crecimiento de las células formadoras de tendones o ligamentos, para inducir la diferenciación de los progenitores de las células formadoras de tendones o ligamentos, o para inducir el crecimiento *ex vivo* de las células de tendones/ligamentos o sus progenitores para su retorno *in vivo* para efectuar la reparación del tejido. Las composiciones pueden ser útiles también en el tratamiento de la tendinitis,

del síndrome de túnel carpiano, y otros defectos de tendones o ligamentos. Las composiciones pueden incluir también una matriz y/o agente secuestrante apropiado como un portador, como es bien conocido en el estado de la técnica.

La proteína o polipéptido puede ser útil también para la proliferación de células neurales y para la regeneración del tejido nervioso y cerebral, es decir, para el tratamiento de las enfermedades y neuropatías del sistema nervioso central y periférico, así como de los trastornos traumáticos que implican la degeneración, muerte, o trauma de las células neurales o del tejido nervioso. Más específicamente, una proteína o polipéptido pueden usarse en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso periférico, tales como las lesiones de los nervios periféricos, la neuropatía periférica y las neuropatías localizadas, y las enfermedades del sistema nervioso central, tales como el Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica, y el síndrome de Shy-Drager. Otras condiciones que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención incluyen los trastornos mecánicos y traumáticos, tales como los trastornos de la médula espinal, los traumas en la cabeza, y las enfermedades cerebrovasculares tales como la apoplejía. Las neuropatías periféricas que resultan de la quimioterapia o de otras terapias médicas pueden ser tratables también usando una proteína o polipéptido.

Las proteínas o polipéptidos pueden ser útiles también para promover un cierre mejor o más rápida de heridas no cicatrizantes, incluyendo sin limitación, las úlceras por presión, las úlceras asociadas con la insuficiencia vascular, las heridas quirúrgicas y traumáticas, y similares.

Se espera que una proteína o polipéptido puedan exhibir también actividad para la generación o regeneración de otros tejidos, tales como órganos (incluyendo, por ejemplo, el páncreas, el hígado, el intestino, el riñón, la piel, el endotelio), el músculo (liso, esquelético, o cardíaco), y el tejido vascular (incluyendo el endotelio vascular), o para la promoción del crecimiento de células que forman parte de tales tejidos. Parte de los efectos deseados pueden conseguirse mediante la inhibición o modulación de la cicatrización fibrótica para permitir la regeneración del tejido normal. Una proteína o polipéptido de la invención puede exhibir también actividad angiogénica.

Una proteína o polipéptido pueden ser útiles también para la protección o regeneración del intestino y para el tratamiento de la fibrosis pulmonar o hepática, para la lesión por reperusión en varios tejidos, y en condiciones que resulten de la lesión sistémica por citocinas.

Una proteína o polipéptido pueden ser útiles para promover o inhibir la diferenciación de tejidos descrita más arriba a partir de tejidos o células precursores, o para inhibir el crecimiento de tejidos descrito más arriba.

La actividad de una proteína o polipéptido puede, entre otros medios, medirse con los procedimientos siguientes:

Los ensayos para la actividad de generación de tejido incluyen, sin limitación, los descritos en: publicación de patente internacional n° WO95/16035 (hueso, cartilago, tendón); publicación de patente internacional n° WO95/05846 (nervio, neuronal); publicación de patente internacional n° WO91/07491 (piel, endotelio).

Los ensayos de actividad cicatrizante de heridas incluyen, sin limitación, los descritos en: Winter, Epidermal Wound Healing, pp. 71-112 (editores Maibach, H.I. y Rovee, D.T.), Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago, según fueron modificados por Eaglstein y Mertz, J. Invest. Dermatol 71:382-84 (1978).

Una proteína o polipéptido puede exhibir también actividad agonista o antagonista contra actividades relacionadas con la activina o la inhibina. Las inhibinas se caracterizan por su capacidad para inhibir la liberación de hormona estimuladora del folículo (FSH), mientras que las activinas se caracterizan por su capacidad para estimular la liberación de hormona estimuladora del folículo (FSH). Por tanto, una proteína o polipéptido de la presente invención que sea agonista de la inhibina puede ser útil como anticonceptivo en base a la capacidad de las inhibinas para disminuir la fertilidad en los mamíferos hembra y para disminuir la espermatogénesis en los mamíferos macho. Adicionalmente, las proteínas o polipéptidos que son antagonistas de la activina pueden ser útiles como anticonceptivos en base a la capacidad de las moléculas de actividad para estimular la liberación de FSH a partir de las células de la pituitaria anterior. Alternativamente, las proteínas o polipéptidos que son agonistas de la activina pueden ser útiles como agentes terapéuticos inductores de fertilidad en base a la capacidad de las moléculas de actividad para estimular la liberación de FSH a partir de las células de la pituitaria anterior. Consultar, por ejemplo, la patente estadounidense n° 4.798.885. Además, las proteínas o polipéptidos que son antagonista de la inhibina puede ser útiles como agentes inductores de la fertilidad, en base a la capacidad de las inhibinas para disminuir la fertilidad en los mamíferos hembra y para disminuir la espermatogénesis en los mamíferos macho. Una proteína o polipéptido pueden ser útiles también para avanzar el inicio de la fertilidad en animales sexualmente inmaduros, con objeto de incrementar las prestaciones reproductivas a lo largo de la vida de animales domésticos tales como las vacas, ovejas y cerdos.

La actividad de una proteína o polipéptido puede, entre otros medios, medirse con los procedimientos siguientes:

Los ensayos de actividad de activina/inhibina incluyen, sin limitación, los descritos en: Vale *et al.*, Endocrinology 91:562-572, 1972; Ling *et al.*, Nature 321:779-782, 1986; Vale *et al.*, Nature 321:776-779, 1986; Mason *et al.*, Nature 318: 659-663, 1985; Forage *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:3091-3095, 1986.

Una proteína o polipéptido puede ser un antagonista o agonista de la actividad quimiotáctica o quimiocinética (por ejemplo, actuar como una quimocina) de las células de mamífero, incluyendo, por ejemplo, los monocitos, los

fibroblastos, los neutrófilos, las células T, los mastocitos, los eosinófilos, las células epiteliales y/o endoteliales. Las proteínas quimiotácticas o quimiocinéticas pueden usarse para movilizar o atraer una población celular deseada a un sitio de acción deseado. Los antagonistas o agonistas de las proteínas quimiotácticas o quimiocinéticas proporcionan ventajas concretas en el tratamiento de la inflamación, o de heridas u otros traumas de los tejidos, así como en el tratamiento de infecciones localizadas. Por ejemplo, la atracción de linfocitos, monocitos o neutrófilos hacia los tumores o sitios de infección puede resultar en respuestas inmunitarias mejoradas contra el tumor o el agente infeccioso.

Una proteína o polipéptido o péptido es un agonista de la actividad quimiotáctica para una población celular determinada si puede estimular, directa o indirectamente, la orientación o movimiento seguidos por tal población celular. Preferiblemente, la proteína o polipéptido o péptido tiene la capacidad de estimular directamente el movimiento de las células. Puede determinarse fácilmente si una proteína determinada tiene actividad quimiotáctica mediante el empleo de tal proteína o péptido en cualquier ensayo conocido de quimiotaxis celular.

La actividad de una proteína o polipéptido puede, entre otros medios, medirse con los procedimientos siguientes:

Los ensayos de actividad quimiotáctica (los cuales identificarán las proteínas que inducen o previenen la quimiotaxis) consisten en ensayos que miden la capacidad de una proteína para inducir la migración de células a través de una membrana, así como la capacidad de una proteína para inducir la adhesión de una población celular a otra población celular. Los ensayos apropiados para el movimiento y la adhesión incluyen, sin limitación, los descritos en: *Current Protocols in Immunology*, editores J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Marguiles, E.M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates y Wiley-Interscience (capítulo 6.12, "Measurement of alpha and beta Chemokines", pp. 6.12.1-6.12.28; Taub *et al.* *J. Clin. Invest.* 95:1370-1376, 1995; Lind *et al.* *APMIS* 103:140-146, 1995; Muller *et al.* *Eur. J. Immunol.* 25:1744-1748; Gruber *et al.* *J. of Immunol.* 152:5860-5867, 1994; Johnston *et al.* *J. of Immunol.* 153:1762-1768, 1994.

Una proteína o polipéptido puede ser también un antagonista o agonista de la actividad hemostática o trombolítica. Semejante proteína o polipéptido se espera que sea útil en el tratamiento y/o detección (por ejemplo, diagnóstico) de varios trastornos de la coagulación (incluyendo los trastornos hereditarios, tales como las hemofilias), o para potenciar la coagulación y otros sucesos hemostáticos en el tratamiento de heridas que resultan de traumas, cirugía u otras causas. Una proteína o polipéptido de la invención puede ser útil también para disolver o inhibir la formación de trombos, y para el tratamiento y prevención de las enfermedades que resultan de ellos (tales como, por ejemplo, el infarto de vasos cardíacos y del sistema nervioso central (por ejemplo, apoplejía)).

La actividad de una proteína o polipéptido puede, entre otros medios, medirse con los procedimientos siguientes:

Los ensayos de actividad hemostática y trombolítica incluyen, sin limitación, los descritos en: Linet *et al.*, *J. Clin. Pharmacol.* 26:131-140, 1986; Burdick *et al.*, *Thrombosis Res.* 45:413-419, 1987; Humphrey *et al.*, *Fibrinolysis* 5:71-79 (1991); Schaub, *Prostaglandins* 35: 467-474, 1988.

Una proteína o polipéptido pueden demostrar también actividad como receptores, ligandos de receptor, o antagonistas o agonistas de interacciones receptor/ligando. Los ejemplos de tales receptores y ligandos incluyen, sin limitación, los receptores de citocinas y sus ligandos, las receptor quinasas y sus ligandos, las receptor fosfatasas y sus ligandos, los receptores implicados en las interacciones célula-célula y sus ligandos (incluyendo sin limitación, las moléculas de adhesión celular (tales como las selectinas, integrinas y sus ligandos) y los pares receptor/ligando implicados en la presentación de antígeno, el reconocimiento de antígeno, y el desarrollo de las respuestas inmunitarias celular y humoral). Los receptores y ligandos son útiles también para examinar potenciales inhibidores peptídicos o de molécula pequeña de la interacción receptor-ligando relevante. Una proteína o polipéptido (incluyendo, sin limitación, los fragmentos de receptores y ligandos) pueden ellos mismos ser útiles como inhibidores de las interacciones receptor/ligando.

La actividad de una proteína o polipéptido puede, entre otros medios, medirse con los procedimientos siguientes:

Los ensayos apropiados para la actividad receptor-ligando incluyen, sin limitación, los descritos en: *Current Protocols in Immunology*, editores J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Marguiles, E.M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates y Wiley-Interscience (capítulo 7.28, "Measurement of Cellular Adhesion under static conditions", pp. 7.28.1-7.28.22), Takai *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6864-6868, 1987; Bierer *et al.*, *J. Exp. Med.* 168:1145-1156, 1988; Rosenstein *et al.*, *J. Exp. Med.* 169: 49-160 1989; Stoltenborg *et al.*, *J. Immunol. Methods* 175:59-68, 1994; Stitt *et al.*, *Cell* 80:661-670, 1995.

Las proteínas o polipéptidos pueden ser también antagonistas o agonistas de la inflamación. La actividad antiinflamatoria puede conseguirse proporcionando un estímulo a las células implicadas en la respuesta inflamatoria, inhibiendo o promoviendo las interacciones célula-célula (tales como, por ejemplo, la adhesión celular), inhibiendo o promoviendo la quimiotaxis de células implicadas en los procesos inflamatorios, inhibiendo o promoviendo la extravasación celular, o estimulando o suprimiendo la producción de otros factores que inhiben o promueven más directamente una respuesta inflamatoria. Las proteínas o polipéptidos pueden usarse para tratar y/o detectar (por ejemplo, un diagnóstico) enfermedades inflamatorias, incluyendo las enfermedades crónicas o agudas, incluyendo, sin limitación, el indicio asociado con la infección (tal como el choque séptico, la sepsis o síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica (SIRS)), la lesión por isquemia-reperfusión, la letalidad de endotoxinas, la artritis, el rechazo hiperagudo mediado por complemento, la nefritis, la lesión pulmonar inducida por citocina o quimocina, la enfermedad inflamatoria del

intestino, la enfermedad de Crohn o la resultante de la sobreproducción de citocinas tales como el TNF o la IL- 1. Las proteínas o polipéptidos de la invención puede ser útiles también para tratar la anafilaxis y la hipersensibilidad a una sustancia o material antigénico.

- 5 Los trastornos del sistema nervioso, que pueden tratarse y/o detectarse (por ejemplo, un diagnóstico) con los polipéptidos o proteínas incluyen, pero no están limitados a, las lesiones del sistema nervioso, y las enfermedades o trastornos que resultan en la desconexión de axones, en una disminución o degeneración de las neuronas, o en la desmielinización. Las lesiones del sistema nervioso que pueden tratarse y/o detectarse (por ejemplo, un diagnóstico)
- 10 en un paciente (incluyendo los pacientes mamíferos humanos y no humanos) incluyen, pero no están limitadas a, las lesiones siguientes, tanto del sistema nervioso central (incluyendo la médula espinal y el cerebro) como del periférico:
- (i) las lesiones traumáticas, incluyendo lesiones causada por daño físico o asociadas con cirugía, por ejemplo, lesiones que cortan una porción del sistema nervioso, o lesiones por compresión;
 - 15 (ii) las lesiones isquémicas, en las que la carencia de oxígeno en una porción del sistema nervioso resulta daño o muerte neuronal, incluyendo el infarto o isquemia cerebral, o el infarto o isquemia de la médula espinal;
 - (iii) las lesiones cancerosas, en las que una porción del sistema nervioso es destruida o dañada por tejido canceroso, el cual es un cáncer asociado al sistema nervioso o un cáncer derivado de tejido que no es del sistema
 - 20 nervioso;
 - (iv) las lesiones infecciosas, en las que una porción del sistema nervioso es destruida o dañada a resultas de una infección, por ejemplo, por un absceso o está asociadas con la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus del herpes zóster o del herpes simplex, o con la enfermedad de Lyme, la tuberculosis, la sífilis;
 - 25 (v) las lesiones degenerativas, en las que una porción del sistema nervioso es destruida o dañada a resultas de un proceso degenerativo, incluyendo, pero no limitándose a, la degeneración asociada con la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la corea de Huntington, o la esclerosis lateral amiotrófica;
 - 30 (vi) las lesiones asociadas con enfermedades o trastornos nutricionales, en las que una porción del sistema nervioso es destruida o dañada a resultas por un trastorno o enfermedad nutricional, incluyendo, pero no limitándose a, la carencia de vitamina B12, la carencia de ácido fólico, la enfermedad de Wernicke, la ambliopía del tabaco-alcohol, la enfermedad de Marchiafava-Bignami (degeneración primaria del cuerpo calloso), y la degeneración cerebral alcohólica;
 - 35 (vii) las lesiones neurológicas asociadas con enfermedades sistémicas, incluyendo, pero no limitándose a, la diabetes (neuropatía diabética, parálisis de Bell), lupus eritematoso sistémico, carcinoma, o sarcoidosis;
 - 40 (viii) las lesiones causadas por sustancias tóxicas, incluyendo el alcohol, plomo, o neurotoxinas concretas; y
 - (ix) las lesiones desmielinizada en las que una porción del sistema nervioso está destruido o dañado por una enfermedad desmielinizante, incluyendo, pero no limitándose a, la esclerosis múltiple, la mielopatía asociadas al virus de la inmunodeficiencia humana, la mielopatía transversa o con varias etiologías, la leucoencefalopatía multifocal progresiva, y la mielínolisis central pontina.
 - 45

Los agentes terapéuticos que son útiles, según la invención, para el tratamiento de un trastorno del sistema nervioso central pueden seleccionarse ensayando la actividad biológica para promover la supervivencia o diferenciación de neuronas. Por ejemplo, y no a modo de limitación, los agentes terapéuticos que provocan cualquiera de los efectos

50 siguientes puede ser útil según la invención:

- (i) tiempo de supervivencia incrementado de las neuronas en cultivo;
- (ii) proliferación neuronal incrementada en cultivo o *in vivo*;
- 55 (iii) producción incrementada de una molécula asociada a neurona en cultivo o *in vivo*, por ejemplo, la colin acetiltransferasas o la acetilcolinesterasa en relación a las neuronas motoras; o
- (iv) síntomas disminuidos de disfunción neuronal *in vivo*.
- 60

Tales efectos pueden medirse mediante cualquier procedimiento conocidos en la técnica. En unas realizaciones preferidas, no limitantes, la supervivencia incrementadas de las neuronas puede medirse por el procedimiento establecido por Arakawa *et al.* (1990, J. Neurosci. 10: 3507-3515); la proliferación incrementada de neuronas puede detectarse mediante los procedimientos establecidos por Pestronk *et al.* (1980, Exp. Neurol. 70:65-82) o Brown *et al.* (1981, Ann. Rev. Neurosci. 4:17-42); la producción incrementada de moléculas asociadas a neuronas puede medirse mediante bioensayos, ensayos enzimáticos, unión de anticuerpo, ensayo por transferencia Northern, etcétera, dependiendo de la molécula que vaya a medirse; y la disfunción de las neuronas motoras puede medirse verificando la manifestación

65

física del trastorno de la neurona motora, por ejemplo, debilidad, velocidad de la conducción en la neurona motora, o discapacidad funcional.

En unas realizaciones específicas, los trastornos de las neuronas motoras que pueden tratarse y/o detectarse (por ejemplo, un diagnóstico) incluyen, pero no se limitan a, los trastornos tales como el infarto, la infección, la exposición a toxina, las lesiones, el daño quirúrgico, las enfermedades degenerativas o el cáncer que pueden afectar las neuronas motoras así como otros componentes del sistema nervioso, así como los trastornos que selectivamente afectan las neuronas, tales como la esclerosis amiotrófica lateral, e incluyendo, pero no limitándose a, la atrofia espinal muscular progresiva, la parálisis bulbar progresiva, la esclerosis primaria lateral, la atrofia muscular infantil y juvenil, la parálisis bulbar progresiva infantil (síndrome de Fazio-Londe), la poliomieltis y el síndrome postpolio, y la neuropatía motora y sensorial hereditaria (enfermedad de Charcot-Marie-Tooth).

Una proteína o polipéptido puede exhibir también uno o más de las siguientes actividades o efectos adicionales: inhibir el crecimiento, infección o función de, o matar, los agentes infecciosos, incluyendo, sin limitación, las bacterias, los virus, los hongos y otros parásitos; afectar (suprimir o potenciar) características corporales o características de aspecto, incluyendo, sin limitación, la altura, el peso, el color del pelo, el color de los ojos, la piel, la proporción carne/grasa, o la pigmentación de otro tejido, o el tamaño o forma de un órgano o parte del cuerpo (tal como, por ejemplo, el aumento o disminución de mama, el cambio en la forma o aspecto de un hueso); afectar biorritmos o ciclos o ritmos circadianos; afecta la fertilidad de sujetos macho o hembra; afecta el metabolismo, catabolismo, anabolismo, procesado, utilización, almacenamiento o eliminación de grasa dietaria, lípidos, proteínas, carbohidratos, vitaminas, minerales, cofactores u otros factores o componentes nutricionales; afectar características de comportamiento, incluyendo, sin limitación, el apetito, la libido, el estrés, el aprendizaje (incluyendo los trastornos del aprendizaje), la depresión (incluyendo los trastornos depresivos) y los comportamientos violentos; proporcionar efectos analgésicos u otros efectos reductores del dolor; promover la diferenciación y crecimiento de células madre embrionarias en líneas celulares distintas de los linajes hematopoyético; actividad hormonal o endocrina; en el caso de los enzimas, corregir deficiencia del enzima y tratar enfermedades relacionadas con la deficiencia; el tratamiento de los trastornos hiperproliferativos (tales como, por ejemplo, la psoriasis); la actividad parecida a la de inmunoglobulina (tal como, por ejemplo, la capacidad para unir antígenos o complemento); y la capacidad para actuar como un antígeno en una composición de vacuna para generar una respuesta inmunitaria contra tal proteína u otro material o entidad que se entrecruce con esa proteína.

Una proteína o polipéptido (derivado de cualquier fuente, incluyendo, sin limitación, de fuentes recombinantes y no recombinantes) puede administrarse a un paciente que la necesita, sola o en composiciones farmacéuticas en las que se mezcla con portadores o excipientes apropiados, en dosis para tratar o mejorar una variedad de trastornos. Semejante composición puede incluir también (además de la proteína o polipéptido y un portador) diluyentes, rellenos, sales, tampones, estabilizantes, solubilizantes, y otros materiales bien conocidos en la técnica. El término “farmacéuticamente aceptable” significa un material no tóxico que no interfiere con la efectividad de la actividad biológica del ingrediente o ingredientes activos. Las características del portador dependerán de la ruta de administración. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener también citocinas, linfocinas, u otros factores hematopoyéticos tales como M-CSF, GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IFN, TNF0, TNF1, TNF2, G-CSF, Meg-CSF, la trombopoietina, el factor de célula madre, y la eritropoietina. La composición farmacéutica puede contener además otros agentes, los cuales o potencian la actividad de la proteína o polipéptido, o complementan su actividad o uso en el tratamiento. Tales factores y/o agentes adicionales pueden incluirse en la composición farmacéutica para producir un efecto sinérgico con la proteína o polipéptido de la invención, o para minimizar los efectos secundarios. De forma opuesta, la proteína o polipéptido de la presente invención puede incluirse en formulaciones de la citocina, linfocina, otro factor hematopoyético, factor trombolítico o antitrombolítico, o agente antiinflamatorio concreto para minimizar los efectos secundarios de la citocina, linfocina, otro factor hematopoyético, factor trombolítico o antitrombolítico, o agente antiinflamatorio. Una proteína o polipéptido puede ser activo en multímeros (por ejemplo, heterodímeros u homodímeros) o complejos con sí mismo u otras proteínas. Como resultado, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender una proteína o polipéptido de la invención en tal forma multimérica o complejada.

Las técnicas para la formulación y administración de los compuestos de la presente solicitud pueden hallarse en “Remington’s Pharmaceutical Sciences”, Mack Publishing Co., Easton, PA, en la última edición. Una dosis terapéuticamente efectiva se refiere además a la cantidad de compuesto suficiente para resultar en una mejora de los síntomas, por ejemplo, el tratamiento, curación, prevención o mejora de la condición médica relevante, o un incremento en la tasa de tratamiento, curación, prevención o mejora de tales condiciones. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual, administrado solo, una dosis terapéuticamente efectiva se refiere al ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a las cantidades combinadas de los ingredientes activos que resultan en el efecto terapéutico, sea administrados en combinación, en serie, o simultáneamente.

