

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 923 755**

51 Int. Cl.:

C12N 9/52 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

C12N 9/96 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2016** **PCT/US2016/058237**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.04.2017** **WO17070554**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2016** **E 16858357 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2022** **EP 3365442**

54 Título: **Procedimientos para crear sistemas de proteínas de dimerización inducidos químicamente para la regulación de eventos celulares**

30 Prioridad:

23.10.2015 US 201562245756 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.09.2022

73 Titular/es:

FRED HUTCHINSON CANCER CENTER (100.0%)
1100 Fairview Avenue North
Seattle, WA 98109, US

72 Inventor/es:

AMIN, RUPESH

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

ES 2 923 755 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

Procedimientos para crear sistemas de proteínas de dimerización inducidos químicamente para la regulación de eventos celulares

CAMPO DE LA DIVULGACIÓN

La presente descripción proporciona procedimientos para crear sistemas de proteínas de dimerización inducida químicamente (CID) y usos de los mismos según se reivindica. Los procedimientos utilizan proteínas de dimerización del dominio de unión al anticuerpo como se reivindica. Los sistemas creados se pueden usar para regular eventos celulares como la expresión génica, la señalización de receptores y la muerte celular para lograr una variedad de resultados de tratamiento clínicamente relevantes.

ANTECEDENTES DE LA DIVULGACIÓN

La capacidad para regular con precisión eventos celulares (p. ej., expresión génica, señalización intracelular, migración celular, muerte celular, etc.) en organismos vivos tiene un potencial inmenso en una variedad de contextos. Por ejemplo, la capacidad de regular con precisión eventos celulares se puede utilizar en medicina humana para tratar innumerables condiciones.

Muchos eventos celulares se regulan (p. ej., se inician, modulan o terminan) cuando las proteínas interactúan o dejan de interactuar entre sí. Por ejemplo, la expresión génica puede iniciarse cuando una proteína del dominio de unión al ADN interactúa con una proteína del dominio de activación de la transcripción. La expresión génica puede terminar, por ejemplo, cuando cesa la interacción. La señalización del receptor celular también puede iniciarse cuando interactúan los dominios proteicos intracelulares de un receptor. La señalización del receptor celular puede terminar, por ejemplo, cuando cesa la interacción. Las vías de señalización celular también se pueden regular reuniendo enzimas y sus sustratos (como las quinasas y sus objetivos aguas abajo). La degradación de proteínas se puede iniciar reclutando maquinaria de ubiquitinación a una proteína objetivo. Además, los procesos de muerte celular pueden iniciarse cuando interactúan las proteínas caspasas.

La interacción de proteínas inducida químicamente (p. ej., dimerización de proteínas inducida químicamente (CID)) se refiere a un proceso mediante el cual dos proteínas que normalmente no interactúan, se emparejan (p. ej., se homodimerizan o heterodimerizan) en presencia de una molécula pequeña (p. ej., un fármaco de molécula pequeña) [20]. El ejemplo más utilizado de esta tecnología es el sistema de dimerización FKBP12/FRB [21, 22]. FKBP12 y FRB son proteínas de origen humano que se dimerizan en presencia del fármaco de molécula pequeña inmunosupresor, rapamicina. La fusión de FKBP12 a un dominio de unión al ADN y la fusión de FRB a un dominio de activación transcripcional produce un sistema en el que la adición de rapamicina activa la expresión génica reclutando el dominio de activación transcripcional en la proximidad del ADN promotor [21].

Un inconveniente del sistema FKBP12/FRB, sin embargo, es la lenta tasa de disociación de FKBP12 y FRB después de la eliminación del exceso de molécula pequeña, lo que conduce a una desactivación lenta de la expresión génica después de la eliminación de la molécula pequeña [25, 26].

Además de la heterodimerización con FRB, se puede hacer que FKBP12 se homodimerice consigo mismo mediante el uso de un ligando simétrico FK1012 o sus derivados [28, 29]. En un ejemplo del uso de este sistema, una fusión de FKBP12 con un fragmento de proteínas Fas o Caspasa 9 humanas crea interruptores de caspasa inducibles. La adición de la molécula pequeña a las células que expresan cualquiera de las proteínas de fusión da como resultado una cascada de caspasas y la muerte celular [30, 31]. Este sistema se encuentra actualmente en ensayos en humanos como un procedimiento para controlar la enfermedad de injerto contra huésped en terapias de células T humanas modificadas [32, 33].

Además de FKBP12 y FRB, también se han creado sistemas CID con las proteínas calcineurina (que se une al fármaco FK506) y DHFR (que se une al fármaco trimetoprima) [27].

Existen limitaciones con las tecnologías CID actuales. Primero, las pequeñas moléculas utilizadas para controlar los sistemas a menudo tienen características indeseables. La rapamicina y el FK506 son fármacos inmunosupresores potentes y no son adecuados para su uso en aplicaciones de terapia génica. Aunque se pueden sintetizar moléculas pequeñas modificadas sin actividad inmunosupresora (como con los "rapalogs"), el proceso de aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de EE. UU. aún debe evaluar la seguridad de cada fármaco. Además, no está claro desde el principio que se pueden encontrar moléculas pequeñas con un conjunto ideal de características, lo que podría hacer perder tiempo en el costoso desarrollo de fármacos. En segundo lugar, como las proteínas CID en estos sistemas se derivan de proteínas humanas con funciones celulares normales, su sobreexpresión puede alterar la fisiología celular. Por ejemplo, Se ha demostrado que la sobreexpresión de FKBP12 altera la entrada de calcio en el músculo y el procesamiento de la proteína APP asociada al Alzheimer en las neuronas [34, 35]. Estos sistemas también pueden tener una cinética de encendido/apagado deficiente y, por lo tanto, no pueden

regularse con suficiente precisión. Los sistemas existentes actualmente también pueden causar efectos fuera del objetivo en la expresión de genes endógenos.

El documento WO 2004/046733 A1 describe un inmunoensayo no competitivo para analitos pequeños. Parker et al (2009), Journal of the American Chemical Society, 131, 45, 16392-16394 describe una molécula pequeña reclutadora de anticuerpos que se dirige a la gp120 del VIH. WO 2015/150771 A1 describe un sistema de señalización de receptor de antígeno quimérico (CAR). El documento US 2014/0286987 A1 describe un procedimiento para controlar la proliferación de células T. Seeber et al (2014), PLOS ONE, 9, 2, e86184 describe una plataforma de alto rendimiento supuestamente robusta para generar anticuerpos monoclonales recombinantes funcionales utilizando células B de conejo de sangre periférica.

RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

La invención está definida por las reivindicaciones.

La presente descripción proporciona procedimientos para crear sistemas mejorados de dimerización inducida químicamente (CID) según se reivindica. Los sistemas CID descritos se mejoran porque usan uno o más de 1) proteínas humanizadas o derivadas de seres humanos con inmunogenicidad baja o nula; 2) proteínas sin funciones intracelulares conocidas para que la fisiología celular en curso se vea mínimamente afectada; y 3) inductores de molécula pequeña que ya están aprobados por la FDA para uso humano y tienen buenas características farmacológicas para la aplicación prevista. La presente divulgación también proporciona usos de los sistemas creados.

La primera proteína se une a una molécula pequeña seleccionada. La segunda proteína se une a la primera proteína, pero solo cuando se une a la molécula pequeña. Por lo tanto, la interacción entre las proteínas se controla mediante la administración y eliminación de la molécula pequeña.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figuras 1A-1C. Control génico y celular mediante dimerización inducida químicamente (CID) de proteínas. 1A) Control transcripcional de la expresión génica mediante CID. Una proteína se fusiona con un dominio de unión al ADN y la otra con un dominio de activación transcripcional. La adición de la molécula pequeña provoca la dimerización y recluta el dominio de activación en la proximidad del dominio de unión al ADN y da como resultado la transcripción de genes diana que contienen sitios de unión al ADN afines dentro del promotor. 1B) Control de señalización celular mediante CID. Los receptores celulares que dependen de la dimerización para la activación de la señalización aguas abajo pueden fusionarse con el par de proteínas de dimerización. La adición de la molécula pequeña provoca la dimerización del receptor y da como resultado la señalización. 1C) Control de la apoptosis celular mediante CID. Las caspasas iniciadoras dependen de la dimerización para su escisión y activación.

Figuras 2A-2D. Esquema general de un procedimiento de ejemplo. 2A) Se generan anticuerpos diméricos o de cadena pesada solamente contra un hapteno de molécula pequeña elegido mediante la inmunización de un animal diana. 2B) Los dominios de unión de los anticuerpos específicos anti-hapteno se aíslan en forma de anticuerpos de cadena sencilla (scFV) o VHH de cadena pesada únicamente. Estos dominios de unión luego se analizan y optimizan adicionalmente para seleccionar una alta especificidad y afinidad. 2C) VHH o scFV en complejo con una molécula pequeña se usa para inmunizar animales diana para generar anticuerpos antimetátipo. 2D) Los dominios de unión de anticuerpos antimetátipo específicos se aíslan y optimizan para seleccionar la especificidad y la afinidad. En realizaciones particulares, estos pares de dominio de unión de anticuerpo/dominio de unión de anticuerpo antimetátipo forman las dos proteínas del sistema CID.

Figura 3. Ejemplo de modificación química de una molécula pequeña para permitir la conjugación. La doxiciclina de molécula pequeña modelo se puede modificar mediante nitración y posterior reducción, lo que da como resultado la unión de una amina primaria en el ^{noveno} carbono. Esta amina primaria se puede usar luego para acoplar doxiciclina a fluoróforos, proteína portadora, biotina, etc. usando química conocida.

Figuras 4A-4B. Ejemplo de esquema de detección de anticuerpos. 4A) Esquema de selección para la unión de moléculas anti-pequeñas VHH o scFV. VHH o scFV individuales (representados por los cuadros sombreados de manera diferente) se pueden expresar intracelularmente en una gran biblioteca de células. Las células se pueden incubar con un conjugado de molécula pequeña-fluoróforo para permitir la unión de la molécula pequeña por VHH o scFV específicos. A continuación, las células pueden lavarse para eliminar el exceso de molécula pequeña y clasificarse mediante citometría de flujo, seleccionando las células que conservan el fluoróforo de molécula pequeña debido a la unión de VHH o scFV. 4B) Esquema de selección para antimetátipo VHH o scFV utilizando un enfoque de dos híbridos. VHH o scFV individuales pueden expresarse como fusiones con un dominio de activación transcripcional en una gran biblioteca de células. Estas células también pueden expresar un VHH o scFV que se une a una molécula antipequeña fusionado con un dominio de unión al ADN y un indicador transcripcional TdTomato. En presencia de una molécula pequeña, el antimetátipo específico VHH o scFV se dimerizan con el anticuerpo asociado y pueden provocar la transcripción del reportero TdTomato. VHH o scFV no específicos no se dimerizan y no se produce transcripción.

Figuras 5A-5B. Ejemplos de vectores de cribado. 5A) Ejemplo de vector de exploración de mamíferos. 5B) Ejemplo de vector de selección de levadura.

Figura 6. Vector de expresión bacteriano de ejemplo.

Figuras 7A - 7B. Vectores de ejemplo Gal4 DBD. 7A) Ejemplo de vector Gal4 DBD de mamífero. 7B) Ejemplo de vector Gal4 DBD de levadura.

Figuras 8A-8B. Vectores de ejemplo del dominio de activación. 8A) Ejemplo de vector de dominio de activación de mamíferos. 8B) Ejemplo de receptor del dominio de activación de levadura.

Figura 9. Ejemplo de vector informador sensible a Gal4 de mamífero y vector Gal4-VP16 de control de mamífero.

Figuras 10A-10D. Primers de ejemplo. 10A) Ejemplos de cebadores VHH de camello/llama. 10B) Ejemplos de cebadores VHH de alpaca. 10C) Cebadores de amplificación de ADN genómico de ejemplo. 10D) Ejemplos de cebadores de secuenciación de vectores de expresión bacteriana.

Figura 11. Cebadores de scFV humanos de ejemplo.

Figura 12. Cebadores VHH humanos de ejemplo.

En las Figuras vectoriales de ejemplo, las características más destacadas están etiquetadas con recuadros sombreados y flechas. La secuencia de ADN del sitio de clonación múltiple en el que se ligan el VHH o el scFV se muestra junto con la secuencia de la proteína traducida de la fusión de VHH o scFV resultante. Los sitios de corte de enzimas de restricción están etiquetados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La capacidad de regular con precisión eventos celulares (p. ej., expresión génica, señalización intracelular, migración celular, muerte celular, etc.) en organismos vivos tiene un potencial inmenso en una variedad de contextos. Por ejemplo, la capacidad de regular con precisión eventos celulares se puede utilizar en medicina humana para tratar innumerables condiciones.

Muchos eventos celulares se regulan (p. ej., se inician, modulan o terminan) cuando las proteínas interactúan o dejan de interactuar entre sí. Por ejemplo, la expresión génica puede iniciarse cuando una proteína del dominio de unión al ADN interactúa con una proteína del dominio de activación de la transcripción. La expresión génica puede terminar, por ejemplo, cuando cesa la interacción. La señalización del receptor celular también puede iniciarse cuando interactúan los dominios proteicos intracelulares de un receptor. La señalización del receptor celular puede terminar, por ejemplo, cuando cesa la interacción. Las vías de señalización celular también se pueden regular reuniendo enzimas y sus sustratos (como las quinasas y sus objetivos aguas abajo). La degradación de proteínas se puede iniciar reclutando maquinaria de ubiquitinación a una proteína objetivo. Además, los procesos de muerte celular pueden iniciarse cuando interactúan las proteínas caspasas.

La interacción de proteínas inducida químicamente (p. ej., dimerización de proteínas inducida químicamente (CID)) se refiere a un proceso mediante el cual dos proteínas que normalmente no interactúan, se emparejan (p. ej., se homodimerizan o heterodimerizan) en presencia de una molécula pequeña (p. ej., un fármaco de molécula pequeña) [20]. El ejemplo más utilizado de esta tecnología es el sistema de dimerización FKBP12/FRB [21, 22]. FKBP12 y FRB son proteínas de origen humano que se dimerizan en presencia del fármaco de molécula pequeña inmunosupresor, rapamicina. La fusión de FKBP12 a un dominio de unión al ADN y la fusión de FRB a un dominio de activación transcripcional produce un sistema en el que la adición de rapamicina activa la expresión génica reclutando el dominio de activación transcripcional en la proximidad del ADN promotor [21].

Un inconveniente del sistema FKBP12/FRB, sin embargo, es la tasa de disociación lenta de FKBP12 y FRB después de la eliminación del exceso de molécula pequeña, lo que lleva a una desactivación lenta de la expresión génica después de la eliminación de la molécula pequeña [25, 26].

Además de la heterodimerización con FRB, se puede hacer que FKBP12 se homodimerice consigo mismo mediante el uso de un ligando simétrico FK1012 o sus derivados [28, 29]. En un ejemplo del uso de este sistema, una fusión de FKBP12 con un fragmento de proteínas Fas o Caspasa 9 humanas crea interruptores de caspasa inducibles. La adición de la molécula pequeña a las células que expresan cualquiera de las proteínas de fusión da como resultado una cascada de caspasas y la muerte celular [30, 31]. Este sistema se encuentra actualmente en ensayos en humanos como un procedimiento para controlar la enfermedad de injerto contra huésped en terapias de células T humanas modificadas [32, 33]. Además de FKBP12 y FRB, también se han creado sistemas CID con las proteínas calcineurina (que se une al fármaco FK506) y DHFR (que se une al fármaco trimetoprima) [27].

Existen limitaciones con las tecnologías CID actuales. Primero, las pequeñas moléculas utilizadas para controlar los

sistemas a menudo tienen características indeseables. La rapamicina y el FK506 son fármacos inmunosupresores potentes y no son adecuados para su uso en aplicaciones de terapia génica. Aunque se pueden sintetizar moléculas pequeñas modificadas sin actividad inmunosupresora (como con los "rapalogs"), aún se debe evaluar la seguridad de cada fármaco mediante el proceso de aprobación de la FDA. Además, no está claro desde el principio que se pueden encontrar moléculas pequeñas con un conjunto ideal de características, lo que podría hacer perder tiempo en el costoso desarrollo de fármacos. En segundo lugar, como las proteínas CID en estos sistemas se derivan de proteínas humanas con funciones celulares normales, su sobreexpresión puede alterar la fisiología celular. Por ejemplo, Se ha demostrado que la sobreexpresión de FKBP12 altera la entrada de calcio en el músculo y el procesamiento de la proteína APP asociada al Alzheimer en las neuronas [34, 35]. Estos sistemas también pueden tener una cinética de encendido/apagado deficiente y, por lo tanto, no pueden regularse con suficiente precisión. Los sistemas existentes actualmente también pueden causar efectos fuera del objetivo en la expresión de genes endógenos.

La presente divulgación proporciona procedimientos para crear sistemas mejorados de dimerización inducida químicamente (CID) como se reivindica. Los sistemas CID descritos se mejoran porque usan uno o más de 1) proteínas humanizadas o derivadas de seres humanos sin inmunogenicidad o con baja inmunogenicidad; 2) proteínas sin función intracelular conocida para que la fisiología celular en curso se vea mínimamente afectada; y 3) inductores de molécula pequeña que ya están aprobados por la FDA para uso humano y tienen buenas características farmacológicas para la aplicación prevista. La presente divulgación también proporciona usos de los sistemas CID creados como se reivindica.

