



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 348 478**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05762419 .9**

96 Fecha de presentación : **25.04.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1743178**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.01.2007**

54

Título: **Procedimiento de identificación de un ligando capaz de modular selectivamente una cascada funcional que implica una diana, y sus aplicaciones para el cribado de alto caudal de moléculas de interés.**

30

Prioridad: **27.04.2004 FR 04 04433**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.12.2010

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.12.2010

73

Titular/es:
**Centre National de la Recherche Scientifique
3, rue Michel Ange
75016 Paris, FR
Université de Montpellier I y
Université de Montpellier II**

72

Inventor/es: **Dariavach, Piona y
Martineau, Pierre**

74

Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 348 478 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:

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de identificación de un ligando capaz de modular selectivamente una cascada funcional que implica una molécula diana o diana, así como a sus aplicaciones para el cribado de alto caudal de moléculas de interés, en particular terapéutico (medicamento).

10 Los adelantos recientes en el campo de la genómica y de la proteómica, que han conducido a la identificación de un número considerable de nuevas dianas terapéuticas potenciales, han abierto unas perspectivas muy interesantes en el campo farmacéutico.

15 Sin embargo, el descubrimiento de nuevos medicamentos implica poner a punto unos métodos de cribado de alto caudal de bancos de moléculas que sean eficaces, es decir, que permitan aislar a partir de un número restringido de moléculas seleccionadas (dianas o *hits*), unas moléculas activas *in vivo* sobre la patología que se desea tratar (líderes o *leads*).

20 En efecto, los ensayos funcionales (*in vitro* en cultivo celular o *in vivo* en un modelo animal apropiado) que permiten verificar la actividad de las dianas seleccionadas durante el cribado generalmente no se pueden adaptar al alto caudal.

25 Siendo la mayoría de las proteínas eucariotas multi-funcionales y estando implicadas en varias cascadas funcionales, las moléculas aisladas deben ser capaces de modular específicamente la propiedad de interés de la diana sin afectar a sus demás actividades cuya modulación podría tener unos efectos deletéreos para la célula.

30 En consecuencia, el cribado debe ser muy específico para restringir al máximo el número de dianas (*hits*) identificadas, de manera que se ensaye sólo un bajo número en unos ensayos funcionales *in vivo*.

Estos métodos de cribado deben además ser fáciles de realizar y aplicables a cualquier diana.

35 Con este objetivo, se han propuesto unos métodos de cribado que se basan en la identificación de moléculas (mimotopos) que imitan la interacción entre la diana y un péptido o un oligonucleótido (aptámero).

40 A título de ejemplo, la solicitud WO 03/059943 describe la identificación de péptidos que se unen a unas proteínas quinasas y que se pueden utilizar para el cribado de bancos de moléculas en unos ensayos competitivos. La solicitud WO 01/01137 se refiere a unas proteínas de fusión utilizadas para el estudio de las interacciones proteína-proteína, en las que se sustituye un dominio de unión modular de una primera proteína por un anticuerpo de cadena simple (sFv) y se sustituye el sitio de unión para un dominio de unión modular sobre una segunda proteína por un epítipo que se une a este anticuerpo scFv. La solicitud WO 2004/020619 se refiere en particular al uso de anticuerpos dirigidos contra unos mutantes de la proteína PLC-gamma2 en unos modelos animales para el estudio de las disfunciones relacionadas con la proteína PLC-gamma2. Por último, la solicitud WO 96/04557 describe la utilización de anticuerpos recombinantes para

45

identificar las superficies activas de dianas farmacéuticas.

5 Los métodos de cribado que utilizan unos aptámeros y/o unos péptidos se ilustran en Lapan *et al.*, Expert Opin. Ther. Targets, 2002, 6, 507-516; Green *et al.*, BioTechniques, 2001, 30, 1094-1110; Burgstaller *et al.*, Drug Discovery Today, 2002, 7, 1221-1228; solicitudes internacionales PCT WO 98/19162 y WO 03/059943 y patente US nº 6.329.145.

10 En un primer tiempo, unos aptámeros/péptidos capaces de unirse a la diana son seleccionados *in vitro* y después se verifica su actividad moduladora, frente a la diana, mediante un ensayo funcional *in vitro* en un sistema celular apropiado o *in vivo* en un modelo animal apropiado.

15 En un segundo tiempo, los aptámeros/péptidos que poseen una actividad moduladora sobre la diana se utilizan en unos ensayos de unión competitiva para identificar unas dianas (hits) capaces de desplazar la unión existente entre el aptámero/péptido y la diana. A continuación, la actividad moduladora de las dianas frente a la diana se verifica mediante un ensayo funcional *in vitro* en cultivo celular o *in vivo* en un modelo animal apropiado, de manera que se aíslan unas moléculas “líderes” (leads).

20 Estos métodos han sido validados con unas dianas tales como la isoforma BB del factor de crecimiento humano derivado de las plaquetas (PDGF BB) y la proteína Rev del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

25 Los inventores se han propuesto como objetivo la puesta a punto de métodos de cribado alternativos. Han demostrado que la sustitución de los aptámeros o de los péptidos moduladores por unos anticuerpos o unos fragmentos de anticuerpos moduladores, en los métodos de cribado tales como los descritos en la técnica anterior, permitía identificar unas moléculas capaces de modular selectivamente una cascada funcional que implica una diana (cascada metabólica, cascada de activación, cascada de señalización, etc.).

35 Los anticuerpos presentan la ventaja de reconocer cualquier región de una proteína, de manera específica y con una afinidad elevada (del orden del nM). En particular, pueden reconocer los sitios de superficie de esta proteína y son por lo tanto muy interesantes para inhibir específicamente las regiones de proteínas implicadas en unas cascadas funcionales a través de unas interacciones proteína-proteína; se ha demostrado en particular que unos fragmentos de anticuerpo (scFv) dirigidos contra los dominios SH2 de la proteína tirosinaquinasa Syk, eran capaces de inhibir específicamente *in vivo* la vía de la fosfolipasa C- γ 2 (PLC- γ 2; Dauvilillers *et al.*, J. Immunol., 2002, 169, 2274-2283). En consecuencia, los mimotopos aislados mediante un procedimiento de cribado que utiliza unos anticuerpos o unos fragmentos de anticuerpos deberían presentar las mismas propiedades, en particular en términos de afinidad/especificidad para la diana.

45 Por ejemplo, los inventores han cribado un banco de 3.000 moléculas con la ayuda de un anticuerpo dirigido contra los dominios SH2 de la proteína tirosinaquinasa Syk y capaz de inhibir la vía de la PLC- γ 2; entre los 10 ligandos de la proteína Syk que se seleccionaron, uno por lo menos era una molécula inhibidora *in vivo*, que actúa sobre la vía de la PLC- γ 2, sin alterar la de Ras dependiente asimismo de la proteína Syk.

5 Por el contrario, no se ha demostrado que unos aptámeros y unos péptidos eran capaces de reconocer cualquier epítipo en la superficie de un antígeno. Debido a su pequeño tamaño, los péptidos y los aptámeros están más adaptados para interactuar en las cavidades de las dianas más que en superficie, lo cual es favorable para la inhibición de una actividad enzimática, pero poco interesante para inhibir unas cascadas funcionales.

10 Por otro lado, un cierto número de anticuerpos monoclonales recombinantes se utilizan en los tratamientos terapéuticos. Se pueden citar, por ejemplo, el cetuximab (anti-EGFR), el rituximab (anti-CD20), el infliximab (anti-TNF), etc. Estos anticuerpos son, o bien unos anticuerpos quiméricos, lo más frecuentemente ratón/humano, o bien unos anticuerpos humanizados. Estos anticuerpos son difíciles de producir y presentan un coste elevado. El procedimiento de cribado propuesto por los inventores permite sustituir estos anticuerpos por unas moléculas químicas que tienen las mismas propiedades inhibitorias, más fáciles de producir a un coste bastante más inferior (de por lo menos un factor 10).