En la práctica del procedimiento de tratamiento, se administra una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína o polipéptido a un mamífero que tiene una enfermedad a tratar. La proteína o polipéptido pueden administrarse de acuerdo con el procedimiento de la invención, bien solos o en combinación con otras terapias tales como los tratamientos que emplean citocinas, linfocinas u otros factores hematopoyéticos. Cuando se coadministra con una o más citocinas, linfocinas u otros factores hematopoyéticos, se administra una proteína o polipéptido de la cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína o polipéptido de la presente invención a un mamífero que tiene una enfermedad a tratar. La proteína o polipéptido puede administrarse según el procedimiento de la invención, bien solo o en combina-

ción con otras terapias tales como los tratamientos que emplean citocinas, linfocinas u otros factores hematopoyéticos. Cuando se coadministra con una o más citocinas, linfocina u otros factores hematopoyéticos, la proteína o polipéptido de la presente invención, las rutas de administración pueden, por ejemplo, incluir la administración oral, rectal, trans-mucosal, o intestinal; el suministro parenteral, incluyendo intramuscular, subcutáneo, las inyecciones intramedulares, así como las inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales, o intra-oculares. La administración de la proteína o polipéptido usados en la composición farmacéutica, o para practicar el procedimiento de la presente invención, puede llevarse a cabo de una variedad de formas convencionales, tales como la ingestión oral, la inhalación, la aplicación tópica o cutánea, la inyección subcutánea, intraperitoneal, parenteral o intravenosa. La administración intravenosa al paciente es la preferida.

Alternativamente, se puede administrar el compuesto de manera local en vez de sistémica, por ejemplo, a través de la inyección del compuesto directamente en las articulaciones artríticas o en el tejido fibrótico, a menudo en un depósito o formulación de liberación sostenida. Con objeto de prevenir el proceso de cicatrización que frecuentemente ocurre como complicación de la cirugía del glaucoma, los compuestos pueden administrarse tópicamente, por ejemplo, como gotas oftálmicas. Además, se puede administrar el fármaco en un sistema de suministro dirigido del fármaco, por ejemplo, en un liposoma recubierto con un anticuerpo específico que apunte, por ejemplo, al tejido artrítico o fibrótico. Los liposomas se dirigirán hacia el tejido aquejado y serán captados selectivamente por éste.

Por tanto, las composiciones farmacéuticas pueden formularse de manera convencional usando uno o más portadores fisiológicamente aceptables, que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesado de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. Estas composiciones farmacéuticas pueden manufacturarse de una manera que es conocida por sí misma, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulado, preparación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización. La formulación apropiada depende de la ruta de administración escogida. Cuando una cantidad terapéuticamente efectiva de proteína o polipéptido se administra oralmente, la proteína o polipéptido adoptarán la forma de una tableta, cápsula, polvo, solución o elixir. Cuando se administra en forma de tableta, la composición farmacéutica puede adicionalmente contener un portador sólido tal como una gelatina o un adyuvante. La tableta, cápsula y polvo contendrán desde aproximadamente el 5 al 95% de proteína o polipéptido de la presente invención, y preferiblemente desde aproximadamente el 25 al 90% de proteína o polipéptido de la presente invención. Cuando se administra en forma líquida, puede añadirse un portador líquido tal como agua, petróleo, aceite de origen animal o vegetal, tal como el aceite de cacahuete, aceite mineral, aceite de soja, o aceite de sésamo, o aceites sintéticos. La forma líquida de la composición farmacéutica puede contener además solución salina fisiológica, solución de dextrosa u otro sacárido, o glicoles tales como el etilenglicol, el propilenglicol, o el polietilenglicol. Cuando se administra en forma líquida, la composición farmacéutica contiene desde aproximadamente el 0,5 al 90% de proteína o polipéptido de la presente invención, y preferiblemente desde aproximadamente el 1 al 50% de proteína o polipéptido de la presente invención.

Cuando una cantidad terapéuticamente efectiva de proteína o polipéptido se administra mediante inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, la proteína o polipéptido adoptarán la forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable y libre de pirógenos. La preparación de tales soluciones de proteína parenteralmente aceptables, prestando especial consideración al pH, isotonicidad, estabilidad, y similares, se halla dentro del conocimiento del campo. Una composición farmacéutica preferida para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea debe contener, además de la proteína o polipéptido de la presente invención, un vehículo isotónico tal como la inyección de cloruro sódico, la inyección de Ringer, la inyección de dextrosa, la inyección de dextrosa y cloruro sódico, la inyección de Ringer con lactato, u otro vehículo conocido en el estado de la técnica. Las composiciones farmacéuticas también pueden contener estabilizantes, conservantes, tampones, antioxidantes, u otros aditivos conocidos por los especialistas en la técnica. Para la inyección, todos los agentes de la invención pueden formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como la solución de Hank, la solución de Ringer, o el tampón salino fisiológico. Para la administración transmucosal, se usan en la formulación agentes penetrantes apropiados para la barrera que debe permearse. Tales penetrantes son generalmente conocidos en el estado de la técnica.

Para la administración oral, los compuestos pueden formularse fácilmente combinando los compuestos activos con portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en el estado de la técnica. Tales portadores permiten que los compuestos de la invención se formulen como tabletas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, papillas, suspensiones, y similares, para la ingestión oral por parte de un paciente que debe tratarse. Las preparaciones farmacéuticas para uso orla pueden obtenerse añadiendo un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir los auxiliares apropiados, si se desea, para obtener tabletas o núcleos de grageas. Los excipientes apropiados son, en concreto, los rellenos tales como los azúcares, incluyendo la lactosa, la sacarosa, el manitol, o el sorbitol; las preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, el almidón de maíz, el almidón de trigo, el almidón de arroz, el almidón de patata, la gelatina, la goma de tragacanto, la metilcelulosa, la hidroximetilcelulosa, la carboximetilcelulosa sódica, y/o la polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes desintegrantes tales como la polivinilpirrolidona entrecruzada, el agar, el ácido algínico o una sal del mismo, tal como el alginato sódico. Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos apropiados. Para este propósito pueden usarse soluciones de azúcares concentradas, las cuales pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, y/o dióxido de titanio, soluciones de laca, y solventes orgánicos o mezclas de solventes apropiados. Pueden añadirse colorantes o pigmentos a las tabletas o a los recubrimientos de las grageas para su identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

Las preparaciones farmacéuticas que pueden usarse oralmente incluyen las cápsulas duras hechas de gelatina, así como las cápsulas blandas, selladas, hechas de gelatina y un plastificante tal como el glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos en mezcla con rellenos tales como la lactosa, unidores tales como los almidones, y lubricantes tales como el talco o el estearato de magnesio, y, opcionalmente, con estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos apropiados, tales como los aceites grasos, la parafina líquida, o los polietilenglicol líquidos. Además, pueden añadirse estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deberían estar en dosis apropiadas para tal administración. Para la administración bucal, las formulaciones pueden adoptar la forma de tabletas o pastillas formuladas de la forma convencional.

Para la administración por inhalación, los compuestos se suministran convenientemente en forma de una presentación de atomizador de aerosol a partir de envases presurizados, o de un nebulizador, haciendo uso de un propelente apropiado, por ejemplo, el diclorodifluorometano, el triclorofluorometano, el diclorotetrafluoroetano, el dióxido de carbono u otro gas apropiado. En el caso de un aerosol presurizado, la dosis unitaria puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador o insuflador pueden formularse conteniendo una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo apropiada, tal como la lactosa o el almidón. Los compuestos pueden formularse para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en ampulas o en contenedores multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes formuladores tales como agentes suspensores, estabilizantes y/o dispersantes.

Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse según sea apropiado como suspensiones aceitosas para inyección. Los solventes o vehículos lipofílicos apropiados incluyen los aceites grasos, tales como el aceite de sésamo, o los ésteres sintéticos de ácidos grasos, tales como el etiloleato o los triglicéridos, o los liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, tal como la carboximetilcelulosa sódica, el sorbitol, o el dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizantes apropiados, o agentes que incrementan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Alternativamente, el ingrediente activo puede adoptar la forma de un polvo para su constitución con un vehículo apropiado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

Los compuestos pueden formularse también en composiciones rectales tales como, por ejemplo, supositorios o enemas de retención, que contengan bases de supositorios convencionales tales como la manteca de coco u otros glicéridos. Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos pueden formularse también como una preparación de depósito. Tales formulaciones de actuación duradera pueden administrarse mediante implante (por ejemplo, subcutánea o intramuscularmente) o mediante inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrofóbicos apropiados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o como resinas de intercambio iónico, o como derivados ligeramente solubles, por ejemplo, como una sal ligeramente soluble.

Un portador farmacéutico para los compuestos hidrofóbicos es un sistema cosolvente que comprende alcohol bencílico, un tensioactivo no polar, un polímero orgánico miscible en agua, y una fase acuosa. El sistema cosolvente puede ser un sistema cosolvente VPD. VPD es una solución de 3% p/v de alcohol bencílico, 8% p/v del tensioactivo no polar polisorbato 80, y 65% p/v de polietilenglicol 300, enrasada a volumen en etanol absoluto. El sistema cosolvente VPD (VPD:5W) consiste en VPD diluida 1:1 con una solución de dextrosa al 5% en agua. Este sistema cosolvente disuelve bien compuestos hidrofóbicos, y por sí mismo produce una baja toxicidad a partir de su administración sistémica. Naturalmente, las proporciones de un sistema cosolvente pueden variarse considerablemente sin destruir sus características de solubilidad y toxicidad. Además, la identidad de los componentes del cosolvente pueden variarse: por ejemplo, pueden usarse otros tensioactivos no polares de baja toxicidad en vez del polisorbato 80; la fracción de tamaño del polietilenglicol puede variarse; otros polímeros biocompatibles pueden remplazar el polietilenglicol, por ejemplo, la polivinilpirrolidona; y otros azúcares y polisacáridos pueden sustituir la dextrosa. Alternativamente, pueden emplearse otros sistemas de suministro para compuestos farmacéuticos hidrofóbicos. Los liposomas y las emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos o portadores de suministro para fármacos hidrofóbicos. También pueden emplearse ciertos solventes orgánicos, tales como el dimetilsulfóxido, aunque usualmente a costa de una mayor toxicidad. Adicionalmente, los compuestos pueden suministrarse usando un sistema de liberación sostenida, tal como las matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el agente terapéutico. Se han establecido varios materiales de liberación sostenida y son bien conocidos por los expertos en la materia. Las cápsulas de liberación sostenida pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar los compuestos desde durante unas pocas semanas, hasta más de cien días. Dependiendo de la naturaleza química y la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, pueden emplearse estrategias adicionales para la estabilización de la proteína.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender además portadores o excipientes sólidos o geles apropiados. Los ejemplos de tales portadores o excipientes incluyen, pero no se limitan a, el carbonato cálcico, el fosfato cálcico, varios azúcares, los almidones, los derivados de celulosa, la gelatina, y los polímeros tales como los polietilenglicoles. Muchos de los compuestos inhibidores de proteinasas de la invención pueden proporcionarse como sales con contraiones farmacéuticamente aceptables. Esas sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables son aquellas

sales que retienen la efectividad y propiedades biológicas de los ácidos, y que se obtienen mediante reacción con bases inorgánicas u orgánicas tales como el hidróxido sódico, el hidróxido de magnesio, el amoníaco, la trietilamina, la dialquilamina, la monoalquilamina, los aminoácidos dibásicos, el acetato sódico, el benzoato potásico, la trietanolamina y similares.

La composición farmacéutica puede estar en forma de un complejo de la(s) proteína(s) o polipéptido(s) de la presente invención, junto con antígenos de proteína o péptido. El antígeno de proteína y/o péptido suministrará una señal de estímulo a ambos, los linfocitos B y T. Los linfocitos B responderán al antígeno a través de su receptor de inmunoglobulina de superficie. Los linfocitos T responderán al antígeno a través del receptor de las células T (TCR) a continuación de la presentación del antígeno por parte de la proteínas del MHC. El MHC y las proteínas relacionadas estructuralmente, incluyendo las codificadas por los genes del MHC de la clase I y clase II en células huéspedes, servirán para presentar el antígeno o antígenos peptídicos a los linfocitos T. Los componentes del antígeno pueden suministrarse también como complejos de péptido-MHC purificados, solos o con moléculas coestimulantes que pueden enviar señales directamente a las células T. Alternativamente, pueden combinarse con la composición farmacéutica de la invención, anticuerpos capaces de unir a inmunoglobulinas de superficie y otras moléculas sobre las células B, así como anticuerpos capaces de unir el TCR y otras moléculas sobre las células T. La composición farmacéutica de la invención puede estar en forma de un liposoma en el que se combina la proteína o polipéptido de la presente invención, además de otros portadores farmacéuticamente aceptables, con agentes anfipáticos tales como lípidos, los cuales existen en forma agregada como micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos, o capas lamelares en solución acuosa. Los lípidos apropiados para la formulación liposomal incluyen, sin limitación, los monoglicéridos, los diglicéridos, los sulfolípidos, la lisolecitina, los fosfolípidos, la saponina, los ácidos biliares, y similares. La preparación de tales formulaciones liposomales se halla dentro del nivel de capacitación en la técnica, según se describe, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n° 4.235.871; 4.501.728; 4.837.028; y 4.737.323, todas las cuales se incorporan en la presente invención por referencia.

La cantidad de proteína o polipéptido en la composición farmacéutica dependerá de la naturaleza y gravedad de la condición que se esté tratando, y de la naturaleza de los tratamientos previos que haya experimentado el paciente. En última instancia, el médico responsable decidirá la cantidad de proteína o polipéptido de la presente invención con que tratar cada paciente individual. Inicialmente, el médico responsable administrará dosis bajas de proteína o polipéptido de la presente invención, y observará la respuesta del paciente. Pueden administrarse dosis mayores de proteína o polipéptido de la presente invención hasta que se obtiene el efecto terapéutico óptimo para el paciente, y en ese punto la dosis ya no se incrementa más. Se contempla que los diversas composiciones farmacéuticas usadas para practicar el procedimiento deben contener aproximadamente 0,01 μ g a aproximadamente 100 mg (preferiblemente aproximadamente 0,1 μ g hasta aproximadamente 10 mg, más preferiblemente aproximadamente 0,1 μ g hasta aproximadamente 1 mg) de proteína o polipéptido de la presente invención por kg de peso corporal. Para las composiciones en la presente invención que son útiles para la regeneración del hueso, cartílago, tendón, o ligamento, el procedimiento terapéutico incluye administrar la composición tópica, sistémica, o localmente, como un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica a usar en esta invención está, por supuesto, en una forma fisiológicamente aceptable, libre de pirógenos. Además, la composición puede encapsularse de forma deseable o inyectarse en una forma viscosa para su suministro en el sitio del daño del hueso, cartílago o tejido. La administración tópica puede ser apropiada para la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos. Otros agentes terapéuticos útiles, distintos de una proteína o polipéptido de la invención, que pueden incluirse también opcionalmente en la composición tal como se describe más arriba, pueden alternativa o adicionalmente administrarse en los procedimientos de la invención de forma simultánea o secuencial con la composición. Preferiblemente, para la formación de hueso y/o cartílago, la composición incluirá una matriz capaz de suministrar la composición que contiene proteína en el sitio del daño del hueso y/o cartílago, proporcionando una estructura para el hueso y cartílago en desarrollo, y óptimamente será capaz de ser resorbida en el cuerpo. Tales matrices pueden estar formadas por materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas.

La elección del material de la matriz se basa en la biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, aspecto cosmético, y propiedades de interfaz. La aplicación particular de las composiciones definirá la formulación apropiada. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser de sulfato cálcico, fosfato tricálcico, hidroxiapatito, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, y polianhídridos, biodegradables y químicamente definidas. Otros materiales potenciales son biodegradables y están biológicamente bien definidos, tales como el hueso y el colágeno dérmico. Otras matrices están formadas por proteínas puras o componentes de la matriz extracelular. Otras matrices potenciales no son biodegradables y están biológicamente bien definidos, tales como el hidroxiapatito sinterado, el biovidrio, los aluminatos, u otras cerámicas. Las matrices pueden estar formadas por combinaciones de cualquiera de los tipos de materiales mencionados más arriba, tales como el ácido poliláctico y el hidroxiapatito, o el colágeno y el fosfato tricálcico. Las biocerámicas pueden alterarse en su composición, tal como en fosfato-aluminato de calcio, y procesarse para alterar el tamaño de poro, el tamaño de la partícula, la forma de la partícula, y la biodegradabilidad. Actualmente, el preferido es un copolímero al 50:50 (peso molar) de ácido láctico y ácido glicólico, en forma de partículas porosas que tienen diámetros que oscilan desde 150 hasta 180 micrones. En algunas aplicaciones, será útil utilizar un agente secuestrante, tal como la carboximetilcelulosa o un coágulo de sangre autólogo, para prevenir que la composición de proteína o polipéptido se disocie de la matriz.

Una familia preferida de agentes secuestrantes la constituyen los materiales celulósicos tales como las alquilcelulosas (incluyendo las hidroxialquilcelulosas), incluyendo la metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, y la carboximetilcelulosa, siendo las más preferidas las sales catiónicas de la

carboximetilcelulosa (CMC). Otros agentes secuestrantes preferidos incluyen el ácido hialurónico, el alginato sódico, el poli(etilenglicol), el óxido de polioxietileno, el polímero de carboxivinilo, y el poli(alcohol vinílico). La cantidad de agente secuestrante útil en la presente invención es del 0,5-20% en peso, preferiblemente del 1-10% en peso, en base al peso total de la formulación, lo que representa la cantidad necesaria para impedir la desorción de la proteína o polipéptido de la matriz de polímero, y para permitir la manipulación necesaria de la composición, aunque no tanta como para que las células progenitoras no puedan infiltrar la matriz, proporcionando, de ese modo, a la proteína o polipéptido la oportunidad de ayudar a la actividad osteogénica de las células progenitoras. En otras composiciones, la proteína o polipéptidos pueden combinarse con otros agentes beneficiosos para el tratamiento del defecto, herida o tejido del hueso y/o cartílago en cuestión. Estos agentes incluyen varios factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), los factores transformadores (TGF- α o TGF- β), y el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF).

Las composiciones terapéuticas son valiosas también actualmente para las aplicaciones veterinarias. Además de los humanos, los animales domésticos y los caballos pura sangre son particularmente pacientes deseados para semejante tratamiento con proteínas o polipéptidos de la presente invención. El régimen de dosificación de una composición farmacéutica que contiene la proteína a usarse en la regeneración del tejido será determinado por el médico responsable atendiendo a varios factores que modifican la acción de las proteínas o polipéptidos, por ejemplo, la cantidad de peso de tejido que se desea formar, el sitio de la lesión, la condición del tejido dañado, el tamaño de la herida, el tipo de tejido lesionado (por ejemplo, hueso), la edad, sexo y dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección, el tiempo de administración, y otros factores clínicos. La dosis puede variar con el tipo de matriz usada en la reconstitución y con la inclusión de otras proteínas en la composición farmacéutica. Por ejemplo, la adición de otros factores de crecimiento conocidos, tales como el IGF-I (factor I de crecimiento parecido a la insulina), a la composición final puede afectar también la dosificación. El progreso puede monitorizarse mediante la evaluación del crecimiento y/o reparación del tejido/hueso, por ejemplo, mediante rayos X, determinaciones histomorfométricas, y etiquetado con tetraciclina.

Los polinucleótidos de la presente invención pueden usarse también para la terapia génica. Tales polinucleótidos pueden introducirse, tanto *in vivo* como *ex vivo*, en células para su expresión en un sujeto mamífero. Los polinucleótidos de la invención pueden administrarse también mediante otros procedimientos conocidos para la introducción del ácido nucleico dentro de una célula u organismo (incluyendo, sin limitación, en forma de vectores víricos o ADN desnudo).

También pueden cultivarse células *ex vivo*, en presencia de proteínas o polipéptidos de la presente invención, con objeto de que proliferen o produzcan un efecto deseado sobre la actividad de tales células. Las células tratadas pueden introducirse a continuación *in vivo* con propósitos terapéuticos.

Las composiciones farmacéuticas incluyen composiciones en donde los ingredientes activos están contenidos en una cantidad efectiva para conseguir su propósito previsto. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente efectiva significa una cantidad efectiva para prevenir el desarrollo o para aliviar los síntomas existentes del sujetos que se está tratando. La determinación de las cantidades efectivas se halla claramente dentro de las capacidades de los expertos en la materia, especialmente a la luz de las descripciones detalladas proporcionadas en la presente invención. Para cualquier compuesto usado en el procedimiento de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos con cultivos celulares. Por ejemplo, puede formularse una dosis en modelos animales para conseguir un rango de concentración circulante que incluye el IC₅₀ determinado en cultivo celular (es decir, la concentración de compuesto de ensayo que consigue una inhibición mitad de la máxima de la actividad proteinasa C). Tal información puede usarse para determinar más precisamente las dosis útiles en humanos.

Una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a una cantidad de compuesto que resulta en una mejora de los síntomas o una prolongación de la supervivencia en un paciente. La toxicidad y eficacia terapéutica de tales compuestos puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva para el 50% de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, y puede expresarse como la proporción entre LD₅₀ y ED₅₀. Los compuestos que presentan índices terapéuticos elevados son los preferidos. Los datos obtenidos de estos ensayos con cultivos celulares y estudios con animales pueden usarse para formular un rango de dosis para uso en humanos. La dosis de tales compuestos preferiblemente se halla dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluye el ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. La formulación exacta, la ruta de administración, y la dosis pueden ser escogidas por médico individual a la vista de la condición del paciente. Consultar, por ejemplo, Fingl *et al.*, 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", capítulo 1, p. 1. La cantidad y el intervalo de la dosis pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles en plasma de la porción activa que sean suficientes para mantener los efectos inhibidores de la proteinasa C, o una concentración efectiva mínima (MEC). La MEC variará para cada compuesto, pero puede estimarse a partir de los datos *in vitro*, por ejemplo, la concentración necesaria para conseguir un 50-90% de inhibición de la proteinasa C usando los ensayos descritos en la presente invención. Las dosis necesarias para conseguir la MEC dependerán de las características individuales y de la ruta de administración. No obstante, pueden usarse los ensayos de HPLC o los bioensayos para determinar las concentraciones en plasma.

Los intervalos de las dosis pueden determinarse también usando el valor de la MEC. Los compuestos deben administrarse usando un régimen que mantenga niveles en plasma por encima de la MEC durante el 10-90% del tiempo,

preferiblemente entre el 30-90%, y más preferiblemente entre el 50-90%. En casos de administración local o captación selectiva, la concentración local efectiva del fármaco puede no estar relacionada con la concentración en plasma.

La cantidad de composición administrada dependerá, por supuesto, del sujeto que se está tratando, del peso del sujeto, de la gravedad de la afección, la manera de administración, y el juicio del medico responsable.