Las proteínas utilizadas dentro de los sistemas CID descritos incluyen dominios de unión a anticuerpos. Cuando se usan en humanos, los dominios de unión a anticuerpos pueden ser derivados de humanos o humanizados. Los dominios de unión a anticuerpos no tienen funciones intracelulares conocidas y, en consecuencia, se pueden usar en sistemas CID sin afectar significativamente la fisiología celular en curso. Además, los dominios de unión de anticuerpos pueden unirse con gran afinidad a los objetivos, lo que permite un control más preciso de los eventos celulares que el que se logra con los sistemas CID existentes en la actualidad. En realizaciones particulares, sin afectar significativamente la fisiología celular en curso significa que (i) cuando se analiza el transcriptoma celular (usando, por ejemplo, RNA-Seq, también conocido como secuenciación instantánea del transcriptoma completo (WTSS)), menos del 0,1% de los genes muestran un cambio en la expresión; (ii) la integridad de la membrana celular no se ve afectada, y/o (iii) la entrada de calcio en respuesta a estímulos fisiológicos no se ve afectada. En realizaciones particulares, sin afectar significativamente la fisiología celular en curso significa que (i) cuando se analiza el transcriptoma celular (usando, por ejemplo, RNA-Seq, también conocido como secuenciación instantánea del transcriptoma completo (WTSS)), menos del 0,1% de los genes muestran un cambio en la expresión; (ii) no se afecta la integridad de la membrana celular, y (iii) no se afecta la entrada de calcio en respuesta a estímulos fisiológicos. En realizaciones particulares, se puede confirmar un control más preciso en comparación con la regulación de la expresión génica utilizando el sistema de dimerización de FKBP12 y FRB descrito.

Las moléculas pequeñas que inducen la dimerización de proteínas se seleccionan para que tengan una toxicidad baja o nula, sean seguras para su uso en seres humanos y otros animales y, preferiblemente, hayan obtenido la aprobación de la FDA u otra normativa para su uso en otras indicaciones.

En realizaciones particulares, se elige un dominio de unión que se une a la molécula pequeña seleccionada con alta afinidad. Este primer dominio de unión se denomina AB1. El segundo dominio de unión se une a AB1, pero solo cuando AB1 se une a la molécula pequeña seleccionada. Este segundo dominio de unión, un dominio de unión "metatipo", se denomina AB2.

Las células pueden incluir AB1 y AB2, por ejemplo, administrándoles AB1 y AB2 y/o modificándolas genéticamente para expresar AB1 y AB2. En ausencia de la molécula pequeña seleccionada, AB1 y AB2 no interactuarán y los eventos celulares no se verán afectados significativamente. Cuando se administra la molécula pequeña seleccionada, se unirá a AB1. AB2 luego se unirá al complejo AB1/molécula pequeña, provocando la interacción entre AB1 y AB2, y cualquier otra proteína que se haya asociado con ellos. Por ejemplo, como se muestra en la FIG. 1A, un dominio de unión (AB1 o AB2) se puede asociar con un dominio de unión al ADN y el otro dominio de unión se puede asociar con un dominio de activación de la transcripción. Cuando se administra la molécula pequeña seleccionada, se unirá a AB1, lo que conducirá a la unión del complejo AB1/molécula pequeña por AB2.

Como otro ejemplo no limitativo, y como se muestra en la FIG. 1B, AB1 y AB2 pueden asociarse cada uno con la parte intracelular de un receptor celular. En ausencia de la molécula pequeña seleccionada, AB1 y AB2 no interactuarán y la señalización del receptor no se iniciará en función del sistema CID. Cuando se administra la molécula pequeña seleccionada, se unirá a AB1, lo que conducirá a la unión de AB2 al complejo AB1/molécula pequeña. Después de esta unión, las porciones del receptor se unirán, lo que dará como resultado el inicio de la señalización del receptor.

Como tercer ejemplo no limitativo, y como se muestra en la FIG. 1C, AB1 y AB2 pueden asociarse cada uno con una caspasa iniciadora. En ausencia de la molécula pequeña seleccionada, AB1 y AB2 no interactuarán, y los procesos de muerte celular no se iniciarán según el sistema CID. Cuando se administra la molécula pequeña seleccionada, se unirá a AB1, lo que conducirá a la unión de AB2 al complejo AB1/molécula pequeña. Después de esta unión, las caspasas se unirán, dando como resultado el inicio de los procesos de muerte celular.

Habiendo explicado los mecanismos generales de los sistemas, ahora se describe con más detalle cada uno de los componentes, usos y procedimientos para crear los sistemas.

5 Dominios de unión AB1 y AB2. Los dominios de unión AB1 y AB2 incluyen un dominio de unión a anticuerpos. Un dominio de unión a anticuerpo se refiere a cualquier parte de un anticuerpo (p. ej., anticuerpo completo o fragmento del mismo) que retiene la capacidad de unirse a un epítipo previsto (p. ej., una parte de la molécula pequeña seleccionada para AB1 y una parte de AB1/pequeña complejo molecular para AB2). En realizaciones particulares, los fragmentos de anticuerpos se utilizan como dominios de unión. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fv, scFv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; y anticuerpos lineales.

Un fragmento Fv incluye los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo. Aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir mediante, por ejemplo, procedimientos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formar una única cadena proteica en la que el Las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (Fv de cadena sencilla (scFv)). Para obtener información adicional sobre Fv y scFv, véase, por ejemplo, Bird y col., Science 242 (1988) 423-426; Houston y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 5879-5883; Plueckthun, en Farmacología de los anticuerpos monoclonales, vol. 113, Rosenberg y Moore (eds.), Springer-Verlag, Nueva York), (1994) 269-315; WO1993/16185; patente estadounidense 5.571.894; y la patente estadounidense 5.587.458.

Un fragmento Fab es un fragmento de anticuerpo monovalente que incluye los dominios VL, VH, CL y CH1. El fragmento AF(ab')₂ es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra. Para una discusión de los fragmentos Fab y F(ab')₂ que tienen una semivida in vivo aumentada, véase la Patente de EE.UU. 5.869.046.

Los diacuerpos incluyen dos sitios de unión a epítopos que pueden ser bivalentes. Ver, por ejemplo, EP 0404097; WO1993/01161; y Holliger, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448. Los fragmentos de anticuerpos también pueden incluir regiones determinantes complementarias (CDR) aisladas. Para una revisión de fragmentos de anticuerpos, véase Hudson, et al., Nat. Medicina. 9 (2003) 129-134.

Los fragmentos de anticuerpos pueden fabricarse mediante diversas técnicas, incluida la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción mediante células huésped recombinantes (p. ej., E. coli). Los fragmentos de anticuerpos pueden examinarse por sus propiedades de unión de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Como se indica, un epítipo denota el sitio de unión de un objetivo unido por un dominio de unión correspondiente. El dominio de unión se une a un epítipo lineal (p. ej., un epítipo que consiste en un tramo de 5 a 12 aminoácidos consecutivos) o el dominio de unión se une a una estructura tridimensional formada por la disposición espacial del objetivo. Los epítopos tridimensionales reconocidos por un dominio de unión, por ejemplo, por el sitio de reconocimiento del epítipo o paratopo de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, pueden considerarse como características superficiales tridimensionales de una molécula de epítipo. Estas características se ajustan con precisión (en) al sitio de unión correspondiente del dominio de unión y, por lo tanto, se facilita la unión entre el dominio de unión y su proteína diana.

"Unión" significa que el dominio de unión se asocia con su epítipo diana con una consistente de disociación (1(D) de 10⁻⁵ M o menos, en una realización de 10⁻⁵ M a 10⁻¹³ M, o en una realización de 10⁻⁵ M a 10⁻¹⁰ M. El término se puede usar además para indicar que el dominio de unión no se une a otras biomoléculas presentes (p. ej., se une a otras biomoléculas con una consistente de disociación (KD) de 10⁻⁴ M o más, en una realización de 10⁻⁴ M a 1 M.

Las realizaciones particulares descritas en el presente documento requieren una unión de alta afinidad entre un dominio de unión y su epítipo (p. ej., AB1 y una molécula pequeña seleccionada como se analiza en otro lugar del presente documento). En realizaciones particulares, la unión de alta afinidad requiere una consistente de disociación (1(D) de 10⁻⁷ M o menos, o en una realización de 10⁻⁷ M a 10⁻¹² M, o en una realización de 10⁻⁷ M a 10⁻¹⁵ M. En realizaciones particulares, la unión de alta afinidad se demuestra mediante clones que mantienen la unión de la molécula pequeña al tinte durante largos períodos de tiempo (p. ej., 4 minutos o más después del lavado) como se describe en el Ejemplo 1.

Los dominios de unión se pueden obtener utilizando procedimientos para obtener anticuerpos monoclonales, procedimientos de presentación en fagos, procedimientos para generar anticuerpos humanos o humanizados, o procedimientos que utilizan un animal o una planta transgénicos modificados para producir anticuerpos como es conocido por los expertos en la materia (ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses números 6.291.161 y 6.291.158) y como se describe en otra parte del presente documento. Las bibliotecas de expresión en fagos de anticuerpos parcial o totalmente sintéticos están disponibles y se pueden seleccionar para detectar un anticuerpo o un fragmento del mismo que se pueda unir a una molécula pequeña seleccionada o un complejo AB1/molécula pequeña. Por ejemplo, los dominios de unión pueden identificarse examinando una biblioteca de fagos Fab para fragmentos Fab que se unen específicamente a una molécula pequeña seleccionada o complejo AB1/molécula pequeña (ver Hoet et al., Nat. Biotechnol. 23:344, 2005). También están disponibles bibliotecas de expresión de fagos

de anticuerpos humanos. Además, las estrategias tradicionales para el desarrollo de hibridomas utilizando una molécula pequeña seleccionada o un complejo AB1/molécula pequeña como inmunógeno en sistemas convenientes (p. ej., ratones, ratón HuMAb[®], TC mouse[™], KM-mouse[®], llamas, pollo, ratas, hámsters, conejos, etc.) pueden usarse para desarrollar dominios de unión. Una vez identificada, la secuencia de aminoácidos o la secuencia de polinucleótidos que codifica el dominio de unión pueden aislarse y/o determinarse. La figura 2 describe particularmente procedimientos de ejemplo para obtener dominios de unión AB1 y AB2 para producir un CID como se describe en este documento.

Complementando la descripción en otra parte del presente documento, se describen procedimientos para humanizar anticuerpos en, por ejemplo, Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann y col., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen y col., Science 239:1534-1536 (1988), y la patente de EE.UU. N° 4.816.567. En general, los residuos del dominio variable de un anticuerpo no humano se "importan" a una molécula de inmunoglobulina humana, lo que da como resultado anticuerpos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos FR de un anticuerpo humano se sustituyen por residuos de sitios análogos de anticuerpos no humanos. - anticuerpos humanos. En aplicaciones humanas, es importante humanizar un dominio de unión no humano manteniendo una alta afinidad por la molécula pequeña seleccionada o el complejo AB1/molécula pequeña. Para tal fin, modelos tridimensionales de inmunoglobulina están disponibles y son adecuados para su uso en el análisis de secuencias humanizadas propuestas en comparación con los anticuerpos parentales no humanos. Dicho análisis permite la identificación de residuos probablemente implicados en el reconocimiento y la unión de la molécula pequeña seleccionada o el complejo AB1/molécula pequeña y, por lo tanto, el diseño racional de secuencias humanizadas que conservan la especificidad y la afinidad por los epítopos objetivo.

Se pueden seleccionar numerosas moléculas pequeñas para su uso con los sistemas CID descritos en el presente documento. Preferiblemente, la molécula pequeña seleccionada está aprobada para su uso en seres humanos por una autoridad reguladora, como la FDA. La administración de la molécula pequeña no debe causar efectos adversos que superen los beneficios de la CID según el juicio de un proveedor médico (médico o veterinario) o científico investigador.

Pequeñas moléculas seleccionadas podrían ser, por ejemplo, antibióticos. Los ejemplos de antibióticos incluyen aclarubicina, actinomicina D, actinoplanona, adriamicina, derivado de aeroplisinina, aminoglucósidos (p. ej., gentamicina o neomicina), amoxicilina, ampicilina, amrubicina, antraciclina, azinomicina-A, azitromicina, aztreonam, bisucaberina, sulfato de bleomicina, briostatina-1, caliquemicina, cefepima, cefixima, ceftriaxona, cefalosporina C, cefamandol, cefazolina, cloranfenicol, cromoximicina, ciprofloxacina, clindamicina, dactinomicina, daunorubicina, ditrisarrubicina B, doxorubicina, doxorubicina-fibrinógeno, doxiciclina, elsamicina-A, epirubicina, erbstatina, eritromicina, esorubicina -Al, esperamicina-Alb, fostriecina, glidobactina, gregatina-A, grincamicina, herbimicina, idarrubicina, iludinas, imipenem, kzasamicina, kesarirhodinas, menogaril, meropenem, metronidazol, mitomicina, neoenactina, netilmicina, oxalisina, oxaunomicina, penicilinas (p. ej., oxacilina o mezlocilina), peplomicina, pilatina, pirarrubicina, porotramicina, pirindanicina A, rifampicina, espectinomicina, estreptomina cina, tetraciclina, tigeciclina, tobramicina y trimetoprima.

Como se indicó anteriormente, siempre que la administración de la molécula pequeña no provoque efectos adversos que superen los beneficios de la CID según el juicio de un médico competente (médico o veterinario) o científico investigador, se pueden seleccionar moléculas pequeñas adicionales de los agentes alquilantes, , agentes anestésicos, agentes antifúngicos, agentes antiinfecciosos, agentes antiinflamatorios, agentes antimetabolitos, antimicrobianos, antimitóticos, antioxidantes, antiplaquetarios, agentes antiproliferativos, agentes antisecretores, agentes antiestenosis, antitrombinas, agentes antivirales, anticuerpos, antisépticos, agentes citostáticos, captadores de radicales libres, antagonistas de factores de crecimiento, agentes marcadores (por ejemplo, agentes de contraste, agentes fluorescentes, agentes luminiscentes, agentes magnéticos, agentes radiomarcados, agentes radiopacos), nucleótidos, agentes nutracéuticos (por ejemplo, vitaminas, minerales, etc.), proteínas, agentes radioterapéuticos, ribonucleasas, esteroides y vasodilatadores. Como entenderá un experto en la materia, muchas moléculas pequeñas pueden pertenecer a más de una de estas clases, y la inclusión en una clase no excluye la inclusión en otra. Dicho esto, a continuación se proporcionan más ejemplos particulares de algunas de estas moléculas pequeñas.

Los ejemplos de agentes alquilantes incluyen análogos de aldofosfamida, altretamina, anaxirona, bestrabucil, budotitane, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, ciplato, difenilespiromustina, diplatino citostático, elmustina, estramustina fosfato sódico, fotemustina, hepsul-fam, ifosfamida, iproplatino, lomustina, mafosfamida, mitolactol, oxaliplatino, prednimustina, ranimustina, semustina, espiromustina, tauromustina, temozolomida, teroxirona, tetraplatino y trimelamol.

Los ejemplos de agentes anestésicos incluyen ametocaína, amobarbital, barbitúricos, benzodiazepinas, bupivacaína, buprenorfina, butorfanol, cocaína, diacetil morfina, diazepam, dibucaína, etomidato, fentanilo, hidromorfona, ketamina, levobupivacaína, levorfanol, lidocaína, lorazepam, meperidina, mepivacaína, metadona, metohexital, midazolam, morfina, nalbufina, oxicodona, oximorfona, pentazocina, prilocaína, procaína, propofol, remifentanilo, ropivacaína, sufentanilo, tiamilal y tiopental.

Los ejemplos de agentes antifúngicos incluyen antifúngicos de polieno, tales como anfotericina B, candidina, filipina,

hamicina, imidaxol, natamicina, nistatina, rimocidina, antifúngicos de tiazol y triazol. Los agentes antifúngicos de imidazol incluyen bifonazol, blotrimazol, butoconazol, econazol, fenticonazol, isoconazol, ketoconazol, miconazol, omoconazol, oxiconazol, sertaconazol, sulconazol y tioconazol. Los agentes antifúngicos a base de triazol incluyen albaconazol, fluconazol, isavuconazol, itraconazol, posaconazol, ravuconazol, terconazol y voriconazol. Los agentes antifúngicos tiazoles incluyen abafungina. Los ejemplos de agentes antifúngicos de alilamina incluyen amorolfina, butenafina, naftifina y terbinafina. Los agentes antifúngicos de equinocandina incluyen anidulafungina, caspofungina y micafungina. Los agentes antimicóticos adicionales incluyen ácido benzoico, ciclopirox, cristal violeta, flucitosina o 5-fluorocitosina, griseofulvina, haloprogina, poligodio, tolnaftato y ácido undecilénico. Los aceites esenciales que tienen propiedades antifúngicas incluyen alicina, aceite de citronela, aceite de coco, mirto limón, yodo de lugol, aceite de semilla de neem, hoja de olivo, aceite de naranja, orégano, aceite de palmarosa, pachulí, selenio y aceite de árbol de té.

Los ejemplos de agentes antiinfecciosos incluyen análogos de pirimidina. Un análogo de pirimidina generalmente se refiere a un compuesto con una estructura de anillo de pirimidina (1,3-diazina) sustituido con uno o más átomos o grupos químicos u oxidado en uno o más carbonos en la estructura del anillo de pirimidina. En realizaciones particulares, el análogo de pirimidina contiene un sustituyente de halógeno, tal como F, Cl, Br o I, en un carbono en la estructura del anillo de pirimidina. Los ejemplos de fluoropirimidinas incluyen 5-fluorocitosina, 5-fluorotimidina, 5-FU, 5-FUdR (5-fluoro-desoxiuridina; floxuridina), capecitabina, monofosfato de fluorodesoxiuridina (5-dFUMP), trifosfato de fluorouridina (5-FUTP), trifluorotimidina y trifluridina. Otros análogos de pirimidina halogenados incluyen 5-bromocitosina, 5-bromodesoxiuridina (5-BudR), 5-bromouracilo, 5-clorocitosina, 5-clorodesoxiuridina, 5-clorouracilo, 5-yodocitosina, 5-yododesoxiuridina (5-ludR) y 5-yodouracilo.

Los análogos de uracilo-pirimidina se refieren a compuestos que contienen una estructura de anillo de uracilo sustituida con uno o más átomos o grupos químicos. El análogo de uracilo contiene un sustituyente de halógeno, como F, Cl, Br o I. En ciertas realizaciones, el análogo de uracilo contiene un sustituyente F y se denomina análogo de fluorouracilo. Los ejemplos de análogos de fluorouracilo incluyen 5-FU, carmofur, doxifluridina, emitefur, floxuridina y tegafur.