20 La presente invención tiene por consiguiente por objeto, un procedimiento de identificación de un ligando capaz de modular selectivamente una cascada funcional que implica una diana de una célula de un organismo humano, animal o vegetal o de un microorganismo, implicando dicha cascada funcional una sucesión de reacciones en dicha célula, siendo cada una de las reacciones dependiente de las anteriores y en una actividad biológica medible en dicha célula, caracterizado porque comprende por lo menos las etapas siguientes:

- 25
- a) identificar un anticuerpo intracelular o un fragmento de anticuerpo intracelular, que puede ser expresado en dicha célula y que comprende por lo menos uno de los dominios variables de una cadena de inmunoglobulina, capaz de unirse a dicha diana y modular dicha cascada funcional que implica dicha diana,

30

 - b) cribar a partir de un banco de moléculas de masa molecular inferior a 2.500 Da distintas de unos oligómeros, cíclicos o no cíclicos, los ligandos moduladores de la unión entre dicha diana y el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo identificado en a), y

35

 - c) identificar a partir de los ligandos moduladores obtenidos en b), aquéllos capaces de modular dicha cascada funcional.

40 Las etapas del procedimiento según la invención, tales como las definidas anteriormente están esquematizadas en la figura 1.

Definiciones

45 Se entiende mediante las expresiones y los términos:

- “cascada funcional” una vía metabólica, una vía de señalización o una cascada de activación que implica una sucesión de reacciones (reacciones enzimáticas, interacciones moleculares, cambios de conformación, modificaciones químicas) en una célula, siendo cada una de las reacciones dependiente de las anteriores y

desembocando en una actividad biológica medible en dicha célula,

- “modulación” una modulación positiva o negativa: activación o inhibición, total o parcial,
- “diana implicada en una cascada funcional” cualquier molécula de una célula de un organismo (humano, animal, vegetal) o de un micro-organismo (virus, bacteria, hongo, parásito) que es capaz de interactuar con uno o varios ligandos (o parejas naturales, conocidas o desconocidas), uniéndose cada uno a un sitio o a una región distinta de dicha diana (figura 2); la unión del ligando modula una cascada funcional implicada en un proceso fisiológico o patológico de dicha célula o de dicho microorganismo y resulta en una actividad biológica medible en dicha célula o en dicho microorganismo. Dicha diana puede ser en particular: una proteína, un péptido, un polinucleótido (ADN, ARN), un lípido, un azúcar o un derivado de los anteriores (glicoproteína, glicolípido, etc.).

La figura 3 ilustra el ejemplo de la proteína tirosinaquinasa (PTK) Syk que es una proteína multifuncional implicada entre otros en dos cascadas de activación: la primera (cascada 1) que conduce a la activación de la proteína Ras después de la MAPK, interviene en el crecimiento y en la diferenciación de algunas células de la línea linfocítica incluyendo los linfocitos B, los mastocitos, los basófilos y una sub-población de linfocitos T (primera actividad biológica), y la segunda (cascada 2) que conduce a la activación de la PTK Btk, de la fosfolipasa C- γ 2 (PLC γ 2) y al aumento del flujo de calcio intracelular, resulta en la desgranulación y en la liberación de mediadores alérgicos por los mastocitos (segunda actividad biológica). La cascada funcional que se desea inhibir selectivamente es la cascada 2 que tiene unas aplicaciones en la prevención y/o en el tratamiento de las alergias, mientras que la cascada 1 no debe ser inhibida porque podría resultar en unos efectos secundarios nefastos para las células (agresividad de los tumores; Coopman *et al.*, Nature, 2000, 406, 742-747).

- “banco de moléculas” o quimioteca, un conjunto de moléculas distintas de los anticuerpos o de los fragmentos de anticuerpos, emparentadas por su estructura, su origen o su función, en particular un banco combinatorio que incluye unas moléculas que difieren entre sí por la sustitución sistemática o aleatoria de sus constituyentes elementales, por ejemplo un banco de oligómeros tales como unos péptidos, unos oligonucleótidos (aptámeros) y unos oligosacáridos o bien un banco de moléculas orgánicas distintas de los oligómeros, cíclicos o no cíclicos, en particular unas pequeñas moléculas orgánicas, es decir, de masa molecular inferior a 2.500 Da, preferentemente inferior a 2.000 Da, de manera preferida inferior a 1.500 Da, de manera más preferida inferior a 1.000 Da, de manera todavía más preferida inferior a 750 Da.
- “fragmento de anticuerpos” un fragmento capaz de unirse a una diana, que comprende por lo menos el dominio variable de una cadena pesada (CH) y/o el dominio variable de una cadena ligera (VL) de una inmunoglobulina clásica, o bien el dominio variable de una inmunoglobulina de cadena única, tal como los fragmentos Fab, Fv, scFv o VHH.
- “anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a dicha diana y modular

5 una cascada funcional que implica dicha diana” un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de unirse a dicha diana e imitar la interacción *in vivo* de dicha diana con su ligando (pareja natural) a nivel del sitio de interés; el epítopo de la diana reconocido por dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo se solapa parcial o totalmente con el sitio de interés de dicha diana (figura 2B).

10 El cribado del banco de moléculas (etapa b) o de un banco de anticuerpos o de fragmentos de anticuerpos (etapa a) de identificación de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos capaces de unirse a la diana se llevan a cabo mediante cualquier método conocido por el experto en la materia que permita la medición de la interacción entre dos parejas (ELISA, transferencia de energía mediante resonancia (FRET), polarización de fluorescencia, resonancia plasmónica de superficie). Las etapas a) y b) se llevan a cabo con la ayuda de una diana o de un derivado de la diana tal como un fragmento que comprende por lo menos el sitio de interés, un mimotopo o también un anticuerpo anti-idiotípico que representa la imagen interna de dicho sitio de interés de la diana. Dicha diana y sus derivados o bien el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo son eventualmente inmovilizados sobre un soporte apropiado y/o marcados mediante cualquier medio que permita obtener una señal medible, conocido por el experto en la materia.

20 La identificación de los ligandos o bien de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos capaces de modular selectivamente una cascada funcional que implica dicha diana se realiza mediante un ensayo funcional que permite medir la actividad biológica que resulta de dicha cascada funcional. Se trata, en particular, de un ensayo *in vitro*, en un sistema celular apropiado o *in vivo*, en un organismo no humano apropiado.

25 Las células en cultivo pueden ser inmortalizadas o en cultivo primario, adherentes o en suspensión. El organismo vivo puede ser cualquier organismo no humano o microorganismo de laboratorio o de estudio (animal (roedores, conejos, cerdos, bovinos, ovinos, etc.) o planta transgénica o no transgénica, parásito, etc.)

30 Entre los sistemas celulares y los organismos apropiados, se pueden citar en particular los que son unos modelos del proceso fisiológico o patológico que implica dicha cascada funcional, tales como, de manera no limitativa, unos modelos de la diabetes, de la alergia, de la artritis o del asma.

35 Ventajosamente, la identificación de los anticuerpos o de fragmentos de anticuerpos capaces de modular una cascada funcional que implica dicha diana se lleva a cabo en unas células modificadas por un vector de expresión de dichos anticuerpos o de sus fragmentos (anticuerpos o fragmentos de anticuerpos intracelulares).

40 El ensayo funcional utilizado en esta verificación *in vitro*, en un sistema celular o *in vivo* en un organismo apropiado, depende de la actividad biológica que se busca modular en un objetivo terapéutico o no terapéutico.

45 A título de ejemplo no limitativo de actividad biológica medible en unas células, se pueden citar en particular: la división, la migración, la desgranulación, el transporte a través de membranas, la diferenciación, la apoptosis, la replicación, la transcripción y la producción de factores tales como unas citoquinas. Los ensayos funcionales que permiten medir dicha actividad biológica *in vitro* o *in vivo* son conocidos por el experto en la materia.

5 La identificación de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo en a) se lleva a cabo mediante el cribado de un banco de anticuerpos o de fragmentos de anticuerpos, preferentemente un banco de fragmentos scFv, de manera preferida un banco de fagos que expresan unos fragmentos scFv en su superficie.

La identificación de dicho anticuerpo puede comprender:

- 10
- una primera etapa de cribado de los anticuerpos o de los fragmentos de anticuerpo capaces de unirse a dicha diana, en particular en fago-ELISA, y
 - 15 - una segunda etapa de identificación de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo capaces de modular dicha cascada funcional, en particular en unas células modificadas por un vector de expresión de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (anticuerpos o fragmentos de anticuerpos intracelulares).