Si se desea, la composición puede presentarse en un envase o en un dispositivo dispensados que puede contener una o más formas de dosis unitarias que contienen el ingrediente activo. El envase puede, por ejemplo, comprender una lámina de metal o de plástico, tal como un blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado por instrucciones para la administración. También pueden prepararse composiciones que comprenden un compuesto formulado en un portador farmacéutico compatible, colocarse en un contenedor apropiado, y etiquetarse para el tratamiento de una enfermedad indicada.

En una aplicación de esta realización, puede grabarse una secuencia de nucleótidos de la invención en un medio legible por ordenador. Tal y como se usa en la presente invención, "medio legible por ordenador" se refiere a cualquier medio que puede ser leído y accedido directamente por un ordenador. Tales medios incluyen, pero no se limitan a: medios de almacenamiento magnéticos, tales como los discos flexibles, el medio de almacenamiento en disco duro, y en cinta magnética; medios de almacenamiento óptico tales como los CD-ROM; medios de almacenamiento eléctrico tales como las RAM y ROM; e híbridos de estas categorías tales como los medios de almacenamiento magnético/ópticos. Un especialista capacitado apreciará fácilmente que cualquiera de los medios legibles por ordenador conocidos puede usarse para crear un artículo manufacturado que comprende un medio legible por ordenador que tiene grabada sobre él una secuencia de nucleótidos de la presente invención. Tal y como se utiliza en la presente invención, "grabado" se refiere a un proceso para almacenar información sobre un medio legible por ordenador. Un especialista capacitado fácilmente adoptará cualquiera de los procedimientos actualmente conocidos para grabar información sobre medio legible por ordenador para generar artículos manufacturados que comprenden la información de la secuencia de nucleótidos de la presente invención.

Hay una diversidad de estructuras de almacenamiento de datos disponibles para un especialista capacitado para crear un medio legible por ordenador que tenga registrado sobre sí una secuencia de nucleótidos de la presente invención. La elección de la estructura de almacenamiento de datos se basará generalmente en los medios escogidos para acceder a la información almacenada. Además, una variedad de programas de procesamiento de datos y formatos pueden usarse para almacenar la información de la secuencia de nucleótidos de la presente invención en medio legible por ordenador. La información de la secuencia puede representarse en un fichero de texto de procesador de textos, formateado en un programa disponible comercialmente tal como WordPerfect y Microsoft Word, o representado en forma de un fichero ASCII, almacenarse en un programa de base de datos, tal como DB2, Sybase, Oracle, o similares. Un especialista capacitado puede adaptar fácilmente cualquier número de formatos de estructuración de procesamiento de datos (por ejemplo, fichero de texto o base de datos) con objeto de obtener un medio legible por ordenador que tenga grabado sobre sí la información de la secuencia de nucleótidos de la presente invención. Hay programas de ordenador disponibles públicamente que permiten al especialista capacitado acceder a la información de la secuencia proporcionada en un medio legible por ordenador. Los ejemplos que siguen demuestran cómo el programa que implementa los algoritmos de búsqueda BLAST (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)) y BLAZE (Brutlag *et al.*, Comp. Chem. 17:203-207 (1993)) en un sistema Sybase se usa para identificar marcos de lectura abiertos (ORF) en la secuencia de ácido nucleico. Tales ORF pueden ser fragmentos que codifican proteína o polipéptido y pueden ser útiles para producir proteínas o polipéptidos comercialmente importantes, tales como los enzimas usados en las reacciones de fermentación y en la producción de metabolitos comercialmente útiles.

Tal y como se utiliza en la presente invención, "un sistema basado en ordenador" se refiere a los medios de soporte físico, a los medios de programa de ordenador, y a los medios de almacenamiento usados para analizar la información de la secuencia de nucleótidos de la presente invención. Los medios de soporte físico mínimos de los sistemas basados en ordenador de la presente invención comprenden una unidad de procesamiento central (CPU), medios de entrada, medios de salida, y medios de almacenamiento de datos. Un especialista capacitado puede apreciar fácilmente que uno cualquiera de los sistemas basados en ordenador actualmente disponibles es apropiados para su uso en la presente invención. Como se ha mencionado más arriba, los sistemas basados en ordenador de la presente invención comprenden un medio de almacenamiento de datos que tiene almacenada en su interior una secuencia de nucleótidos de la presente invención, y los medios de soporte físico y medios de programa de ordenador necesarios para apoyar e implementar un medio de búsqueda. Tal y como se utiliza en la presente invención, "un medio de almacenamiento de datos" se refiere a la memoria que puede almacenar la información de la secuencia de nucleótidos de la presente invención, o un medio de acceso a la memoria que puede acceder dispositivos que tengan grabado sobre ellos la información de la secuencia de nucleótidos de la presente invención.

Tal y como se utiliza en la presente invención, "medios de búsqueda" se refiere a uno o más programas que están implementados sobre el sistema basado en ordenador para comparar una secuencia diana o motivo estructural diana con la información de la secuencia almacenada en los medios de almacenamiento de datos. Los medios de búsqueda son útiles para identificar fragmentos o regiones de una secuencia conocida que se correspondan con una secuencia diana o motivo diana determinados. Existen una variedad de algoritmos conocidos descritos públicamente y una variedad de programas disponibles comercialmente para llevar a cabo medios de búsqueda, y pueden usarse en los sistemas basados en ordenador de la presente invención. Los ejemplos de tales programas de ordenador incluyen, pero no se limitan a, MacPattern (EMBL), BLASTN y BLASTA (NPOLYPEPTIDEIA). Un especialista capacitado puede

reconocer fácilmente que uno cualquiera de los algoritmos, o de los paquetes de programas que los implementan para realizar búsquedas de homología, puede adaptarse para su uso en los sistemas actuales basados en ordenador. Tal y como se utiliza en la presente invención, una “secuencia diana” puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos de seis o más nucleótidos, o de dos o más aminoácidos. Un especialista capacitado puede reconocer fácilmente que cuanto más larga es una secuencia diana, menos probable es que una secuencia diana esté presente como un suceso aleatorio en la base de datos. La longitud de secuencia más preferida para una secuencia diana es desde aproximadamente 10 hasta 100 aminoácidos, o desde aproximadamente 30 hasta 300 residuos nucleótidos. Sin embargo, es algo bien sabido que las búsquedas de fragmentos comercialmente importantes, tales como fragmentos de secuencias implicados en la expresión de genes y en el procesado de proteínas y polipéptidos, pueden ser de longitud más corta.

Tal y como se utiliza en la presente invención, “un motivo estructural diana”, o “motivo diana”, se refiere a cualquier secuencia o combinación de secuencias seleccionada racionalmente, en donde la secuencia o secuencias se escogen en base a una configuración tridimensional, la cual se forma a partir del plegamiento del motivo diana. Hay una variedad de motivos diana conocidos en el estado de la técnica. Los motivos diana de la proteína o polipéptido incluyen, pero no se limitan a, los sitios activos de enzimas y las secuencias de señal. Los motivos diana de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a, las secuencias promotoras, las estructuras en horquilla, y los elementos de expresión inducible (secuencias unidoras de proteína o polipéptido).

La presente invención describe además procedimientos para identificar la presencia o expresión de una de las dianas reconocidas por un polipéptido o proteína de la presente invención, u homólogo de las mismas, en una muestra de ensayo.

En general, los procedimientos para detectar una diana reconocida por un polipéptido o proteína pueden comprender poner en contacto una muestra con un polipéptido o proteína de la invención, que se une y forma un complejo con la diana durante un período suficiente para formar un complejo, y detectar el complejo, de forma que si se detecta el complejo, se detecta una diana de la invención en la muestra.

En detalle, tales procedimientos comprenden incubar una muestra de ensayo con uno o más de los anticuerpos de la presente invención, y ensayar la presencia de unión de los anticuerpos a la diana dentro de la muestra de ensayo.

La condición para incubar un anticuerpo, incluyendo un fragmento Fab descrito por la invención, con una muestra de ensayo varía. Las condiciones de incubación dependen del formato empleado en el ensayo, los procedimientos de detección empleados, y del tipo y naturaleza del anticuerpo usado en el ensayo. Un experto en la materia reconocerá que uno cualquiera de los formatos de ensayo de amplificación o inmunológicos disponibles puede adaptarse fácilmente para emplear los anticuerpos de la presente invención. Pueden hallarse ejemplos de tales ensayos en Chard, T., *An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Países Bajos (1986); Bullock, G.R. *et al.*, *Techniques in Immunocytochemistry*, Academic Press, Orlando, FL, volumen 1 (1982), volumen 2 (1983), volumen 3 (1985); Tijssen, P., *Practice and Theory of immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Países Bajos (1985); y Kuwata *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245:764-73 (1998), Hillenkamp *et al.*, *Anal. Chem.* 63:1193-202 (1991), patentes estadounidenses nº 5.111.937 y 5.719.060. Las muestras de ensayo de la presente invención incluyen las células, la proteína o polipéptido, o los extractos de membranas de las células, o los fluidos biológicos tales como los esputos, sangre, suero, plasma, u orina. La muestra de ensayo usada en el procedimiento descrito más arriba variará en base al formato del ensayo, a la naturaleza del procedimiento de detección, y a los tejidos, células o extractos usados como muestra a ensayar. Los procedimientos para preparar extractos de proteína o polipéptido, o extractos de membrana de las células, son bien conocidos en el estado de la técnica, y pueden adaptarse fácilmente con objeto de obtener una muestra que sea compatible con el sistema utilizado.

También se describen los equipos que se proporcionan, los cuales contienen los reactivos necesarios para realizar los ensayos de la presente invención. Específicamente, la invención proporciona un equipo con compartimentos para recibir, en estrecha asociación, uno o más contenedores que comprenden: (a) un primer contenedor que comprende uno de los anticuerpos de la presente invención; y (b) uno o más contenedores adicionales que comprenden uno o más de los siguientes: reactivos de lavado, reactivos capaces de detectar la presencia de un anticuerpo unido.

En detalle, un equipo con compartimentos incluye cualquier equipo en el cual los reactivos están almacenados en contenedores separados. Tales contenedores incluyen contenedores de vidrio pequeños, contenedores de plástico, o tiras de plástico o papel. Tales contenedores permiten transferir reactivos eficientemente de un compartimento a otro compartimento, de tal forma que las muestras y reactivos no presenten contaminación cruzada, y los agentes o soluciones de cada contenedor pueden añadirse de forma cuantitativa de un compartimento a otro. Tales contenedores incluirán un contenedor que aceptará la muestra de ensayo, un contenedor que contiene los anticuerpos usados en el ensayo, contenedores que contienen reactivos de lavado (tales como la solución salina tamponada con fosfato, tampones Tris, etcétera), y contenedores que contienen los reactivos usados para detectar el anticuerpo o sonda unidos. Los tipos de reactivos de detección incluyen los anticuerpos secundarios etiquetados, o de forma alternativa, si el primer anticuerpo está etiquetado, los reactivos enzimático o de unión de anticuerpo que son capaces de reaccionar con el anticuerpo etiquetado. Un experto en la materia reconocerá fácilmente que las sondas y anticuerpos de la presente invención descritos pueden incorporarse fácilmente en uno de los formatos de equipos establecidos, los cuales son bien conocidos en el estado de la técnica.

Usando los polipéptidos o proteínas descritos por la invención, la presente invención describe además procedimientos para obtener e identificar agentes que se unen a una diana reconocida por el polipéptido o proteína. De forma detallada, dicho procedimientos comprende los pasos de:

- (a) poner en contacto una diana con una proteína o polipéptido aislados de la presente invención; y
- (b) determinar si la diana se une a dicha proteína o polipéptido.

En general, tales procedimientos para identificar compuestos que se unen a un polipéptido pueden comprender poner en contacto un compuesto con un polipéptido durante un tiempo suficiente para formar un complejo polipéptido/compuesto, y detectar el complejo, de forma que si se detecta un complejo polipéptido/compuesto, se identifica un compuesto que se une a un polinucleótido de la invención.

Los procedimientos para identificar compuestos que se unen a un polipéptido pueden comprender también poner en contacto un compuesto con un polipéptido en una célula durante un tiempo suficiente para formar un complejo polipéptido/compuesto, en donde el complejo dirige la expresión de una secuencia de gen receptor en la célula, y detectar el complejo detectando la expresión de la secuencia del gen indicador, de forma que si se detecta un complejo polipéptido/compuesto, se identifica un compuesto que se une a un polipéptido de la invención.

Los compuestos identificados a través de tales procedimientos pueden incluir compuestos que modulan la actividad de una diana reconocida por un polipéptido o proteína (es decir, incrementan o disminuyen la actividad de la diana respecto la actividad observada en ausencia del compuesto). Alternativamente, los compuestos identificados a través de tales procedimientos pueden incluir compuestos que modulan la expresión de un polinucleótido de la invención (es decir, incrementan o disminuyen la expresión respecto los niveles de expresión observados en ausencia del compuesto). Los compuestos pueden ensayarse usando ensayos estándares bien conocidos por los especialistas en la técnica por su capacidad para modular la actividad/expresión.

Los agentes examinados en el ensayo anterior pueden ser, pero no se limitan a, péptidos, carbohidratos, derivados de vitaminas, u otros agentes farmacéuticos. Los agentes pueden seleccionarse o cribarse aleatoriamente, o seleccionarse racionalmente, o diseñarse usando técnicas de modelado de proteínas.

Para el cribado aleatorio, los agentes tales como los péptidos, carbohidratos, agentes farmacéuticos y similares se seleccionan aleatoriamente, y a continuación se ensaya su capacidad para unirse a la diana reconocida por el polipéptido o proteína. Alternativamente, los agentes pueden seleccionarse o diseñarse reacionalmente. Tal y como se utiliza en la presente invención, se dice que un agente se “selecciona o diseña racionalmente” cuando el agente se escoge en base a la configuración de la proteína o polipéptido concreto. Por ejemplo, un experto en la materia puede adaptar fácilmente procedimientos disponibles actualmente para generar péptidos, agentes farmacéuticos, y similares, capaces de unirse a una secuencia peptídica específica con objeto de generar péptidos antipéptido racionalmente diseñados, por ejemplo, consultar Hurby *et al.*, “Application of Synthetic Peptides: Antisense Peptides”, en *Synthetic Peptides, A User's Guide*, W.H. Freeman, NY (1992), pp. 289-307, y Kaspczak *et al.*, *Biochemistry* 28:9230-8 (1989), o agentes farmacéuticos, o similares.

Además de lo precedente, una clase de agentes, como ampliamente se les describe, puede usarse para controlar la expresión génica a través de la unión a uno de los ORF o EMF. Como se ha descrito más arriba, tales agentes pueden examinarse aleatoriamente o diseñarse/seleccionarse racionalmente. La posibilidad de apuntar a los ORF o EMF permite a un especialista capacitado diseñar agentes específicos para una secuencia o específicos para un elemento, modulando la expresión de un único ORF o múltiples ORF, los cuales dependen del mismo EMF para el control de la expresión.

Como elección de formato de anticuerpo, nosotros preferimos el formato Fab frente al formato scFv, puesto que el formato Fab permite ensayos de cribado rápido por afinidad y con elevado rendimiento de preparaciones crudas de anticuerpos. Muchos scFv además forma especies de mayor peso molecular, incluyendo dímeros (Weidner, *et al.*, (1992) *J. Biol. Chem.* 267:10281-10288; Holliger, *et al.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-6448) y trímeros (Kortt *et al.*, (1997) *Protein Eng.* 10:423-433), lo que complica tanto la selección como la caracterización. Escogemos el formato de exhibición Fab en el que un dominio variable de un gen de cadena pesada o ligera está unido a una proteína de cubierta de un fago, y, en alguna realización, también lleva una etiqueta para su detección y purificación. La otra cadena se expresa como un fragmento separado, secretado al periplasma, en donde puede emparejarse con el gen que está en una proteína de fusión con la proteína de cubierta del fago (Hoogenboom, *et al.*, (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4133-4137). En algunas realizaciones, la proteína de cubierta del fago es una proteína de cubierta pIII. En otras realizaciones, el dominio variable de un gen de cadena pesada se fusiona a la proteína de cubierta de un fago, y el gen de la cadena ligera se expresa como un fragmento separado.

La elección del formato Fab se basó en la noción de que el aspecto monomérico del Fab permite el cribado rápido de un número elevado de clones usando cinéticas de unión (velocidad de disociación) con fracciones de proteína crudas. Esto reduce dramáticamente el tiempo para el análisis postselección cuando se compara con el necesario para seleccionar anticuerpos Fv de cadena simple (scFv) a partir de bibliotecas de fagómidos (Vaughan, *et al.*, (1996) *Nat. Biotechnol.* 14:309-314; Sheets, *et al.*, (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:6157-6162), o fragmentos Fab a partir de otras bibliotecas de fagos (Griffiths, *et al.*, (1993) *EMBO J.* 12:725-734).

La biblioteca Fab de la invención produjo un promedio de 14 Fab diferentes contra 6 antígenos ensayados. Estos incluían el toxoide del tétano, el hapteno feniloxazolona, el antígeno MUC1 asociado con el cáncer de mama, y tres hormonas glicoproteicas estrechamente relacionadas: la gonadotropina coriónica humana ("hCG"), la hormona luteinizante humana ("hLH"), y la hormona folículoestimulante humana ("hFSH"). Para las hormonas glicoproteicas, la biblioteca Fab de la invención produjo un grupo de anticuerpos, o específicos de la hormona o de reacción cruzada. Por tanto, sin usar sofisticados protocolos de selección, se recuperaron Fab específicos para hormona, así como de reacción cruzada, contra estas glicohormonas altamente homólogas, demostrando que la biblioteca es un fuente rica en especificidades de anticuerpo. Las afinidades de los anticuerpos anti-glicohormona variaron entre 2,7 y 38 nM. Finalmente, el formato Fab permitió el cribado rápido y una clasificación fiable de los clones individuales en base a la velocidad de disociación usando fracciones crudas.

Además, las especificidades de los anticuerpos obtenidos mediante selecciones sobre las gonadotropinas son únicas: debido al elevado grado de homología entre la hLH y la hCG, ha sido muy difícil aislar anticuerpos monoclonales específicos de la hCG con la tecnología del hibridoma, mientras que hay muy pocos anticuerpos específicos de la hLH (Moyle, *et al.*, (1990) J. Biol. Chem. 265:8511-8518; Cole, (1997) Clin. Chem. 43:2233-2243). Usando un procedimiento de selección hacia adelante directo, tomando ninguna precaución para evitar la selección de Fab que reaccionen de forma cruzada, hemos aislado fácilmente fragmentos con todas las especificidades posibles: Fab específicos para cualquiera de las tres hormonas hCG, hLH y hFSH, y Fab de reacción cruzada que reconocen la cadena α común o los epítomos sobre la cadena β compartidos por la hCG y hLH. Estas selecciones demuestran que pueden recuperarse de la biblioteca anticuerpos dirigidos contra diferentes epítomos dentro de moléculas de antígeno únicas. La biblioteca Fab de la invención permite la monitorización de selecciones con preparaciones de fagos policlonales, y el cribado a gran escala de velocidades de disociación de anticuerpos con fragmentos Fab no purificados.

En conjunto, se recuperaron anticuerpos con velocidades de disociación del orden de 10^{-2} a 10^{-4} s⁻¹ y afinidades de hasta 2,7 nM. Las cinéticas de estos anticuerpos de fagos son del mismo orden de magnitud que las de los anticuerpos asociados con una respuesta inmunitaria secundaria.

Una indicación de que los anticuerpos de la biblioteca Fab se comportan de forma similar o mejor que los anticuerpos de una biblioteca scFv en relación a la afinidad, se obtiene de una comparación de selecciones de dos bibliotecas diferentes sobre los dos mismos antígenos en condiciones idénticas. Los anticuerpos contra el MUC1 seleccionados de una gran biblioteca de scFv ingenua (Henderikx *et al.*, (1998) Cancer Res. 58:4324-4332) tenían velocidades de disociación más rápidas que los Fab equivalentes aislados de la biblioteca descrita en este estudio. Además, mostraron un uso del gen V muy distinto, y tienen una especificidad fina diferente. De forma similar, cuando se compararon las velocidad de disociación de los anticuerpos de fagos contra el marcador de pancarcinoma Glicoproteína-2 Epitelial, uno de los Fab seleccionados de la presente biblioteca parece tener una velocidad de disociación 10 veces más lenta que el mejor scFv (Vaughan *et al.*, (1996) Nat. Biotechnol. 14:309-314).

Las afinidades de los fragmentos de anticuerpo seleccionados es, no obstante, muy dependiente del antígeno usado para la selección. Sheets y colaboradores describieron un afinidad que variaba entre 26 y 71 nM para los fragmentos scFv seleccionados específicos para los fragmentos tipo A anti-neurotoxina de Clostridia botulinum, mientras que para los anticuerpos contra el dominio extracelular de la ErbB-2 humana, se hallaron Kd entre 0,22 y 4,03 nM (Sheets *et al.*, (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:6157-6162). Las afinidades de los Fab específicos para la gonadotropina seleccionados a partir de nuestra biblioteca variaron entre 2,7 y 38 nM, lo que es comparable con la unión a la proteína de los scFv procedentes de la biblioteca ingenua preparada por Vaughan *et al.* y Sheets *et al.*, y se aproxima a los valores de los mejores anticuerpos en su clase.

El tamaño de la biblioteca Fab de la invención no sólo es importante para la afinidad, sino que también determina la tasa de éxito de la selección de anticuerpos contra un gran conjunto de antígenos. En este aspecto, la biblioteca Fab de la invención se comporta muy bien: se seleccionaron más de 24 anticuerpos contra el hapteno phOx, y un promedio de 13 anticuerpos contra los otros antígenos.

En el limitado conjunto de 14 clones secuenciados, hemos identificado anticuerpos con genes de la región variable procedentes de todas las grandes familias del gen V, incluyendo V_{H1/3/4}, V_{K1/3}, y V_{A1/2}, pero también se recuperaron segmentos usados menos frecuentemente de la familia V_{H6}, V_{K2/7} y V_{A7}. Lo más probablemente es que el uso de un conjunto extendido de cebadores de genes de la región variable, diseñados a partir de la información de secuencia más reciente de las regiones V de la línea germinal, y/o las PCR separadas, combinadas con la clonación parcialmente separada, aseguran el acceso a una muestra altamente diversa del repertorio de genes V.