Otros ejemplos de antiinfecciosos incluyen clorhexidina, compuestos de plata, iones de plata, partículas de plata u otros compuestos, iones o partículas metálicos (como el oro). Los agentes antiinfecciosos adicionales incluyen 2-p-sulfanilnilinoetanol, ácido 4-sulfanilamidosalicílico, 4,4'-sulfinildianilina, acetosulfona, amifloxacina, amikacina, amoxicilina, anfotericina B, apalcilina, apiciclina, apramicina, arbekacina, aspoxicilina, azaserina, azidamfenicol, azitromicina, aztreonam, bacitracina, bambemicina(s), biapenem, brodimoprim, butirosina, candicidina(s), capreomicina, carbenicilina, carbomicina, carumonam, cefadroxilo, cefamandol, cefatrizina, cefbuperozona, cefclidina, cefdinir, cefditoren, cefepima, cefetamet, cefinenoxima, cefixima, cefminox, cefodizima, cefonicid, cefoperazona, ceforanida, cefotaxima, cefotetán, cefotiam, cefozopran, cefpimizol, cefpiramida, cefpiroma, cefprozil, cefroxadina, ceftazidima, ceftaram, ceftibuten, ceftriaxona, cefzonam, cefalexina, cefaloglicina, cefalosporina, cloranfeloquina C, cefalosporina clorhexidina, clorfenesina, clortetraciclina, ciprofloxacina, ciprofloxacina, claritromicina, clinafloxacina, clindamicina, clomociclina, colistina, ciclacilina, dapsona, demeclociclina, dermostatina(s), diatimosulfona, dibekacina, dihidroestreptomicina, diritromicina, enoxacina, enviomicina, epicilina, eritromicina, filipina, fleroxacina, flomoxef, fortimicina(s), fungicromina, gentamicina(s), glucosulfona solasulfona, compuestos de oro (como cloruro de oro, auranofina), iones de oro, partículas de oro, gramicidina S, gramicidina(s), grepafloxacina, guameciclina, hetacilina, imipenem, yodo, isepamicina, josamicina, kanamicina(s), leucomicina(s), lincomicina, lomefloxacina, lucensomicina, limeciclina, meclociclina, mepartricina, meropenem, metaciclina, micronomicina, midecamicina(s), minociclina, moxalactama, mupirocina, nadifloxacina, natamicina, neomicina, netilmicina, norfloxacina, nistatina, ofloxacina, oleandomicina, oligomicina(s), oxitetraciclina, panipenem, paromomicina, pazufloxacina, pefloxacina, penicilina N, perimicina A, pipaciclina, ácido pipemídico, polimixina, povidona/yodo, primicina, p-sulfanililbencilamina, quinacilina, ribostamicina, rifamida, rifampin, rifamicina SV, rifapentina, rifaximina, ristocetina, rtipenem, rokitamicina, rolitetraciclina, rosaramicina, rosoxacina, roxitromicina, salazosulfadimidina, sanciclina, cloruro de plata, compuestos de plata (p. iones de plata, nitrato de plata, óxido de plata), partículas de plata, sisomicina, esparfloxacina, espectinomomicina, espiramicina, estreptomicina, succisulfona, sulfacrisoidina, ácido sulfalóxico, sulfamidocrisoidina, ácido sulfanílico, sulfoxona, teicoplanina, temafloxacina, temocilina, tetraciclina, tetroxoprima, tiamfenicol, tiazolsulfona, tiostrepton, ticarcilina, tigemonam, tobramicina, tosufloxacina, trimetoprima, trospectomicina, trovafloxacina, tuberactinomicina, tubercidina y vancomicina.

Los ejemplos de agentes antimetabolitos incluyen 5-fluorouracilo, 5-FU-fibrinógeno, ácido acantifólico, aminotiadiazol, brequinar sódico, carmofur, ciclopentil citosina, conjugados de citarabina, estearato de fosfato de citarabina, dezaguanina, didesoxicitidina, didesoxiguanosina, didox, doxifluridina, fazarabina, floxuridina, fosfato de fludarabina, inhibidores de aminoácidos esenciales, isopropilpirrolizina, metobenzaprima, metotrexato, N-(2'-furanidil)-5-fluorouracilo, norspermidina, inhibidores de la descarboxilación de ornitina, pentostatina, piritrexim, plicamicina, tioguanina, tiazofurina, trimetrexato, inhibidores de la tirosina cinasa y uricitina.

Los ejemplos de antimicrobianos incluyen péptidos antimicrobianos (AMP), diacetato de clorhexidina y carbonato de plata.

Los ejemplos de antiplaquetarios incluyen abciximab, inhibidores del receptor de adenosina difosfato (ADP),

inhibidores de la recaptación de adenosina, aspirina, cilostazol, clopidogrel, dipiridamol, elinogrel, eptifibatida, inhibidores de la glicoproteína IIB/IIIA (solo para uso intravenoso), antagonistas de GPVI, irreversibles . inhibidores de la ciclooxigenasa, antagonistas de PAR-1 o PAR-4, inhibidores de la fosfodiesterasa, prasugrel, terutrobán inhibidores del tromboxano, antagonistas del receptor del tromboxano, inhibidores de la tromboxano sintasa, ticagrelor, ticlopidina y tirofiban.

Los ejemplos de agentes antiproliferativos incluyen ácido acetilsalicílico, acitretina, alstonina, amonafida, anfetinilo, amsacrina, angiopeptina, ankinomicina, anti-neoplaston, glicinato de aphidicolin, asparaginasa, baccharin, batracylin, benfluoron, benzotript, bromofosfamide, caracemide, carmethizol hydrochloride, chloresulfadoxone, clafenur, claviridenona, crisnatol, curaderm, citarabina, citocitina, dacarbazina, dateliptinio, éter de dihaematoporfirina, dihidrolenperona, dinalina, distamicina, docetaxel, elliprabina, acetato de eliptinio, enoxaprina, epotilonas, ergotamina, etopósido, tretinatol, fenretinida, nitrato de galio, genkwadafnina, inhibidores de HDAC , hexadecilfosfolina, hirudina, homoharringtonina, hidroxiurea, ilmofoquina, isoglutamina, isotretinoína, leucoregulina, lonidamina, merbarona, derivados de merocianina, metilanilinoacridina,minactivina, mitonafida, mitoquidona, mitoxantrona, mopidamol, motretinida, N-(retinoil)aminoácidos, N-desidroalaninas aciladas, nafazatrom, derivado de nocodazol, octreotida, oquizanocina, paclitaxel, pancratistatina, pazelliptina, piroxantrona, polihematoporfirina, ácido polipeico, probimane, procarbazona, proglumida, razoxano, retelliptina, spatol, derivados del espirociclopropano, espirogermanio, estripoldinona, superóxido dismutasa, tenipósido, taliblastina, tocotrienol, agentes e inhibidores de la topoisomerasa, topotecán, agentes que interactúan con la tubulina, ucrania, sulfato de vinblastina, vincristina, vindesina, vinestramida, vinorelbina, vintriptol, vinzolidina, withanólidos y anticuerpos monoclonales capaces de bloquear la proliferación de células del músculo liso.

Los ejemplos de antisépticos incluyen alcoholes (p. ej., etanol, 1-propanol, 2-propanol), sales de amonio cuaternario también conocidas como cuaternarios o QAC (p. ej., cloruro de benzalconio (BAC), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTMB), cloruro de cetilpiridinio (Cetrim, CPC) y cloruro de bencetonio (BZT)), ácido bórico, verde brillante, hipoclorito de calcio, gluconato de clorhexidina, peróxido de hidrógeno, yodo (p. ej., yodo-providona y yodo de Lugol), mercurocromo, diclorhidrato de oclenidina, fenol (ácido carbólico) compuestos, polihexanida (polihexametileno biguanida, PHMB), bicarbonato de sodio, cloruro de sodio e hipoclorito de sodio.

Los ejemplos de antitrombina incluyen aspirina, cilostazol, dabigatrán, enoxaparina, eptifibatida, heparina, hirudina y uroquinasa.

Los ejemplos de agentes antivirales incluyen 5-bromouridina, aciclovir, alovudina, amantadina, proteínas antivirales, arbidol, brivudina, cidofovir, daclatasvir, docosanol, oligomerizador de caspasa activado por ARN bicatenario (ARNds) (DRACO), famciclovir, FGI-104, fialuridina, fomiviren, foscarnet, FV-100, ganciclovir, ibacitabina, idoxuridina, imiquimod, inosina, inosina pranobex, interferón, maribavir, metisazona, moroxidina, antivirales de nucleótidos, oragen, penciclovir, pleconaril, podofiloxina, prosetta, PSI-6130, reciGen, resiquimod, ribavirina, rintatolimod, semapimod, setrobuvir, simeprevir, sofosbuvir, sorivudina, taribavirina, tecovirimat, telbivudina, tenofovir alafenamida fumarato, teaflavina, tilorona, trifluridina, tromantadina, valaciclovir, valganciclovir y vidarabina.

Los vasodilatadores de ejemplo incluyen hidralazina y minoxidil.

Una vez que se identifican, seleccionan y/o generan las proteínas (p. ej., fragmentos de dominio de unión a anticuerpos) y la molécula pequeña, las proteínas se expresan como proteínas de fusión con moléculas efectoras. Como se indicó anteriormente, las moléculas efectoras son aquellas que regulan un proceso en una célula cuando se dimerizan. Por tanto, las moléculas efectoras pueden ser dominios de unión al ADN, dominios de activación de la transcripción, porciones de receptores (p. ej., receptores intracelulares), caspasas, enzimas, quinasas, etc.

Ejemplos de proteínas del dominio de unión al ADN y proteínas del dominio de activación de la transcripción incluyen dedos de zinc, hélice-bucle-hélices, hélice-giro-hélices, cremalleras de leucina, proteína activadora de catabolitos (CAP), proteína activadora-1 (AP-1), CCAAT/proteína de unión potenciadora (C/EBP), proteínas de choque térmico, factor de transcripción activador (ATF), proteína de unión al elemento de respuesta cAMP (CREB), cMyc y N-Myc.

Los dedos de zinc estabilizan la unión del ADN manteniendo su cadena principal de fosfato. La hélice-bucle-hélice básica contiene dos hélices α conectadas por un bucle. El motivo hélice-giro-hélice es un motivo común de reconocimiento de ADN en procariotas. En algunos factores de transcripción, el sitio de unión del dímero con el ADN forma la cremallera de leucina. La cremallera de leucina puede mediar en la formación de homodímeros o heterodímeros.

La proteína activadora de catabolitos (CAP) activa la transcripción en más de cien promotores. CAP es un dímero con dos subunidades idénticas y contiene un motivo de unión al ADN hélice-giro-hélice. CAP interactúa con un sitio de ADN doblemente simétrico de 22 pb. El complejo CAP-ADN es doblemente simétrico en el sentido de que una subunidad de CAP interactúa con la mitad del sitio de ADN, mientras que la otra subunidad de CAP interactúa con la otra mitad del sitio de ADN.

AP -1, C/EBP y ATF/CREB son proteínas de cremallera de leucina que se unen a la secuencia de reconocimiento de

ADN como un dímero. Las proteínas de choque térmico también son proteínas de cremallera de leucina, pero se unen como un trímero. cMyc y N-Myc son proteínas básicas de hélice-bucle-hélice que se unen como un dímero.

Como entenderá un experto en la materia, las proteínas represoras de la transcripción también se pueden usar como proteínas efectoras con los sistemas CID descritos en el presente documento. Las proteínas represoras de la transcripción inhiben, en lugar de iniciar la transcripción. Los ejemplos de proteínas represoras de la transcripción incluyen el represor de metionina (metJ) y el represor lacZYA.

Los ejemplos de receptores intracelulares incluyen receptores nucleares y receptores citoplasmáticos. Estos tipos de receptores son proteínas solubles. El ligando de estos receptores (p. ej., hormonas no polares, vitamina A, ácido retinoico, vitamina D y derivados y metabolitos) puede atravesar la membrana plasmática por difusión pasiva para iniciar la transducción de señales. Al unirse, el complejo puede pasar a través de la membrana nuclear hacia el núcleo, alterando la expresión génica. Por ejemplo, los receptores nucleares activados se adhieren al ADN en secuencias de elementos sensibles a hormonas (HRE) específicas de hormonas, ubicadas en la región promotora de genes activados por el complejo hormona-receptor. Los receptores nucleares también pueden tener dominios de unión a ADN que contienen dedos de zinc y un dominio de unión a ligando.

Los receptores de hormonas esteroides se localizan particularmente en el citoplasma (Tipo I) o en el núcleo (Tipo II) y pertenecen a una gran familia de factores de transcripción. Los receptores de tipo I tienen una proteína de choque térmico (HSP) asociada con el receptor inactivo que se liberará cuando el receptor interactúe con el ligando. Los receptores nucleares de tipo II no tienen HSP y, a diferencia del receptor de tipo I clásico, se encuentran en el núcleo celular.

Los receptores de esteroides tienen una única cadena polipeptídica que comprende tres dominios distintos: un extremo amino que está implicado en la activación o estimulación de la transcripción al interactuar con otros componentes de la maquinaria transcripcional; un dominio de unión a ADN que es responsable de unir el receptor a las secuencias específicas de ADN; y un dominio de unión a ligando o terminal carboxi que se une al ligando natural. Además, hay otras dos regiones en estos receptores: la secuencia de localización nuclear que dirige la proteína al núcleo; y el dominio de dimerización, que une los dos receptores en una forma capaz de unirse al ADN.

El receptor de ácido retinoico (RAR) es otro ejemplo de receptor nuclear de tipo II que también puede actuar como factor de transcripción. Hay tres receptores de ácido retinoico (RAR), RAR-alfa, RAR-beta y RAR-gamma, codificados por los genes RARA, RARB, RARG, respectivamente.

Las caspasas son una familia de proteasas aspárticas de cisteína o proteasas dirigidas por aspartato dependientes de cisteína que desempeñan un papel importante en la apoptosis, la necrosis y la inflamación. Las caspasas son esenciales en los procesos celulares, incluida la apoptosis, en el desarrollo y en las etapas de la vida adulta. Algunas caspasas también son necesarias en el sistema inmunitario para la maduración de los linfocitos. Se ha demostrado que el fracaso de la apoptosis contribuye al desarrollo de tumores, quimiorresistencia y enfermedades autoinmunes.

Las caspasas se agrupan como iniciadores o efectores de la apoptosis, según dónde entren en el proceso de muerte celular. Las caspasas iniciadoras escinden las pro-formas inactivas de las caspasas efectoras, activándolas así. Las caspasas efectoras posteriormente escinden otros sustratos proteicos dentro de la célula para desencadenar el proceso apoptótico. El inicio de esta cascada de caspasas está regulado por inhibidores de caspasas.

Antes de la activación, las caspasas iniciadoras están presentes como monómeros que deben dimerizarse para una activación completa, mientras que las caspasas efectoras están presentes como zimógenos dimericos que deben procesarse para una activación completa. La estabilidad del dímero puede deberse principalmente a las interacciones en la interfaz del dímero, ya que cada caspasa tiene propiedades únicas en esta región que se prestan a su modo específico de activación. Además, la dimerización es responsable de la formación del sitio activo porque ambos monómeros aportan residuos que permiten la formación de un sitio activo completamente funcional. En general, la dimerización juega un papel clave en la capacidad de las caspasas para formar proteasas completamente funcionales.

Los ejemplos de caspasas iniciadoras incluyen Caspase-2 (CASP2), Caspase-8 (CASP8), Caspase-9 (CASP9) y Caspase-10 (CASP10). Los ejemplos de caspasas efectoras incluyen Caspase-3 (CASP3), Caspase-6 (CASP6) y Caspase-7 (CASP7). Otras caspasas que no están clasificadas como caspasas iniciadoras o efectoras incluyen Caspase-4 (CASP4), Caspase-5 (CASP5) y Caspase-1 (CASP1). CASP4 y CASP5 son enzimas inflamatorias y, junto con CASP1, están involucradas en la maduración de las células T. Otros nombres para estas caspasas de ejemplo incluyen los siguientes: "ICE" para CASP1; "ICH-1" para CASP2; "CPP32", "Yama" y "apopain" para CASP3; "ICE(rel)II", "TX" e "ICH-2" para CASP4; "ICE(rel)III" y "TY" para CASP5; "Mch2" para CASP6; "Mch3", "ICE-LAP3", y "CMH-1" para CASP7; "FLICE", "MACH" y "Mch5" para CASP8; "ICE-LAP6" y "Mch6" para CASP9; y "Mch4" y "FLICE-2" para CASP10.

Como comprenderá un experto en la materia, las proteínas efectoras también pueden incluir, por ejemplo, otras diversas enzimas, quinasas y proteasas.

Como se describe con más detalle en otra parte del presente documento, las proteínas efectoras se expresan como fusiones con las proteínas CID de los sistemas descritos en el presente documento. La expresión de proteínas de fusión es bien conocida, y las proteínas de fusión pueden incluir cualquier enlazador o espaciador apropiado para facilitar la interacción apropiada entre varios dominios. Las proteínas efectoras y las proteínas CID también pueden unirse a través de cualquier otro mecanismo conocido o disponible para los expertos en la materia.

Los procedimientos para crear los sistemas CID según lo reivindicado comprenden:

a. seleccionar un dominio de unión de anticuerpo de metatipo (AB2) que se une a una parte de un primer dominio de unión de anticuerpo (AB1), pero solo cuando AB1 se une a una molécula pequeña para formar un complejo AB1/molécula pequeña; y B. expresar AB1 como una proteína de fusión con una primera molécula efectora y expresar AB2 como una proteína de fusión con una segunda molécula efectora.