20 De manera más precisa, los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos, en particular los fragmentos scFv seleccionados durante la etapa de cribado pueden ser clonados a continuación en un vector apropiado y expresados en unas células, en particular unas células eucariotas tales como unas células de mamífero modificadas por el vector recombinante así obtenido. Dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, denominados anticuerpos intracelulares (Cattaneo *et al.*, Trends in Biotechnology, 1999, 17, 115-121) son expresados en forma funcional, capaces de unir la diana en el compartimento de las células modificadas en el que se expresa (núcleo, citoplasma, 25 compartimento secretor). Además, se pueden introducir unas mutaciones en la secuencia de los anticuerpos o de los fragmentos de anticuerpos seleccionados, de manera que se mejora su solubilidad y/o su conformación en las células, en particular en las eucariotas. Entre las mutaciones que se pueden prever, se pueden citar en particular las mutaciones puntuales descritas en Hurlle *et al.*, PNAS USA, 1994, 91, 5446-5450 y Martineau *et al.*, J. Mol. Biol., 1998, 280, 117-127. Además, se pueden seleccionar unos anticuerpos o 30 fragmentos de anticuerpos que presentan una estabilidad y/o una afinidad aumentada mediante una etapa adicional de selección fenotípica, tal como se ha descrito en Cattaneo *et al.*, citado anteriormente.

35 Alternativamente, la identificación de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos capaces de modular dicha cascada funcional se lleva a cabo mediante una selección fenotípica apropiada de células modificadas por un banco de anticuerpos o de fragmentos de anticuerpos, según el principio tal como se ha descrito en Cattaneo *et al.*, citado anteriormente.

40 Según otro modo de realización ventajoso de dicho procedimiento, la etapa b) de cribado comprende:

- 45
- la puesta en contacto del banco de moléculas a ensayar con la diana o uno de sus derivados tales como se han definido anteriormente,
 - la adición del anticuerpo o fragmento de anticuerpo eventualmente marcado, y
 - la medición, mediante cualquier medio apropiado, de la cantidad relativa de

anticuerpo unido a la diana, en presencia o en ausencia de dicho banco de moléculas.

5 Según otro modo de realización ventajoso de dicho procedimiento, la etapa b) de cribado se lleva a cabo mediante un ensayo de unión de dicha diana, en competición con dicho anticuerpo o dicho fragmento de anticuerpo, de manera que se aíslan unos ligandos de dicha diana que desplazan dicho anticuerpo o dicho fragmento de anticuerpo del complejo diana/anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

10 Un ejemplo de este modo de realización comprende:

- 15 - la puesta en contacto del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo, eventualmente marcado, con la diana o uno de sus derivados tales como se han definido anteriormente,
- la adición del banco de moléculas a ensayar de manera que se detectan las moléculas capaces de desplazar el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de su complejo con el fragmento de la diana, y
- 20 - la medición, mediante cualquier medio apropiado, de la cantidad relativa de anticuerpo unido a la diana, en presencia o en ausencia de dicho banco de moléculas.

25 Otro ejemplo de este modo de realización comprende:

- la mezcla del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo, eventualmente marcado, con el banco de moléculas a ensayar,
- 30 - la puesta en contacto de la mezcla con la diana o uno de sus derivados tales como se han definido anteriormente, y
- la medición, mediante cualquier medio apropiado, de la cantidad relativa de anticuerpo unido a la diana, en presencia o en ausencia de dicho banco de moléculas.

35 La capacidad de una molécula para modular la unión entre la diana y el anticuerpo se determina comparando el valor de la señal de unión del anticuerpo, en presencia o en ausencia de cada una de las moléculas del banco, ensayadas separadamente.

40 Según otro modo de realización ventajoso de dicho procedimiento, las etapas a) y c) se llevan a cabo mediante un ensayo funcional que permite medir la actividad biológica que resulta de dicha cascada funcional, en particular mediante un ensayo *in vitro*, en un sistema celular apropiado o *in vivo*, en un organismo no humano apropiado.

45 Según otro modo de realización ventajoso de dicho procedimiento, dicha diana se selecciona de entre: una enzima, un receptor, una proteína adaptadora, un vehículo, una proteína de protección, y una proteína reguladora.

A título de ejemplo no limitativo de estas proteínas, se pueden citar: unas enzimas

5 tales como unas proteínas tirosinaquinasas como la proteína Syk; unos receptores de citoquinas tales como el receptor de IL-13, de EGF o de TNF, unas proteínas adaptadoras tales como SLP-76 y E6-AP; unas proteínas de protección tales como HSP70 y HSP60; unas proteínas reguladoras tales como NF- κ 13, I- κ B, Akt, PSAT-1, p53, p73 y la familia Bcl2.

10 Según todavía otro modo de realización ventajoso de dicho procedimiento, dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo en a) está dirigido contra los dominios SH2 de la proteína Syk y es capaz de inhibir la vía de la PLC γ -2. Dicho anticuerpo permite identificar unos medicamentos que actúan específicamente sobre las reacciones de hipersensibilidad de tipo I, útiles para la prevención y/o el tratamiento de patologías tales como la conjuntivitis o la rinitis alérgica, el asma extrínseco, el edema de Quincke y el choque anafiláctico, en los casos más graves.

15 Según otro modo de realización ventajoso de dicho procedimiento, dicho banco de moléculas en b) es un banco de pequeñas moléculas orgánicas.

20 La presente invención tiene asimismo por objeto un kit para la realización del procedimiento tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque comprende por lo menos:

- 25 - una diana de una célula de un organismo humano, animal o vegetal o de un microorganismo, implicada en una cascada funcional que implica una sucesión de reacciones en dicha célula, siendo cada una de las reacciones dependiente de las anteriores y desembocando en una actividad biológica medible en dicha célula, comprendiendo un fragmento de dicha diana por lo menos el sitio de interés, un mimotopo de dicha diana, o también un anticuerpo anti-idiotípico que representa la imagen interna de dicho sitio de interés de la diana tales como se han definido anteriormente,
- 30 - un anticuerpo intracelular o un fragmento de anticuerpo intracelular, que puede ser expresado en dicha célula y que comprende por lo menos uno de los dominios variables de una cadena de inmunoglobulina, capaz de unirse a dicha diana y de modular dicha cascada funcional que implica dicha diana o un banco de anticuerpos o de fragmentos de anticuerpos, tales como se han definido anteriormente, y
- 35 - un banco de moléculas orgánicas de masa molecular inferior a 2.500 Da distintas de los oligómeros, cíclicos o no cíclicos, a ensayar, tal como se ha definido anteriormente.
- 40

45 El procedimiento según la invención se puede utilizar para cribar cualquier tipo de molécula de interés terapéutico o no terapéutico, capaz de actuar sobre un proceso fisiológico o patológico de cualquier tipo de célula o de microorganismo tales como se han definido anteriormente.

Se puede utilizar para cribar nuevas familias de moléculas que presentan nuevas propiedades de interés terapéutico o no terapéutico o derivados de estas moléculas que presentan una actividad específica y/o un índice terapéutico mejorados.

Los bancos de moléculas se preparan según los métodos clásicos de síntesis química combinatoria, conocidos por el experto en la materia.

- 5 El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo tales como se han definido anteriormente se preparan mediante las técnicas clásicas conocidas por el experto en la materia, tales como las descritas en *Antibodies: A Laboratory Manual*, E. Howell y D Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. De manera más precisa:
- 10 - los anticuerpos monoclonales se producen a partir de hibridomas obtenidos por fusión entre unos linfocitos B de un animal inmunizado y unos mielomas, según la técnica de Köhler y Milstein (*Nature*, 1975, 256, 495-497); los hibridomas se cultivan *in vitro*, en particular en unos fermentadores o se producen *in vivo*, en forma de ascito; alternativamente, dichos anticuerpos monoclonales se producen
- 15 mediante ingeniería genética tal como se describe en *Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display Methods and Protocols*, P.M. O'Brien y R. Aitken. Humana Press, Vol. 178, 2002. Por ejemplo, unos animales apropiados son inmunizados de manera repetida con la diana o uno de sus fragmentos, según un protocolo estándar que comprende una primera inmunización por inyección intraperitoneal del antígeno en un volumen equivalente de adyuvante completo de Freund y después una segunda inmunización (recuerdo) 15 días más tarde en
- 20 unas condiciones idénticas pero esta vez con adyuvante incompleto de Freund. Los anticuerpos monoclonales se producen según un protocolo estándar que comprende el sacrificio de los animales dos semanas después del último recuerdo, la extracción del bazo, la puesta en suspensión de los linfocitos esplénicos y la fusión de estos linfocitos con la línea celular murina SP2/0 que no produce ningún anticuerpo murino, que es inmortalizada, y que posee toda la maquinaria necesaria para la secreción de inmunoglobulinas.
- 25
- 30 - los bancos de anticuerpos son, o bien unos bancos naturales producidos a partir de las regiones V_H y V_L clonadas a partir de los ARNm de hibridomas o de linfocitos esplénicos de individuos no sometidos a tratamiento previo o previamente inmunizados, o bien unos bancos recombinantes; por ejemplo los fragmentos Fv, scFv o Fab son expresados en la superficie de fagos filamentosos según la técnica descrita inicialmente en Winter y Milstein, *Nature*, 1991, 349, 293-299 (*Methods in Molecular Biology: Antibody Phage Display Methods and Protocols*, P.M. O'Brien y R. Aitken. Humana Press, Vol. 178, 2002; Knappik *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 2000, 296, 57-86; Vaughan *et al.*, *Nature Biotech*, 1996, 14, 309-314).
- 35
- 40 - Los anticuerpos específicos de la diana se aíslan mediante cribado de los bancos tales como se han definido anteriormente, en particular unos bancos de fagos; después de varias etapas de selección, los fagos que expresan los fragmentos de anticuerpos específicos de la diana son aislados y los ADNc que corresponden a dichos fragmentos se expresan en un sistema de expresión apropiado, mediante
- 45 las técnicas clásicas de clonación y de expresión de ADN recombinante. Preferentemente dichos ADNc son clonados al mismo tiempo en un vector de expresión procariota y eucariota, en forma de una proteína de fusión que comprende por lo menos en su extremo $-NH_2$ o $COOH$, una etiqueta para la detección de dicho fragmento de anticuerpo, por ejemplo un epítopo (c-myc, HA).