De acuerdo con la presente invención, se prepara una biblioteca a partir de polinucleótidos que son capaces de codificar el miembro del par de unión específica. Existen una diversidad de técnicas para preparar la biblioteca, la cual puede prepararse, por ejemplo, tanto a partir de ADN genómico como a partir de ADNc. Consultar, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, la cual se incorpora en la presente invención por referencia. Las células pueden servir como fuente de los polinucleótidos, los cuales codifican miembros de un par de unión específica de interés. Pueden emplearse procedimientos y medios de enriquecimiento para amplificar las regiones que contienen el gen o genes. Por ejemplo, cuando el miembro de la par de unión específica deseado es un anticuerpo, pueden prepararse el ARN y/o el ADN genómico, por ejemplo, a partir de células del bazo obtenidas de un animal no inmunizado, a partir de un animal inmunizado con la diana o dianas de interés, a partir de células de hibridoma, o a partir de células linfoblastoides.

La biblioteca de anticuerpos obtenida de los animales no inmunizados contiene una representación no desviada del repertorio completo de anticuerpos, mientras que la biblioteca obtenida a partir de animales inmunizados contiene una población sesgada de anticuerpos dirigidos contra epítomos de la diana o dianas. Las células del bazo, o las células inmunes de otros tejidos o del sistema circulatorio puede obtenerse a partir de una variedad de especies animales, tales como el humano, ratón, rata, equino, bovino, aviario.

La amplificación del ARN mensajero (ARNm) aislado a partir de células de interés, tales como las células del bazo o células de hibridoma, puede realizarse de acuerdo con los protocolos esbozados en, la patente estadounidense n° 4.683.202, Orlandi, *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833-3837 (1989), Sastry *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5728-5732 (1989), and Huse *et al.* Science 246:1275-1281 (1989), Abelson, J. and Simon, M. (editores), Methods in Enzymology, "combinatorial chemistry", vol. 267, San Diego: Academic Press (1996), Kay, B.K., Winter, J., McCafferty, J. (editores), Phage Display of peptides and Proteins, a Laboratory Manual, San Diego: Academic Press (1996), cada una incorporada en la presente invención por referencia. Los cebadores de oligonucleótidos útiles en los protocolos de amplificación pueden ser único o degenerados o incorporar inosina en las posiciones degeneradas. Por tanto, para inmunoglobulinas multicaténarias, los cebadores generalmente se usarían para la amplificación de secuencias que codifican las regiones variables de ambas, las cadenas pesada y ligera. Las secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción pueden incorporarse en los cebadores para permitir la clonación del fragmento amplificado dentro de un vector, en un marco de lectura predeterminado, para su expresión.

Las bibliotecas de expresión que contienen el ADNc amplificado se preparan típicamente en un vector tal como un bacteriófago o fagómido. Las características de los bacteriófagos o fagómidos apropiados dependen de la realización específica empleada, y generalmente serán aquellas que, de forma conveniente, permiten la inserción de los polinucleótidos recombinantes en las células huéspedes mediante empaquetado o transformación *in vitro*.

Las células huéspedes se infectan a continuación con el fago o fagómido y el fago auxiliar, y se cultivan en condiciones que permiten la expresión y ensamblado de partículas de fago. En una realización, las células huésped apropiadas para los bacteriófagos o fagómidos de la invención son varias cepas de *E. coli*, dependiendo los ejemplos específicos de cuál de los varios vectores apropiados se escoge. Por supuesto, también pueden usarse fagos o fagómidos que tienen huéspedes bacterianos distintos de *E. coli*.

Para enriquecer en partículas de fago o fagos y aislarlos, los cuales contienen secuencias clonadas que codifican un miembro de un par de unión específica deseada, y, por tanto, para aislar últimamente las propias secuencias de ácido nucleico, las partículas de fago o los fagos recolectados de las células huéspedes se purifican mediante afinidad. En la purificación mediante afinidad se usa una diana o pareja de unión para el miembro de unión específica deseado. Por ejemplo, cuando el miembro del par de unión específica deseado es un anticuerpo que se une específicamente a una diana determinada, la diana se usa para recuperar partículas de fago o fagos que tienen el anticuerpo deseado sobre su superficie. La diana típicamente se adsorbe sobre un sustrato insoluble, tal como una partícula o cuenta o placa. Las partículas de fago o fagos obtenidos de este modo pueden entonces amplificarse infectándolo en células huéspedes (con el fago auxiliar para las partículas de fago que contienen los fagómidos). Pueden emplearse rondas adicionales de enriquecimiento por afinidad y amplificación hasta que se alcanza el nivel de enriquecimiento deseado, o hasta que las partículas de fago o fagos deseados ya no se enriquecen respecto a las partículas de fago o fagos de fondo.

Las partículas de fago-anticuerpo o fagos-anticuerpo enriquecidos también se criban con técnicas de detección adicionales, tales como la hibridación en placa (o colonia) de expresión (consultar, por ejemplo, Young y Davis, Science, 222:778-782 (1983), incorporada en la presente invención por referencia) en donde se usa la misma u otra pareja de unión como sonda. El cribado puede emplear ensayos adicionales (para un actividad catalítica, por ejemplo) los cuales se usan para detectar, *in situ*, placas que expresan miembros de pares de unión específica que tienen las características deseadas. Las partículas de fagos o fagos obtenidos del protocolo de cribado se infectan en células, se propagan, y el ADN de la partícula de fago o fago se aísla y secuencia, y/o se reclona en un vector previsto para la expresión de genes en procariotas o eucariotas, para obtener cantidades mayores del miembros del par de unión específica seleccionado.

En otra realización, el miembro del par de unión específica codificado en la biblioteca (o las múltiples cadenas que comprenden dicho miembro de par de unión específica) se transportan a un compartimento extracitoplasmático de la célula huésped, usualmente el espacio periplásmico, para facilitar el procesamiento y/o ensamblado correcto. Cuando se emplea el transporte extracitoplasmático del miembro del par de unión específica deseado, las secuencias que codifican el miembro del par de unión específica se clonan adyacentes a las señales de transcripción y traducción apropiadas, y a los líderes de péptidos señal que dirigirán las cadenas maduras hacia el periplasma. Como más arriba, al menos una de las cadenas se clona como una proteína de fusión con una proteína de cubierta de fago, de forma que la proteína de cubierta de fago no interfiere sustancialmente con la capacidad del miembro del par de unión específica de interés para unirse a una diana que se usa en el protocolo de enriquecimiento por afinidad.

Un ejemplo preferido de esta realización es la colocación de un miembro de par de unión específica en la región N-terminal de la proteína de cubierta menor pIII del bacteriófago fd. Antes de su incorporación en el fago, la pIII reside en la membrana interna de la célula de la célula huésped, con su extremo N-terminal sobresaliendo hacia el periplasma. En esta configuración, el polipéptido de un miembro de un par de unión específica en el extremo N-terminal de la pIII está disponible para unirse a otras cadenas polipeptídicas que constituyen el miembro de interés del

par de unión específica. Este complejo se incorpora a continuación en la partícula de fago madura o en el fago cuando estos salen de la célula, y el extremo C terminal se inserta en la cubierta de la partícula de fago o fago.

En esta realización la síntesis y amplificación de polinucleótidos es como se ha descrito más arriba, y a continuación se clona en o cerca de una secuencia de vector que codifica una proteína de cubierta, en donde el vector es, o se deriva de un fago filamentoso, tal como los f1, fd, Pf1, M13, etcétera. En una realización preferida, el fago filamentoso es fd-tet. El vector del fago se escoge para contener un sitio de clonación ubicado en la región 5' de un gen que codifica una proteína de cubierta de fago, tal como, por ejemplo, la proteína de cubierta pIII. Un vector apropiado (por ejemplo, el fd-tet B1 que se describe más abajo) permite la clonación orientada de secuencias ajenas, de forma que se expresen en o cerca del extremo N-terminal de la proteína de cubierta madura.

Se construye una biblioteca clonando los polinucleótidos (por ejemplo, la región V_H) procedentes de las células donantes en un sitio de clonación de un gen de una proteína de cubierta (por ejemplo, el gen III, "gIII"). Las secuencias clonadas de, por ejemplo, los dominios V_H se expresan por último como polipéptidos o proteínas fusionados al extremo N-terminal de la proteína de cubierta madura, sobre la superficie exterior, accesible, de las partículas de fago o fago ensamblados.

Cuando la proteína deseada es una proteína multicatenaria, tal como un anticuerpo o el fragmento de unión del mismo, el polinucleótido que codifica la cadena o cadenas que no se clona en una proteína de cubierta de fago, puede clonarse directamente (tal y como se describe más abajo) en un sitio apropiado del vector que contiene la biblioteca de proteína de cubierta-primer cadena; o, preferiblemente, la cadena o cadenas subsiguientes pueden clonarse como una biblioteca distinta en un vector plasmídico diferente, amplificarse, y subsiguientemente los fragmentos pueden instalarse en el vector de la biblioteca de proteína de cubierta-primer cadena. Por ejemplo, cuando la primera cadena es una cadena pesada de un anticuerpo o el fragmento de unión de la misma, el destino final de la secuencia de ADNc del V_L de la cadena ligera es un vector que ya contiene una secuencia V_H en un gen de proteína de cubierta, por tanto, las secuencias V_H y V_L se recombinan aleatoriamente en un único vector.

La cadena segunda o subsiguientes de la proteína multicatenaria deseada, tal como la V_L , se clona de forma que se expresa con una secuencia líder de péptido señal que dirigirá su secreción al periplasma de la célula huésped. Por ejemplo, varias secuencias líderes han mostrado ser capaces de dirigir la secreción de secuencias de anticuerpo en *E. coli*, tales como la OmpA (Hsiung, *et al.*, Biotechnology 4:991-995 (1986)), la pelB (Better, *et al.*, Science 240:1041-1043 (1988)), phoA (Skerra and Pluckthun, Science 240:1038-1043 (1988)), la beta-lactamasa (Zemel-Dreaseen y Zamir, Gene 27:315-322 (1984)), y las descritas por Abelson, J. y Simon, M. (editores), Methods in Enzymology, combinatorial chemistry, volumen 267, San Diego: Academic Press (1996), y Kay, B.K., Winter, J., McCafferty, J. (editores), Phage Display of peptides and Proteins, a Laboratory Manual, San Diego: Academic Press (1996).

Generalmente, la estrategia de clonación exitosa que utiliza una proteína de cubierta de fago, tal como la pIII del fago filamentoso fd, proporcionará: (1) la expresión de una cadena de proteína (o una primera cadena polipeptídica cuando la proteína deseada es multicatenaria, por ejemplo, la cadena V_H) fusionada al extremo N-terminal de una proteína de cubierta (por ejemplo, la pIII) de tamaño completo (o prácticamente de tamaño completo), y el transporte a la membrana interna del huésped, en donde el dominio hidrofóbico de la región C-terminal de la proteína de cubierta ancla la proteína de fusión a la membrana, con el extremo N-terminal conteniendo la cadena que sobresale hacia el espacio periplasmático y está disponible para la interacción con una segunda o subsiguiente cadena (por ejemplo, V_L para formar un fragmento Fab), el cual está de ese modo unido a la proteína de cubierta; y (2) la expresión adecuada de una segunda o subsiguiente cadena polipeptídica, si está presente (por ejemplo, V_L), y el transporte de esta cadena al compartimento soluble del periplasma.

En una realización para el enriquecimiento por afinidad de los clones deseados, aproximadamente de 10^3 a 10^4 equivalentes de biblioteca (un equivalente de biblioteca es uno de cada recombinante, 10^4 equivalentes de una biblioteca de 10^9 miembros es $10^9 \times 10^4 = 10^{13}$ partículas de fago o fagos) se incubaron con diana para la cual se buscaba un miembro de un par de unión específica (por ejemplo, un anticuerpo). La diana es una de las varias formas apropiadas para los esquemas de enriquecimiento por afinidad. En un ejemplo, la diana se inmoviliza sobre una superficie o partícula, opcionalmente anclada por un amarre de suficiente longitud (por ejemplo, de 3 a 12 átomos de carbono) para mantener la diana lo bastante lejos de la superficie para permitir la interacción libre con el sitio de combinación del anticuerpo. La biblioteca de partículas de fago o fagos portadores de anticuerpos se criba a continuación sobre la diana inmovilizada, generalmente de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en Abelson, J. y Simon, M. (editores), Methods in Enzymology, "Combinatorial chemistry", volumen 267, San Diego: Academic Press (1996), Kay, B.K., Winter, J., McCafferty, J. (editores), Phage Display of Peptides and Proteins, a Laboratory Manual, San Diego: Academic Press (1996).

Un segundo ejemplo de presentación de diana es una diana unida a un ligando reconocible (de nuevo, opcionalmente con un amarre de cierta longitud). Un ejemplo específico de tal ligando es la biotina. La diana, modificada de ese modo, se incuba con la biblioteca de partículas de fago o fagos, y la unión ocurren con ambos reactivos en solución. Los complejos resultantes se unen entonces a la estreptavidina (o avidina) a través de la porción biotina. La estreptavidina puede inmovilizarse sobre una superficie, tal como una placa de plástico, o sobre partículas, en cuyo caso los complejos están físicamente retenidos; o la estreptavidina puede etiquetarse, por ejemplo, con un fluoróforo, para etiquetar el fago/anticuerpo activo para su detección y/o aislamiento mediante procedimientos de clasificación, por ejemplo, en un clasificador de células activado por fluorescencia.

En una realización, las partículas de fago o los fagos portadores de anticuerpos sin la especificidad deseada se eliminan mediante varios medios, por ejemplo, mediante lavado. El grado y la rigurosidad de lavado requerido se determinarán para cada miembro de par de unión específica de interés. Puede ejercerse un cierto grado de control sobre las características de la unión de los anticuerpos recuperados mediante el ajuste de las condiciones de la incubación de unión y del lavado subsiguiente. La temperatura, el pH, la fuerza iónica, la concentración de cationes divalentes, y el volumen y duración del lavado seleccionarán anticuerpos con un rango determinado de afinidad por el hapteno. La selección basada en la velocidad de disociación lenta, que usualmente predice una afinidad elevada, es la forma más práctica. Esta puede realizarse bien mediante incubación continuada en presencia de una cantidad saturante de hapteno libre, o incrementando el volumen, número, y longitud de los lavados. En cada caso, se impide la reunión de anticuerpo-fago disociados, y a medida que transcurre el tiempo, se recuperan complejos anticuerpo-fago de mayor y mayor afinidad.

Los anticuerpos con ciertas actividades catalíticas pueden enriquecerse en grupos de anticuerpos con afinidad elevada por los reactivos (sustratos e intermediarios) pero con baja afinidad por los productos. Un examen doble para enriquecer en anticuerpos con estas características puede ser útil para hallar anticuerpos que catalizan ciertas reacciones. Además, también pueden seleccionarse anticuerpos catalíticos capaces de ciertas reacciones de corte. Una categoría de tales reacciones es el corte de un grupo final específico de una molécula. Por ejemplo, un anticuerpo catalítico para cortar un aminoácido específico del extremo de un péptido puede seleccionarse inmovilizando el péptido, y cribando la biblioteca de anticuerpos en condiciones que se espera promuevan la unión pero no el corte (por ejemplo, temperatura baja, determinada fuerza iónica, pH, concentración de cationes, etcétera, dependiendo de la naturaleza del grupo final y de la reacción de corte), y siguiendo con un lavado. Esto permite que los anticuerpos que reconocen el grupo final se unan y pasen a estar inmovilizados, y de este grupo surgirán los que son capaces de cortar. Para hallar los que son capaces de cortar, las condiciones se desplazan hacia las favorables al corte. Este paso liberará aquellos pares anticuerpo-fago capaces de cortarse y liberarse por sí mismos del péptido inmovilizado.

Una forma alternativa de conseguir esto es cribar en busca de anticuerpos que se unen al grupo final específico, anclando ese grupo final a un enlace diferente del que ha de cortarse (por ejemplo, un enlace que no es peptídico). Mediante el cribado subsiguiente (de los fagos positivos procedentes de la primera criba) sobre el grupo final unido a través del enlace correcto en condiciones de corte, la fracción no unidora se verá enriquecida en aquellos con la actividad catalítica deseada.

Para eluir el anticuerpo-partícula de fago o anticuerpo-fago activos de la diana inmovilizada, después del lavado con la rigurosidad apropiada, la partícula de fago o fago unidos (activos) pueden recuperarse mediante elución con desplazamiento del pH. Por ejemplo, pueden usarse el pH 2 ó el pH 11, los cuales se neutralizan a continuación y el fago eluido se amplifica infectando o transformando las células huéspedes. Las células se hacen crecer a continuación como colonias resistentes a la tetraciclina. Las colonias se rascan y el fago extruido se purifica mediante procedimientos estándares como antes. Estos fagos se usan a continuación en otra ronda de enriquecimiento por afinidad (cribado), y este ciclo se repite hasta que se alcanza el nivel de enriquecimiento deseado, o hasta que el fago diana ya no se enriquecen respecto a las partículas de fago o fagos de fondo. Para aislar clones individuales, las partículas de fago o fagos de la ronda final de cribado y elución se infectan en células, o sus ADN se transforman en células, y se hacen crecer sobre agar (usualmente L-agar) y antibióticos (usualmente tet) para formar colonias individuales bien separadas, cada una de las cuales es un clon portador de vectores con ambas secuencias de V_H y V_L . El ADN de hebra sencilla procedente de las partículas de fago o de fagos extruidos de cada colonia puede aislarse, y el ADN que codifica los fragmentos V_H y V_L puede secuenciarse. La forma replicativa del ADN de fago (doble hebra) puede aislarse mediante procedimientos estándares, y el ADN en los sitios de clonación (secuencias V_H y V_L) puede reclonarse en un vector diseñado para la expresión del producto de genes en procariotas o eucariotas, para obtener mayores cantidades de los anticuerpos concretos seleccionados en el proceso de criba.

Los fagos que se han identificado como portadores de un anticuerpo reconocido por el ligando diana se propagan según sea apropiado para el vector de fago concreto usado. Para fd-tet esto se hace en un medio líquido de medio rico (caldo-L, por ejemplo) con selección por antibiótico (Tet). Se recolectan los fagos y el ADN se prepara y secuencian mediante procedimientos estándares para determinar la secuencia de ADN y aminoácido del anticuerpo concreto.

El ADN puede reclonarse en un vector de expresión eucariota o procariota apropiado, y transfectarse en un huésped apropiado para la producción de grandes cantidades de proteína. El anticuerpo se purifica a partir del sistema de expresión usando procedimientos estándares. La afinidad de unión del anticuerpo se confirma mediante inmunoensayos bien conocidos con el antígeno diana o por actividad catalítica, tal y como se describe en Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988), Abelson, J. y Simon, M. (editores), *Methods in Enzymology*, "Combinatorial chemistry", volumen 267, San Diego: Academic Press (1996), Kay, B.K., Winter, J., McCafferty, J. (editores), *Phage Display of peptides and Proteins*, a Laboratory Manual, San Diego: Academic Press (1996).

En otra realización, las partículas de fago o los fagos que exhiben el miembro del par de unión específica se purifican mediante afinidad como sigue: aproximadamente 10^3 - 10^4 equivalentes de biblioteca de partículas de fago o fago se dejan reaccionar durante la noche con 1 microgramo de anticuerpo purificado a 4°C. La mezcla se criba mediante un procedimiento como sigue. Se recubre una placa de Petri de poliestireno con 1 ml de solución de estreptavidina (1 mg/ml en NaHCO_3 0,1 M, pH 8,6, 0,02% de NaN_3) y se incuba durante la noche a 4°C. Al día siguiente se retira la solución de estreptavidina. La placa se rellena con 10 ml de solución de bloqueo (30 mg/ml de BSA, 3 microgramos/ml de estreptavidina en NaHCO_3 0,1 M, pH 9,2, 0,02% de NaN_3) y se incuba durante 2 horas a temperatura

ambiente. Se añaden dos microgramos de IgG de cabra anti-ratón biotinilada (BRL) al anticuerpo-biblioteca hecha reaccionar, y se incuban durante 2 horas 4°C. Inmediatamente antes de la criba, se retira la solución de bloqueo de la placa recubierta con estreptavidina, y la placa se lava tres veces con TBS/0,05% de Tween 20. El anticuerpo-biblioteca hecha reaccionar se añade a continuación a la placa y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las cuentas de agarosa recubiertas con estreptavidina (BRL) pueden usarse también para esta purificación por afinidad. Se retira la solución de la biblioteca, y la placa se lava diez veces con TBS/0,05% de Tween 20 durante un período de 60 minutos. Los fagos unidos se retiran añadiendo tampón de elución (1 mg/ml de BSA, HCl 0,1 N, pH ajustado a 2,2 con glicina) a la placa de Petri, e incubando 10 minutos para disociar los complejos inmunitarios. El eluato se elimina, se neutraliza con Tris 2 M (pH sin ajustar), y se usa para infectar células bacterianas en fase log que contienen F'. Estas células se siembran a continuación sobre placas de agar LB que contienen tetraciclina (20 µg/ml), y se cultivan durante la noche a 37°C. Las partículas de fago o fago se aíslan a partir de estas placas según se describió y el proceso de purificación por afinidad se repite durante dos o tres rondas. Después de la ronda final de purificación, una porción del eluato se usa para infectar células y se siembra a baja densidad sobre placas de LB-tetraciclina. Las colonias individuales se transfieren a tubos de cultivos que contienen 2 ml de LB-tetraciclina y se dejan crecer hasta la saturación. El ADN de los fagos o fagómidos se aísla usando un procedimiento diseñado para la Beckman Biomek Workstation (Mardis y Roe., *Biotechniques*, 7:840-850 (1989)), la cual emplea placas de microtitración de 96 pocillos. El ADN de hebra simple se secuenciar mediante el procedimiento del dideoxi, usando la Sequenase (U.S. Biochemicals) y un cebador de secuenciación de oligonucleótidos (5'-CGATCTAAAGTTTTGTCGTCT-3'), el cual es complementario de la secuencia ubicada 40 nucleótidos 3' respecto del segundo sitio BstXI en fdTetB1.

Consideramos un cierto número de variables a tener en cuenta en la construcción de una nueva biblioteca de anticuerpo-fago muy extensa: (i) el diseño del cebador se optimizó para la amplificación de conjuntos de genes variables para mantener la máxima diversidad; (ii) se desarrolló un procedimiento de clonación en dos pasos, altamente eficiente, para obtener una biblioteca ingenua muy extensa; (iii) se escogieron un formato de anticuerpo y un vector de clonación compatible, lo que debería permitir el rápido análisis consiguiente de los clones seleccionados.

Con objeto de conseguir acceder a tantos segmentos de genes de la región V de las cadenas pesada y ligera humanas como fuera posible, se desarrolló un nuevo conjunto de cebadores de oligonucleótidos (TABLA I), cuyo diseño se basó en la información de secuencia más reciente proporcionada por la base V.

Los cebadores se han diseñado para ser el o varias secuencias consenso, las cuales tendrán la menos un 70% de homología con la respectiva región codificante, basada en los extremos 5' o 3' en los segmentos de genes de la línea germinal humana, de la familia del gen V específica que tendrán que amplificar. Los cebadores amplificarán al menos un segmento de gen-V usando las condiciones de PCR descritas más abajo, y en una realización se añaden, con los sitios de restricción convenientemente posicionados para la clonación en el vector para la expresión de Fab.