Las realizaciones particulares incluyen seleccionar, identificar y/o generar un primer dominio de unión al anticuerpo (AB1) que se une a la molécula pequeña seleccionada y seleccionar un dominio de unión al metatipo del anticuerpo (AB2) que se une a una parte de un primer dominio de unión al anticuerpo (AB1), pero solo cuando AB1 se une a una molécula pequeña para formar un complejo AB1/molécula pequeña; y expresar AB1 como proteína de fusión con una primera molécula efectora y expresar AB2 como proteína de fusión con una segunda molécula efectora.

Las realizaciones particulares incluyen la selección, identificación y/o generación adicional de una molécula pequeña.

Las realizaciones particulares incluyen seleccionar, identificar y/o generar una molécula pequeña, seleccionar, identificar y/o generar un primer dominio de unión de anticuerpos (AB1) que se une a la molécula pequeña seleccionada, y seleccionar un dominio de unión de anticuerpos de metatipo (AB2) que se une a una parte de un primer dominio de unión al anticuerpo (AB1), pero solo cuando AB1 se une a una molécula pequeña para formar un complejo AB1/molécula pequeña; y expresar AB1 como proteína de fusión con una primera molécula efectora y expresar AB2 como proteína de fusión con una segunda molécula efectora.

Las realizaciones particulares de los procedimientos incluyen las siguientes etapas:

seleccionar una molécula pequeña; unir la molécula pequeña seleccionada a una proteína portadora para formar un inmunógeno o a un sustrato sólido; seleccionar, identificar y/o generar un dominio de unión que se une a la molécula pequeña con alta afinidad (AB1); y seleccionar un dominio de unión de anticuerpo de metatipo (AB2) que se une a una parte de un primer dominio de unión de anticuerpo (AB1), pero solo cuando AB1 se une a una molécula pequeña para formar un complejo AB1/molécula pequeña; y expresar AB1 como proteína de fusión con una primera molécula efectora y expresar AB2 como proteína de fusión con una segunda molécula efectora.

Las realizaciones particulares de los procedimientos incluyen las siguientes etapas:

seleccionar una molécula pequeña; unir la molécula pequeña a un soporte sólido; seleccionar, identificar y/o generar un dominio de unión (AB1) que se une a la molécula pequeña seleccionada (en lugar del sustrato sólido) con alta afinidad; humanizar los dominios de unión AB1, si es necesario; confirmar la unión de alta afinidad continua entre los dominios de unión AB1 y la molécula pequeña seleccionada; unir AB1 a la molécula pequeña seleccionada; seleccionar un dominio de unión (AB2) que se une al complejo AB1/molécula pequeña de una manera que depende de la presencia de la molécula pequeña; expresar AB1 como una proteína de fusión con una primera molécula efectora y expresar AB2 como una proteína de fusión con una segunda molécula efectora; optimizar el complejo de unión AB1/molécula pequeña/AB2; y usar el sistema CID formado para regular eventos celulares como se reivindica.

En el presente documento se describen procedimientos que incluyen uno o más de los siguientes pasos: seleccionar una molécula pequeña; unir la molécula pequeña a una proteína portadora para producir un inmunógeno; inmunizar a un animal contra el inmunógeno; recoger y aislar glóbulos blancos/células B y transcribir de forma inversa el ARN en ADNc; amplificación de ADNc de dominios de unión a inmunógenos; digerir los productos PCR resultantes y ligar los productos en un vector de exploración; transfectar vectores de detección en células de colonias de crecimiento (p. ej., E. coli electrocompetente); expandir y seleccionar células transfectadas; extraer plásmidos de células transfectadas expandidas y seleccionadas; integrar plásmidos en el genoma de una célula huésped y seleccionar células de expresión; seleccionar células que expresan dominios de unión (AB1) que se unen a la molécula pequeña seleccionada (en lugar de a la proteína transportadora unida) con alta afinidad; recuperar secuencias que codifican dominios de unión AB1 expresados por células seleccionadas y amplificar las secuencias; humanizar los dominios de unión AB1, si es necesario; confirmar la unión de alta afinidad continua entre los dominios de unión AB1 y la molécula pequeña seleccionada; expresar dominios de unión AB1 humanizados en células huésped; aislar y purificar los dominios de unión AB1 humanos o humanizados expresados; confirmar la afinidad de unión de los dominios de unión AB1 aislados y purificados y la molécula pequeña seleccionada; inmunizar un animal con el complejo AB1/molécula pequeña para formar anticuerpos antimetatipo contra el complejo; recoger y aislar glóbulos blancos/células B y transcribir de forma inversa el ARN en ADNc; amplificar el ADNc de AB1/dominios de unión del complejo de molécula pequeña; digerir los productos PCR resultantes y ligar los productos en un vector de exploración; seleccionar dominios de unión (AB2) que se unen al complejo AB1/molécula pequeña de una manera que depende de la presencia de la molécula pequeña; recuperar secuencias que codifican dominios de unión AB2; humanizar los dominios de unión AB2, si es necesario; optimizar el complejo de unión AB1/molécula

pequeña/AB2; y usar el sistema CID formado para regular eventos celulares.

La invención proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión del dominio de unión al anticuerpo (AB1), una proteína de fusión del dominio de unión al anticuerpo metatipo (AB2) y una pequeña molécula de un sistema de proteínas de dimerización inducido químicamente, en el que AB2 se une a una porción de AB1, pero solo cuando AB1 se une a una molécula pequeña para formar un complejo de AB1/molécula pequeña, en el que la proteína de fusión AB1 comprende AB1 y una primera molécula efectora y la proteína de fusión AB2 comprende AB2 y una segunda molécula efectora, para usar en un procedimiento de tratamiento de una afección mediante la regulación eventos celulares, comprendiendo el procedimiento administrar la cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión AB1 y la proteína de fusión AB2 del sistema de proteínas de dimerización inducido químicamente a un sujeto y administrar de forma controlable la cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula pequeña del sistema al sujeto, tratando así la afección regulando eventos celulares. Dicha terapia incluye el tratamiento de sujetos (humanos, animales veterinarios (perros, gatos, reptiles, aves, etc.), ganado (caballos, vacas, cabras, cerdos, pollos, etc.), y animales de investigación (monos, ratas, ratones, peces, etc.)). El tratamiento de sujetos incluye la administración de cantidades terapéuticamente eficaces. Las cantidades terapéuticamente eficaces incluyen aquellas que proporcionan cantidades eficaces y/o tratamientos terapéuticos.

Una "cantidad eficaz" es la cantidad de proteína de fusión AB1, proteína de fusión AB2 y molécula pequeña necesaria para dar como resultado un cambio fisiológico deseado en un sujeto. Las cantidades efectivas a menudo se administran con fines de investigación. Las cantidades efectivas descritas en este documento regulan un evento celular. Es decir, por ejemplo, afectan a la expresión génica, la señalización del receptor intracelular y/o la muerte celular de una manera prevista.

Un "tratamiento terapéutico" incluye un tratamiento administrado a un sujeto que se beneficiaría de la regulación de un evento celular. Cualquier condición que pueda mejorarse mediante dicha regulación celular puede tratarse usando un CID desarrollado de acuerdo con los procedimientos que se reivindican. Las condiciones de ejemplo incluyen cáncer, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, SIDA, trastornos o déficits sensoriales, parálisis, entumecimiento, enfermedades desmielinizantes, enfermedades metabólicas, enfermedades autoinmunes, enfermedades neurológicas, afecciones cardíacas, diabetes, rechazo de órganos o tejidos, quemaduras, trastornos de la piel, trastornos óseos, etc.

La eficacia de una cantidad terapéuticamente eficaz puede confirmarse observando la regulación celular (p. ej., un aumento en la expresión de proteínas o muerte celular) a través de ensayos conocidos u observando una mejora clínica en una condición tratada.

La dosis real de proteína de fusión AB1, proteína de fusión AB2 y cantidad de molécula pequeña administrada a un sujeto particular puede ser determinada por un médico, veterinario o investigador teniendo en cuenta parámetros tales como factores físicos y fisiológicos que incluyen el objetivo; peso corporal; severidad de la condición; tipo de celda que requiere regulación; intervenciones terapéuticas previas o concurrentes; idiopatía del sujeto; y vía de administración.

Dosis de ejemplo de proteína de fusión AB1, proteína de fusión AB2 y molécula pequeña a menudo pueden oscilar entre 0,1 y 5 µg/kg o entre 0,5 y 1 µg/kg. En otros ejemplos, una dosis puede incluir 1 µg/kg, 5 µg/kg, 10 µg/kg, 15 µg/kg, 20 µg/kg, 25 µg/kg, 30 µg/kg, 35 µg/kg, 40 µg/kg, 45 µg/kg, 50 µg/kg, 55 µg/kg, 60 µg/kg, 65 µg/kg, 70 µg/kg, 75 µg/kg, 80 µg/kg, 85 µg/kg, 90 µg/kg, 95 µg/kg, 100 µg/kg, 150 µg/kg, 200 µg/kg, 250 µg/kg, 350 µg/kg, 400 µg/kg, 450 µg/kg, 500 µg/kg, 550 µg/kg, 600 µg/kg, 650 µg/kg, 700 µg/kg, 750 µg/kg, 800 µg/kg, 850 µg/kg, 900 µg/kg, 950 µg/kg, 1000 µg/kg, 0,1 a 5 mg/kg, o de 0,5 a 1 mg/kg. En otros ejemplos, una dosis puede incluir 1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, 55 mg/kg, 60 mg/kg, 65 mg/kg, 70 mg/kg, 75 mg/kg, 80 mg/kg, 85 mg/kg, 90 mg/kg, 95 mg/kg, 100 mg/kg, 150 mg/kg, 200 mg/kg, 250 mg/kg, 350 mg/kg, 400 mg/kg, 450 mg/kg, 500 mg/kg, 550 mg/kg, 600 mg/kg, 650 mg/kg, 700 mg/kg, 750 mg/kg, 800 mg/kg, 850 mg/kg, 900 mg/kg, 950 mg/kg, 1000 mg/kg o más.

Como entenderá un experto en la materia, cuando el sujeto expresará intracelularmente la proteína de fusión AB1 y la proteína de fusión AB2, estas cantidades de dosis de ejemplo se refieren a composiciones administradas que incluyen moléculas de ácido nucleico como una terapia genética que efectivamente entregar secuencias de nucleótidos codificantes intracelularmente. En consecuencia, como indica el contexto, la proteína de fusión AB1 y la proteína de fusión AB2 pueden referirse a una proteína o un ácido nucleico que codifica la proteína.

Se puede usar cualquier procedimiento para administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de ácidos nucleicos (p. ej., ARN, ADN) que codifican proteínas de fusión efectoras AB1 o efectoras AB2. Las formas más comunes implican el uso de ADN desnudo, complejos de ADN, vectores, vectores virales (p. ej., virus recombinantes), plásmidos y transposones/transposasas.

En realizaciones particulares, cuando se administran como ADN desnudo o complejos de ADN, los ácidos nucleicos pueden incorporar grupos químicos que alteran las características físicas del ácido nucleico. Como ejemplo, el éster de fosfato de internucleótido puede sustituirse opcionalmente con azufre para retardar la degradación de la molécula

de ácido nucleico. La molécula de ácido nucleico se puede introducir en la célula diana por cualquier medio conocido por los expertos en la materia, incluidos varios ejemplos que se describen a continuación.

Cualquier vector adecuado para administrar moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión a una célula o a un sujeto, de modo que la célula o células del sujeto expresen las proteínas de fusión puede emplearse en procedimientos que usan sistemas CID creados de acuerdo con los procedimientos reivindicados. En realizaciones particulares, la molécula de ácido nucleico se incorpora a una partícula viral para mediar en la transferencia génica a una célula. En realizaciones particulares, el virus simplemente puede exponerse a la célula huésped apropiada en condiciones fisiológicas, lo que permite la captación del virus. Los ejemplos de vectores virales incluyen los derivados de adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, lentivirus, virus del herpes simple, virus vaccinia, etc.

En realizaciones particulares, los ácidos nucleicos o los vectores que comprenden los ácidos nucleicos se pueden transfectar en células mediante transformación *ex vivo*; inyección, tal como inyección subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal; transfección mediada por liposomas; transfección mediada por receptor; etc.

Los vectores pueden comprender secuencias reguladoras para controlar la expresión de las moléculas de ácido nucleico. Estas secuencias reguladoras pueden ser de naturaleza eucariótica o procariótica. En realizaciones particulares, la secuencia reguladora puede ser un promotor específico de tejido de modo que la expresión de las proteínas de fusión sea sustancialmente mayor en el tipo de tejido diana en comparación con otros tipos de tejido. En realizaciones particulares, la secuencia reguladora puede dar como resultado la expresión constitutiva de las proteínas de fusión tras la entrada del vector en la célula. Alternativamente, las secuencias reguladoras pueden incluir secuencias inducibles. Las secuencias reguladoras inducibles son bien conocidas por los expertos en la técnica y son aquellas secuencias que requieren la presencia de un factor inductor adicional para dar como resultado la expresión de las proteínas de fusión. Los ejemplos de secuencias reguladoras adecuadas incluyen sitios de unión correspondientes a factores de transcripción específicos de tejido basados en proteínas nucleares endógenas, secuencias que dirigen la expresión en un tipo de célula específico, el operador lac, el operador de tetraciclina y el operador de hormona esteroide. Cualquier secuencia reguladora inducible conocida por los expertos en la técnica se puede usar junto con los usos de los sistemas CID según se reivindica.

En realizaciones particulares, el ácido nucleico se integra de forma estable en el genoma de un subconjunto de células del sujeto. En realizaciones particulares, el ácido nucleico se mantiene estable en un subconjunto de las células del sujeto como un segmento episomal separado.

En realizaciones particulares, la eficacia de la integración, el tamaño de la secuencia de ADN que se puede integrar y el número de copias de una secuencia de ADN que se puede integrar en un genoma se pueden mejorar mediante el uso de transposones. Los transposones o elementos transponibles incluyen una secuencia de ácido nucleico corta con secuencias repetidas terminales aguas arriba y aguas abajo. Los transposones activos pueden codificar enzimas que facilitan la escisión e inserción de ácido nucleico en una secuencia de ADN diana.

Se han descrito en la técnica varios elementos transponibles que facilitan la inserción de ácidos nucleicos en el genoma de los vertebrados, incluidos los seres humanos. Los ejemplos incluyen la bella durmiente (p. ej., derivada del genoma de los peces salmónidos); piggyback (p. ej., derivado de células de lepidópteros y/o *Myotis lucifugus*); marinero (p. ej., derivado de *Drosophila*); príncipe rana (p. ej., derivado de *Rana pipiens*); Tol2 (p. ej., derivado del pez medaka); TcBuster (p. ej., derivado del escarabajo rojo de la harina *Tribolium castaneum*) y spinON.

Cada una de las dosis descritas de ingredientes activos (proteína de fusión AB1, proteína de fusión AB2 y molécula pequeña) puede ser cada componente solo, proteína de fusión AB1 y proteína de fusión AB2 en combinación, o proteína de fusión AB1, proteína de fusión AB2 y la molécula pequeña en combinación. En realizaciones particulares, cuando se incluyen en combinaciones para producir una dosis, tal como una dosis establecida en este documento, los sustituyentes en la combinación se pueden proporcionar en proporciones de ejemplo tales como: 1:1:1; 1:2:1; 1:3:1; 1:4:1; 1:5:1; 1:10:1; 1:2:2; 1:2:3; 1:3:4; 1:4:2; 1:5:3; 1:10:20; 1:1:2; 1:4:3; 1:100:1; 1:25:30; 1:4:16; 1:1000:15; 1:3:10; 1:5:15; 1:50:90; 1:18:3; 1:10:100 (donde la proteína de fusión AB1, la proteína de fusión AB2 y la molécula pequeña, en realizaciones individuales particulares, puede ocurrir en cada posición de relación de cada relación proporcionada para proporcionar un número significativo de relaciones beneficiosas). Los sustituyentes en una combinación se pueden proporcionar dentro de la misma composición o dentro de diferentes composiciones.

Se pueden lograr cantidades terapéuticamente eficaces mediante la administración de dosis únicas o múltiples de proteína de fusión AB1, proteína de fusión AB2 y la molécula pequeña durante el curso de un régimen de tratamiento (p. ej., QID, TID, BID, diariamente, cada dos días, cada 3 días, cada 4 días, cada 5 días, cada 6 días, semanal, cada 2 semanas, cada 3 semanas, mensual, cada 2 meses, cada 3 meses, cada 4 meses, cada 5 meses, cada 6 meses, cada 7 meses, cada 8 meses, cada 9 meses, cada 10 meses, cada 11 meses o anualmente).

"Administrar de forma controlada" una molécula pequeña seleccionada significa que la presencia de la molécula pequeña dentro de las células de un sujeto se produce después del establecimiento de una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína de fusión AB1 y proteína de fusión AB2 y que la molécula pequeña seleccionada generalmente será

metabolizado por la célula mientras permanecen cantidades terapéuticamente efectivas de proteína de fusión AB1 y proteína de fusión AB2. Por supuesto, cuando se inicia la muerte celular, la célula puede dejar de existir antes de que la molécula pequeña se haya metabolizado por completo.

- 5 Las realizaciones de ejemplo y el ejemplo proporcionado a continuación describen pasos de ejemplo y detallados para crear un CID como se reivindica. La descripción abarca varias combinaciones de estos pasos.