5 Dicha proteína de fusión puede comprender eventualmente, en uno de sus extremos, una etiqueta para la purificación del fragmento de anticuerpo, por ejemplo una secuencia polihistidina para la purificación sobre una columna de níquel-agarosa. Dicho vector de expresión eucariota contiene, además de los elementos reguladores de la transcripción/traducción apropiados (promotor, potenciador, secuencia de consenso de Kozak, señal de poliadenilación, etc.) bajo el control de los cuales se insertan las secuencias codificantes tales como se han definido anteriormente, los elementos indispensables para la expresión de dichos fragmentos en el compartimento celular apropiado tal como se ha definido anteriormente, en particular en el citoplasma, y eventualmente un marcador de selección (gen de resistencia a un antibiótico, etc.) para la selección de líneas de células, en particular eucariotas, modificadas de manera estable por dicho vector de expresión y que producen los anticuerpos intracelulares.

15 Los anticuerpos monoclonales o sus fragmentos tales como se han definido anteriormente, se purifican mediante las técnicas clásicas conocidas por el experto en la materia, en particular mediante cromatografía de afinidad.

20 La diana o el fragmento que comprenden el sitio de interés pueden ser, o bien purificados a partir de tejidos o de células, mediante las técnicas clásicas conocidas por el experto en la materia, o bien producidas mediante las técnicas clásicas de ADN recombinante conocidas por el experto en la materia, siguiendo los protocolos estándares tales como los descritos en particular en Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA). El polinucleótido que codifica para dicha proteína o dicho fragmento se clona en un vector de expresión (plásmido, virus, etc.) en el que dicho polinucleótido se dispone bajo el control de elementos reguladores apropiados de la transcripción y de la traducción. Además, dicho vector puede comprender unas secuencias (etiquetas o *tag*) fusionadas en fase con el extremo 5' y/o 3' de dicho polinucleótido, útiles para la inmovilización y/o la detección y/o la purificación de la proteína expresada a partir de dicho vector; dicha proteína se expresa a continuación en unas células hospedantes apropiadas (bacterias, levaduras, células de insecto o de mamífero) y eventualmente purificada.

35 Alternativamente, el fragmento que comprende el sitio de interés se sintetiza en fase sólida, según el método originalmente descrito por Merrifield *et al.* (J. Am. Chem. Soc., 1964, 85: 2149).

40 El marcado de la diana, del anticuerpo o de su fragmento y la detección de la unión anticuerpo/diana y ligando/diana, se llevan a cabo mediante las técnicas clásicas conocidas por el experto en la materia: (i) por fusión de la secuencia codificante con la secuencia de un epítipo (c-myc, HA), (ii) por acoplamiento con un marcador apropiado tal como un fluoróforo, una enzima (fosfatasa alcalina, peroxidasa), un isótopo radiactivo, o la biotina, (iii) por un anticuerpo secundario marcado o bien por cualquier interacción específica con un marcador apropiado. Por ejemplo, la unión anticuerpo/diana y ligando/diana se detecta mediante la transferencia de fluorescencia entre dos proteínas fluorescentes complementarias (Philipps *et al.*, J. Mol. Biol., 2003, 327, 239), dos fluoróforos complementarios (fluoresceína/terametilrodamina) o una combinación de los dos. Por ejemplo, dicha diana o dicho fragmento comprenden un fluoróforo receptor o donante respectivamente en su extremo NH₂ y/o COOH y el anticuerpo o el fragmento de

anticuerpo comprenden el fluoróforo complementario en su extremo NH₂ y/o COOH.

El procedimiento según la invención presenta las ventajas siguientes:

- 5
- permite identificar nuevas moléculas que actúan de manera selectiva y específica sobre un proceso fisiopatológico, que se pueden utilizar potencialmente como medicamento, por la combinación de dos etapas de cribado:
 - 10
 - una etapa de cribado mediante un ensayo de unión, fácilmente automatizable y adaptable al alto caudal, unas moléculas que imitan la interacción de una diana con un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo (enfoque idiotípico) y son por lo tanto susceptibles de modular la cascada funcional que implica dicha diana, y
 - 15
 - una etapa de cribado de bajo caudal, mediante un ensayo en cultivo celular o en un modelo animal apropiado, de las moléculas capaces de modular la cascada funcional que implica dicha diana, en particular mediante la medición de la actividad biológica que resulta de dicha cascada.
- 20
- Por ejemplo, en el caso de la proteína tirosinaquinasa Syk, los resultados obtenidos a partir de un banco de 3.000 moléculas muestran que la eficacia de la primera etapa de cribado con el anticuerpo anti-Syk es tal que la segunda etapa de cribado funcional sobre un número restringido de moléculas (10 moléculas), permite aislar por lo menos una molécula inhibidora activa *in vivo* en la cascada funcional seleccionada.
- 25
- en la medida en la que utiliza un enfoque idiotípico, presenta las ventajas siguientes, a saber:
 - 30
 - se adapta a todas las dianas celulares,
 - 35
 - se adapta al reconocimiento de cualquier sitio de una diana de interés, de manera específica y con una afinidad elevada (del orden del nM) y, en particular, un sitio de la superficie de dicha diana, susceptible de unir una pareja por medio de una interacción de tipo proteína-proteína; en consecuencia, los ligandos aislados mediante este procedimiento de cribado deberían presentar las mismas propiedades, en particular en términos de afinidad/especificidad para la diana,
 - 40
 - no implica el hecho de conocer la pareja natural cuya interacción con la diana está imitada por el anticuerpo y el ligando seleccionado a partir del banco de moléculas, y
 - permite identificar nuevas moléculas que permiten ventajosamente sustituir los anticuerpos monoclonales recombinantes utilizados en los tratamientos terapéuticos tal como el cetuximab (anti-EGFR), el rituximab (anti-CD20) y el infliximab (anti-TFN) que son difíciles de producir y presentan un coste elevado.