Los cebadores deben permitir la amplificación eficiente de todos los segmentos de gen-V usados. Además, para obtener las bibliotecas de Fab de grandes dimensiones de la invención (más de 10¹⁰ en diversidad), usamos un procedimiento de clonación en dos pasos: los genes variables de las cadenas pesada y ligera se clonaron primero por separado como productos de la PCR digeridos, y se combinaron a continuación mediante clonación de fragmentos de restricción para formar una biblioteca extensa de fragmentos Fab. Este procedimiento de clonación debería ser una ruta más eficiente para la construcción de bibliotecas que la relativamente ineficiente clonación directa de los productos de la PCR digeridos, a la vez que evita la inestabilidad del ADN asociada a menudo con los sistemas de recombinación *in vivo* (Griffiths, *et al.*, *EMBO J.* 13:3245-3260 (1994)).

Se construyó un nuevo vector de fagómido, pCES1 (Figura 1), que permite la clonación paso a paso de fragmentos de anticuerpo en formato Fab. En este sistema vector, los genes de la región variable de la cadena pesada se clonan como fragmentos del gen-V_H; el vector proporciona a todos los Fab un dominio C_{H1} de gamma-1. El V_HC_{H1} formado por la inserción de los fragmentos de gen-V_H al vector se fusiona (en el vector) con dos etiquetas para la purificación y detección (una cola de histidina para la cromatografía por afinidad al metal inmovilizado (Hochuli, *et al.*, (1988) *BioTechnology* 6:1321-1325), y una etiqueta derivada de c-myc (Munro, *et al.*, H.R. (1986) *Cell* 46:291-300)), seguidas por un codón de terminación ámbar (Hoogenboom, *et al.*, (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4133-4137) y la proteína III de cubierta menor del fago filamentoso fd. La cadena ligera del anticuerpo se clona como un fragmento V_LC_L completo, para la secreción dirigida y el ensamblaje con el V_HC_{H1} sobre la partícula de fago.

En una realización, el vector comprende un casete de expresión bicistrónico o un casete de expresión cistrónico doble para permitir la expresión enlazada (para el bicistrónico) o independiente (para el doble cistrónico) de las cadenas pesada y ligera de anticuerpo o sus fusiones, consistiendo tales casete de expresión en los siguientes elementos: (1) un promotor apropiado para la expresión no inducible e inducible (por ejemplo, el lacZ); un sitio de unión de ribosoma y una secuencia de señal precediendo las regiones codificantes de las cadenas ligera y pesada; (3) posible, pero no necesariamente, una región que sigue la región codificante de la cadena pesada o ligera, que codifica una secuencia etiqueta tal como una tira de 5-6 histidinas o una secuencias reconocida por un anticuerpo, y un codón ámbar; (4) una proteína de cubierta del fago codificada como una fusión en el extremo 3' de la cadena pesada o la ligera.

Esta nueva biblioteca de fagos será una fuente valiosa de anticuerpos contra esencialmente cualquier diana. Los anticuerpos pueden usarse como reactivos de investigación o como punto de partida para el desarrollo de anticuerpos terapéuticos o productos para la agricultura. A medida que la lista de genomas secuenciados y productos de genes relacionados con enfermedades se expande rápidamente, habrá una necesidad creciente de un procedimiento *in vitro*

y eventualmente automatizado para el aislamiento de anticuerpos. Puesto que los anticuerpos han sido y serán las sondas ideales para investigar la naturaleza, ubicación y purificación de nuevos productos de genes, se prevé que esta biblioteca desempeñe un papel importante en la validación de dianas y en el descubrimiento de dianas en el área de la genómica funcional.

Las variantes de proteínas expresadas sobre la superficie del bacteriófago se han seleccionado en base a su afinidad por el ligando (antígeno) usando cromatografía, cribado, y adsorción a células. La elución a partir de matrices de afinidad se ha conseguido mediante elución específica usando el ligando (antígeno o un compuesto relacionado) o mediante elución no específica usando, por ejemplo, trietilamina 100 mM. Los procedimientos de lavado eliminan el fago unido no específicamente. El fago se une a la matriz y se eluye de ella de acuerdo con la afinidad o con la naturaleza de la interacción de unión. Los fagos eluidos específicamente se usan a continuación para infectar células *E. coli* macho que expresan el pilus, permitiendo la recuperación del fago que contiene el ADN que codifica las proteínas con las características de unión deseadas.

La selección puede hacerse no sólo en base a la especificidad, sino también en base a la afinidad. La separación se consigue fácilmente mediante cromatografía de afinidad entre el fago que expresa un anticuerpo con una constante de disociación de 10^{-8} M y uno con una constante de disociación de 10^{-5} M. Clackson, T. *et al.* (1991), *Nature* 352:624-628. El aislamiento de este último anticuerpo a partir de un repertorio inmunitario demuestra que los anticuerpos con afinidades características de las respuestas inmunitarias primarias pueden aislarse usando la tecnología de fagos.

Los anticuerpos dirigidos contra los antígenos de la superficie celular pueden aislarse también mediante adsorción selectiva del fago sobre la superficie de las células. De forma similar, puede ser posible incorporar la selección negativa con células para eliminar reactividades cruzadas no deseadas con marcadores de la superficie celular. Puesto que están son procedimientos bastante difíciles y aún pobremente comprendidos, los procedimientos basados en la selección sobre antígeno purificado deben usarse siempre que sea posible.

Cualquier selección de unidores dentro de una población automáticamente tenderá a seleccionar variantes de elevada afinidad a expensas de las de menor afinidad, enriqueciendo la población de elevada afinidad. Esto se ha usado recientemente con buenos resultados en el aislamiento de anticuerpos humanos de elevada afinidad a partir de un repertorio ingenuo. Marks, J.D. *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597. Para una selección óptima, la concentración de antígeno debe ser inferior a la constante de afinidad. Esto debe tenerse presente cuando se aísla un anticuerpo con características predefinidas. En las revisiones en este manual se proporcionan detalles adicionales sobre varios procedimientos de selección.

Con grupos tan extensos de anticuerpos aislados, es útil tener procedimientos disponibles para determinar fácilmente los parámetros cinéticos de cada interacción anticuerpo-antígeno individual. Hemos mostrado que es posible determinar rápida y precisamente la velocidad de disociación de anticuerpos no purificados en fracciones periplasmáticas preparadas a partir de cultivos en pequeña escala usando la resonancia de plasmón superficial. Usando este procedimiento, una serie de Fab específicos para el toxoide tetánico mostraron una disociación monofásica, que es la esperada para un fragmento Fab verdaderamente monomérico que se una superficie con una baja densidad de antígeno. Usando este ensayo de criba por velocidad de disociación, determinamos que las velocidades de disociación de los mejores Fab específicos para el toxoide tetánico y el MUC1 eran del orden de 10^{-2} a 10^{-4} s⁻¹.

Ensayamos la integridad de los Fab seleccionados, obtenidos de fracciones periplasmáticas, usando transferencias Western. Cuando se incubaron en tampón de muestras no reductor, se detectaron dos productos con el anticuerpo 9E10, el cual reconoce la etiqueta myc en el extremo del dominio C_{HI}, el producto principal es la molécula Fab intacta, en la cual un puente disulfuro intermolecular une covalentemente los fragmentos de cadena pesada y ligera; el producto de bajo peso molecular lo más probable es que se derive de cadenas pesadas unidas pero no por un puente disulfuro. El análisis con sueros anti-cadena ligera revela un patrón similar, y muestra que los clones usaron un porcentaje prácticamente igual de cadenas kappa y lambda (halladas respectivamente en seis y siete clones de un total de 13 ensayados). A partir de la reducción de Fab funcionales, unidores de antígeno, purificados, se observan cantidades iguales de cadena pesada y ligera, mientras que en condiciones no reductoras, el producto principal está representado por la molécula Fab unida por disulfuro, con una cantidad igual visible de productos V_HC_{HI} y V_LC_L unidos no covalentemente. Los rendimientos de producción de los Fab de hormonas seleccionados varían entre 160 µg y 1,43 mg de Fab por litro de cultivo, lo que está en el mismo rango hallado para los Fab no seleccionados.

Se secuenció completamente un grupo de 14 Fab específicos para antígeno (3 anti-anticuerpos contra el MUC1; 11 anti-anticuerpos contra la gonadotropina). Los genes de la cadena pesada se derivan de las cuatro familias V_H más extensas (V_{H1}, V_{H3}, V_{H4} y V_{H6}); los genes de V_L pertenecen a una de las cuatro familias de V_K o a una de las tres familias de V_λ. Se observa promiscuidad de cadenas para el clon específico de la cadena α SC#4G, para los clones específicos de α/β-LH LH#2H y LH#3G, y para el clon específico de β-FSH FS#8B, todos los cuales usaron un segmento de gen de cadena ligera V_{K2} altamente homólogo, combinado con diferentes fragmentos de cadena pesada. Los tres anticuerpos anti-MUC1 usan genes de las cadenas pesada y ligera derivados de 2 familias V_H y V_K diferentes; el clon MUC#9 usa un V_H con un entrecruzamiento de 2 segmentos.

La presente invención se ilustra adicionalmente en los ejemplos siguientes.

Como fuente de tejido linfóide usamos linfocitos de sangre periférica de 4 donantes sanos, y parte de un bazo sin tumor extraído de un paciente con carcinoma gástrico. Los linfocitos B se aislaron de 2 L de sangre sobre un gradiente de Ficoll-Paque. Para el aislamiento del ARN, el precipitado de células se disolvió inmediatamente en 50 ml de guanidina 8 M/2-mercaptoetanol 0,1 M (Chirgwin, *et al.*, (1979) *Biochemistry* 18:5294-5299). El ADN cromosómico se cortó hasta el final pasándolo a través de una jeringa estrecha (1,2/0,5 mm de galga), y los restos insolubles se eliminaron mediante centrifugación a baja velocidad (15 min, 2.934 $\times g$, a temperatura ambiente). El ARN se precipitó mediante centrifugación a través de un gradiente en bloque de CsCl (12 ml de sobrenadante sobre una capa de 3,5 ml de CsCl 5,7 M/EDTA 0,1 M; en total, 4 tubos) durante 0 h a 125.000 $\times g$, a 20°C en un rotor SW41 (Beckman). El rendimiento de ARN total fue aproximadamente de 600 μg . El ARN se almacenó a -20°C en etanol.

Se usaron 2 g de tejido, procedente del bazo, para la homogeneización con un Politrón en 20 ml de tiocianato de guanidinio 8 M/2-mercaptoetanol 0.1 M. El volumen total se incrementó hasta 80 ml con tampón tiocianato de guanidinio, y después de pasarlo a través de una jeringa estrecha para corte y eliminación de restos, el ARN se precipitó de nuevo como se ha descrito más arriba, excepto que fue durante 15 h a 85.000 $\times g$, a 20°C, en un rotor SW28.1 (12 ml de sobrenadante sobre 3,5 ml de CsCl 5,7 M/EDTA 0,1 M en 5 tubos SW28.1). De 2 g de tejido se extrajeron 3 mg de ARN total.

Se preparó ADNc cebado aleatoriamente con 250 μg de ARN de PBL, mientras que en una reacción aparte se usaron 300 μg de ARN de bazo como plantilla. El ARN se desnaturalizó con calor durante 5 minutos a 65°C en presencia de 20 μg de cebador aleatorio (Promega), a continuación se añadieron tampón y DTT de acuerdo con las instrucciones de los proveedores (Gibco-BRL), así como 250 μM dNTP (Pharmacia), 800 U de RNAsin (40 U/ μl ; Promega) y 2.000 U de MMLV-RT (200 U/ μl ; Gibco-BRL) en un volumen total de 500 μl . Transcurridas 2 h a 42°C, se detuvo la incubación mediante una extracción con fenol/cloroformo; el ADNc se precipitó y disolvió en 85 μl de agua.

Los oligonucleótidos usados para la amplificación mediante la PCR de regiones V de cadena pesada y ligera humana se describen en la Figura 2. Las regiones variables de cadena pesada derivadas de IgM se obtuvieron mediante una PCR primaria con un cebador de región constante de IgM. Todas las PCR primarias se llevaron a cabo con cebadores BACK separados y cebadores FOR combinados para mantener la máxima diversidad. Los productos de la PCR se reamplificaron con una combinación de cebadores JHFOR, hibridación al extremo 3' de V_H , y cebadores VHBACK etiquetados con Sfi, hibridación al extremo 5', y clonación subsiguiente como fragmentos V_H . Los genes V de la cadena ligera de las familias kappa y lambda se obtuvieron mediante PCR con un conjunto de cebadores CKFOR o CIFOR, hibridación con el extremo 3' del dominio constante y cebadores BACK, cebando en el extremo 5' de las regiones V. Los segmentos de ADN se reamplificaron con cebadores etiquetados con sitios de restricción, y se clonaron como fragmentos $V_{kappa};C_k$ y $V_\lambda C_\lambda$.

La PCR se realizó en un volumen de 50 μl usando la polimerasa AmpliTaq (Cetus) y 500 pM de cada cebador durante 28 ciclos (1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 2 min a 72°C), se generaron 9 amplificaciones distintas de V_H derivados de IgM con 2 μl de ADNc cebado aleatoriamente (equivalente a 6 μg de ARN de PBL o a 7 μg de ARN de bazo) como plantilla para cada reacción. Para las familias de cadena ligera, se obtuvieron 6 productos $V_{kappa};C_k$ diferentes y 11 productos $V_\lambda C_\lambda$, (cebadores C_{12} y C_{17} combinados en cada reacción). Todos los productos se purificaron a partir de gel de agarosa con el equipo de extracción QIAex-II (Qiagen). Como entrada para la reamplificación para introducir sitios de restricción, se usaron como plantilla 100-200 ng de fragmento de ADN purificado en un volumen de reacción de 100 μl . La gran cantidad de entrada, que garantizaba el mantenimiento de la variabilidad, se comprobó mediante análisis de 4 μl de la mezcla de PCR "no amplificada" sobre gel de agarosa.

Para la construcción del repertorio de la cadena pesada primaria y de los dos repertorios de la cadena ligera primaria, los productos de la PCR, con sitios de restricción añadidos, se purificaron en gel antes de la digestión, y las diferentes familias V_H , V_k y V_λ se combinaron en tres grupos. Los fragmentos $V_{kappa};C_k$ y $V_\lambda C_\lambda$ se digirieron con ApaI y AscI, y se clonaron en el vector fagómico pCES1. Los fragmentos V_H , 1,5 μg en total, se digirieron con SfiI y BstEII, y se ligaron en una mezcla de reacción de 100-200 μl , con 9 U de ADN ligasa de T4 a temperatura ambiente, a 4 μg , de vector pUC119-CES1 purificado en gel (similar al vector pCES1, pero con el gen pIII suprimido). La mezcla de ligación desalada de los grupos de cadena ligera o pesada se usó para la electroporación de la cepa TG1 de *E. coli*, para crear las bibliotecas de una cadena.

La biblioteca de Fab se obtuvo clonando los fragmentos de V_H , digeridos a partir de ADN de plásmidos preparados a partir de los repertorios de cadena pesada, en la colección de plásmidos que contenían los repertorios de cadena ligera. En ADN plasmídico aislado de al menos 3×10^9 bacterias de la biblioteca de V_H se digirió con SfiI y BstEII para su clonación en el vector que ya contenía las bibliotecas de cadena ligera λ y κ . Para retener clones con un sitio BstEII interno en el V_λ (este sitio es relativamente frecuente en algunos segmentos V de la línea germinal λ (Persic, *et al.*, (1997) *Gene* 187:9-18), y también en el dominio constante de una de las familias q), la clonación de $V_H C_{H1}$ en el repertorio de cadena ligera λ que contenía el vector se llevó a cabo también usando los sitios de clonación SfiI y NotI, para crear una biblioteca de V_λ menos sesgada en restricción.

El rescate de las partículas de fagómico con el fago auxiliar M13-KO7 se realizó de acuerdo con (Marks, *et al.*, (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597) a una escala de 10 L, usando números de bacterias representativos de la biblioteca para inoculación, para garantizar la presencia de al menos 10 bacterias de cada clon en el inóculo inicial. Para las selecciones, se usaron 10^{13} cfu (unidades formadoras de colonia) con antígenos inmovilizados en inmunotubos (tubos

Maxisorp, Nunc) (Marks, *et al.*, (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597) o con antígenos biotinilados solubles (Hawkins, *et al.*, (1992b) J. Mol. Biol. 226:889-896). La cantidad de antígenos inmovilizados y de hapteno feniloxazolona (conjugados con BSA en una proporción de 17 a 1) se redujo 10 veces durante las rondas de selección subsiguientes, empezando a 100 $\mu\text{g/ml}$ en la ronda 1. La captura con antígeno biotinilado en solución se usó para un péptido de 100 meros que codificaba cinco copias de la repetición en tándem de la MUC1 (Henderikx, *et al.*, (1998) Cancer Res. 58: 4324-4332), o con la gonadotropina coriónica humana (hCG), la hormona luteinizante humana (hLH), la hormona estimulante del folículo humana (hFSH) y su derivado quimérico (hFSH-CTP, que contiene el péptido carboxi terminal de la subunidad β de la hCG fusionada con la subunidad β de la hFSH). Los antígenos se biotinilaron en una proporción de diez a doce moléculas de NHS-Biotina (Pierce) por molécula de antígeno de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. A menos que se indique lo contrario, los antígenos se usaron para la selección a las concentraciones de 100 nM, 30 nM y 10 nM respectivamente durante las rondas 1, 2 y 3. Para la hFSH-CTP se usaron respectivamente 50, 15 y 10 nM; para el péptido MUC1 se usaron 500, 100, 20 y 5 nM.

El Fab soluble se produjo a partir de clones individuales según se describió previamente (Marks, *et al.*, (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597). Los sobrenadantes de los cultivos se ensayaron en ELISA con antígeno directamente depositado o antígeno biotinilado indirectamente capturado a través de BSA biotinilasa-estreptavidina inmovilizadas. El toxoid tetánico y la phOx-BSA se depositaron a 10 $\mu\text{g/ml}$ en NaHCO_3 0,1 M, pH 9,6, durante 16 h, a 4°C. Para el recubrimiento con hCG y hFSH-CTP se usó una concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$ en NaHCO_3 50 mM, pH 9,6. Para la captura de los antígenos biotinilados, se depositó BSA biotinilada a 2 $\mu\text{g/ml}$ en PBS durante 1 h, a 37°C. Después de 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0,1% (v/v) (PBST), las placas se incubaron durante 1 hora con estreptavidina (10 $\mu\text{g/ml}$ en PBS/gelatina al 0,5%) (Henderikx, *et al.*, (1998) Cancer Res. 58:4324-4332). Después de un lavado como el anterior, se añadió el antígeno biotinilado para una incubación durante la noche a 4°C, a una concentración de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ para el péptido MUC-1, 3 $\mu\text{g/ml}$ para la hLH, y 0,6 $\mu\text{g/ml}$ para la hFSH (la unión a la hCG se ensayó con antígeno depositado directamente). Las placas se bloquearon durante 30 minutos a temperatura ambiente con un 2% (p/v) de leche en polvo semidescremada (Marvel) en PBS. El sobrenadante del cultivo se diluyó 1 o 5 veces en un 2% (p/v) de Marvel/PBS y se incubó 2 horas; el Fab unido se detectó con anticuerpo anti-myc 9E10 (5 $\mu\text{g/ml}$) que reconoce la etiqueta péptido-myc en el extremo carboxi terminal de la cadena de Fd pesada, y conjugado de anti-raton de conejo con HRP (DAKO) (Marks, *et al.*, (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597). A continuación de la última incubación, se realizó la tinción con tetrametilbencidina (TMB) y H_2O_2 como sustrato, y se detuvo añadiendo medio volumen de H_2SO_4 2 N; la densidad óptica se midió a 450 nm. Los clones que dieron una señal positiva en el ELISA (más de 2 $\times$ la señal de fondo) se analizaron mediante identificación genética con BstNI de los productos de la PCR obtenidos mediante amplificación con los cebadores de oligonucleótidos M13-hacia atrás y gen III-hacia adelante (Marks, *et al.*, (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597).

La inducción a gran escala de fragmentos Fab solubles a partir de clones individuales se realizó a una escala de 50 ml en 2 $\times$ TY que contenían 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicilina y 2% de glucosa. Después de dejarlas crecer a 37°C hasta una OD600 de 0,9, las células se precipitaron (10 minutos a 2.934 $\times g$) y resuspendieron dos veces en 2 $\times$ TY con ampicilina e IPTG 1 mM. Las bacterias de recolectaron transcurridas 3,5 horas creciendo a 30° mediante centrifugación (como antes); las fracciones periplasmáticas se prepararon resuspendiendo el precipitado de células en 1 ml de PBS enfriado sobre hielo. Después de 2 a 16 horas en un agitador rotativo a 4°C, los esferoplastos se retiraron mediante dos pasos de centrifugación: después de centrifugar durante 10 min a 3.400 $\times g$, el sobrenadante se clarificó mediante un paso de centrifugación adicional durante 10 min a 13.000 $\times g$ en una centrifuga Eppendorf. La fracción periplásmica obtenida se usó directamente para la determinación de las especificidades finas mediante resonancia de plasmón superficial para estudios de transferencia Western.

Para la secuenciación, se preparó ADN plasmídico a partir de cultivos de 50 ml cultivados a 30°C en medio LB que contenía 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y el 2% de glucosa, usando el QIAGEN Midi Kit (Qiagen). La secuenciación se realizó con el equipo de termociclado (Amersham) con cebadores etiquetados con CY5 CH1FOR (5'-GTC CTT GAC CAG GCA GCC CAG GGC-3') y M13REV (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'); las muestras se corrieron en el ALF-Express (Pharmacia). Las secuencias de los genes V se alinearon con V-BASE (Tomlinson *et al.*, V-BASE, MRC Centre for Protein Engineering, 1997, <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imtdoc/public/INTRO.html>) o el Centro Sanger (Sanger Centre Germline Query, 1997, <http://www.sanger.ac.uk/Data Search/gq-search.html>).