Ejemplo 1. Paso 1. Los haptenos de molécula pequeña con grupos funcionales reactivos (p. ej., aminas primarias, ácidos carboxílicos, aldehídos, sulfhidrilos) pueden conjugarse químicamente con proteínas transportadoras o soporte sólido mediante procedimientos conocidos [44, 45]. Los haptenos de molécula pequeña que no poseen grupos funcionales reactivos para la conjugación, o donde se desean sitios de conjugación alternativos, pueden modificarse para incluir dichos grupos reactivos mediante procedimientos de síntesis química conocidos, como el procedimiento de diazonio o la reacción de Mannich [44, 45]. Por ejemplo Pastor-Navarro et al. [46] detalla procedimientos para modificar químicamente la doxiciclina de molécula pequeña prototípica (un fármaco antibacteriano de molécula pequeña) para su posterior acoplamiento a una proteína transportadora. De manera similar, Mata [47] describe procedimientos para modificar β -lactámicos de molécula pequeña (como la penicilina) para acoplarlos a un soporte sólido. Como se muestra en la fig. 3, la doxiciclina modificada por nitración seguida de reducción para contener un grupo reactivo de amina primaria se puede acoplar a una proteína transportadora por reacción con éster de NHS, imidoéster o varios grupos químicos diferentes [44]. La proteína transportadora utilizada puede ser cualquier cantidad de proteínas utilizadas para la inmunización contra haptenos, incluidas, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA), proteína transportadora azul (BIP), etc. Estas proteínas están disponibles comercialmente (Thermo Fischer, Sigma Aldrich, etc.) en varios formatos que permiten la conjugación química directa usando una variedad de químicas. La proteína transportadora particular utilizada para el acoplamiento, la proparte de hapteno a transportador y otros atributos, como la longitud y el tipo de brazo espaciador, se pueden ajustar para optimizar la producción de anticuerpos de alta afinidad.

En realizaciones particulares, se usa un único grupo funcional reactivo de la molécula pequeña para acoplarse a la proteína transportadora o al soporte sólido (FIG. 3). Esto asegura que cada molécula del hapteno se conjuge a la proteína portadora o al soporte sólido en una sola orientación estereotipada. Además, el mismo grupo de reacción utilizado para el acoplamiento a la proteína transportadora se puede utilizar en un paso posterior de los procedimientos con fines de cribado. Para moléculas pequeñas con múltiples grupos funcionales reactivos, la conjugación se puede realizar de manera que asegure que solo un único grupo reactivo de la molécula pequeña se acopla a la proteína.

[Paso 2. Se puede inmunizar a un miembro de la familia Camelidae (camellos, llamas, alpacas, vicuñas y guanacos) contra el conjugado de proteína transportadora/molécula pequeña seleccionado (también conocido como inmunógeno) usando procedimientos de inmunización conocidos (FIG. 2) [48]. Un animal transgénico que contiene el locus de la cadena pesada del anticuerpo humano y está desprovisto de cadenas ligeras de anticuerpos funcionales puede ser inmunizado contra el inmunógeno [49]. Un mamífero con loci nativos de anticuerpos de cadena pesada y ligera o, alternativamente, un mamífero transgénico con loci humanos de cadena pesada y ligera, puede ser inmunizado contra el inmunógeno [49]. La inmunización debe llevarse a cabo en presencia de un adyuvante para potenciar la producción de anticuerpos [48, 50]. En la mayoría de los casos, el adyuvante completo de Freund es efectivo, sin embargo, se puede probar cualquier número de adyuvantes si Freund's no logra dar una respuesta de anticuerpos adecuada o si el adyuvante de Freund causa efectos secundarios graves en los animales [51, 52]. La cantidad de conjugado de hapteno/proteína transportadora y adyuvante administrado, y el momento de las inmunizaciones de refuerzo varían según el animal, pero se pueden encontrar pautas generales en Leenaars M et al y en Pardon E et al [51, 53]. Se pueden realizar dos o tres inmunizaciones de refuerzo para aumentar la afinidad de los anticuerpos. Las muestras de suero se pueden tomar y analizar mediante ELISA o ensayos similares para confirmar la generación de anticuerpos conjugados anti-molécula pequeña/proteína transportadora. Para ELISA, la molécula pequeña de hapteno se conjuga con biotina usando el mismo grupo reactivo que se usó para el acoplamiento de la proteína transportadora en el Paso 1 (FIG. 3). Esta pequeña molécula biotinilada luego se une a estreptavidina o neutravidina en placas o perlas para su uso en ensayos ELISA [54]. La biotina unida covalentemente a varios tipos de enlazadores flexibles y grupos funcionales reactivos adecuados para la conjugación química están disponibles en numerosas empresas, como Thermo Fischer o Sigma Aldrich. También se pueden usar químicas de unión distintas de la biotina-avidina.

Paso 3. Al final del período de inmunización, se realiza una extracción de sangre, aspiración de médula ósea, recolección de bazo (en el caso de animales pequeños como ratones y ratas) o disección de ganglios linfáticos para aislar glóbulos blancos o células B. [48, 53]. Generalmente, entre 10 y 50 millones de glóbulos blancos son suficientes para los pasos posteriores. Los glóbulos rojos se pueden agotar mediante lisis o separación en gradiente de Ficoll y se puede extraer el ARN de los glóbulos blancos restantes utilizando varios procedimientos, como la extracción con tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo (Trizol) o kits basados en columnas (Qiagen RNeasy) [55]. Alternativamente, después del agotamiento de los glóbulos rojos, las células B pueden enriquecerse mediante clasificación por citometría de flujo o separación magnética utilizando anticuerpos específicos de células B, y extraer el ARN de este material enriquecido [55]. El ARN aislado (5 μ g) se puede transcribir de forma inversa mediante un cebador aleatorio o una síntesis basada en oligo-dT en ADNc utilizando la transcriptasa inversa Invitrogen SuperScript III (u otra enzima similar) de acuerdo con el protocolo del fabricante [56]. Después de la síntesis de cDNA, se puede agregar E. coli RNase H (Invitrogen u otro proveedor) a la reacción para degradar el RNA y aumentar la eficiencia de la PCR en los pasos

posteriores (condiciones de reacción específicas proporcionadas por el fabricante). El ADNc se puede utilizar como molde para la amplificación por PCR de dominios de unión a antígeno de cadena pesada solamente (VHH) o de cadena sencilla (scFV, compuesto por VH y VL). La estrategia de amplificación difiere según el animal utilizado para la inmunización.

Paso 4. Para especies de camélidos, como ejemplo, (o loci de anticuerpos derivados de especies de camélidos) se pueden usar dos rondas de PCR en un formato anidado para amplificar específicamente el repertorio de VHH reordenado. La primera ronda PCR se puede hacer con 1 st cebadores redondos (Figuras 10A-10B) y entre 0,5 y 4 μ L de ADNc como molde. La polimerasa Q5 de New England Biolabs se puede utilizar para la amplificación con las condiciones de reacción proporcionadas por el fabricante (también son adecuadas otras polimerasas de alta fidelidad). Las condiciones de amplificación pueden ser las siguientes: desnaturalización inicial a 98°C durante 1 min, 30 ciclos de 10 segundos 98°C - 30 segundos 55°C - 1 minuto 72°C, seguido de una extensión final de 5 minutos a 72°C. El número de ciclos y la temperatura de recocido de la imprimación se pueden ajustar para aumentar el rendimiento del producto. El producto de PCR resultante se puede separar por tamaños en un gel de agarosa y los fragmentos de ADN de entre 600 y 700 pares de bases (correspondientes a VHH) se pueden cortar del gel y purificar [56]. Luego se pueden usar varios nanogramos (1 a 5 μ L) de este producto como plantilla para una segunda PCR anidada con 2 cebadores de segunda ronda (Figuras 10A-10B), nuevamente utilizando la polimerasa Q5 de New England Biolabs de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las condiciones de amplificación por PCR pueden ser idénticas a las de la primera ronda de la PCR. El número exacto de ciclos de PCR se puede ajustar para aumentar el rendimiento del producto o reducir la amplificación no específica (el número general de ciclos en este paso puede oscilar entre 15 y 20). El producto de la PCR resultante (de 300 a 450 pares de bases de longitud) se puede digerir con las enzimas de restricción NotI y BstEII y ligarse en un vector de detección de mamíferos o levaduras (Figura 5a y 5b) cortado con las mismas enzimas [56].

Para animales transgénicos con cadenas pesadas y ligeras derivadas de humanos, el artículo de investigación de Andris-Widhopf et al. describe una estrategia general para clonar repertorios de anticuerpos VH y VL reorganizados a partir de ADNc y la posterior fusión en un formato de anticuerpo de cadena única (scFV). usando un conector largo de 18 aminoácidos [57]. El protocolo descrito en Andris-Widhopf et al. se puede seguir pero con las siguientes modificaciones. En primer lugar, las secuencias de los cebadores se alteran por las enumeradas en la FIG. 11. Las secuencias de los cebadores se han alterado para permitir la clonación en el vector de cribado elegido con sitios de enzimas de restricción compatibles (los nombres de los cebadores no se modifican con respecto al protocolo original). En segundo lugar, todos los pasos de la PCR se llevan a cabo utilizando la polimerasa Q5 de New England Biolabs o una polimerasa de alta fidelidad similar de acuerdo con las instrucciones del fabricante. reemplazando la polimerasa Taq utilizada en el protocolo original. En tercer lugar, después de la amplificación por PCR final de la biblioteca de scFV, el producto de la PCR se digiere con las enzimas de restricción NotI y Sall (en lugar de SfiI) y se liga al vector de cribado de mamífero o de levadura cortado con las mismas enzimas [56]. Artículos de Little et al., y Pansri et al. [58, 59] describen estrategias alternativas para clonar scFV de origen humano a partir de ADNc. Estos protocolos y las secuencias de los cebadores asociados se pueden modificar para que sean compatibles con los procedimientos descritos en el presente documento. y Pansri et al. [58, 59] describen estrategias alternativas para clonar scFV de origen humano a partir de ADNc. Estos protocolos y las secuencias de los cebadores asociados se pueden modificar para que sean compatibles con los procedimientos descritos en el presente documento. y Pansri et al. [58, 59] describen estrategias alternativas para clonar scFV de origen humano a partir de ADNc. Estos protocolos y las secuencias de los cebadores asociados se pueden modificar para que sean compatibles con los procedimientos descritos en el presente documento.

Los animales transgénicos con solo un locus de cadena pesada humana y ninguna cadena ligera funcional producen anticuerpos humanos solo de cadena pesada (HCAb). HIGO. 12 proporciona secuencias de cebadores para amplificar los exones de la región variable humana (VHH) de estos HCAb del ADNc. En la primera PCR, cada uno de los cebadores directos de la primera ronda puede emparejarse con uno de los cebadores inversos de la primera ronda en reacciones de PCR separadas. Las condiciones de las reacciones de PCR pueden ser las mismas que para la primera ronda de amplificación de VHH de Camelid (anteriormente indicada). Cada uno de estos productos de PCR (entre 0,1 μ L y 1 μ L) se puede utilizar como plantilla para una segunda PCR anidada utilizando los cebadores directo e inverso correspondientes de la segunda ronda. Nuevamente, las condiciones de la PCR pueden ser las mismas que para la segunda ronda de amplificación VHH de Camelid. Las condiciones de la PCR deben optimizarse para evitar la sobreamplificación y la desviación del repertorio de anticuerpos.

Las bibliotecas de VHH y scFV pueden derivarse de otras especies siguiendo los protocolos básicos descritos anteriormente, pero con secuencias de cebadores específicas de especies alternativas. Las bibliotecas de VHH y scFV también pueden derivarse de animales no inmunes vírgenes o de secuencias no naturales sintéticas. Otros formatos de anticuerpos, como los dominios de unión (VL) solo de cadena ligera, también se pueden adaptar para este protocolo. Sin embargo, se espera que el número de anticuerpos conjugados de molécula pequeña/proteína portadora con suficiente afinidad en dichas bibliotecas sea pequeño y, por lo tanto, la selección de tales bibliotecas es laboriosa y no es el mejor procedimiento. Además, los sitios de las enzimas de restricción en las secuencias de los cebadores y los sitios correspondientes en el vector de selección se pueden alterar para que se puedan usar otras enzimas de restricción para el paso de clonación. Alternativamente, los fragmentos de ADN de VHH o scFV se pueden insertar en el vector mediante otros procedimientos de clonación, como la clonación de Gibson o SLiCE [60]. Para estos

procedimientos alternativos, las secuencias de los cebadores y el sitio correspondiente en el vector se pueden cambiar para que sean compatibles. Cualquier alteración de los cebadores o del vector de detección se debe realizar de modo que el marco de lectura del codón del gen VHH o scFV siga siendo el mismo que el del gen TdTomato en el vector de detección, de modo que se produzca una única proteína de fusión tras la traducción (VHH-TdTomato o scFV - TdTomato).

Paso 5. Después del ligamiento de las secuencias amplificadas de VHH o scFV en el vector de detección, los plásmidos pueden transformarse en *E. coli* electrocompetente MegaX DH10B de Invitrogen (o bacterias altamente competentes similares con una eficiencia superior a 10^9 ufc/ μ g de ADN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, las bacterias pueden cultivarse con selección de fármaco con ampicilina (100 μ g/ml) de una manera que mantenga la representación de la biblioteca de plásmidos, ya sea en placas de agar como describen Hanahan et al. [61] o en medios semisólidos como describen Elsaesser y Paysan [62]. El plásmido se puede extraer de la bacteria utilizando un kit de plásmido de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante (u otros procedimientos de aislamiento de plásmido similares que producen ADN de plásmido purificado con bajos niveles de endotoxinas).

Paso 6. En el vector de selección, el ADNc de VHH o scFV se clona en marco con el gen de la proteína fluorescente roja TdTomato, creando un gen de fusión. Debido a que el VHH o el scFV se clonan sin un péptido líder, la proteína resultante se mantiene intracelularmente en el citoplasma (Figura 4). En el vector de cribado de mamíferos, el gen de fusión anticuerpo-TdTomato puede ser impulsado por el promotor compuesto CAGG fuerte y expresado de forma ubicua (pueden sustituirse otros promotores fuertes como el promotor Eif1 α) [63]. Este promotor también impulsa el marcador de selección de fármacos, puromicina N-acetil-transferasa, que es cocistónico con el gen del anticuerpo-TdTomato mediante la inclusión del péptido 2A. El vector de detección de mamíferos (FIG. 5A) puede ser un transposón basado en Piggybac [64]. La cotransfección de este plásmido transposón y la proteína transposasa Piggybac correspondiente en células diana da como resultado la integración de la construcción génica en el genoma de la célula huésped y la expresión estable de VHH-TdTomato o scFV-TdTomato del promotor CAGG. También se pueden usar sistemas de transposones alternativos (La bella durmiente, Tol2, etc.) o vectores virales (retrovirales, lentivirales, etc.) para administrar el gen de fusión anticuerpo-TdTomato en células de mamífero (con clonación de los vectores apropiados). En el vector de cribado de levadura (*S. cerevisiae*) (Figura 5B), el gen de fusión anticuerpo-TdTomato puede ser dirigido por el promotor TDH3 fuerte (se pueden sustituir promotores más débiles como el promotor ADH1). El mantenimiento y la propagación del plásmido pueden ser proporcionados por el origen de replicación basado en 2 micras y el marcador auxotrófico URA3 puede usarse para la selección de células de expresión. En estos vectores pueden sustituirse promotores alternativos o genes de selección.

Paso 7. Para introducir la proteína de fusión anticuerpo-TdTomato en las células, las células de mamífero pueden cotransfectarse con los plásmidos de cribado de la biblioteca VHH o scFV y un plásmido que exprese la transposasa Piggybac. Se puede usar cualquier número de líneas celulares de mamíferos para el cribado, como HeLa, CHO, HEK293, COS7, etc. (en realizaciones particulares, las líneas celulares no son adherentes y se transfectan fácilmente con ADN o se infectan con virus recombinantes). La transfección se puede realizar con Invitrogen Lipofectamine 2000 de acuerdo con el protocolo del fabricante, con modificaciones para garantizar la integración de una sola copia del vector de detección (es decir, cada célula tiene como máximo una copia del transgén VHH o scFV integrado). Pueden utilizarse procedimientos Southern blot, PCR en tiempo real o similares para evaluar el número de copias del transgén en las células transfectadas y la cantidad de vector, transposasa, y la lipofectamina (o el virus) se pueden valorar para encontrar la cantidad adecuada de cada uno para garantizar la integración de una sola copia. También se pueden usar procedimientos alternativos de transfección o infección celular por virus (si se usa la administración retroviral o lentiviral) con advertencias similares.

Dos días después de la transfección, la eficacia puede controlarse mediante citometría de flujo, usando el porcentaje de células que expresan TdTomato como una métrica. Dos días después de la transfección, las células que expresan la fusión VHH o scFV-TdTomato se pueden seleccionar con 100 ng/mL a 1 μ g/mL de puromicina (u otro antibiótico si se usó otro marcador de selección en el vector de selección). La selección puede continuar hasta que la mayoría de las células expresen el transgén (TdTomato positivo). A continuación, las células pueden examinarse mediante clasificación por citometría de flujo como se describe en el paso 8.

Para *S. cerevisiae*, los plásmidos de cribado VHH o scFV pueden introducirse mediante electroporación de alta eficacia como describen Benatuil et al. o por transformación LiAc como describen Gietz y Schiestl [65, 66]. Después de la transformación, la levadura se puede sembrar directamente en placas de agar de medios sintéticos que carecen de uracilo (u otro aminoácido si se usó otro marcador auxotrófico en el plásmido de detección). Se puede usar cualquier cantidad de cepas diferentes de *S. cerevisiae*, como la cepa S288c BY4741 de laboratorio común (la eliminación adicional del gen del transportador ABC PDR5, o la eliminación de los reguladores transcripcionales PDR1 y PDR3, pueden ayudar en la selección descrita en el Paso 8 al disminución del flujo de salida de la molécula pequeña [67]). La levadura se puede cultivar en condiciones estándar durante 3-7 días como se describe en [66],

El número de células (p. ej., de mamífero o de levadura) utilizadas en el protocolo depende del tamaño de la biblioteca de VHH o scFV. El número de células de mamífero o de levadura transfectadas o transformadas debe ser aproximadamente diez veces (o más) el número de secuencias de plásmido únicas en la biblioteca. Si la biblioteca contiene 1×10^6 plásmidos únicos (según se determina contando las diluciones de las bacterias después de la

transformación), entonces al menos 10×10^6 células de mamífero o levadura deben transfectarse o transformarse inicialmente con el plásmido de la biblioteca. Esto asegura que todos los miembros de la biblioteca de anticuerpos estén representados en la población celular y que la selección esté completa. Esto se puede hacer iterativamente en grupos más pequeños y manejables.