45

Además de las disposiciones anteriores, la invención comprende asimismo otras disposiciones que se pondrán más claramente de manifiesto a partir de la descripción

siguiente, que se refiere a unos ejemplos de cribado de moléculas capaces de modular selectivamente la desgranulación de los mastocitos, con la ayuda de un fragmen de un scFv dirigido contra los dominios SH2 de la diana Syk, de la familia de las PTK (proteína tirosina quinasa), así como a los dibujos adjuntos, en los que:

- 5
- la figura 1 es una representación esquemática del procedimiento según la invención,
 - la figura 2 es una representación esquemática de una diana y de la cascada funcional en la que está implicada,
 - la figura 3 es una representación esquemática de las cascadas de activación que implican la proteína tirosina quinasa Syk y unas actividades biológicas resultantes,
 - la figura 4 ilustra la validación del procedimiento según la invención utilizando la proteína Syk como diana y el fragmento scFv G4G11 como anticuerpo para el cribado de una quimioteca. Entre las diez moléculas procedentes del cribado en ELISA, por lo menos una de ellas inhibe en gran medida la liberación de los mediadores de la inflamación en el ensayo de liberación de la beta-hexosaminidasa: a la concentración de 3 μ M, el fármaco inhibe hasta 93% la desgranulación inducida por el IgE pero no la inducida por la ionomicina,
 - la figura 5 ilustra la comparación de los efectos biológicos del fármaco con la inhibición observada con el scFv. Se han analizado unos lisados de células RBL-2H3 no activadas (NA) y activadas (A), en presencia de la molécula seleccionada en ELISA (fármaco) a una concentración final de 1,5 a 12 μ M (a y b) o de 3 μ M (c y d) o en ausencia de esta molécula, mediante: a y b: inmunotransferencia con la ayuda de un anticuerpo anti-fosfotirosina 4G10 (a), de un anticuerpo antifosfoMAPK (b1) o de un anticuerpo anti-MAPK (b2); c y d: inmunoprecipitación con la ayuda de un anticuerpo anti-Syk (c) o anti-PLC- γ 2 (d) y después inmunotransferencia con la ayuda del mismo anticuerpo utilizado como control, o del anticuerpo anti-fosfotirosina 4G10.

35 **EJEMPLO: Utilización de un fragmento scFv dirigido contra los dominios SH2 de la proteína Syk para cribar unas moléculas capaces de inhibir la cascada de activación de la PLC- γ 2 y de la tirosina quinasa Btk que conduce a la desgranulación de los mastocitos y a la liberación de los mediadores de la inflamación.**

40 La proteína Syk es una proteína tirosina quinasa, multifuncional, que desempeña un papel importante en la activación de algunas células de la línea linfóide incluyendo los linfocitos B, los mastocitos y basófilos, y una sub-población de linfocitos T. La activación de la línea mastocitaria, a consecuencia del reconocimiento por el receptor de las IgE (Fc ϵ RI), de IgE asociadas a un alérgeno, resulta en la liberación de mediadores alérgicos tales como la histamina y la serotonina.

45 De manera más precisa, la agregación del receptor Fc ϵ RI provoca rápidamente la fosforilación de la proteína Syk y su activación. Syk así activada fosforila a su vez sus sustratos citoplásmicos incluyendo la proteína tirosina quinasa Btk y la fosfolipasa C- γ 2

(PLC- γ 2), ambas implicadas en la cascada de activación de la cual resulta la desgranulación de los mastocitos y la liberación de mediadores alérgicos (vía de la PLC- γ -2; figura 3).

5 La proteína Syk interviene en una segunda vía (figura 3) que conduce a la activación de la proteína Ras y después de la MAP quinasa (MAPK). Es importante no perturbar esta vía puesto que se ha demostrado que intervenía en el crecimiento y en la diferenciación de las células y que la modificación de esta segunda vía podría provocar unos fenómenos malignos.

10 Unas investigaciones anteriores han permitido mostrar que dos scFv que interactúan con los dominios SH2 eran capaces de inhibir específicamente *in vivo* la vía de la PLC- γ -2 (G4G11, G4E4; Dauvillier *et al.*, J. Immunol., 2002, 169, 2274-2283). El anticuerpo G4G11 se ha utilizado para cribar unas pequeñas moléculas orgánicas capaces de inhibir específicamente esta vía, *in vivo*.

1) Cribado de un banco de moléculas en ELISA

a) Material

20 La proteína Syk recombinante que contiene dos dominios SH2 fusionados en C-terminal de la glutatión-S-transferasa (GST) está producida en *E. coli* y purificada tal como se ha descrito en Penneff *et al.*, citado anteriormente.

25 El fragmento scFv de anticuerpo humano anti-Syk denominado G4G11, que contiene en C-terminal una etiqueta C-myc, para la detección con la ayuda de un anticuerpo y una etiqueta polihistidina para la purificación por cromatografía de afinidad, está producido en *E. coli* y purificado tal como se ha descrito en Penneff *et al.*, citado anteriormente.

30 El anticuerpo secundario es el anticuerpo monoclonal 9E10 dirigido contra el epítipo c-myc (EQKLISEEDLN), acoplado a la peroxidasa (Munro *et al.*, Cell, 1986, 46, 291-300).

35 El banco de moléculas a ensayar es un banco de 3.000 pequeñas moléculas orgánicas (ChemBridge Corporation; <http://chembridge.com>).

40 Todas las diluciones e incubaciones han sido llevadas a cabo en un tampón PBS/Tween 20 al 0,1%/BSA al 0,1%.

Los lavados han sido realizados en un tampón PBS/Tween 20 al 0,1%.

45 El sustrato es el dihidrocloruro de tetrametilbenzidina a 0,1 mg/ml en un tampón de fosfato citrato pH 5, adicionado con H₂O₂ (0,03%).

b) Protocolo

La proteína Syk recombinante (10 μ g/ml en PBS) ha sido adsorbida sobre una placa de 96 pocillos (Maxisorp[®], NUNC; 100 μ l, es decir 1 μ g por pocillo), durante una

5 noche a 4°C. Después de un primer lavado, los sitios no específicos de la placa han sido saturados con una disolución de PBS/BSA al 1% a razón de 250 µl por pocillo, durante una noche a temperatura ambiente. Después del lavado del exceso de disolución de saturación, las moléculas del banco (3.000 moléculas) han sido añadidas a la concentración de 20 µM en un volumen de 50 µl, y las placas han sido incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente. El fragmento scFv ha sido añadido a continuación a la concentración de 150 nM en un volumen de 50 µl y las placas han sido incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de un nuevo lavado, se han añadido 50 µl de anticuerpo secundario marcado con peroxidasa y las placas han sido incubadas durante 10 30 minutos a temperatura ambiente. Después de un último lavado, se ha añadido el sustrato de reacción de la peroxidasa en un volumen de 100 µl, y después las placas han sido incubadas durante 5 minutos y la reacción ha sido detenida mediante la adición de 50 µl de H₂SO₄ 2N. La densidad óptica a 450 nm ha sido medida a continuación con la ayuda de un lector automático para placa ELISA.

15 El banco ha sido cribado dos veces en unos experimentos independientes.

c) Resultados

20 La inhibición de la unión entre el fragmento de la proteína Syk y el scFv G4G11 por la molécula a ensayar se mide mediante la relación I, igual a:

$$\frac{(\text{señal en ausencia de fármaco}) - (\text{señal en presencia de fármaco})}{(\text{señal en ausencia de fármaco})}$$

25 Los resultados son los siguientes:

- 2.990 moléculas no producen ninguna inhibición ($I = 1 \pm 0,2$)
- 8 moléculas producen una baja inhibición ($0,4 < I < 0,8$)
- 30 - 2 moléculas producen una fuerte inhibición ($I \leq 0,3$)

2) Verificación del poder modulador de las moléculas seleccionadas, *in vivo*, en cultivo celular

35 La verificación *in vivo* del poder modulador de las moléculas seleccionadas en ELISA se ha efectuado mediante un ensayo de desgranulación de los mastocitos, mediante la medición de la liberación de la β-hexosaminidasa tal como se ha descrito en Dauvillier *et al.*, citado anteriormente.

40 Además, se ha analizado el efecto de las moléculas seleccionadas en ELISA sobre la tirosina fosforilación de las proteínas totales, y de las proteínas Syk, PLCγ-2 y MAPK tal como se describe en Dauvillier *et al.*, citado anteriormente.

45 Brevemente, las células RBL-2H3 (línea de leucemia basófila de rata) se inoculan en una placa de 96 pocillos a razón de 2.10^5 células/pocillo. Éstas se sensibilizan en presencia de un anticuerpo monoclonal IgE anti-DNP, durante una noche a 37°C. Las células se incuban a continuación durante 2 horas a 37°C, en presencia de diferentes concentraciones de la molécula seleccionada en ELISA, y después se activan mediante el antígeno DNP-BSA, durante 3 minutos a 37°C. El sobrenadante de cultivo se recoge a

continuación y se conserva a 4°C (S1). Las células adherentes son lisadas en presencia de un tampón de lisis que contiene 0,1% de Triton X-100 y unos inhibidores de proteasas. Los lisados celulares se recogen asimismo y se conservan a 4°C (S2).