Una preparación de hCG purificada a partir de orina y las hLH, hFSH y hFSH-CTP recombinantes, purificadas por inmunoafinidad, producidas en células CHO (Matzuk, *et al.*, (1989) J. Cell. Biol. 109:1429-1438; Muyan, *et al.*, (1996) Mol. Endocrinol. 10:1678-1687) se usaron para los estudios de transferencia Western según se había descrito (Moyle, *et al.*, (1990) J. Biol. Chem. 265:8511-8518). Se cargaron entre 0,5 y 1 μg de cada hormona por carril; las proteínas se diluyeron en tampón de muestras no reductor, y se hirvieron durante 5 minutos o se aplicaron directamente sobre el gel sin tratamiento con calor; las proteínas se transfirieron a membrana de transferencia mediante electrotransferencia. La transferencia se incubaron a continuación durante 16 horas a temperatura ambiente con una fracción periplasmática diluida 10 veces en PBS/4% Marvel. El Fab unido se detectó con anticuerpo anti-myc 9E10 (5 $\mu\text{g/ml}$) y conjugado de anti-ratón y fosfatasa alcalina diluido 4.000 veces (Promega), usando los sustratos 5-bromo-1-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) y nitro azul de tetrazolio (NBT) (Boehringer Mannheim) para la visualización.

La especificidad de los Fab se caracterizó adicionalmente mediante resonancia de plasmón superficial (BIAcore 2000, Biacore). Las hLH y hFSH recombinantes, y la hCG urinaria se inmovilizaron sobre las celdas de flujo de un chip de CM usando el equipo NHS/EDC (Pharmacia), rindiendo una superficie de 1906 RU para la hLH, 1529 RU para la hFSH y 1375 RU para la hCG. Las fracciones periplasmáticas se diluyeron tres veces en solución salina

tamponada con Hepes (HBS; Hepes 10 mM, EDTA 3,4 mM, NaCl 150 mM, 0,05% (v/v) de tensioactivo P20, pH 7,4) y se analizaron usando una velocidad de flujo de 10 μ l/min.

Los Fab se obtuvieron mediante replegados de las proteínas bacterianas totales a partir de 50 ml de cultivo (de Haard, *et al.*, (1998) Protein Eng., 11:1267-1276). De forma resumida, las células precipitadas a partir de 50 ml de cultivo bacteriano inducido se resuspendieron en 8 ml de urea 8 M (en PBS). Después de la sonicación, la mezcla de mezcló en un agitador rotatorio durante 30 minutos y el material insoluble se eliminó mediante centrifugación durante 30 minutos a 13.000 $\times$ g. El sobrenadante se dializó frente a PBS con cuatro cambios de tampón. La proteínas insolubles se eliminaron mediante centrifugación y la fracción que fluía libremente, obtenida mediante filtración a través de una membrana de 0,2 μ m, se cargó inmediatamente sobre una columna de hCG (0,3 ml de volumen de lecho). El material de la columna se preparó acoplando 8,4 mg de proteína a un gramo de Sepharose Tressyl de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Pierce). La columna (1 ml de material de columna) se lavó con 10 volúmenes de Tris 100 mM, NaCl 500 mM, pH 7,5, a continuación con 10 volúmenes de Tris 100 mM/NaCl 500 mM, pH 9,5 y con 2 volúmenes de NaCl al 0,9%, el Fab unido se eluyó con dos volúmenes de TEA 0,1 M, y se neutralizó inmediatamente con 0,5 volúmenes de Tris 1 M, pH 7,5. La fracción del Fab se dializó contra PBS usando un filtro de diálisis por centrifugación Microcon 30 (Amicon). Finalmente, se realizó un análisis de filtración en gel sobre una columna Superdex 75HR (Pharmacia). El rendimiento se determinó midiendo la densidad óptica a 280 nm (usando un coeficiente de extinción molar de 13 para los Fab).

Las cinéticas de unión se analizaron mediante resonancia de plasmón superficial sobre tres superficies de hCG diferentes (303 RU, 615 RU y 767 RU inmovilizadas con 4955 RU de BSA sobre una celda de flujo separada como un control negativo). Los Fab presentes en extracto periplasmáticos crudos se cuantificaron sobre una superficie de elevada densidad de anticuerpo policlonal anti-Fab humano (Pierce) según se describió (Kazemier, *et al.*, (1996) J. Immunol. Methods 194:201-209). Los Fab control anti-hCG se purificaron mediante cromatografía de afinidad sobre columnas de hCG tal como se ha descrito más arriba, y se usaron para calibrar el sistema.

La biblioteca de Fab se construyó en dos pasos. En el primer paso, los grupos de genes de la región variable se amplificaron aproximadamente 4×10^8 células B procedentes de PBL de cuatro donantes sanos, y, como una fuente de anticuerpos IgM posiblemente más intensamente mutados, procedentes de un segmento de bazo (sin tumor) extraído de un paciente con carcinoma gástrico, que contenía aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células B (Roit, *et al.*, (1985) Immunology, Gower Medical Publishing, Ltd., London). Sólo se amplificaron segmentos V_H derivados de IgM mediante el uso de una amplificación con un cebador de oligonucleótido ubicado en el primer dominio constante de este isotipo. Estos productos se clonaron en el vector de fagómido pCES1 para V_L y en pUC119-CES1 para V_H (la clonación fue mucho más eficiente en el vector de tamaño menor, en el cual estaba suprimido el gen III). Las bibliotecas de V_H , V_K y V_L derivadas de PBL y bazo se clonaron por separado para mantener la diversidad, para rendir bibliotecas de una cadena con el tamaño típico para bibliotecas construidas por clonación de fragmentos de PCR (Marks, *et al.*, (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597): $1,75 \times 10^8$ clones individuales para la cadena pesada, $9,4 \times 10^7$ clones para V_K , y $5,2 \times 10^7$ clones para V_L . En el segundo paso, los fragmentos de cadena pesada se digirieron del ADN plasmídico aislado del repertorio primario de V_H , y se clonaron en el vector que contenía los repertorios de cadena ligera (de nuevo, por separado para los repertorios derivados de los PLB y del bazo). Las bibliotecas se combinaron usando este procedimiento de clonación eficiente para crear un repertorio de Fab ingenuos con $3,7 \times 10^{10}$ clones individuales ($4,3 \times 10^{10}$ clones recombinantes, 86% de los cuales tienen un inserto Fab de longitud completa), con el 70% de los clones albergando una cadena ligera kappa, y el 30% una cadena lambda. La totalidad de los 20 clones con Fab de longitud completa insertado dieron positivo en los análisis de transferencia en punto con el anticuerpo 9E10 para indicar una nivel de expresión de Fab soluble de al menos 0,2 mg/L.

Evaluamos la biblioteca mediante selección con diferentes antígenos. En primer lugar, se discuten los resultados de los tres modelos de antígenos, la proteína toxoide tetánico, el hapteno 2-feniloxazol-5-ona (phOx) (Griffiths, *et al.*, (1984) Nature 312:271-275) y el péptido MUC1. Tres rondas de biocribado con toxoide tetánico rindieron un conjunto diverso de Fab positivos en el ELISA, en una serie de 47 Fab unidores del toxoide tetánico, al menos 21 eran diferentes con respecto a la identificación genética por BstNI. De forma similar, se recuperó un amplio grupo de Fab específicos de phOx después de tres rondas de criba: se identificaron al menos 24 clones diferentes en una serie de 50 clones positivos en el ELISA. La captura de la solución con el péptido MUC1 biotinilado resultó en la selección de 14 fragmentos de anticuerpo diferentes de los 37 clones positivos en el ELISA seleccionados después de 3 rondas.

Como grupo de ensayo más riguroso de antígenos para ensayar las prestaciones de la biblioteca, escogimos derivar anticuerpos contra tres glicoproteínas relacionadas estructuralmente: la gonadotropina coriónica humana (hCG), la hormona luteinizante humana (hLH) y la hormona estimulante del folículo humana (hFSH) (revisadas en Cole, (1997) Clin. Chem. 43:2233-2243)). Estas hormonas son heterodímeros que comparten una cadena α idéntica con 92 residuos aminoácidos, pero tienen subunidades β de composición y longitud diferente. La cadena β de la hCG contiene 145 residuos aminoácidos, y la de la hLH sólo 121 residuos, mostrando esta última un 85% de homología con la β -hCG. La cadena β de la hFSH tiene sólo 111 aminoácidos y comparte el 36% de los residuos con la hCG. Los anticuerpos que detectan específicamente la hCG se han usado extensivamente en los ensayos de embarazo (Cole, (1997) Clin. Chem. 43:2233-2243) y para el diagnóstico del cáncer (Masure, *et al.*, (1981) J. Clin. Endocrinol. Metab. 53:1014-1020; Papapetrou, *et al.*, (1980) Cancer 45:2583-2592). Un gran conjunto de anticuerpos contra estas dianas ampliaría el número limitado de anticuerpos específicos de la hormona (especialmente contra la hLH) obtenidos usando la tecnología del hibridoma (Cole, (1997) Clin. Chem. 43:2233-2243). El origen humano de los

anticuerpos puede ser beneficioso cuando se usan para la visualización o para la terapia del cáncer de testículos y de vejiga (Masure, *et al.*, (1981) J. Clin. Endocrinol. Metab. 53:1014-1020; Papapetrou, *et al.*, (1980) Cancer 45:2583-2592).

5 En consecuencia, se realizaron selecciones sobre hCG urinaria biotinilada, hLH recombinante, hFSH y hFSH-CTP (esta última es una molécula quimérica que contiene el péptido carboxi terminal de la β -hCG fusionado a la cadena β de la FSH (Fares, *et al.*, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4304-4308)). El grado máximo de enriquecimiento, en relación al incremento en el número de partículas de fago eluidas en la ronda 3 respecto la ronda 1 se halló para la hCG (10.000 veces), seguida por la hFSHCTP (1.000 veces), la hFSH (300 veces) y la hLH (150 veces). Los fagos policlonales de las poblaciones seleccionadas se ensayaron según su unión usando "sensochips" que contenían hormonas inmovilizadas (Schier, *et al.*, (1996) Hum. Antibodies Hybridomas 7:97-105). Los fagos policlonales seleccionados con la hCG mostraron unión después de dos y tres rondas de selección con las tres proteínas, es decir, la hCG, hLH, y hFSH, con la señal visible más intensa para la hCG. El análisis similar de las tres poblaciones de fagos policlonales seleccionadas con tres rondas sobre hFSH mostró un dominio de la unión específica con la hFSH, mientras que las selecciones sobre hFSH-CTP rindieron unidoes contra ambas, las hFSH y la hCG. Por tanto, este cribado de fagos policlonales proporciona un ensayo rápido para verificar la calidad global de los clones en el repertorio seleccionado, y puede usarse también para guiar la elección de las condiciones para la siguiente ronda de selección (Schier, *et al.*, (1996) Hum. Antibodies Hybridomas 7:97-105).

20 Los ELISA de los anticuerpos de fagos monoclonales revelaron que tres rondas de selección con la hCG resultaban efectivamente en el aislamiento de un porcentaje elevado (74%) de clones positivos para la gonadotropina. El 27% de estos clones reaccionaban de forma cruzada con la hLH; ninguno reaccionaba con la estreptavidina. El análisis de huella genética con BstNI de los clones positivos en el ELISA reveló un alto grado de diversidad (8 patrones diferentes).¹ A partir de un clon representativo específico de hCG (codificado CG#4F) y de un clon con reacción cruzada con hLH (CG#5C), se ensayó la especificidad en BIAcore usando fragmentos Fab solubles no purificados. El clon CG#4F dio una respuesta elevada con hCG, sin unión visible a hLH o hFSH-CTP. Por contra, el clon CG#5C se unió a hCG y hLH, pero no a hFSH-CTP. Las transferencias Western, con las diferentes hormonas en forma no reducida, mostró el reconocimiento específico de la subunidad β de la hCG por el clon CG#4F, mientras que el clon con reactividad cruzada CG#5C reaccionó con la subunidad β de ambas, la hCG y la hLH.

30 La selección con la hormona hLH resultó en el aislamiento de clones específicos para la hLH y con reactividad cruzada para la hCG. El examen en el ELISA de los clones individuales procedentes de la tercera ronda de selección reveló una gran fracción de clones específicos de la hLH (69%), y un grupo menor de clones con reactividad cruzada (16%); no se seleccionaron clones reactivos con la estreptavidina. Dentro del grupo de clones específicos, se pudo discriminar una gran colección de especies diferentes (>21) mediante el análisis de huella genética; sin embargo, todas las especies con reactividad cruzada tenían un único patrón. La especificidad única de la hLH se confirmó para los clones representativos LH#2H y LH#3G, mostrada en la resonancia de plasmón superficial y en la transferencia Western. El LH#3G sólo reconoce el heterodímero α/β intacto de la hLH. Dos clones representativos de un anticuerpo panreactivo en el ELISA, codificados LH#1C y LH#3F, reaccionaron en el BIAcore con la hFSH-CTP, la hCG y la hLH, y en la transferencia Western con las cadenas α de las tres hormonas.

45 Cuando la hFSH se usó como antígeno durante la selección, se aislaron 6 anticuerpos diferentes de la biblioteca, con un tipo, representado por el clon FS#8B, dominando la población seleccionada. Esta Fab sólo reconocía la hFSH en BIAcore, y, como el análisis de transferencia Western demostró, en concreto su unidad β . Además, la especificidad de un clon unido de la cadena α , el SC#2B, se confirmó en el BIAcore y en la transferencia Western.

A partir de la selección con FSH-CTP, se identificaron mediante huella genética 7 Fab diferentes específicos de la cadena α de los cuales se examinaron con más detalle los clones codificados SC#2B, SC#2F, SC#2G y SC#4G. El análisis de inmunotransferencia, con el Fab recombinante como anticuerpo detector, confirmó la especificidad por la cadena α .

55 Se determinaron las afinidades y las velocidades de disociación de los Fab LH#LC, SC#2B, LH#3F y CG#5C, reactivos con hCG y purificados por afinidad. Las velocidades de disociación para la mayoría de los Fab eran del orden de 10^{-2} y 10^{-3} s⁻¹. Los valores de velocidad de disociación obtenidos usando fracciones periplasmáticas crudas concordaban con los valores hallados para los Fab purificados, validando la utilidad del cribado por velocidad de disociación con fragmentos Fab no purificados. Las afinidades, 23 nM y 38 nM respectivamente para el anticuerpo LH#1C específico de la subunidad α y para el anticuerpo CG#5C con reactividad cruzada con la subunidad β de la hCG/hLH, son comparables con la afinidad de los anticuerpos seleccionados a partir de una biblioteca de anticuerpo de fagos inmunitarios murinos (H.d.H., B. Kazemier, *et al.*, no publicado); la afinidad máxima, 2,7 nM para el Fab S~#2B específico de la cadena α se aproxima a los valores de los mejores anticuerpos monoclonales anti-hCG (H.d.H., B. Kazemier, *et al.*, no publicado).

65 El objetivo de este procedimiento es seleccionar y enriquecer en fagos-anticuerpos contra un antígeno depositado sobre la superficie de inmunotubos. El antígeno se depositó sobre el inmunotubo (por ejemplo, un inmunotubo de Nunc) y se incubó con la biblioteca de fagos. Los fagos no unidos se eliminaron mediante lavado, y se eluyeron los fagos unidos, por tanto, la biblioteca de fagos se enriquece en anticuerpos de fago que específicamente unen el antígeno.

El objetivo de este procedimiento es biotinar proteínas o péptidos. A pH neutro o superior, los grupos amino primarios reaccionan con la NHS-SS-biotina, y se libera la N-hidroxisulfosuccinimida. Los grupos NH_2 N-terminales libres, así como las lisinas (K) de la proteína reaccionan con la NHS-S-S-Biotina en este rango de pH.

La NHS-SS-biotina es un análogo único de la biotina con un brazo espaciador extendido de aproximadamente 24,3 Å de longitud, el brazo espaciador de la NHS-LC-biotina mide 22,4 Å. Estos análogos de cadena larga reducen los impedimentos estéricos asociados con la unión de moléculas biotiniladas a la avidina o estreptavidina.

La presencia del enlace S-S en la NHS-S-S-biotina permite la interrupción de la unión usando agentes reductores (DTT, DTE, β -mercaptoetanol). La NHS-LC-biotina se usa cuando se necesita una proteína/péptido biotinilado que no sea sensible a los agentes reductores.

El objetivo de este procedimiento es seleccionar anticuerpos de fago contra un antígeno biotinilado. La selección se efectúa en solución, y puede usarse para seleccionar anticuerpos de fago contra antígenos que son proclives a la desnaturalización cuando se depositan sobre superficies sólidas.

Primero, se incuba el antígeno biotinilado con la biblioteca de anticuerpos de fago. Después de la adición de las Dynabeads (Dyna) recubiertas con estreptavidina, la biotina del complejo antígeno-anticuerpo se unirá a la estreptavidina. Este complejo Dynabead-antígeno-anticuerpo se extrae con un imán (por ejemplo, un imán Dynal) y, por tanto, debe contener los anticuerpos específicos.

El objetivo de este procedimiento es seleccionar aquellos anticuerpos de una biblioteca que se unen a antígenos presentes sobre la membrana celular, usando células en cultivo adherente o células en suspensión. El procedimiento puede usarse para la selección de anticuerpo contra dianas expresadas sobre líneas celulares (tumores).

Mediante la incubación de células enteras, de orgánulos, o de fracciones de membrana con un repertorio de anticuerpos de fago con elevada variedad, tal como las bibliotecas de Fab de la invención (concentradas por precipitación con PEG), sólo (o de forma preferente) se retendrán los anticuerpos relevantes contra una de las moléculas expresadas sobre la superficie de la membrana o membranas celulares, mientras que se separan los anticuerpos de fago que no se unen de los anticuerpos unidos a las células, los orgánulos o las fracciones de membrana (por procedimientos bien conocidos en el estado de la técnica para separar células, orgánulos o fracciones de membrana de moléculas en solución). La población de fagos retenida se enriquece en aquellos clones que son específicos para las moléculas relacionadas con las células. En principio, los factores siguientes influirán positivamente el enriquecimiento de clones individuales: afinidad, abundancia de antígeno, y baja toxicidad de la construcción de anticuerpo por el huésped TG1.

El objetivo de este procedimiento es preparar fragmentos de anticuerpo solubles a partir del periplasma de *E. coli*. En el periplasma hay: menos actividad proteasa, menos proteínas contaminantes que en el citoplasma o sobrenadantes, y el anticuerpo está más concentrado. Por tanto, las preparaciones periplasmáticas son más estables y más puras que los sobrenadantes del cultivo.

A consecuencia de la inducción de cultivos bacterianos que contienen fagómidos en medio bajo en glucosa con IPTG, se producen fragmentos de anticuerpo solubles y se dirigen al periplasma, en donde se concentran antes de 4 horas. El cultivo durante la noche en estas condiciones hará que la membrana bacteriana sea permeable y se hallarán anticuerpos en el sobrenadante. Para la preparación de fracciones periplasmáticas, primero se lisa la pared bacteriana mediante choque osmótico frío (TES enfriado en hielo), y a continuación rápidamente se diluye en una solución helada de baja fuerza osmótica (TES/ H_2O). El EDTA hace a la membrana externa más permeable, y el frío inhibe la actividad proteasa. De forma subsiguiente, las células bacterianas se centrifugan y el sobrenadante contiene entonces las proteínas periplasmáticas.

Los anticuerpos de la fracción periplasmática pueden usarse como un “extracto crudo” o los anticuerpos pueden purificarse mediante medios convencionales bien conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo, los citados en las Sección 5.6 y 5.7.

El objetivo de este procedimiento es purificar anticuerpos marcados con una etiqueta His6 a partir de fracciones periplasmáticas de Fab preparadas como se describió en el Ejemplo 6.18.

Cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC) para la purificación de proteínas recombinantes etiquetadas 6 × con His, en condiciones nativas: Las proteínas recombinantes etiquetadas con histidina se capturan sobre un metal quelado que contiene resina a través de la coordinación de tres átomos de N de las histidinas al metal (mayoritariamente Ni^{2+} o Co^{2+}). Después de eliminar mediante lavado las proteínas contaminantes y otros constituyentes celulares, la proteína etiquetada con his se eluye específicamente de la resina con imidazol, el cual compite con el ion metálico por la unión a residuos histidina.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- EP 0844306 A [0006]
- WO 9201047 A [0045] [0053]
- US 5272071 A, Chappel [0116]
- US 5578461 A, Sherwin [0116]
- US 9209627 W [0116]
- WO 9309222 A [0116]
- US 9006436 W [0116]
- WO 9106667 A [0116]
- US 4518584 A [0156]
- WO 9516035 A [0207]
- WO 9505846 A [0207]
- WO 9107491 A [0207]
- US 4798885 A [0209]
- US 4235871 A [0241]
- US 4501728 A [0241]
- US 4837028 A [0241]
- US 4737323 A [0241]
- US 5111937 A [0261]
- US 5719060 A [0261]
- US 4683202 A [0281]
- EP 99201558 A [0354]

Documentos que no son patentes citados en la descripción

- A. F. WILLIAMS; A. N. BARCLAY. *Ann. Rev Immunol.*, 1988, vol. 6, 381-405 [0049]
- WALSH, P.S. *et al. PCR Methods Appl.*, 1992, vol. 1, 241-250 [0057]
- SAMBROOK, J. *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory*, 1989 [0064]
- AUSUBEL, F.M. *et al. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons*, 1989 [0064]
- MANIATIS *et al. Molecular Cloning A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory*, 1989 [0099]
- AUSUBEL *et al. Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience*, 1989 [0099]
- DAVIS, L. *et al. Basic Methods in Molecular Biology*, 1986 [0104] [0109]
- Current Protocols in Molecular Biology. *Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience*, 1988, vol. 2 [0106]

ES 2 321 568 T3

• Expression and Secretion Vectors for Yeast. **GRANT** *et al. Methods in Enzymology. Acad. Press, 1987*, vol. 153, 516-544 [0106]

• **GLOVER**. DNA Cloning. *IRL Press, 1986*, vol. II [0106]

• **BITTER**. Heterologous Gene Expression in Yeast. *Methods in Enzymology, 1987*, vol. 152, 673-684 [0106]

• The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*. *Cold Spring Harbor Press, 1982*, vol. I, II [0106]

• **SAMBROOK** *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor, 1989* [0110]

• **GLUZMAN**. *Cell, 1981*, vol. 23, 175 [0111]

• **CAMPBELL**, A.M. Monoclonal Antibodies Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. *Elsevier Science Publishers, 1984* [0117]

• **ST. GROTH** *et al. J. Immunol., 1990*, vol. 35, 1-21 [0117]

• **KOHLER; MILSTEIN**. *Nature, 1975*, vol. 256, 495-497 [0117]

• **KOZBOR** *et al. Immunology Today, 1983*, vol. 4, 72 [0117]

• **COLE** *et al.* Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. *Alan R. Liss, Inc, 1985*, 77-96 [0117]

• **LUTZ** *et al. Exp. Cell Research., 1988*, vol. 175, 109-124 [0121]

• **CAMPBELL**, A.M. Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. *Elsevier Science Publishers, 1984* [0122]

• **STERNBERGER**, L.A. *et al. J. Histochem. Cytochem., 1970*, vol. 18, 315 [0124]