Paso 8. Para examinar la biblioteca de VHH o scFV en busca de aglutinantes eficientes del conjugado de molécula pequeña/proteína transportadora, se puede emplear un ensayo de citometría de flujo que detecta VHH o scFV que son funcionales (se unen al antígeno, se pliegan correctamente y tienen buena estabilidad) en el citoplasma (FIG. 4A). El hapteno de molécula pequeña utilizado para la inmunización en los Pasos 1 y 2 puede modificarse mediante la unión de un tinte fluorescente como BODIPY FL o fluoresceína. Ambos tintes son excitados eficientemente por un láser de 488nm (excitación máxima entre 490 y 500nm) y emiten luz cerca de 520nm. Los espectros de estos tintes están bien separados de TdTomato (exmax 554nm, emmax 581nm) y, por lo tanto, son adecuados para la clasificación por citometría de flujo de varios colores. Más lejos,

La molécula pequeña se puede acoplar a cualquiera de los colorantes usando el mismo grupo reactivo en la molécula pequeña que se usó para acoplar a una proteína transportadora en el Paso 1 (Figura 3). La posición en la molécula pequeña donde se une el fluoróforo es crítica. El acoplamiento de la molécula pequeña con el colorante se realiza con un brazo espaciador (como los enlazadores basados en polietilenglicol) para minimizar aún más la interferencia estérica en el ensayo de unión. BODIPY FL y la fluoresceína están disponibles comercialmente en múltiples formatos (incluso con diferentes brazos espaciadores) que permiten la conjugación química directa usando una variedad de químicas (Thermo Fischer, Sigma-Aldrich, etc.). El acoplamiento se puede realizar de acuerdo con las instrucciones del fabricante y el conjugado de colorante y molécula pequeña se puede purificar mediante cromatografía en columna. La identidad y la estructura del conjugado de molécula pequeña-colorante pueden confirmarse mediante procedimientos basados en espectrometría de masas o espectroscopía de resonancia magnética nuclear. A continuación, todos los conjugados de molécula pequeña y tinte pueden analizarse para determinar la permeabilidad celular.

Idealmente, la molécula pequeña elegida en el Paso 1 es un fármaco con una excelente permeabilidad celular (por ejemplo, varias tetraciclinas o antibióticos β -lactámicos como la doxiciclina o la penicilina). La conjugación del colorante con la molécula pequeña no debería afectar abiertamente a su permeabilidad. Como prueba cualitativa simple, el conjugado de molécula pequeña-colorante puede agregarse a células de mamífero o levadura en cultivo en concentraciones que varían de 1 nM a 1 mM durante 1 hora. Posteriormente, las células se pueden examinar inmediatamente bajo un microscopio fluorescente con un conjunto de filtros FITC estándar. Las células deben estar etiquetadas uniformemente por el tinte, lo que indica que el tinte de molécula pequeña es permeable a la membrana. Si el conjugado de molécula pequeña-colorante no es permeable, las células permanecerán sin marcar o, alternativamente, tendrán puntos focales de fluorescencia correspondientes a endosomas (lo que indica la absorción de molécula pequeña-colorante por pinocitosis en lugar de difusión simple). Se pueden sustituir en el conjugado diferentes brazos espaciadores o modificaciones de tinte (como la sulfonación) para aumentar la permeabilidad de la membrana. Alternativamente, se pueden probar otros tintes con mejor permeabilidad celular. Después de la incubación de 1 hora con el colorante de molécula pequeña, las células pueden lavarse dos veces en PBS y resuspenderse en medio fresco (sin el colorante de molécula pequeña), luego analizarse por microscopía o citometría de flujo en intervalos de uno a cinco minutos. Dependiendo de la permeabilidad de la membrana de la molécula pequeña-tinte, la fluorescencia celular volverá lentamente a los niveles de fondo; el tiempo en el que la fluorescencia de las células ha vuelto a los niveles de fondo es el "tiempo hasta el fondo". La tasa de flujo de tinte de molécula pequeña que sale de las células y el "tiempo hasta el fondo" pueden ser parámetros utilizados en la selección posterior de la biblioteca de VHH o scFV.

Las células que expresan la biblioteca VHH o scFV creada en el Paso 7 pueden incubarse con el conjugado de colorante de molécula pequeña durante 1 hora, lavarse dos veces con PBS y, posteriormente, volver a colocarse en condiciones de cultivo. La cantidad de tiempo que se cultivan las células antes del análisis depende de la tasa de flujo de tinte de molécula pequeña que sale de las células. Las células deben analizarse en el punto de tiempo de "tiempo hasta el fondo" o después. A continuación, las células se pueden clasificar mediante un citómetro de flujo utilizando los filtros de excitación y emisión apropiados, seleccionando las células que son positivas para TdTomato y colorante de molécula pequeña (BODIPY-FL o fluoresceína positiva). Estas células clasificadas pueden cultivarse más o procesarse para aislar el ADN (como se describe en el Paso 9).

El marco conceptual para este ensayo es que la unión de la molécula pequeña por VHH o scFV (que son intracelulares) impide la difusión del conjugado de molécula pequeña-colorante fuera de la célula (Figura 4A). El resultado es que las células que expresan VHH o scFV que se unen a la molécula pequeña permanecen fluorescentes secuestrando la molécula pequeña-colorante en el citoplasma, mientras que las células que expresan VHH o scFV que no se unen pierden el conjugado de molécula pequeña-colorante a medida que se diluye. Se espera que VHH o scFV que tienen pequeñas consistentes de disociación (unión más estrecha) con la molécula pequeña retengan la molécula pequeña durante más tiempo en el citoplasma. Por lo tanto, las células también se pueden clasificar después de períodos de tiempo más largos para seleccionar específicamente células que expresen VHH o scFV de unión de alta afinidad. Alternativamente, las células se pueden clasificar en función de la proporción de TdTomato a colorante de molécula pequeña,

Aunque el ensayo descrito usa TdTomato y BODIPY FL/fluoresceína, se pueden usar otras combinaciones de proteína fluorescente y tinte fluorescente si los espectros de excitación y emisión de las dos especies se pueden resolver mediante citometría de flujo, la proteína fluorescente no interfiere con Unión de VHH o scFV, y el colorante fluorescente es permeable a las células y no interfiere con la unión de moléculas pequeñas.

También se pueden emplear procedimientos alternativos de cribado de VHH o scFV, como la visualización en fagos o la visualización en la superficie de la levadura (como se describe en detalle en [68]). Sin embargo, debido a que estos procedimientos no detectan VHH o scFV que son funcionales (es decir, se unen al antígeno, se pliegan correctamente, son estables) en el espacio intracelular, no son el mejor procedimiento y el VHH o scFV recuperado aún debe examinarse aún más para detectar la función citoplasmática. [69]. Las bibliotecas de anticuerpos ScFV en particular pueden beneficiarse del uso primero de una pantalla de visualización de superficie, ya que muchos scFV no se pliegan correctamente en el espacio intracelular. El scFV recuperado en dicha selección puede analizarse luego en el ensayo de unión de tinte-molécula pequeña intracelular descrito anteriormente; aquellos que no funcionan intracelularmente pueden mutarse o injertarse en marcos de scFV estables que se sabe que promueven el plegamiento y volver a probar la capacidad de unión [70, 71]. Estos procedimientos de presentación en superficie pueden requerir la unión de la molécula pequeña a una superficie sólida. Nuevamente, la molécula pequeña se une usando el mismo grupo reactivo que se usó para acoplarse a una proteína transportadora en el Paso 1.

Paso 9. La especificidad del VHH o scFV expresado por las células seleccionadas puede determinarse mediante citometría de flujo utilizando la molécula pequeña sin marcar como competidor. Estas pruebas pueden garantizar que los VHH o scFV seleccionados se unan solo a la molécula pequeña y no al enlazador o fluoróforo adjunto; además, pueden proporcionar datos sobre la afinidad y la cinética de unión de VHH o scFV. La ventaja de estos ensayos basados en células es que la unión por VHH o scFV se mide en un contexto celular.

La población de células clasificadas del Paso 8 puede clonarse en una sola célula (p. ej., mediante clasificación por citometría de flujo o dilución limitante). Los clones individuales se pueden expandir y volver a analizar individualmente para la unión de moléculas pequeñas utilizando el ensayo del Paso 8 y se pueden seleccionar clones de células de unión de alta afinidad (clones que mantienen la unión de la molécula pequeña al colorante durante largos períodos de tiempo (p. ej., 4 minutos o más después de la expansión celular también se puede realizar en cultivo a granel seguido de rondas adicionales de clasificación celular para enriquecer aún más las células que expresan VHH o scFV de unión de alta afinidad, seguido de la clonación y expansión de células individuales).

Cada clon celular (que expresa un solo VHH o scFV) se puede incubar con una concentración determinada de colorante de molécula pequeña y cantidades crecientes de molécula pequeña sin marcar en una serie de pocillos. Por ejemplo, la concentración de colorante etiquetado para especies no etiquetadas puede variar de 1 a 0, de 1 a 0,1, de 1 a 0,25, de 1 a 0,5, de 1 a 1, de 1 a 2, de 1 a 4, de 1 a 10, de 1 a 100. Después de varias horas de incubación para permitir el equilibrio, las células pueden lavarse minuciosamente y analizarse mediante citometría de flujo. En este ensayo, la molécula pequeña sin marcar actúa como un competidor de las especies marcadas con tinte para la unión de VHH o scFV. Para VHH o scFV que se unen específicamente a la molécula pequeña (y no al enlazador o al fluoróforo), a medida que aumenta la concentración de la molécula pequeña no marcada, la fluorescencia de las células disminuye en proporción directa porque ambas especies de moléculas pequeñas se unen al anticuerpo con igual afinidad. Alternativamente, para VHH o scFV cuya unión depende total o parcialmente del enlazador o fluoróforo, la molécula pequeña no marcada no compite eficazmente por la unión del anticuerpo y la fluorescencia celular no disminuye proporcionalmente.

Los clones de células que expresan VHH o scFV que se unen específicamente a la molécula pequeña pueden analizarse adicionalmente para determinar la tasa de disociación de la molécula pequeña del anticuerpo. Cada clon celular se puede incubar en cultivo con vehículo solo o cantidades saturadas (1 nM a 1 mM) del conjugado de molécula pequeña-tinte durante varias horas para lograr la unión de saturación del VHH o scFV. A continuación, se puede añadir al cultivo un exceso de 100 veces de molécula pequeña sin marcar; posteriormente, a intervalos de tiempo regulares (de 1 a 5 minutos), las células pueden lavarse rápidamente y analizarse mediante citometría de flujo para determinar la retención del conjugado de colorante y molécula pequeña. En este ensayo, el exceso de molécula pequeña sin marcar evita de forma eficaz que la molécula marcada con colorante se vuelva a unir y disminuye la fluorescencia celular con el tiempo. Estos datos de series de tiempo se pueden usar para estimar la tasa de separación de la molécula pequeña del VHH o scFV [72]. Los clones celulares que expresan VHH o scFV que se unen fuerte y selectivamente a la molécula pequeña pueden elegirse para las etapas posteriores. Alternativamente, si no se recuperan tales VHH o scFV, los clones con mejor desempeño pueden aislarse y mutarse sistemáticamente como se describe en los Pasos 10 y 11 para generar variantes con las propiedades deseadas.

Las variantes químicas de la molécula pequeña también pueden probarse como se describe anteriormente para determinar la especificidad del VHH o scFV para familias de moléculas. Por ejemplo, si se usa doxiciclina como hapteno de molécula pequeña, se puede probar la capacidad de otras tetraciclinas (como tetraciclina, minociclina, tigeciclina, etc.) para unirse al VHH o scFV en competencia con un conjugado de doxiciclina-colorante. De manera similar, si se usa penicilina como la molécula pequeña de hapteno, se puede ensayar la unión de otras moléculas de β -lactámico a los dominios de unión.

Un procedimiento alternativo es utilizar tecnologías de secuenciación de ADN de alto rendimiento como Illumina HiSeq o Roche 454 (u otras tecnologías similares) para secuenciar poblaciones enteras de VHH o scFV en grupos de células en lugar de la clonación de células individuales. Las secuencias de VHH o scFV se pueden recuperar de las células usando el protocolo de PCR como se describe en el Paso 10. Los productos de PCR de VHH o scFV se pueden cortar con las enzimas de restricción NotI y Sall, se pueden purificar mediante la selección del tamaño del gel de agarosa y las secuencias adaptadoras de ADN apropiadas se ligan en (específico para cada plataforma de secuenciación). Las secuencias del adaptador y los protocolos de secuenciación difieren para cada tecnología de secuenciación y se pueden obtener del fabricante en particular. Debido al tamaño de VHH y scFV, las tecnologías de secuenciación que son capaces de realizar lecturas largas de ADN (lecturas de extremos emparejados de >250 pb y lecturas de extremos únicos de > 500 pb) son preferibles. Las células que expresan VHH o scFV se clasifican mediante citometría de flujo para la unión del conjugado de molécula pequeña con colorante, como se describe en el paso 8; o clasificados por especificidad como se describe en el paso 9 (clasificación de células cuya unión al colorante conjugado se ve interrumpida por un exceso de molécula pequeña no marcada). Las secuencias de ADN de VHH o scFV que están altamente enriquecidas en la población clasificada objetivo en comparación con la población de células parentales inicial pueden amplificarse de manera única con cebadores específicos de secuencia o sintetizarse de novo (mediante síntesis de ADN) y clonarse en el vector de detección de mamífero o levadura apropiado. Estos clones de VHH o scFV luego se introducen en las células por transposición (como se describe en el paso 7) y se vuelven a analizar para determinar la especificidad y la afinidad como en el paso 9.

Paso 10. Las secuencias de VHH o scFV pueden recuperarse de clones celulares seleccionados mediante PCR usando 50-200 ng de ADN genómico y los cebadores de amplificación de ADN genómico proporcionados en la FIG. 10C. La PCR se puede realizar con polimerasa Q5 de New England Biolabs (o una polimerasa robusta de alta fidelidad similar) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las condiciones de amplificación pueden ser las siguientes: desnaturalización inicial a 98°C durante 1 min, 25 a 35 ciclos de 10 segundos 98°C - 30 segundos 60°C - 1 minuto 72°C, seguido de una extensión final de 5 minutos a 72° C. El ADN amplificado se puede digerir con las enzimas de restricción NotI y Sall y ligarse al vector de cribado de mamífero o levadura cortado con las mismas enzimas. Los plásmidos ligados se pueden transformar en la cepa DH5α o DH10B de *E. coli* (u otras cepas similares utilizadas para la clonación de rutina). El ADN del plásmido de clones bacterianos individuales puede comprobarse mediante digestión de restricción de diagnóstico y secuenciarse mediante secuenciación estándar de Sanger utilizando los cebadores de amplificación de ADN genómico de la FIG. 10C [56].

Paso 11. Si el VHH o el scFV se derivan de secuencias de anticuerpos no humanos, pueden "humanizarse" utilizando los procedimientos descritos, por ejemplo, en Vincke et al. [73] para VHH de especies de camélidos, o Philibert et al. [71], Kuramochi et al. [74], y/o Olimpieri et al. [75] por ejemplo, para scFV derivados de ratón u otras especies. Aunque no es absolutamente necesario, la humanización de los anticuerpos es el mejor procedimiento si las proteínas se van a utilizar en aplicaciones de terapia génica humana. En general, los procedimientos de humanización incluyen injertar las CDR o los residuos determinantes de la especificidad (SDR) del anticuerpo no humano en un marco de anticuerpo humano; reduciendo la inmunogenicidad de los anticuerpos extraños en huéspedes humanos. Usando las secuencias de VHH o scFV del Paso 10, se puede seleccionar un marco de anticuerpo humano apropiado para el injerto de CDR o SDR.

Una consecuencia del injerto es a menudo la pérdida de afinidad de unión por el antígeno diana. Para recuperar la especificidad y la afinidad por el antígeno después del injerto, los clones de VHH o scFV injertados pueden mutarse mediante mutagénesis puntual o transposición de ADN utilizando técnicas conocidas [68, 76]; posteriormente, estos mutantes pueden examinarse (ya sea individualmente o en un formato de biblioteca) como se describe en los Pasos 8 y 9 para seleccionar anticuerpos con especificidad y afinidad de unión similar al VHH o scFV original. Es decir, la afinidad de unión no debe reducirse de manera estadísticamente significativa. Se pueden realizar rondas iterativas de mutagénesis y selección para obtener VHH o scFV con la especificidad y la afinidad de unión deseadas. Además de recuperar o mejorar la especificidad y la afinidad de unión después de la humanización,

Paso 12. Una vez que se identifican las células que expresan VHH o scFV con una afinidad de unión muy alta por la molécula pequeña, el ADN de estos clones de células individuales se puede aislar usando procedimientos estándar [56]. Utilizando este ADN como molde, las secuencias de VHH o scFV pueden recuperarse mediante PCR con cebadores de amplificación de ADN genómico como se describe en el Paso 9. El ADN amplificado puede digerirse con las enzimas de restricción NotI (o NcoI) y Sall y ligarse al vector de expresión bacteriano (p.ej. figura 6) cortado con las mismas enzimas. Alternativamente, las secuencias de VHH o scFV en los vectores de detección pueden transferirse directamente al vector de expresión bacteriano mediante clonación molecular estándar [56].