5 Para calcular la cantidad de la enzima β -hexosaminidasa liberada, las disoluciones S1 y S2 son incubadas con el sustrato de la enzima: el 4-nitrofenil-2-desoxi- β -D-glucopiranosido, durante 1h30 a 37°C. La reacción enzimática se detiene mediante la adición de una disolución de glicina pH 3 y la densidad óptica se lee a 405 nm. La cantidad de β -hexosaminidasa liberada corresponde a:

$$10 \quad \frac{\text{Hex S1}}{(\text{Hex S1} + \text{Hex S2})} \times 100$$

15 Para cada concentración, se ha efectuado un ensayo de desgranulación mediante un ionóforo de calcio (ionomicina) como control.

Entre las diez moléculas procedentes del cribado en ELISA que tiene una relación $I \leq 0,8$, una de ellas inhibe fuertemente la liberación de β -hexosaminidasa tal como lo muestra la figura 4. En efecto, esta molécula inhibe el 93% de la desgranulación inducida por el IgE, a una concentración de 3 μ M pero no afecta a la desgranulación inducida por la ionomicina.

20 Unos ensayos complementarios han mostrado que la molécula identificada se comporta *in vivo* como el scFv G4G11 e inhibe la vía dependiente de PLC- γ , sin afectar a la vía dependiente de Ras (figura 5). En efecto:

- 25
- no afecta a la fosforilación global de las proteínas (figura 5a),
 - no afecta a la fosforilación de Syk (figura 5c),
 - no afecta a la fosforilación de la MAPK (figura 5b),
 - disminuye la fosforilación de la PLC- γ (figura 5d).

30 **3) Verificación del poder modulador de las moléculas seleccionadas, *in vivo*, en el ratón.**

La capacidad de la molécula más activa de la figura 4, para inhibir el choque anafiláctico sistémico, ha sido ensayada en el ratón BALB/c.

Más precisamente, un grupo de ratones (grupo 1) ha recibido una inyección de IgE monoclonal anti-DNP, por vía intravenosa a razón de 100 μ g por ratón BALB/c. Cuarenta y siete horas después, y una hora antes de la inyección del antígeno DNP, la molécula se administra por vía oral, a razón de 100 mg/kg, en una sola toma. Una hora después de la administración de la molécula, el antígeno DNP que contiene 2% de azul de Evans, se inyecta por vía intravenosa, a razón de 1 mg por ratón. Tres grupos de ratones de control han sido ensayados en paralelo con el grupo 1, a saber:

- 45
- grupo 2: ratones BALB/c que no reciben ningún fármaco y que permite medir el choque anafiláctico máximo (control positivo).

- grupo 3: ratones BALB/c que reciben una molécula inactiva.
- grupo 4: ratones que reciben el IgE pero no el antígeno DNP (control negativo).

5 El efecto de la molécula sobre el choque anafiláctico se ha determinado a continuación mediante la medición de la liberación del azul de Evans, mediante extravasación. Para ello, los ratones han sido sacrificados, y después se les han cortado las orejas. Se extrajeron unas superficies iguales de las orejas, con la ayuda de un sacabocados y después se han picado, y puesto en una disolución de formamida, durante 10 una noche a 55°C. Al día siguiente, la liberación del azul de Evans en la disolución de formamida ha sido determinada mediante la medición de la densidad óptica a 610 nm.

15 Los resultados muestran una disminución de 70% de la extravasación del azul de Evans en los ratones que han recibido la molécula activa en el ensayo de inhibición de la desgranulación de los mastocitos (figura 4), con relación a los ratones de control que no reciben ninguna molécula o que reciben una molécula inactiva. Estos resultados demuestran la capacidad de la molécula seleccionada mediante el procedimiento de cribado según la invención, para proteger a un animal del choque anafiláctico.

Reivindicaciones

- 5 1. Procedimiento de identificación de un ligando capaz de modular selectivamente una cascada funcional que implica una diana de una célula de un organismo humano, animal o vegetal o de un microorganismo, implicando dicha cascada funcional una sucesión de reacciones en dicha célula, siendo cada una de las reacciones dependiente de las anteriores y desembocando en una actividad biológica medible en dicha célula, que comprende por lo menos las etapas siguientes:
- 10
- 15 a) identificar un anticuerpo intracelular o un fragmento de anticuerpo intracelular, que puede ser expresado en dicha célula y que comprende por lo menos uno de los dominios variables de una cadena de inmunoglobulina, capaz de unirse a dicha diana y modular dicha cascada funcional que implica dicha diana,
- 20 b) cribar a partir de un banco de moléculas de masa molecular inferior a 2.500 Da diferentes de unos oligómeros, cíclicos o no cíclicos, unos ligandos moduladores de la unión entre dicha diana y el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo identificado en a), y
- 25 c) identificar a partir de los ligandos moduladores obtenidos en b), aquéllos capaces de modular dicha cascada funcional.
- 30 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las etapas a) y b) se llevan a cabo con la ayuda de una diana o de un derivado de la diana tal como un fragmento que comprende por lo menos el sitio de interés, un mimotopo, o también un anticuerpo anti-idiotípico que representa la imagen interna de dicho sitio de interés de la diana.
- 35 3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque dicha diana o su derivado o también el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo están marcados mediante cualquier medio que permite la obtención de una señal medible.
- 40 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la identificación de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo en a) se lleva a cabo mediante el cribado de un banco de fragmentos scFv, preferentemente, un banco de fagos que expresa unos fragmentos scFv en su superficie.
- 45 5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque la identificación de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo intracelular en a) comprende:
- (i) una primera etapa de cribado de los anticuerpos o de los fragmentos de anticuerpos intracelulares capaces de unirse a dicha diana, y

- (ii) una segunda etapa de identificación de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos intracelulares capaces de modular dicha cascada funcional, en unas células modificadas por un vector de expresión de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.

5

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la etapa b) de cribado comprende:

- 10
- la puesta en contacto del banco de moléculas a ensayar con la diana o uno de sus derivados tales como se han definido en la reivindicación 2,
 - la adición del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo, eventualmente marcado, y
- 15
- la medición, mediante cualquier medio apropiado, de la cantidad relativa de anticuerpo unido a la diana, en presencia o en ausencia de dicho banco de moléculas.

20

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la etapa b) de cribado comprende:

- 25
- la puesta en contacto del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo, eventualmente marcado, con la diana o uno de sus derivados tales como se han definido en la reivindicación 2,
 - la adición del banco de moléculas a ensayar de manera que se detectan las moléculas capaces de desplazar el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de su complejo con el fragmento de la diana, y
- 30
- la medición, mediante cualquier medio apropiado, de la cantidad relativa de anticuerpo unido a la diana, en presencia o en ausencia de dicho banco de moléculas.

35

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la etapa b) de cribado comprende:

- 40
- la mezcla del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo, eventualmente marcado, con el banco de moléculas a ensayar,
 - la puesta en contacto de la mezcla con la diana o uno de sus derivados tales como se han definido en la reivindicación 2, y
- 45
- la medición, mediante cualquier medio apropiado, de la cantidad relativa de anticuerpo unido a la diana, en presencia o en ausencia de dicho banco de moléculas.

- 5 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque las etapas a) y c) se llevan a cabo mediante un ensayo funcional que permite medir la actividad biológica que resulta de dicha cascada funcional, en particular mediante un ensayo *in vitro*, en un sistema celular apropiado, o *in vivo* en un organismo no humano apropiado.
- 10 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque dicha diana se selecciona de entre el grupo constituido por: una enzima, un receptor, una proteína adaptadora, un vehículo, una proteína de protección y una proteína reguladora.
- 15 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo identificado en a) está dirigido contra los dominios SH2 de la proteína Syk y es capaz de inhibir específicamente la vía de la PLC γ -2.
- 20 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque dichas pequeñas moléculas orgánicas distintas de oligómeros tienen una masa molecular inferior a 1.000 Da.
- 25 13. Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado porque dichas pequeñas moléculas orgánicas distintas de los oligómeros tienen una masa molecular inferior a 750 Da.
- 30 14. Procedimiento según la reivindicación 4 ó 5, caracterizado porque dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo intracelular es capaz de unir la diana en el compartimento de las células modificadas en el que se expresa.
- 35 15. Procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado porque dicha célula es una célula eucariota y más particularmente una célula de mamífero.
- 40 16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado porque la diana es una molécula de un organismo humano, animal o vegetal.
- 45 17. Kit para la realización del procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado porque comprende por lo menos:
- una diana de una célula de un organismo humano, animal o vegetal o de un microorganismo, implicada en una cascada funcional que implica una sucesión de reacciones en dicha célula, siendo cada una de las reacciones dependiente de las anteriores y desembocando en una actividad biológica medible en dicha célula,

comprendiendo un fragmento de dicha diana por lo menos el sitio de interés, un mimotopo de dicha diana, o también un anticuerpo anti-idiotípico que representa la imagen interna de dicho sitio de interés de la diana,