• **BAYER**, E.A. *et al. Meth. Enzym., 1979*, vol. 62, 308 [0124]

• **ENGVAL**, E. *et al. Immunol., 1972*, vol. 109, 129 [0124]

• **GODING**, J.W. *J. Immunol. Meth., 1976*, vol. 13, 215 [0124]

• **WEIR**, D.M. *et al.* Handbook of Experimental Immunology. *Blackwell Scientific Publications, 1986* [0126]

• **JACOBY**, W.D. *et al. Meth. Enzym. Academic Press, 1974*, vol. 34 [0126]

• **SAMBROOK** J *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, 1989* [0134]

• **KAUFMAN** *et al. Nucleic Acids Res., 1991*, vol. 19, 4485-4490 [0137]

• **R. KAUFMAN**. *Methods in Enzymology, 1990*, vol. 185, 537-566 [0137]

• **EDELMAN** *et al. DNA, 1983*, vol. 2, 183 [0144]

• **ZOLLER; SMITH**. *Nucleic Acids Res., 1982*, vol. 10, 6487-6500 [0144]

• **WELLS** *et al. Gene, 1985*, vol. 34, 315 [0145]

• **AUSUBEL**. *Current Protocols in Molecular Biology* [0145]

• **H. U. SARAGОВИ** *et al. Bio/Technology, 1992*, vol. 10, 773-778 [0146]

• **R. S. MCDOWELL** *et al. J. Amer. Chem. Soc., 1992*, vol. 114, 9245-9253 [0146]

• **SCOPES**. Protein Purification: Principles and Practice. *Springer-Verlag, 1994* [0151]

• **SAMBROOK** *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [0151]

• **AUSUBEL** *et al.* Current Protocols in Molecular Biology [0151]

• **SUMMERS; SMITH**. *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555, 1987* [0158]

• **GYURIS** *et al. Cell, 1993*, vol. 75, 791-803 [0163]

ES 2 321 568 T3

- Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989 [0166]
- Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques. *Academic Press*, 1987 [0166]
- 5 • Current Protocols in Immunology. *Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience* [0170] [0173] [0188]
- *In Vitro* assays for Mouse Lymphocyte Function. 3.1-3.19 [0170]
- **TAKAI et al.** *J. Immunol.*, 1986, vol. 137, 3494-3500 [0170] [0173] [0186] [0188]
- 10 • **BERTAGNOLLI et al.** *J. Immunol.*, 1990, vol. 145, 1706-1712 [0170]
- **BERTAGNOLLI et al.** *Cellular Immunology*, 1991, vol. 133, 327-341 [0170] [0186]
- 15 • **BERTAGNOLLI et al.** *I. Immunol.*, 1992, vol. 149, 3778-3783 [0170]
- **BOWMAN et al.** *I. Immunol.*, 1994, vol. 152, 1756-1761 [0170]
- 20 • **KRUISBEEK**, A. M.; **SHEVACH**, E. M. Current Protocols in Immunology. *John Wiley and Sons*, 1994, vol. 1, 3.12.1-3.12.14 [0171]
- **SCHREIBER**, R. D. Current Protocols in Immunology. *John Wiley and Sons*, 1994, vol. 1, 6.8.1-6.8.8 [0171]
- Measurement of Human and Murine Interleukin 2 and Interleukin 4. **BOTTOMLY**, K.; **DAVITS**, L. S.; **LIPSKY**,
25 P. E. Current Protocols in Immunology. *John Wiley and Sons*, 1991, vol. 1, 6.3.1-6.3.12 [0172]
- **DEVRIES et al.** *J. Exp. Med.*, 1991, vol. 173, 1205-1211 [0172]
- **MOREAU et al.** *Nature*, 1988, vol. 336, 690-692 [0172]
- 30 • **GREENBERGER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1983, vol. 80, 2931-2938 [0172]
- Measurement of mouse and human interleukin 6. **NORDAN**, R. Current Protocols in Immunology. *John Wiley and Sons*, 1991, vol. 1, 6.6.1-6.6.5 [0172]
- 35 • **SMITH et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1986, vol. 83, 1857-1861 [0172]
- Measurement of human Interleukin 11. **BENNETT**, F.; **GIANNOTTI**, J.; **CLARK**, S. C.; **TURNER**, K. J. Current Protocols in Immunology. *John Wiley and Sons*, 1991, vol. 1, 6.15.1 [0172]
- 40 • Measurement of mouse and human Interleukin 9. **CIARLETTA**, A.; **GIANNOTTI**, J.; **CLARK**, S. C.; **TURNER**, K. J. Current Protocols in Immunology. *John Wiley and Sons*, 1991, vol. 1, 6.13.1 [0172]
- **WEINBERGER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 6091-6095 [0173]
- 45 • **WEINBERGER et al.** *Eur. J. Immun.*, 1981, vol. 11, 405-411 [0173]
- **TAKAI et al.** *J. Immunol.*, 1988, vol. 140, 508-512 [0173] [0186] [0186] [0188]
- 50 • **LENSCHOW et al.** *Science*, 1992, vol. 257, 789-792 [0180]
- **TURKA et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1992, vol. 89, 11102-11105 [0180]
- Fundamental Immunology. *Raven Press*, 1989, 846-847 [0180]
- 55 • Fundamental Immunology. *Raven Press*, 1989, 840-856 [0181]
- **HERRMANN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, vol. 78, 2488-2492 [0186] [0186]
- 60 • **HERRMANN et al.** *J. Immunol.*, 1982, vol. 128, 1968-1974 [0186] [0186]
- **HANDA et al.** *J. Immunol.*, 1985, vol. 135, 1564-1572 [0186]
- **TAKAI et al.** *I. Immunol.*, 1986, vol. 137, 3494-3500 [0186]
- 65 • **BOWMAN** *J. Virology*, vol. 61, 1992-1998 [0186]
- **BROWN et al.** *J. Immunol.*, 1994, vol. 153, 3079-3092 [0186]

ES 2 321 568 T3

- **MALISZEWSKI**. *J. Immunol.*, 1990, vol. 144, 3028-3033 [0187]
- **MOND**, J. J.; **BRUNSWICK**, M. Current Protocols in Immunology. *John Wiley and Sons*, 1994, vol. 1, 3.8.1-3.8.16 [0187]
- **BERTAGNOLLI** *et al. J. Immunol.*, 1992, vol. 149, 3778-3783 [0188]
- **GUERY** *et al. J. Immunol.*, 1995, vol. 134, 536-544 [0189]
- **INABA** *et al. Journal of Experimental Medicine*, 1991, vol. 173, 549-559 [0189]
- **MACATONIA** *et al. Journal of Immunology*, 1995, vol. 154, 5071-5079 [0189]
- **PORGADOR** *et al. Journal of Experimental Medicine*, 1995, vol. 182, 255-260 [0189]
- **NAIR** *et al. Journal of Virology*, 1993, vol. 67, 4062-4069 [0189]
- **HUANG** *et al. Science*, 1994, vol. 264, 961-965 [0189]
- **MACATONIA** *et al. Journal of Experimental Medicine*, 1989, vol. 169, 1255-1264 [0189]
- **BHARDWAJ** *et al. Journal of Clinical Investigation*, 1994, vol. 94, 797-807 [0189]
- **INABA** *et al. Journal of Experimental Medicine*, 1990, vol. 172, 631-640 [0189]
- **DARZYNKIEWICZ** *et al. Cytometry*, 1992, vol. 13, 795-808 [0190]
- **GORCZYCA** *et al. Leukemia*, 1993, vol. 7, 659-670 [0190]
- **GORCZYCA** *et al. Cancer Research*, 1993, vol. 53, 1945-1951 [0190]
- **ITO** *et al. Cell*, 1991, vol. 66, 233-243 [0190]
- **ZACHARCHUK**. *Journal of Immunology*, 1990, vol. 145, 4037-4045 [0190]
- **ZAMAI** *et al. Cytometry*, 1993, vol. 14, 891-897 [0190]
- **GORCZYCA** *et al. International Journal of Oncology*, 1992, vol. 1, 639-648 [0190]
- **ANTICA** *et al. Blood*, 1994, vol. 84, 111-117 [0191]
- **FINE** *et al. Cellular Immunology*, 1994, vol. 155, 111-122 [0191]
- **GALY** *et al. Blood*, 1995, vol. 85, 2770-2778 [0191]
- **TOKI** *et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 7548-7551 [0191]
- **JOHANSSON** *et al. Cellular Biology*, 1995, vol. 15, 141-151 [0195]
- **KELLER** *et al. Molecular and Cellular Biology*, 1993, vol. 13, 473-486 [0195]
- **MCCLANAHAN**. *Blood*, 1993, vol. 81, 2903-2915 [0195]
- Methylcellulose colony forming assays. **FRESHNEY**, M. G. *et al. Culture of Hematopoietic Cells. Wiley-Liss, Inc*, 1994, 265-268 [0196]
- **HIRAYAMA** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 5907-5911 [0196]
- **MCNIECE**, I. K.; **BRIDDELL**, R. A. *et al. Culture of Hematopoietic Cells. Wiley-Liss, Inc*, 1994, 23-39 [0196]
- **NEBEN** *et al. Experimental Hematology*, 1994, vol. 22, 353-359 [0196]
- Cobblestone area forming cell assay. **PLOEMACHER**, R. E. *et al. Culture of Hematopoietic Cells. Wiley-Liss, Inc*, 1994, 1-21 [0196]
- Long term bone marrow cultures in the presence of stromal cells. **SPOONCER**, E.; **DEXTER**, M.; **ALLEN**, T. *et al. Culture of Hematopoietic Cells. Wiley-Liss, Inc*, 1994, 163-179 [0196]

ES 2 321 568 T3

- Long term culture initiating cell assay. **SUTHERLAND**, H. J. *et al.* Culture of Hematopoietic Cells. *Wiley-Liss, Inc.*, 1994, 139-162 [0196]
- **WINTER**. Epidermal Wound Healing. *Year Book Medical Publishers, Inc.*, 71-112 [0208]
- **EAGLSTEIN; MERTZ**. *J. Invest. Dermatol.*, 1978, vol. 71, 382-84 [0208]
- **VALE et al.** *Endocrinology*, 1972, vol. 91, 562-572 [0211]
- **LING et al.** *Nature*, 1986, vol. 321, 779-782 [0211]
- **VALE et al.** *Nature*, 1986, vol. 321, 776-779 [0211]
- **MASON et al.** *Nature*, 1985, vol. 318, 659-663 [0211]
- **FORAGE et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, 3091-3095 [0211]
- Measurement of alpha and beta Chemokines. Current Protocols in Immunology. *Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience*, 6.12.1-6.12.28 [0215]
- **TAUB et al.** *J. Clin. Invest.*, 1995, vol. 95, 1370-1376 [0215]
- **LIND et al.** *APMIS*, 1995, vol. 103, 140-146 [0215]
- **MULLER et al.** *Eur. J. Immunol.*, vol. 25, 1744-1748 [0215]
- **GRUBER et al.** *J. of Immunol.*, 1994, vol. 152, 5860-5867 [0215]
- **JOHNSTON et al.** *J. of Immunol.*, 1994, vol. 153, 1762-1768 [0215]
- **LINET et al.** *J. Clin. Pharmacol.*, 1986, vol. 26, 131-140 [0218]
- **BURDICK et al.** *Thrombosis Res.*, 1987, vol. 45, 413-419 [0218]
- **HUMPHREY et al.** *Fibrinolysis*, 1991, vol. 5, 71-79 [0218]
- **SCHAUB.** *Prostaglandins*, 1988, vol. 35, 467-474 [0218]
- Measurement of Cellular Adhesion under static conditions. Current Protocols in Immunology. *Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience*, 7.28.1-7.28.22 [0221]
- **TAKAI et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 6864-6868 [0221]
- **BIERER et al.** *J. Exp. Med.*, 1988, vol. 168, 1145-1156 [0221]
- **ROSENSTEIN et al.** *J. Exp. Med.*, 1989, vol. 169, 149-160 [0221]
- **STOLTENBORG et al.** *J. Immunol. Methods*, 1994, vol. 175, 59-68 [0221]
- **STITT et al.** *Cell*, 1995, vol. 80, 661-670 [0221]
- **ARAKAWA et al.** *J. Neurosci.*, 1990, vol. 10, 3507-3515 [0225]
- **PESTRONK et al.** *Exp. Neurol.*, 1980, vol. 70, 65-82 [0225]
- **BROWN et al.** *Ann. Rev. Neurosci.*, 1981, vol. 4, 17-42 [0225]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Co, [0229]
- **FINGL et al.** *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 1975, 1 [0249]
- **ALTSCHUL et al.** *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-410 [0254]
- **BRUTLAG et al.** *Comp. Chem.*, 1993, vol. 17, 203-207 [0254]
- **CHARD**, T. An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques. *Elsevier Science Publishers*, 1986 [0261]

ES 2 321 568 T3

- **BULLOCK**, G.R. *et al.* Techniques in Immunocytochemistry. *Academic Press*, 1982, vol. 1 [0261]
- *TECHNIQUES IN IMMUNOCYTOCHEMISTRY*. 1983, vol. 2 [0261]
- 5 • *TECHNIQUES IN IMMUNOCYTOCHEMISTRY*. 1985, vol. 3 [0261]
- **TIJSEN**, P. Practice and Theory of immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. *Elsevier Science Publishers*, 1985 [0261]
- 10 • **KUWATA** *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, vol. 245, 764-73 [0261]
- **HILLENKAMP** *et al.* *Anal. Chem.*, 1991, vol. 63, 1193-202 [0261]
- Application of Synthetic Peptides: Antisense Peptides. **HURBY** *et al.* Synthetic Peptides, A User's Guide. W.H. Freeman, 1992, 289-307 [0269]
- 15 • **KASPCZAK** *et al.* *Biochemistry*, 1989, vol. 28, 9230-8 [0269]
- **WEIDNER** *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 10281-10288 [0271]
- 20 • **HOLLIGER** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0271]
- **KORTTET**. *Protein Eng.*, 1997, vol. 10, 423-433 [0271]
- 25 • **HOOGENBOOM** *et al.* *Nucleic Acids Res.*, 1991, vol. 19, 4133-4137 [0271] [0306]
- **VAUGHAN** *et al.* *Nat. Biotechnol.*, 1996, vol. 14, 309-314 [0272] [0276]
- **SHEETS** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1998, vol. 95, 6157-6162 [0272]
- 30 • **GRIFFITHS** *et al.* *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 725-734 [0272]
- **MOYLE** *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1990, vol. 265, 8511-8518 [0274] [0328]
- 35 • **COLE**. *Clin. Chem.*, 1997, vol. 43, 2233-2243 [0274] [0334] [0334] [0334]
- **HENDERIKX** *et al.* *Cancer Res.*, 1998, vol. 58, 4324-4332 [0276] [0324] [0325]
- **SHEETS** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998, vol. 95, 6157-6162 [0277]
- 40 • **SAMBROOK** *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989 [0280]
- **ORLANDI** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 3833-3837 [0281]
- 45 • **SASTRY** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 5728-5732 [0281]
- **HUSE** *et al.* *Science*, 1989, vol. 246, 1275-1281 [0281]
- 50 • Methods in Enzymology, combinatorial chemistry. *Academic Press*, 1996, vol. 267 [0281] [0291] [0293]
- Phage Display of peptides and Proteins, a Laboratory Manual. *Academic Press*, 1996 [0281] [0291] [0293]
- **YOUNG; DAVIS**. *Science*, 1983, vol. 222, 778-782 [0285]
- 55 • **HSIUNG** *et al.* *Biotechnology*, 1986, vol. 4, 991-995 [0291]
- **BETTER** *et al.* *Science*, 1988, vol. 240, 1041-1043 [0291]
- 60 • **SKERRA; PLUCKTHUN**. *Science*, 1988, vol. 240, 1038-1043 [0291]
- **ZEMEL-DREASEN; ZAMIR**. *Gene*, 1984, vol. 27, 315-322 [0291]
- **HARLOW; LANE**. Antibodies, A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor*, 1988 [0300]
- 65 • **MARDIS; ROE**. *Biotechniques*, 1989, vol. 7, 840-850 [0301]
- **GRIFFITHS** *et al.* *EMBO J.*, 1994, vol. 13, 3245-3260 [0305]

ES 2 321 568 T3

- **HOCHULI** *et al. BioTechnology*, 1988, vol. 6, 1321-1325 [0306]
- **MUNRO** *et al. Cell*, 1986, vol. 46, 291-300 [0306]
- 5 • **CLACKSON**, T. *et al. Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0310]
- **MARKS**, J.D. *et al. J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0312]
- 10 • **CHIRGWIN** *et al. Biochemistry*, 1979, vol. 18, 5294-5299 [0317]
- **PERSIC** *et al. Gene*, 1997, vol. 187, 9-18 [0323]
- **MARKS** *et al. J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0324] [0325] [0325] [0325] [0332]
- 15 • **HAWKINS** *et al. J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 226, 889-896 [0324]
- **MATZUK** *et al. J. Cell. Biol.*, 1989, vol. 109, 1429-1438 [0328]
- **MUYAN** *et al. Mol. Endocrinol.*, 1996, vol. 10, 1678-1687 [0328]
- 20 • **DE HAARD** *et al. Protein Eng.*, 1998, vol. 11, 1267-1276 [0330]
- **KAZEMIER** *et al. J. Immunol. Methods*, 1996, vol. 194, 201-209 [0331]
- 25 • **ROIT** *et al. Immunology*. Gower Medical Publishing, Ltd, 1985 [0332]
- **GRIFFITHS** *et al. Nature*, 1984, vol. 312, 271-275 [0333]
- **MASURE** *et al. J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1981, vol. 53, 1014-1020 [0334] [0334]
- 30 • **PAPAPETROU** *et al. Cancer*, 1980, vol. 45, 2583-2592 [0334] [0334]
- **FARES** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1992, vol. 89, 4304-4308 [0335]
- 35 • **SCHIER** *et al. Hum. Antibodies Hybridomas*, 1996, vol. 7, 97-105 [0335] [0335]

REIVINDICACIONES

1. Pluralidad de polinucleótidos codifican una biblioteca Fab, comprendiendo la biblioteca una pluralidad de vectores, en donde cada vector comprende:

- una primera y segunda región de clonación, en donde
 - cada región de clonación comprende, para el vector único, al menos un sitio de corte con enzima de restricción,
 - cada región de clonación está flanqueada en 5' por un sitio de unión a ribosoma y una secuencia de señal,
- un polinucleótido que codifica una región de anclaje, ubicada 3' respecto la segunda región de clonación,
- un miembro de una primera pluralidad de polinucleótidos variables, codificando dicha primera pluralidad de polinucleótidos variables una primera pluralidad de polipéptidos variables,
- un miembro de una segunda pluralidad de polinucleótidos variables, codificando dicha segunda pluralidad de polinucleótidos variables una segunda pluralidad de polipéptidos variables,
 - los polipéptidos de la primera pluralidad de polipéptidos variables y los polipéptidos de la segunda pluralidad de polipéptidos se seleccionan del grupo consistente en una región variable de anticuerpo completa, una región variable de anticuerpo completa seguida por una región constante de anticuerpo completa, una región variable de anticuerpo completa seguida por una parte de una región constante de anticuerpo, una parte de una región variable de anticuerpo, una parte de una región variable de un anticuerpo seguida por una región constante de anticuerpo completa, y una parte de una región variable de anticuerpo seguida por una parte de una región constante de anticuerpo,
 - estando ubicado el miembro de la primera pluralidad de polinucleótidos variables en la primera región de clonación,
 - estando ubicado el miembro de la segunda pluralidad de polinucleótidos variables en la segunda región de clonación, y
- un polinucleótido que codifica una etiqueta.

2. La pluralidad de polinucleótidos según la reivindicación 1, en la cual la primera pluralidad de polinucleótidos variables está formada por polinucleótidos de V_L , y la segunda pluralidad de polinucleótidos variables está formada por polinucleótidos de V_H .

3. La pluralidad de polinucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la pluralidad de polinucleótidos codifica una biblioteca Fab de al menos 10^9 Fab diferentes, preferiblemente al menos 10^{10} Fab diferentes, los más preferiblemente al menos $3,7 \times 10^{10}$ Fab diferentes.

4. Biblioteca de Fab, que comprende:

- una pluralidad de vectores, en donde cada vector comprende:
 - una primera y segunda región de clonación, en donde
 - cada región de clonación comprende, para el vector único, al menos un sitio de corte con enzima de restricción,
 - cada región de clonación está flanqueada en 5' por un sitio de unión a ribosoma y una secuencia de señal,
 - un polinucleótido que codifica una región de anclaje, ubicada 3' respecto la segunda región de clonación,
 - un miembro de una primera pluralidad de polinucleótidos variables, codificando dicha primera pluralidad de polinucleótidos variables una primera pluralidad de polipéptidos variables,
 - un miembro de una segunda pluralidad de polinucleótidos variables, codificando dicha segunda pluralidad de polinucleótidos variables una segunda pluralidad de polipéptidos variables,
 - los polipéptidos de la primera pluralidad de polipéptidos variables y los polipéptidos de la segunda pluralidad de polipéptidos se seleccionan del grupo consistente en una región variable de anticuerpo completa, una región variable de anticuerpo completa seguida por una región constante de anticuerpo completa, una región

ES 2 321 568 T3

variable de anticuerpo completa seguida por una parte de una región constante de anticuerpo, una parte de una región variable de anticuerpo, una parte de una región variable de un anticuerpo seguida por una región constante de anticuerpo completa, y una parte de una región variable de anticuerpo seguida por una parte de una región constante de anticuerpo,

- estando ubicado el miembro de la primera pluralidad de polinucleótidos variables en la primera región de clonación,

- estando ubicado el miembro de la segunda pluralidad de polinucleótidos variables en la segunda región de clonación, para formar una pluralidad de polinucleótidos de fusión que codifican una pluralidad de proteínas de fusión,

- un polinucleótido que codifica una etiqueta,

- una pluralidad de partículas de cápside, en donde la pluralidad de dichos vectores se empaqueta dentro de las partículas de cápside, en donde

- al menos algunas de las partículas de cápside muestran la proteína de fusión, codificada por el vector empaquetado dentro de la cápside, sobre la cápside.