Los plásmidos ligados se pueden transformar en la cepa BL21(DE3) de *E. coli* (o cepas similares diseñadas para la expresión de la proteína impulsada por el promotor T7 inducible por IPTG) mediante procedimientos estándar [56]. Estas bacterias se pueden utilizar para producir proteína VHH o scFV purificada para pasos posteriores. El vector de expresión bacteriano (p. ej., FIG. 6) puede diseñarse de modo que VHH o scFV clonados se marquen en el extremo C-terminal con dos etiquetas de purificación: p. ej., la biotina dirigida a AviTag y una etiqueta de polihistidina 6X. El AviTag es un objetivo para la enzima biotina ligasa bacteriana BirA, que puede unir covalentemente un grupo de biotina a la lisina en el AviTag, ya sea in vivo o in vitro [77]. A continuación, el resto de biotina se puede utilizar para la

purificación de proteínas a base de estreptavidina o avidina. La histidina 6X se une fuertemente a las resinas de afinidad de níquel o cobalto y permite la purificación de proteínas en condiciones suaves. Cualquiera o ambas etiquetas pueden usarse en la purificación por afinidad de VHH o scFV. Muchos fabricantes y proveedores, por ejemplo, Novagen, Thermo Scientific, Sigma-Aldrich, proporcionan reactivos y protocolos detallados para la expresión de proteínas utilizando el sistema promotor T7 inducible IPTG. Del mismo modo, estas empresas también proporcionan reactivos y protocolos para la purificación de proteínas basada en etiquetas AviTag (biotina) y polihistidina.

Paso 13. La afinidad de unión de las proteínas VHH o scFV purificadas por la molécula pequeña puede confirmarse, por ejemplo, mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) [78]. Los chips SPR que se unen a la biotina o la etiqueta de histidina 6X están disponibles de numerosos fabricantes, como Biorad y GE Healthcare. Además, estas empresas tienen chips y protocolos SPR especializados diseñados para la detección de la unión de moléculas pequeñas. Estos protocolos especializados pueden ser necesarios debido a la baja masa de la molécula pequeña. La determinación de la afinidad de unión y la cinética de unión se puede realizar de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Paso 14. Para mayor claridad, la molécula pequeña que se une al clon de VHH o scFV aislado como se describió anteriormente y elegido para su uso en los pasos posteriores se denomina ligante de anticuerpo 1 (AB1). El complejo AB1/molécula pequeña purificado se utiliza para inmunizar animales para generar anticuerpos dirigidos contra el complejo proteína AB1/molécula pequeña, denominados anticuerpos antimetatipo. Para la generación eficaz de anticuerpos antimetatipo, es importante que la molécula pequeña permanezca unida a AB1 mientras está en el animal durante la inmunización. Por lo tanto, un aspecto crítico es que el AB1 seleccionado tiene una alta afinidad de unión a la molécula pequeña (determinada, por ejemplo, como se describe en los Pasos 9 y 13). Aunque es posible fijar la molécula pequeña a AB1 mediante reticulación química,

El complejo AB1/molécula pequeña purificado se puede usar para inmunizar a un animal. Un miembro de la familia Camelidae (camellos, llamas, alpacas, vicuñas y guanacos) puede inmunizarse contra el complejo AB1/molécula pequeña utilizando procedimientos de inmunización conocidos [48]. Un animal transgénico que contiene el locus de la cadena pesada del anticuerpo humano y está desprovisto de cadenas ligeras de anticuerpos funcionales puede ser inmunizado contra el complejo AB1/molécula pequeña [49]. Un mamífero con locus de anticuerpos nativos de cadena pesada y ligera o, alternativamente, un mamífero transgénico con locus de cadena pesada y ligera humana puede ser inmunizado contra el complejo AB1/molécula pequeña [49]. En todos los casos, la inmunización puede llevarse a cabo en presencia de adyuvante para potenciar la producción de anticuerpos [48, 50]. En la mayoría de los casos, el adyuvante de Complete Freund es efectivo,

Para garantizar que AB1 permanezca sustancialmente unido a la molécula pequeña, la concentración de la molécula pequeña en los animales se puede mantener mediante dosis repetidas de la molécula pequeña, ya sea por vía oral o por inyección. Por ejemplo, se puede administrar doxiciclina a ratones, ratas y conejos incluyéndolos en el agua de bebida a 2 mg/ml [79], mientras que a los camélidos se les puede administrar doxiciclina mediante inyección subcutánea a 20 mg/kg de peso del animal cada 2-3 días [79]. La dosificación de otras moléculas pequeñas y la vía de administración pueden ser diferentes para varias moléculas y animales, y depende de la biodisponibilidad de la molécula, su tasa de eliminación del cuerpo, la absorción intestinal y muchos otros parámetros. El Manual Veterinario de Merck [79], el Manual de Medicamentos Veterinarios de Plumb [80], y otros recursos similares contienen información de dosificación sobre medicamentos genéricos de molécula pequeña comunes, como los antibióticos. Para otras clases de moléculas pequeñas, pueden ser necesarias pruebas empíricas para determinar la dosificación correcta. La dosificación debe hacerse al nivel más alto posible que no cause daño al animal. Para las moléculas pequeñas que no se toleran bien o son tóxicas, se puede adoptar un procedimiento de cribado in vitro para encontrar anticuerpos antimetatipo (paso 15).

La administración de la molécula pequeña al animal puede comenzar 1-2 días antes de la inmunización. AB1 puede mezclarse con una cantidad saturada de la molécula pequeña y el adyuvante e inyectarse en el animal receptor. La cantidad de AB1/complejo de molécula pequeña y adyuvante administrado, y el momento de las inmunizaciones de refuerzo varía según el animal, pero las pautas generales se pueden encontrar en Leenaars M et al. y en Pardon et al. [51, 53]. Se pueden realizar dos o tres inmunizaciones de refuerzo para aumentar la afinidad de los anticuerpos. La dosificación de la molécula pequeña puede continuar durante todo el período de inmunización.

Las muestras de suero se pueden tomar y analizar mediante ELISA o ensayos similares para confirmar la generación de anticuerpos antimetatipo. Para ELISA, BirA puede biotilar la proteína AB1 purificada in vitro y luego unirla a estreptavidina o neutravidina en placas o perlas para usar en ensayos ELISA [54, 77]. ELISA se puede realizar en presencia de una cantidad de saturación de la molécula pequeña. También se pueden usar químicas de unión distintas de la biotina-avidina.

Paso 15. Al final del período de inmunización, los pasos 3 y 4 se repiten como se describió anteriormente, excepto que el ADNc amplificado por PCR se digiere con las enzimas de restricción NotI y BstEII (VHH basado en camélido), o NotI y Sall (humano). scFV o VHH, y ligado al vector del dominio de activación de mamífero o de levadura cortado con las mismas enzimas (Figura 8a y 8b). Estos vectores están diseñados de manera que el VHH o scFV clonado esté en fase con un dominio de activación transcripcional (AD) C-terminal: p65 AD en el vector de mamífero y Gal4 AD en

el vector de levadura. Los plásmidos ligados luego se transforman en *E. coli* para la expansión de la biblioteca y la posterior purificación del plásmido como se describe en el paso 5.

Las bibliotecas de dominios de activación de VHH o scFV también se pueden crear a partir de los repertorios de anticuerpos de animales sin tratar usando los procedimientos descritos aquí. Estas bibliotecas deben utilizarse en los casos en que los animales no toleren bien la molécula pequeña elegida y, por lo tanto, no se puedan crear bibliotecas de anticuerpos inmunitarios. Sin embargo, debido a que se espera que el número de VHH o scFV que se unirá a AB1/molécula pequeña en dichas bibliotecas sea muy pequeño, se debe cribar un número mucho mayor de clones. El tiempo y el costo asociados con pantallas tan grandes hacen que esta opción no sea la ideal.

Paso 16. Para realizar una selección de VHH o scFV que se unen al complejo AB1/molécula pequeña, se puede realizar una selección modificada de dos híbridos [81]. Por ejemplo, en un ensayo de ejemplo, una proteína de dimerización de CID se fusiona con el dominio de unión a ADN del gen Gal4 de levadura y la proteína de dimerización de CID se fusiona con un dominio de activación transcripcional. La unión de las proteínas de dimerización entre sí acerca el dominio de activación al dominio de unión al ADN y activa la transcripción de genes informadores impulsados por promotores dependientes del elemento de respuesta Gal4 (GRE). En esta pantalla, se puede introducir un tercer elemento, a saber, la molécula pequeña. La selección se puede realizar para encontrar pares de anticuerpos (AB1 y el anticuerpo antimetatipo) cuya interacción depende de la presencia de la molécula pequeña (en ausencia de la molécula pequeña, la proteína AB1 y el anticuerpo antimetatipo no se unen a El uno al otro). Como se describe por Styne et al. [81], son posibles muchos ensayos de interacción similares y estos procedimientos alternativos se pueden adaptar para detectar pares de proteínas de dimerización AB1/AB2 como se describe en este documento.

Para células de mamífero, el plásmido respondedor Gal4 de mamífero (Figura 9) se puede cotransfectar con un plásmido que expresa transposasa Tol2 [82] en células diana. Al igual que con los pasos anteriores, se puede usar cualquier cantidad de líneas celulares de mamíferos para la detección, como HeLa, CHO, HEK293, COS7, etc. (en realizaciones particulares, las líneas celulares no son adherentes y se transfectan fácilmente con ADN o se infectan con virus recombinantes). La transfección se realiza utilizando Invitrogen Lipofectamine 2000 según el protocolo del fabricante. También se pueden usar procedimientos alternativos de transfección o infección celular por virus (si se utiliza la administración retroviral o lentiviral). Las células con copias integradas del constructo respondedor Gal4 pueden seleccionarse mediante la adición del fármaco G418 al medio de cultivo (entre 50 µg/ml y 500 µg/ml según la sensibilidad del tipo de célula en particular). Las células se pueden clonar de una sola célula mediante clasificación por citometría de flujo o dilución limitante y los clones individuales se pueden examinar en busca de ausencia de fluorescencia TdTomato (para garantizar la ausencia de transcripción de fondo). Los clones sin fluorescencia de TdTomato pueden examinarse adicionalmente para determinar la respuesta a un control de proteína de fusión dominio de unión a ADN Gal4-dominio de activación VP16 (suministrado mediante transfección transitoria de un plásmido de control, figura 9). Los clones de células que se vuelven positivos para TdTomato tras la transfección del plásmido de control (según lo juzgado por citometría de flujo) y, por lo tanto, responden a la activación basada en Gal4 se pueden usar como líneas celulares informadoras. El marco de lectura abierto de AB1 puede transferirse mediante procedimientos de clonación estándar al vector DBD Gal4 de mamífero vacío (Figura 7a). El plásmido AB1-Gal4 DBD puede introducirse luego en la línea celular informadora mediante cotransfección con un plásmido que exprese la transposasa Piggybac [64]. Las células con la construcción AB1-Gal4 DBD integrada en el genoma pueden seleccionarse mediante la adición de higromicina B al medio de cultivo (entre 50 µg/mL y 500 µg/mL dependiendo de la sensibilidad del tipo de célula en particular). Estas células se clonan en células individuales y se analizan los clones individuales para determinar la expresión de AB1-Gal4 DBD mediante PCR en tiempo real, inmunotransferencia con un anticuerpo anti-Gal4 o tinción con el conjugado de colorante de molécula pequeña (paso 8)[56]. Los clones que tienen un alto nivel de proteína AB1-Gal4 DBD pueden seleccionarse para la selección de bibliotecas como se describe a continuación.

La biblioteca de VHH o scFV clonada en el vector del dominio de activación de mamíferos (Paso 15) se puede introducir en la línea celular mediante la cotransfección del plásmido de la biblioteca que exprese, por ejemplo, la transposasa de la Bella Durmiente [83]. La transfección se puede realizar con Invitrogen Lipofectamine 2000 de acuerdo con el protocolo del fabricante, con las modificaciones necesarias para garantizar la integración de una sola copia del vector del dominio de activación (es decir, cada célula tiene como máximo una copia del transgén VHH o scFV integrado). Se pueden usar transferencias Southern, PCR en tiempo real o procedimientos similares para evaluar el número de copias del transgén en las células transfectadas y se puede valorar la cantidad de vector, transposasa y lipofectamina (o virus) para encontrar la cantidad adecuada de cada uno para garantizar la integración de una sola copia. También se pueden usar procedimientos alternativos de transfección o infección celular por virus (si se usa la administración retroviral o lentiviral) con advertencias similares. Dos días después de la transfección, las células que expresan la fusión VHH o scFV-p65 AD pueden seleccionarse con 100 ng/mL a 1 µg/mL de puomicina.

Se espera que la mayoría de los anticuerpos generados contra el complejo AB1/molécula pequeña estén dirigidos contra las regiones marco o las regiones variables de AB1 y no sean específicos para la conformación unida. Dichos anticuerpos forman un complejo con AB1 independiente de la molécula pequeña; por lo tanto, VHH o scFV-p65 AD que se unen a AB1-Gal4 DBD en ausencia de una molécula pequeña impulsan constitutivamente la expresión del indicador Gal4 en las células. Para filtrar estos aglutinantes independientes de moléculas pequeñas, puede emplearse contraselección. El reportero Gal4 transcribe tanto TdTomato como la proteína viral timidina quinasa (FIG. 7A). La

enzima timidina quinasa convierte el fármaco Ganciclovir en un análogo de nucleósido tóxico, matando las células que expresan la enzima (tanto el ganciclovir solo como la timidina cinasa sola son inocuos). Las células indicadoras con la biblioteca de fusión VHH o scFV-p65 AD pueden tratarse con ganciclovir (0,5 μ M - 10 μ M) durante varios días hasta que el análisis de citometría de flujo determine que todas las células positivas para TdTomato se han eliminado del cultivo. A continuación, las células pueden lavarse para eliminar el ganciclovir y volver a colocarse en cultivo. Otros genes suicidas inducibles por fármacos similares pueden usarse en lugar de la timidina quinasa, como una caspasa 9 inducible [31]. Como alternativa, la población celular se puede clasificar mediante citometría de flujo para eliminar las células positivas para TdTomato, seleccionando la población no fluorescente.

Después de la eliminación de estos anticuerpos independientes de moléculas pequeñas de la población celular, se puede emplear un paso de selección positiva para enriquecer las células en las que la unión de VHH o scFV a AB1 requiere la molécula pequeña. Se puede agregar una molécula pequeña a concentraciones de saturación (como se determina en el Paso 9) a las células en cultivo. Las células pueden cultivarse durante 2 o 3 días y luego clasificarse mediante citometría de flujo, seleccionando las células que son positivas para TdTomato. Estas células pueden ser células individuales clonadas por clasificación de flujo o dilución limitante. Los clones de células individuales pueden exponerse a la molécula pequeña en concentraciones crecientes (1 nM - 1 mM) para determinar la sensibilidad de la expresión de TdTomato a los niveles de la molécula pequeña (los clones ideales no son fluorescentes en ausencia de la molécula pequeña, pero cuya fluorescencia aumenta al aumentar la concentración de moléculas pequeñas). Las secuencias de VHH o scFV pueden recuperarse de clones celulares seleccionados mediante PCR usando 50-200 ng de ADN genómico y los cebadores de amplificación de ADN genómico proporcionados en la FIG. 10C. Los productos de la PCR se pueden secuenciar directamente usando el cebador del promotor T7 o se pueden clonar en el vector del dominio de activación de mamíferos (FIG. 8A, usando los sitios de enzimas de restricción compatibles) y luego secuenciar. Estos VHH o scFV se pueden volver a introducir en las células como se describe anteriormente para volver a probar y confirmar. Los clones que vuelven a dar positivo son antimitotipo VHH o scFV específicos para el complejo AB1/molécula pequeña.

Para *S. cerevisiae*, la detección se puede realizar, por ejemplo, en las cepas MaV103 (MATa) o MaV203 (MAT α) [84]. Estas cepas contienen tres genes indicadores de Gal4: HIS3, que proporciona crecimiento en medios que carecen de histidina, LacZ, para la detección colorimétrica de la transcripción de Gal4, y URA3, que proporciona crecimiento en medios que carecen de uracilo, así como sensibilidad al fármaco ácido 5-fluoroorótico (5). -FOA) para selección de contador. Esta cepa puede modificarse aún más mediante la eliminación del gen del transportador ABC PDR5, o la eliminación de los reguladores transcripcionales PDR1 y PDR3, lo que puede ayudar en la detección al disminuir el flujo de salida de la molécula pequeña [67]. El marco de lectura abierto de AB1 puede transferirse mediante procedimientos de clonación estándar al vector de integración DBD Gal4 de levadura vacío (FIG. 7B). Este vector AB1-Gal4 DBD se puede linealizar mediante digestión de restricción con la enzima AclI, y luego se introduce en la cepa de cribado mediante la transformación LiAc estándar [85]. Las células transformadas se pueden seleccionar sembrando en placas de agar de medios sintéticos que carecen de triptófano. La expresión de AB1-Gal4 DBD en células transformadas se puede confirmar mediante PCR en tiempo real, inmunotransferencia con un anticuerpo anti-Gal4 o anti-myc, o tinción con el conjugado de colorante de molécula pequeña (Paso 8) [56]. Esta cepa que expresa AB1-Gal4 DBD puede usarse luego para la selección de bibliotecas. La biblioteca de VHH o scFV clonada en la biblioteca de dominios de activación de levadura (FIG. 8B) puede introducirse en la cepa de cribado mediante transformación o electroporación de LiAc de alta eficiencia [65, 66]. Las células se pueden sembrar en placas de agar de medios sintéticos que carecen de triptófano y leucina para seleccionar células con el plásmido del dominio de activación VHH o scFV. Después de 5-7 días de crecimiento, las colonias de células (que ahora contienen la biblioteca completa de dominios de activación de VHH o scFV) se pueden replicar en placas de agar de medios sintéticos que contienen la molécula pequeña y carecen de los aminoácidos leucina, histidina y uracilo (la molécula pequeña se puede agregar a las placas de agar en concentraciones saturadas). Para moléculas pequeñas que no son estables en placas de agar, las células pueden seleccionarse en cultivo líquido con la molécula pequeña. Las células en las que VHH o scFV se unen a AB1 y activan la transcripción de los genes informadores podrán crecer en estas placas de selección.

Posteriormente, las células pueden someterse a una contraselección para cribar frente a aglutinantes de VHH o scFV independientes de moléculas pequeñas. La levadura superviviente se puede replicar en placas de agar con medios sintéticos completos sin la molécula pequeña y que contengan 5-FOA (0,05 %-0,2 %). VHH o scFV que se unen a AB1 en ausencia de una molécula pequeña transcribirán continuamente el marcador de selección URA3. Las células que expresan URA3 son eliminadas por 5-FOA, mientras que las células que carecen de URA3 sobreviven [86].