- 5
- un anticuerpo intracelular o un fragmento de anticuerpo intracelular, que puede ser expresado en dicha célula y que comprende por lo menos uno de los dominios variables de una cadena de inmunoglobulina, capaz de unirse a dicha diana y de modular dicha cascada funcional que implica dicha diana, o bien un banco de anticuerpos intracelulares o de fragmentos de anticuerpos intracelulares, que
- 10
- pueden ser expresados en dicha célula, y
 - un banco de moléculas orgánicas de masa molecular inferior a 2.500 Da distintas de los oligómeros, cíclicos o no cíclicos.
- 15

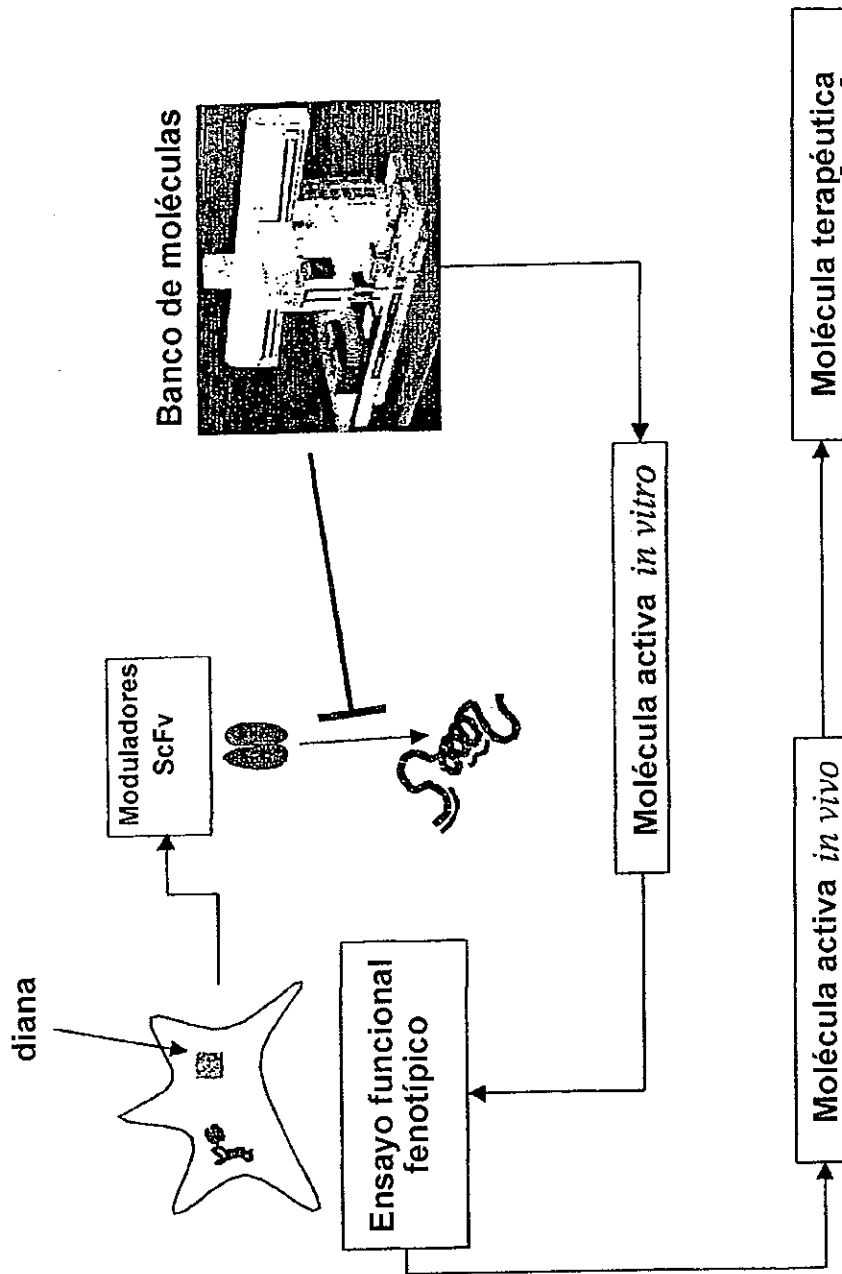


Figura 1

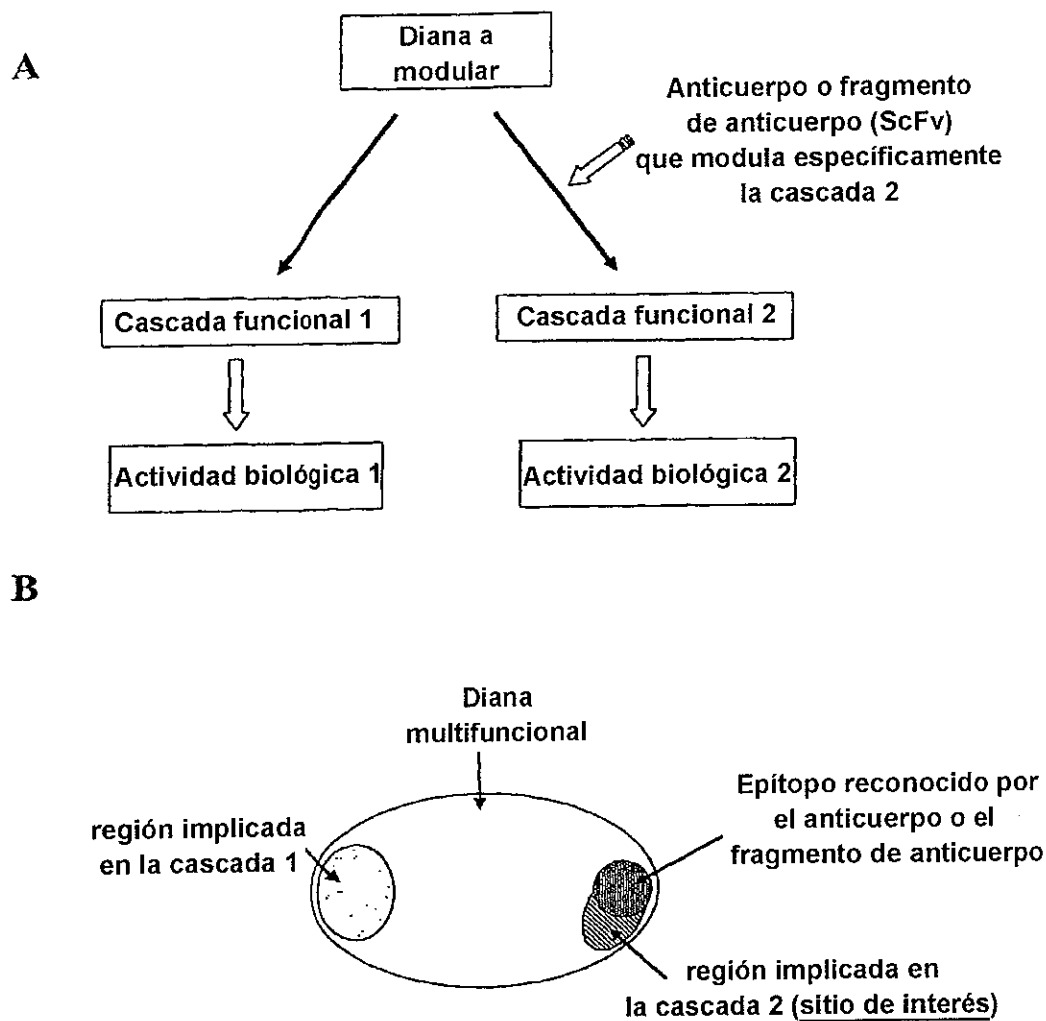


Figura 2

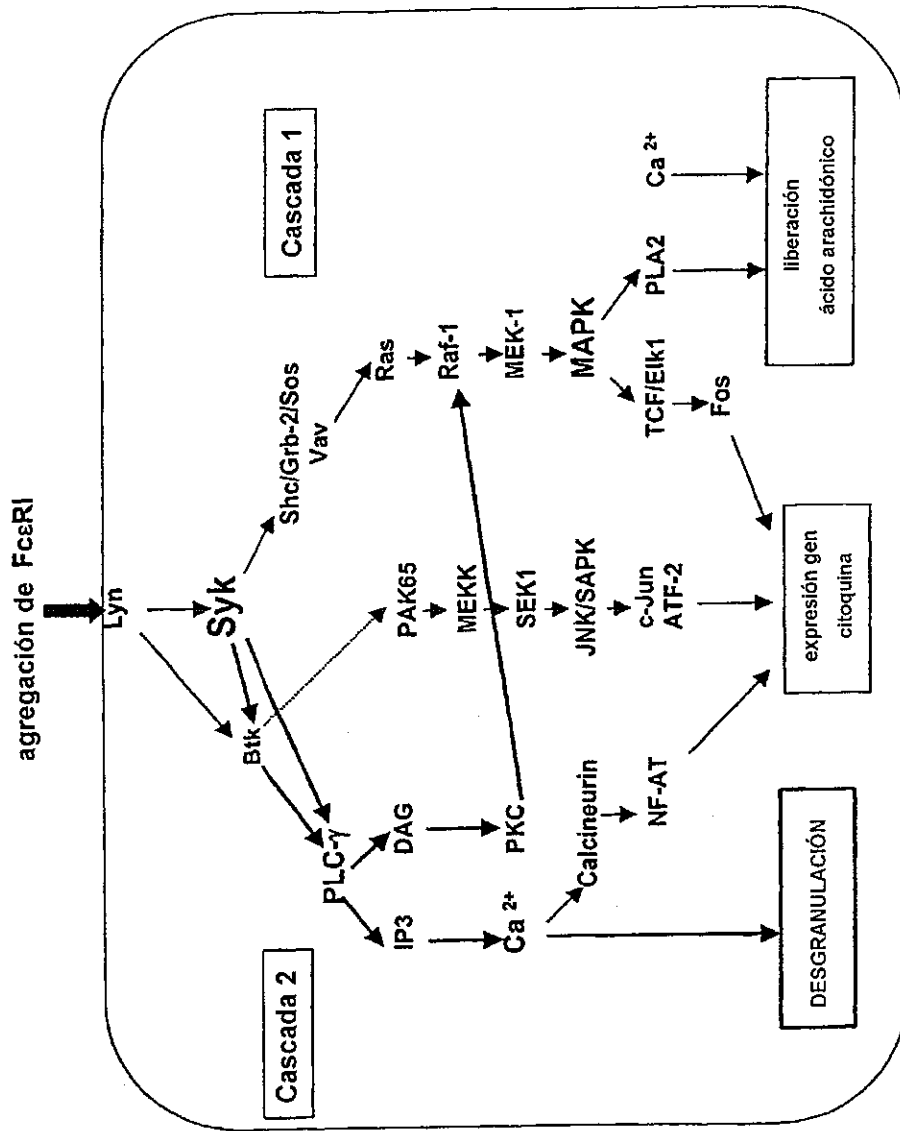


Figura 3

4 / 5

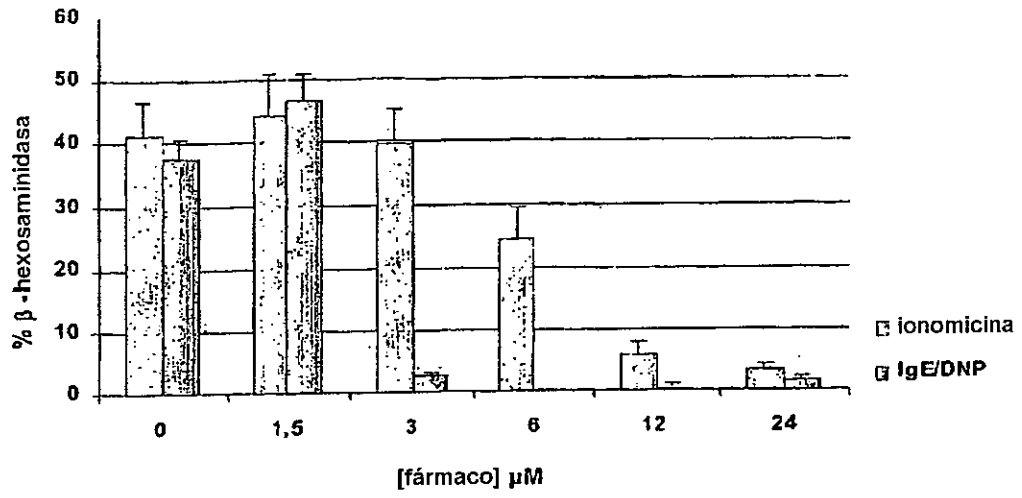


Figura 4

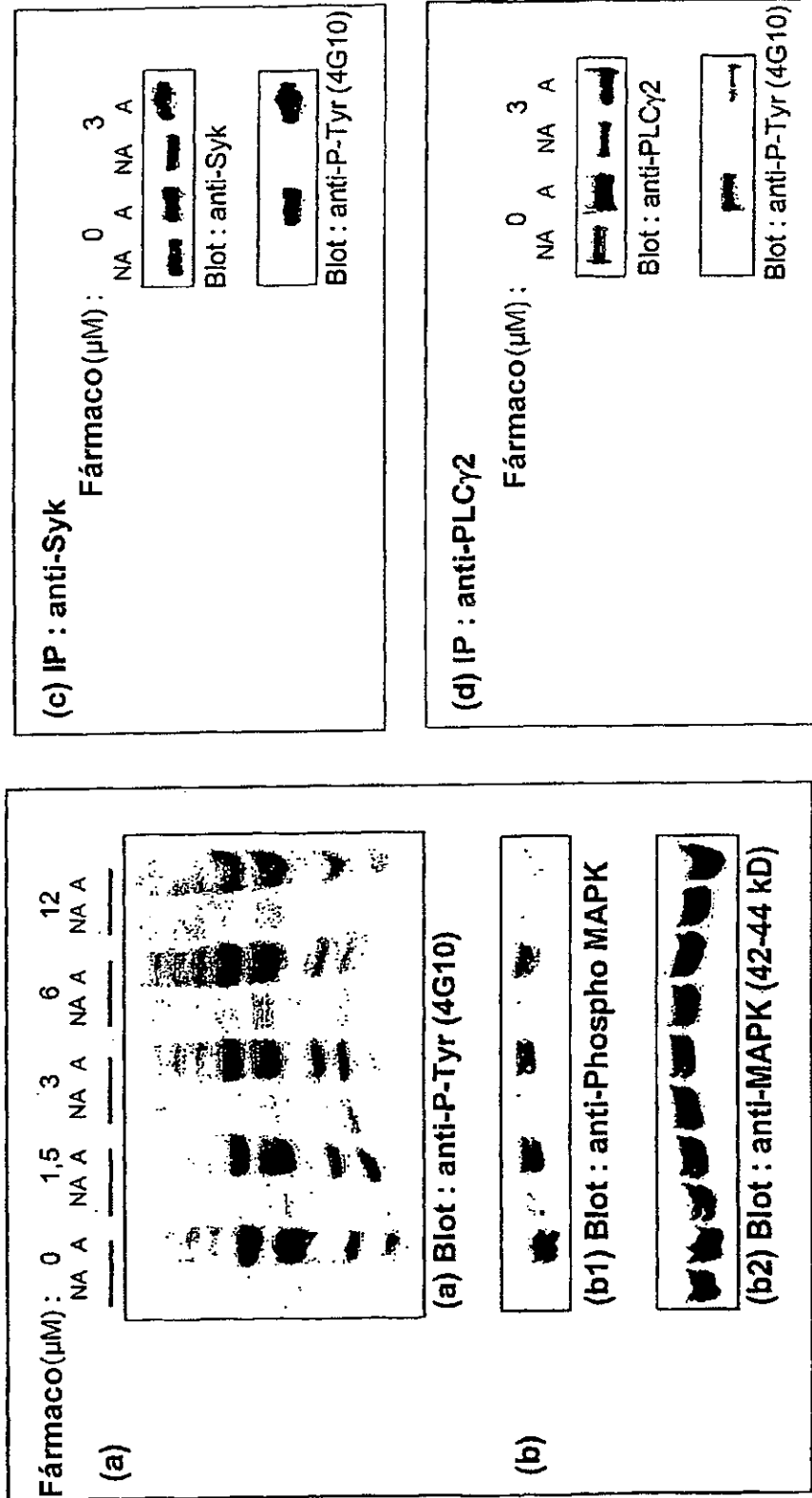


Figura 5