5. Procedimiento para construir una pluralidad de polinucleótidos que codifican una biblioteca de Fab, el cual comprende los pasos de:

- amplificar una primera pluralidad de polinucleótidos variables con un primer conjunto de cebadores,

- amplificar una segunda pluralidad de polinucleótidos variables con un segundo conjunto de cebadores,

- en donde cada conjunto de cebadores comprende oligonucleótidos diseñados para ser homólogos de los extremos 5' y 3' de los polinucleótidos variables que codifican las regiones variables de anticuerpo o partes de las mismas, de tal forma que puedan usarse para amplificar grupos de polinucleótidos variables procedentes de fuentes naturales o sintéticas de genes, mientras que retienen la totalidad o parte del sitio de combinación del anticuerpo con el antígeno;

- clonar la primera y segunda pluralidad de polinucleótidos variables en una pluralidad de vectores,

- en donde cada vector comprende:

- una primera y segunda región de clonación, en donde cada región de clonación comprende, para el vector único, un sitio de corte con enzima de restricción, estando flanqueada cada región de clonación en 5' por un sitio de unión a ribosoma y una secuencia de señal,

- un polinucleótido que codifica una región de anclaje, ubicada 3' respecto la segunda región de clonación, y

- un polinucleótido que codifica una etiqueta,

- en donde un miembro de la primera pluralidad de polinucleótidos variables se clona en el sitio o sitios de corte con enzima de restricción de la primera región de clonación del vector, y un miembro de la segunda pluralidad de polinucleótidos variables se clona en el sitio o sitios de corte con enzima de restricción de la segunda región de clonación del vector.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, que además comprende los pasos de:

- clonar la segunda pluralidad de polinucleótidos variables en una pluralidad de otros vectores, y extraer los polinucleótidos variables del vector con un enzima de restricción.

7. Procedimiento para construir una biblioteca de Fab, en donde la pluralidad de vectores obtenidos según la reivindicación 5 ó 6 se empaqueta en una pluralidad de partículas de cápside.

8. Procedimiento para obtener un clon de Fab con especificidad por una diana, comprendiendo los pasos de:

- obtener una biblioteca según la reivindicación 4, y

- seleccionar una Fab unidor del antígeno usando la selección *in vitro* sobre antígeno inmovilizado o etiquetado.

9. El procedimiento según la reivindicación 8, en donde el antígeno es la glicoproteína humana mucina-1 (MUC1) epitelial polimórfica.

10. A vector que comprende,

- una primera y segunda región de clonación, en donde

- cada región de clonación comprende, para el vector único, al menos un sitio de corte con enzima de restricción,

- cada región de clonación está flanqueada en 5' por un sitio de unión a ribosoma y una secuencia de señal,

- un polinucleótido que codifica una región de anclaje, ubicada 3' respecto la segunda región de clonación,

- un miembro de una primera pluralidad de polinucleótidos variables, codificando dicha primera pluralidad de polinucleótidos variables una primera pluralidad de polipéptidos variables,

- un miembro de una segunda pluralidad de polinucleótidos variables, codificando dicha segunda pluralidad de polinucleótidos variables una segunda pluralidad de polipéptidos variables,

- los polipéptidos de la primera pluralidad de polipéptidos variables y los polipéptidos de la segunda pluralidad de polipéptidos se seleccionan del grupo consistente en una región variable de anticuerpo completa, una región variable de anticuerpo completa seguida por una región constante de anticuerpo completa, una región variable de anticuerpo completa seguida por una parte de una región constante de anticuerpo, una parte de una región variable de anticuerpo, una parte de una región variable de un anticuerpo seguida por una región constante de anticuerpo completa, y una parte de una región variable de anticuerpo seguida por una parte de una región constante de anticuerpo,

- estando ubicado el miembro de la primera pluralidad de polinucleótidos variables en la primera región de clonación,

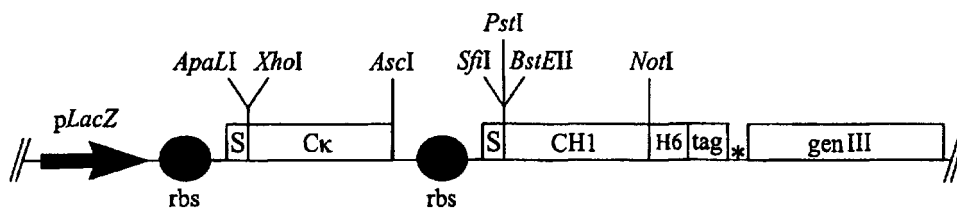
- estando ubicado el miembro de la segunda pluralidad de polinucleótidos variables en la segunda región de clonación, y

- un polinucleótido que codifica una etiqueta.

11. El vector según la reivindicación 10, en la cual la primera pluralidad de polinucleótidos variables está formada por polinucleótidos de V_L , y la segunda pluralidad de polinucleótidos variables está formada por polinucleótidos de V_H .

Figura 1. Representación esquemática (A) y región poliengarce (B) del vector fagómico pCES1.

A.



B.

Sequencia señal
 --- TTA TTC GCA ATT CCT TTA GTT GTT CCT TTC TAT TCT CAC AGT GCA CAG GTC CAA CTG CAG GTC GAC CTC GAG
 L F A I P L V V P F Y S H S A Q V Q L Q V D L E

ApaLI +1
 ATC AAA CGT GGA ACT GTG --- GGA GAG TGT TAA TAA GCG GCG CCA ATT CTA TTT CAA GGA GAC AGT CAT A
 I K R G T V G E C * *
 Gen Ck humano Detención

Sequencia señal
 ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG
 M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A M A Q V

SfiI +1
 CAG CTG CAG GAG AGC GGG GTC ACC GTC TCA AGC GCC TCC ACC --- AAA TCT TGT GCG GCC GCA CAT CAT CAT CAT
 Q L Q E S G V T V S S A S T K S C A A A H H H H
 Gen CH1 (γ1) humano Etiqueta hexa-

PstI BstEII NotI
 CAT CAC GGG GCC GCA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA TAG ACT GTT ---
 H H G A A E Q K L I S E E D L N G A A * T V
 histidina Etiqueta c-Myc Ámbar GenIII

Figura 2: Cebadores de oligonucleótidos usados para la construcción de la biblioteca

A. Amplificaciones primarias

IgM cadena pesada, región constante
HuIgMFOR 5'-TGG AAG AGG CAC GTT CTT TTC TTT-3'

κ cadena ligera, región constante
HuκkFOR 5'-ACA CTC YCC CCT GTT GAA GCT CTT-3'

λ cadena ligera, región constante
HuλC2-FOR 5'-TGA ACA TTC TGT AGG GGC CAC TG-3'
HuλC7-FOR 5'-AGA GCA TTC TGC AGG GGC CAC TG-3'

VH hacia atrás
HuVH1B/7A-BACK 5'-CAG RTG CAG CTG GTG CAR TCT GG-3'
HuVH1C-BACK 5'-SAG GTC CAG CTG GTR CAG TCT GG-3'
HuVH2B-BACK 5'-CAG RTC ACC TTG AAG GAG TCT GG-3'
HuVH3B-BACK 5'-SAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG-3'
HuVH3C-BACK 5'-GAG GTG CAG CTG GTG GAG WCY GG-3'
HuVH4B-BACK 5'-CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GG-3'
HuVH4C-BACK 5'-CAG STG CAG CTG CAG GAG TCS GG-3'
HuVH5B-BACK 5'-GAR GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG-3'
HuVH6A-BACK 5'-CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG-3'

Vκ hacia atrás
HuVκ1B-BACK 5'-GAC ATC CAG WTG ACC CAG TCT CC-3'
HuVκ2-BACK 5'-GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CC-3'
HuVκ3B-BACK 5'-GAA ATT GTG WTG ACR CAG TCT CC-3'
HuVκ4B-BACK 5'-GAT ATT GTG ATG ACC CAG TCT CC-3'
HuVκ5-BACK 5'-GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC-3'
HuVκ6-BACK 5'-GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CC-3'

Vλ hacia atrás

B. Amplificaciones secundarias

κ cadena ligera, región constante
Huκk-FOR-ASC

λ cadena ligera, región constante
HuλC2-FOR-ASC
HuλC7-FOR-ASC

VH hacia atrás
HuVH1B/7A-BACK-SFI
HuVH1C-BACK-SFI
HuVH2B-BACK-SFI
HuVH3B-BACK-SFI
HuVH3C-BACK-SFI
HuVH4B-BACK-SFI
HuVH4C-BACK-SFI
HuVH5B-BACK-SFI
HuVH6A-BACK-SFI

VH hacia adelante
HuJH1/2-FOR
HuJH3-FOR
HuJH4/5-FOR
HuJH6-FOR

Vκ hacia atrás
HuVκ1B-BACK-APA
HuVκ2-BACK-APA
HuVκ3B-BACK-APA
HuVκ4B-BACK-APA
HuVκ5-BACK-APA
HuVκ6-BACK-APA

Vλ hacia atrás

Figura 2: Cebadores de oligonucleótidos para la construcción de la biblioteca

HuVλ1A-BACK	5'-CAG TCT GTG CTG ACT CAG CCA CC-3'	HuVλ1A-BACK-APA
HuVλ1B-BACK	5'-CAG TCT GTG YTG ACG CAG CCG CC-3'	HuVλ1B-BACK-APA
HuVλ1C-BACK	5'-CAG TCT GTC GTG ACG CAG CCG CC-3'	HuVλ1C-BACK-APA
HuVλ2-BACK	5'-CAR TCT GCC CTG ACT CAG CCT-3'	HuVλ2-BACK-APA
HuVλ3A-BACK	5'-TCC TAT GWG CTG ACT CAG CCA CC-3'	HuVλ3A-BACK-APA
HuVλ3B-BACK	5'-TCT TCT GAG CTG ACT CAG GAC CC-3'	HuVλ3B-BACK-APA
HuVλ4-BACK	5'-CAC GTT ATA CTG ACT CAA CCG CC-3'	HuVλ4-BACK-APA
HuVλ5-BACK	5'-CAG GCT GTG CTG ACT CAG CCG TC-3'	HuVλ5-BACK-APA
HuVλ6-BACK	5'-AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC CA-3'	HuVλ6-BACK-APA
HuVλ7/8-BACK	5'-CAG RCT GTG GTG ACY CAG GAG CC-3'	HuVλ7/8-BACK-APA
HuVλ9-BACK	5'-CWG CCT GTG CTG ACT CAG CCM CC-3'	HuVλ9-BACK-APA

Figura 2: Cebadores de oligonucleótidos para la construcción de la biblioteca

5'-ACC GCC TCC ACC GGG CGC GCC TTA TTA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT CTT-3'

5'-ACC GCC TCC ACC GGG CGC GCC TTA TTA TGA ACA TTC TGT AGG GGC CAC TG-3'

5'-ACC GCC TCC ACC GGG CGC GCC TTA TTA AGA GCA TTC TGC AGG GGC CAC TG-3'

5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG RTG CAG CTG GTG CAR TCT GG-3'

5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC SAG GTC CAG CTG GTR CAG TCT GG-3'

5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG RTC ACC TTG AAG GAG TCT GG-3'

5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC SAG CTG GTG GAG TCT GG-3'

5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTG GTG GAG WCY GG-3'

5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GG-3'

5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG STG CAG CTG CAG GAG TCS GG-3'

5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAR GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG-3'

5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTA CAG CTG CAG TCA GG-3'

5'-TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT GCC-3'

5'-TGA AGA GAC GGT GAC CAT TGT CCC-3'

5'-TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC-3'

5'-TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC-3'

5'-ACC GCC TCC ACC AGT GCA CTT GAC ATC CAG WTG ACC CAG TCT CC-3'

5'-ACC GCC TCC ACC AGT GCA CTT GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CC-3'

5'-ACC GCC TCC ACC AGT GCA CTT GAA ATT GTG WTG ACR CAG TCT CC-3'

5'-ACC GCC TCC ACC AGT GCA CTT GAT ATT GTG ATG ACC CAG ACT CC-3'

5'-ACC GCC TCC ACC AGT GCA CTT GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC-3'

5'-ACC GCC TCC ACC AGT GCA CTT GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CC-3'

Figura 2: Cebadores de oligonucleótidos usados para la construcción de la biblioteca

5'-ACC GCC TCC ACC AGT GCA CAG TCT GTG CTG ACT CAG CCA CC-3'
 5'-ACC GCC TCC ACC AGT GCA CAG TCT GTG YTG ACG CAG CCG CC-3'
 5'-ACC GCC TCC ACC AGT GCA CAG TCT GTC GTG ACG CAG CCG CC-3'
 5'-ACC GCC TCC ACC AGT GCA CAR TCT GCC CTG ACT CAG CCT-3'
 5'-ACC GCC TCC ACC AGT GCA CTT TCC TAT GWG CTG ACT CAG CCA CC-3'
 5'-ACC GCC TCC ACC AGT GCA CTT TCT TCT GAG CTG ACT CAG GAC CC-3'
 5'-ACC GCC TCC ACC AGT GCA CAC GTT ATA CTG ACT CAA CCG CC-3'
 5'-ACC GCC TCC ACC AGT GCA CAG GCT GTG CTG ACT CAG CCG TC-3'
 5'-ACC GCC TCC ACC AGT GCA CTT AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC CA-3'
 5'-ACC GCC TCC ACC AGT GCA CAG RCT GTG GTG ACY CAG GAG CC-3'
 5'-ACC GCC TCC ACC AGT GCA CWG CCT GTG CTG ACT CAG CCM CC-3'

ES 2 321 568 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Target Quest B.V.	
5	<120> Bibliotecas originales de fragmentos Fab y procedimientos para su uso	
	<130> 996556/twi	
10	<140> EP 99201558.6	
	<141> 1999-05-18	
	<160> 69	
15	<170> PatentIn Ver. 2.1	
	<210> 1	
20	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 1	
30	tggaagaggc acgttctttt cttt	24
	<210> 2	
35	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 2	
45	acactctccc ctgttgaagc tctt	24
	<210> 3	
50	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 3	
60	tgaacattct gtaggggcca ctg	23
	<210> 4	
65	<211> 23	
	<212> ADN	

ES 2 321 568 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 4	
10	agagcattct gcaggggcca ctg	23
	<210> 5	
	<211> 23	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 5	
25	cagrtgcagc tggcgcartc tgg	23
	<210> 6	
	<211> 23	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 6	
40	saggtccagc tggtrcagtc tgg	23
	<210> 7	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 7	
55	cagrtcacct tgaaggagtc tgg	23
	<210> 8	
	<211> 23	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	

ES 2 321 568 T3

	<400> 8	
	saggtgcagc tggaggagtc tgg	23
5	<210> 9	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
15	<400> 9	
	gaggtgcagc tggaggagwc ygg	23
20	<210> 10	
	<211> 23	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
30	<400> 10	
	caggtgcagc tacagcagtc ggg	23
35	<210> 11	
	<211> 23	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
45	<400> 11	
	cagstgcagc tgcaggagtc sgg	23
50	<210> 12	
	<211> 23	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
60	<400> 12	
	gargtgcagc tggagcagtc tgg	23
65	<210> 13	
	<211> 23	

ES 2 321 568 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 13	
10	caggtacagc tgcagcagtc agg	23
	<210> 14	
15	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 14	
25	gacatccagw tgaccagtc tcc	23
	<210> 15	
30	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 15	
40	gatgttgga tgactcagtc tcc	23
	<210> 16	
45	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 16	
55	gaaattgtgw tgacrcagtc tcc	23
	<210> 17	
60	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	

ES 2 321 568 T3

<400> 17

gatattgtga tgaccacac tcc

23

5

<210> 18

<211> 23

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

15

<400> 18

gaaacgacac tcacgcagtc tcc

23

20

<210> 19

<211> 23

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

30

<400> 19

gaaattgtgc tgactcagtc tcc

23

35

<210> 20

<211> 23

<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

45

<400> 20

cagtctgtgc tgactcagcc acc

23

50

<210> 21

<211> 23

<212> ADN

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

60

<400> 21

65 <210> 22

<211> 23

<212> ADN

ES 2 321 568 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 22	
10	cagtctgtcg tgacgcagcc gcc	23
	<210> 23	
	<211> 21	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 23	
25	cartctgccc tgactcagcc t	21
	<210> 24	
	<211> 23	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 24	
40	tcctatgwgc tgactcagcc acc	23
	<210> 25	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 25	
55	tcttctgagc tgactcagga ccc	23
	<210> 26	
	<211> 23	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	

ES 2 321 568 T3

	<400> 26	
	cacgttatac tgactcaacc gcc	23
5	<210> 27	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
15	<400> 27	
	caggctgtgc tgactcagcc gtc	23
20	<210> 28	
	<211> 23	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
30	<400> 28	
	aattttatgc tgactcagcc cca	23
35	<210> 29	
	<211> 23	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
45	<400> 29	
	cagrctgtgg tgacycagga gcc	23
50	<210> 30	
	<211> 23	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
60	<400> 30	
	cwgccctgtgc tgactcagcc mcc	23
65	<210> 31	
	<211> 51	

ES 2 321 568 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 31
 10 accgcctcca ccgggcgcgc cttattaaca ctctccctg ttgaagctct t
 51

15 <210> 32
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

25 <400> 32
 accgcctcca ccgggcgcgc cttattatga acattctgta ggggccactg 50

30 <210> 33
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

40 <400> 33
 accgcctcca ccgggcgcgc cttattaaga gcattctgca ggggccactg 50

45 <210> 34
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

55 <400> 34
 gtccctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcccagrtgc agctggtgca
 rtctgg 56

60 <210> 35
 <211> 56
 <212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

ES 2 321 568 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

5 <400> 35

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccsaggtcc agctggtrca
gtctgg 56

10

<210> 36

<211> 56

<212> ADN

15

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 36

25

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccagrtca ccttgaagga
gtctgg 56

<210> 37

30

<211> 56

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 37

40

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccsaggtgc agctggtgga
gtctgg 56

45

<210> 38

<211> 56

<212> ADN

50

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

55

<400> 38

60

gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccgaggtgc agctggtgga
gwcygg 56

<210> 39

<211> 56

65

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 321 568 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

5 <400> 39
gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcccaggtgc agctacagca
gtgggg 56

10 <210> 40
<211> 56
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

20 <400> 40
gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcccagstgc agctgcagga
25 gtcsgg 56

<210> 41
<211> 56
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 41
40 gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gccgargtgc agctggtgca
gtctgg 56

45 <210> 42
<211> 56
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

55 <400> 42
gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcccaggtac agctgcagca
60 gtcagg 56

<210> 43
<211> 24
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 321 568 T3

	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido		
5	<400> 43		
	tgaggagacg gtgaccaggg tgcc		24
10	<210> 44		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido		
20	<400> 44		
	tgaagagacg gtgaccattg tccc		24
25	<210> 45		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido		
35	<400> 45		
	tgaggagacg gtgaccaggg ttcc		24
40	<210> 46		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido		
50	<400> 46		
	tgaggagacg gtgaccgtgg tccc		24
55	<210> 47		
	<211> 44		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido		
65	<400> 47		
	accgcctcca ccagtgcact tgacatccag wtgaccagct ctcc		44

ES 2 321 568 T3

	<210> 48	
	<211> 44	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
10	<400> 48	
	accgcctcca ccagtgcact tgatgtgtg atgactcagt ctcc	44
15	<210> 49	
	<211> 44	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
25	<400> 49	
	accgcctcca ccagtgcact tgaaattgtg wtgacrcagt ctcc	44
30	<210> 50	
	<211> 44	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
40	<400> 50	
	accgcctcca ccagtgcact tgatattgtg atgaccaca ctcc	44
45	<210> 51	
	<211> 44	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
55	<400> 51	
	accgcctcca ccagtgcact tgaaacgaca ctcacgcagt ctcc	44
60	<210> 52	
	<211> 44	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 321 568 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
5	<400> 52	
	accgcctcca ccagtgcaact tgaaattgtg ctgactcagt ctcc	44
10	<210> 53	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
20	<400> 53	
	accgcctcca ccagtgccaca gtctgtgctg actcagccac c	41
25	<210> 54	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
35	<400> 54	
	accgcctcca ccagtgccaca gtctgtgytg acgcagccgc c	41
40	<210> 55	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
50	<400> 55	
	accgcctcca ccagtgccaca gtctgtcgtg acgcagccgc c	41
55	<210> 56	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
65	<400> 56	
	accgcctcca ccagtgccaca rtctgccctg actcagcct	39

ES 2 321 568 T3

	<210> 57	
	<211> 44	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
10	<400> 57	
	accgcctcca ccagtgcact ttctatgwg ctgactcagc cacc	44
15	<210> 58	
	<211> 44	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
25	<400> 58	
	accgcctcca ccagtgcact ttctctgag ctgactcagg accc	44
30	<210> 59	
	<211> 41	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
40	<400> 59	
	accgcctcca ccagtgcaca cgttatactg actcaaccgc c	41
45	<210> 60	
	<211> 41	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido	
55	<400> 60	
	accgcctcca ccagtgcaca ggctgtgctg actcagccgt c	41
60	<210> 61	
	<211> 44	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 321 568 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

5 <400> 61

accgcctcca ccagtgcact taatttatg ctgactcagc ccca

44

10 <210> 62

<211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

20 <400> 62

accgcctcca ccagtgcaca grctgtggtg acycaggagc c

41

25 <210> 63

<211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

35 <400> 63

accgcctcca ccagtgcacw gcctgtgctg actcagccmc c

41

40 <210> 64

<211> 89

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Fragmento de pCES1 que comprende la secuencia de señal, los sitios de restricción, y la parte 5' del gen de la C_κ humana

50

<400> 64

55

ttattcgcaa ttccttttagt tgttcctttc tattctcaca gtgcacaggt ccaactgcag 60
gtcgacctcg agatcaaacg tggaaactgtg 90

<210> 65

60 <211> 163

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Fragmento de pCES1

ES 2 321 568 T3

<400> 65
ggagagtgtt aataaggcgc gccaatctta tttcaaggag acagtcataa tgaaatacct 60
attgcctacg gcagccgctg gattgttatt actcgcggcc cagccggcca tggcccaggt 120
gcagctgcag gagagcgggg tcaccgtctc aagcgctcc acc 163

<210> 66
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Fragmento de pCES1 que comprende la parte 3' del gen de la C_{H1} humana, el sitio de restricción, la etiqueta de hexahistidina, la etiqueta cMyc, el codón de terminación, y la parte 5' del gen III.

<400> 66
aaatcttgtg cggccgcaca tcatcatcat catcacgggg ccgcagaaca aaaactcatc 60
tcagaagagg atctgaatgg ggccgcatag actgtt 96

<210> 47
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Fragmento de pCES1

<400> 67
Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser His Ser Ala Gln
1 5 10 15

Val Gln Leu Gln Val Asp Leu Glu Ile Lys Arg Gly Thr Val
20 25 30

<210> 68
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Fragmento codificado por pCES1 que comprende la secuencia de señal y la parte amino terminal del producto del gen de la C_{H1} humana

<400> 68
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Val Thr
20 25 30

Val Ser Ser Ala Ser Thr
35

<210> 69

ES 2 321 568 T3

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Fragmento codificado por pCES1 que comprende la parte carboxilo terminal del producto del gen de la C_{HI} humana, la etiqueta hexahistidina, y la etiqueta cMyc.

10

<400> 69

Lys Ser Cys Ala Ala Ala His His His His His His Gly Ala Ala Glu
1 5 10 15

15

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala
20 25

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65