Las células supervivientes representan aquellas en las que VHH o scFV se unen al complejo AB1/molécula pequeña, pero no AB1 solo. Al igual que con las células de mamíferos, estas células pueden examinarse adicionalmente para identificar células con interacciones de unión más fuertes. Los clones individuales se pueden cultivar en placas de selección apropiadas o en cultivo líquido (-trp, -leu) que contiene X-gal y concentraciones crecientes de la molécula pequeña. A medida que aumenta la concentración de la molécula pequeña, la interacción entre VHH o scFV AD y AB1 Gal4 DBD también debería aumentar, dando lugar a más enzima β -galactosidasa (debido al gen LacZ impulsado por Gal4) y más colonias y escisión de X-gal. de un azul más profundo. Este ensayo también se puede hacer cuantitativo como lo describen Mockli y Auerbach [87]. Se puede realizar un ensayo similar colocando las células en placas en concentraciones crecientes de 3-amino-1,2, 4-triazol (3-AT, 1 mM-100 mM). 3-AT es un inhibidor competitivo del gen

HIS3. Como tal, se requieren mayores niveles de HIS3 para superar las crecientes concentraciones de 3-AT [88]. Aquellas células que sobreviven a las concentraciones más altas de 3-AT a una concentración dada de molécula pequeña representan células con mayores cantidades de transcripción de HIS3 impulsada por la interacción VHH o scFV con el complejo AB1/molécula pequeña. Las secuencias de VHH o scFV pueden recuperarse de clones seleccionados mediante PCR usando 50-200 ng de ADN genómico y los cebadores de amplificación de ADN genómico proporcionados en la FIG. 10C. Los productos de PCR se pueden secuenciar directamente usando el cebador del promotor T7 o se pueden clonar en el vector del dominio de activación de levadura (FIG. 8B, usando los sitios de enzimas de restricción compatibles) y luego secuenciar. Estos VHH o scFV se pueden volver a introducir en las células como se describe anteriormente para volver a probar y confirmar. Los clones que vuelven a dar positivo son antimetatipo VHH o scFV específicos para el complejo AB1/molécula pequeña.

Paso 17. Si se usaron secuencias de anticuerpos no humanos para derivar el antimetatipo VHH o scFV, estos pueden humanizarse como se describe en el Paso 11. Después de la humanización, rondas iterativas de mutagénesis y reselección usando, por ejemplo, los dos El cribado híbrido descrito en el Paso 16 se puede realizar para recuperar la afinidad y especificidad de unión. Además de recuperar o mejorar la especificidad y la afinidad después de la humanización, los clones antimetatipo VHH o scFV se pueden mutar para generar anticuerpos con propiedades alteradas tales como mejor plegamiento y estabilidad o especificidad alterada (también se pueden seleccionar otras características).

Paso 18. Para mayor claridad, los clones antimetatipo VHH o scFV aislados como se describe anteriormente se denominan ligante de anticuerpo 2 (AB2). Una vez que se aíslan los pares AB1/AB2 satisfactorios, cualquiera de los miembros puede mutarse para alterar la cinética, las afinidades de unión o la especificidad de molécula pequeña del complejo. Los dos procedimientos de selección de híbridos descritos anteriormente pueden emplearse para encontrar pares AB1/AB2 mutantes con las propiedades deseadas.

Para adaptar los dos ensayos híbridos para medir la cinética o la estabilidad del complejo, se pueden usar genes indicadores Gal4 con vidas medias más cortas (como proteínas fluorescentes desestabilizadas o luciferasa). La vida media corta de tales proteínas permite la evaluación de la estabilidad compleja después del lavado de la molécula pequeña de dimerización. Por lo tanto, se pueden realizar cribados para proteínas mutantes AB1 o AB2 que prolonguen o acorten la vida media del complejo.

La especificidad de los pares AB1/AB2 para la molécula pequeña particular puede probarse usando compuestos químicamente relacionados como dimerizadores en los dos ensayos híbridos descritos en el Paso 17. Por ejemplo, si se usa doxiciclina como la molécula pequeña hapteno, otras tetraciclinas (tales como tetraciclina, minociclina, tigeciclina, etc.) pueden probarse para determinar su capacidad para dimerizar AB1 y AB2. De manera similar, si se usa penicilina como la molécula pequeña de hapteno, se pueden probar otras moléculas de β -lactámicos. Además, las proteínas AB1 o AB2 se pueden mutar y seleccionar posteriormente mutantes con especificidad alterada para estos otros compuestos relacionados.

Otros compuestos que están químicamente relacionados con la molécula pequeña pueden seleccionarse para aquellos que desestabilizan el complejo AB1/AB2/molécula pequeña. Algunas variantes químicas relacionadas pueden unirse con igual o mayor afinidad a AB1 o AB2, pero tienen afinidad reducida o nula por la otra proteína. Se espera que la adición de tal compuesto desestabilizador a un complejo preformado AB1/AB2/molécula pequeña rompa el complejo compitiendo por la unión a AB1 o AB2. Para seleccionar tales compuestos, se puede emplear el ensayo de dos híbridos utilizando una proteína fluorescente desestabilizada como informador de Gal4. Las células con el reportero Gal4 de proteína fluorescente de vida media corta y que expresan AB1 y AB2 se pueden incubar en la molécula pequeña seleccionada a una concentración establecida durante 1-2 días. Posteriormente, se puede añadir un segundo compuesto de prueba a una concentración igual o mayor y las células se pueden analizar mediante citometría de flujo a intervalos de 2-3 horas. Los compuestos que interrumpen el complejo AB1/AB2/molécula pequeña disminuirán la transcripción del indicador Gal4, lo que dará como resultado una disminución de la fluorescencia celular con el tiempo.

Paso 19. Los pares de proteínas AB1/AB2 pueden usarse para hacer sistemas de control celular inducibles por moléculas pequeñas.

En el presente documento se hace referencia a numerosas proteínas, secuencias codificantes y vectores. Se pueden obtener secuencias de apoyo particulares de bases de datos disponibles públicamente bien conocidas por los expertos en la materia. La referencia a pasos numéricos no requiere que cada paso se lleve a cabo o que se practique necesariamente en el orden establecido en cada realización descrita en este documento. Más bien, los pasos numerados se proporcionan por conveniencia y referencia.

Como entenderá un experto en la materia, cada realización descrita en el presente documento puede comprender, consistir esencialmente en su elemento, paso, ingrediente o componente particular establecido. Por lo tanto, los términos "incluyen" o "incluyendo" deben interpretarse de la siguiente manera: "comprenden, consisten o consisten esencialmente en". El término de transición "comprende" o "comprende" significa que incluye, entre otros, y permite la inclusión de elementos, pasos, ingredientes o componentes no especificados, incluso en cantidades importantes. La

frase de transición "que consiste en" excluye cualquier elemento, paso, ingrediente o componente no especificado. La frase de transición "que consiste esencialmente en" limita el alcance de la realización a los elementos, pasos, ingredientes o componentes y a aquellos que no afectan materialmente la realización. Un efecto material provocaría una reducción estadísticamente significativa de la capacidad para inducir la expresión génica en una célula utilizando un sistema CID creado según los procedimientos reivindicados.

A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción, etc. utilizados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones deben entenderse modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se buscan obtener mediante la presente invención. Como mínimo, cada parámetro numérico debe interpretarse al menos a la luz del número de dígitos significativos notificados y aplicando técnicas de redondeo ordinarias. Cuando se requiere mayor claridad, el término "sobre" tiene el significado que razonablemente le atribuye un experto en la materia cuando se usa junto con un valor o rango numérico establecido, es decir, denota algo más o algo menos que el valor o rango establecido, dentro de un rango de $\pm 20\%$ del Valor establecido; $\pm 19\%$ del valor indicado; $\pm 18\%$ del valor indicado; $\pm 17\%$ del valor indicado; $\pm 16\%$ del valor indicado; $\pm 15\%$ del valor indicado; $\pm 14\%$ del valor indicado; $\pm 13\%$ del valor indicado; $\pm 12\%$ del valor indicado; $\pm 11\%$ del valor indicado; $\pm 10\%$ del valor indicado; $\pm 9\%$ del valor indicado; $\pm 8\%$ del valor indicado; $\pm 7\%$ del valor indicado; $\pm 6\%$ del valor indicado; $\pm 5\%$ del valor indicado; $\pm 4\%$ del valor indicado; $\pm 3\%$ del valor indicado; $\pm 2\%$ del valor indicado; o $\pm 1\%$ del valor indicado.

A pesar de que los rangos numéricos y los parámetros que establecen el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se informan con la mayor precisión posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene inherentemente ciertos errores que resultan necesariamente de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de prueba.

Los términos "un", "una", "el/la" y referencias similares utilizadas en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) deben interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o claramente se contradiga por el contexto. La enumeración de rangos de valores en este documento tiene la intención de servir simplemente como un procedimiento abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentra dentro del rango. A menos que se indique lo contrario en este documento, cada valor individual se incorpora a la especificación como si se mencionara individualmente en este documento. Todos los procedimientos descritos en este documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en este documento o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje de ejemplo (p. ej., "tales como") proporcionado en este documento tiene la intención de ilustrar mejor la invención y no supone una limitación del alcance de la invención reivindicada de otro modo. Ningún lenguaje en la especificación debe interpretarse como una indicación de cualquier elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

Las agrupaciones de elementos alternativos o realizaciones de la invención descritas en este documento no deben interpretarse como limitaciones. Se puede hacer referencia a cada miembro del grupo y reclamarlo individualmente o en cualquier combinación con otros miembros del grupo u otros elementos que se encuentran aquí.

Los detalles que se muestran aquí son a modo de ejemplo y con fines de discusión ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente invención únicamente y se presentan con el fin de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente comprensible de los principios y aspectos conceptuales de diversas realizaciones de la invención. A este respecto, no se intenta mostrar los detalles estructurales de la invención con más detalle del necesario para la comprensión fundamental de la invención, la descripción tomada con los dibujos y/o ejemplos que hacen evidente a los expertos en la materia cómo los diversos formas de la invención se pueden realizar en la práctica.

Las definiciones y explicaciones utilizadas en la presente descripción pretenden controlar cualquier construcción futura a menos que se modifiquen clara e inequívocamente en los siguientes ejemplos o cuando la aplicación del significado hace que cualquier construcción carezca de sentido o sea esencialmente sin sentido. En los casos en que la construcción del término dejaría sin sentido o esencialmente sin sentido, la definición debe tomarse del Webster's Dictionary, 3rd Edition o de un diccionario conocido por los expertos en la materia, como el Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (Ed. Anthony Smith, Oxford University Press, Oxford, 2004).

REFERENCIAS

1. Bruter et al., Molekuliarnaia biologii. 2013;47(3):363-87. PubMed PMID: 23888768.
2. Naidoo et al., Neurology research international. 2012;2012:595410.
3. Gossen et al., PNAS. 1992;89(12):5547-51.
4. Gossen et al., Science. 1995;268(5218):1766-9. PubMed PMID: 7792603.
5. Le et al., PLoS one. 2014;9(9):e102538.
6. Favre et al., Journal of virology. 2002;76(22):11605-11.
7. Toromanoff et al., Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2010;18(1):151-60.

8. Mullick et al., BMC biotechnology. 2006;6:43.
9. Fussenegger et al., Nature biotechnology. 2000;18(11):1203-8.
10. Weber et al., Nature biotechnology. 2002;20(9):901-7.
11. Brown et al., Cell. 1987;49(5):603-12.
- 5 12. Braselmann et al., PNAS. 1993;90(5):1657-61.
13. Burcin et al., Frontiers in bioscience : a journal and virtual library. 1998;3:c1-7.
14. Gallinari et al., Chemistry & biology. 2005;12(8):883-93.
15. Nordstrom, Steroids. 2003;68(10-13):1085-94.
16. No et al., PNAS. 1996;93(8):3346-51.
- 10 17. Suhr et al., PNAS. 1998;95(14):7999-8004. PubMed PMID: 9653129;
18. Palli et al., European journal of biochemistry / FEBS. 2003;270(6):1308-15.
19. Komita et al., Cancer gene therapy. 2009;16(12):883-91.
20. DeRose et al., Pflugers Archiv: European journal of physiology. 2013;465(3):409-17.
21. Rivera et al., Nature medicine. 1996;2(9):1028-32.
- 15 22. Choi et al., Science. 1996;273(5272):239-42.
23. Clemons et al., Chemistry & biology. 2002;9(1):49-61.
24. Pollock et al., PNAS. 2000;97(24):13221-6.
25. Magari et al., The Journal of clinical investigation. 1997;100(11):2865-72.
26. Banaszynski et al., Journal of the American Chemical Society. 2005;127(13):4715-21.
- 20 27. Liu et al., Angewandte Chemie. 2014;53(38):10049-55.
28. Spencer et al., Science. 1993;262(5136):1019-24.
29. Clackson et al., PNAS. 1998;95(18):10437-42.
30. Nor et al., Gene therapy. 2002;9(7):444-51.
31. Straathof et al., Blood. 2005;105(11):4247-54.
- 25 32. Thomis et al., Blood. 2001;97(5):1249-57. PubMed PMID: 11222367.
33. Di Stasi et al., The New England journal of medicine. 2011;365(18):1673-83.
34. Liu et al., Journal of biosciences. 2014;39(1):85-95.
35. Van Acker et al., Journal of cell science. 2004;117(Pt 7):1129-37.
36. Voss et al., Molecular immunology. 1989;26(10):971-7.
- 30 37. Weidner et al., The Journal of biological chemistry. 1992;267(15):10281-8.
38. Hwang & Foote, et al., Methods. 2005;36(1):3-10.
39. Tsurushita et al., Methods. 2005;36(1):69-83.
40. Safdari et al., Biotechnology & genetic engineering reviews. 2013;29:175-86.
41. Wesolowski et al., Medical microbiology and immunology. 2009;198(3):157-74.
- 35 42. Yang & RadeR, et al., Methods in molecular biology. 2012;901:209-32.
43. Toleikis & Frenzel, Methods in molecular biology. 2012;907:59-71.
44. Hermanson, Bioconjugate techniques. Third edition. ed. xvii, 1146 pages p.
- 45 45. Niemeyer, Bioconjugation protocols : strategies and methods. 2nd ed. Totowa, N.J.: Humana Press; 2011. xvi, 605 p. p.
- 40 46. Pastor-Navarro et al., Analytica chimica acta. 2007;594(2):211-8.
47. Mata, Current pharmaceutical design. 1999;5(11):955-64.
48. Greenfield, Antibodies : a laboratory manual. Second edition. ed. xxi, 847 pages p.
49. Bruggemann et al., Archivum immunologiae et therapiae experimentalis. 2015;63(2):101-8.
50. Proetzel & Ebersbach, Antibody methods and protocols. New York: Humana Press; 2012. x, 325 p. p.
- 45 51. Leenaars et al., ILAR journal/National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources. 2005;46(3):269-79.
52. Animal Care and Use Committee. Guidelines for the Use of Adjuvants in Research. Intramural Animal Care and Use (ACU) program of the National Institutes of Health (NIH). 2013.
53. Pardon et al., Nature protocols. 2014;9(3):674-93.
- 50 54. Hornbeck, Current protocols in immunology / edited by John E Coligan [et al]. 2001;Chapter 2:Unit2 1.
55. Coligan, Current protocols in immunology. New York: John Wiley and Sons. p. v. (loose leaf).
56. Green et al., Molecular cloning : a laboratory manual. 4th ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.
57. Andris-Widhopf et al., 3rd. Generation of human scFv antibody libraries: PCR amplification and assembly of light- and heavy-chain coding sequences. Cold Spring Harbor protocols. 2011;2011(9).
- 55 58. Little et al., Journal of immunological methods. 1999;231(1-2):3-9.
59. Pansri et al., BMC biotechnology. 2009;9:6.
60. Casini et al., Nature reviews Molecular cell biology. 2015.
61. Hanahan et al., Methods in enzymology. 1991;204:63-113.
- 60 62. Elsaesser & Paysan, BioTechniques. 2004;37(2):200, 2.
63. Miyazaki et al., Gene. 1989;79(2):269-77.
64. Ding et al., Cell. 2005;122(3):473-83.
65. Benatui et al., Protein engineering, design & selection : PEDS. 2010;23(4):155-9.
66. Gietz & Schiestl, Nature protocols. 2007;2(1):38-41.
- 65 67. Balzi & Goffeau, Journal of bioenergetics and biomembranes. 1995;27(1):71-6.
68. Kontermann & Dübel, Antibody engineering. 2nd ed. Heidelberg: Springer; 2010.

69. Visintin et al., Journal of molecular biology. 2002;317(1):73-83.
 70. Ewert et al., Methods. 2004;34(2):184-99.
 71. Philibert et al., BMC biotechnology. 2007;7:81.
 72. Hulme & Trevethick, British journal of pharmacology. 2010;161(6):1219-37.
 5 73. Vincke et al., The Journal of biological chemistry. 2009;284(5):3273-84.
 74. Kuramochi et al., Methods in molecular biology. 2014;1060:123-37.
 75. Olimpieri et al., Bioinformatics. 2015;31(3):434-5.
 76. Kim et al., Methods in molecular biology. 2014;1131:407-20. 77. Kay et al., Methods in molecular biology. 2009;498:185-96.
 10 78. Mol & Fischer, Surface plasmon resonance : methods and protocols. New York: Humana Press; 2010. x, 286 p. p.
 79. Merck & Co. The Merck veterinary manual. Rahway, N.J. Whitehouse Station, N.J.: Merck and Co. Merck & Co; 1955. p. v.
 80. Plumb DC. Plumb's veterinary drug handbook. Eighth edition. ed. 11 unnumbered pages, 1279 pages p.
 81. Stynen et al., Microbiology and molecular biology reviews : MMBR. 2012;76(2):331-82.
 15 82. Balciunas et al., PLoS genetics. 2006;2(11):e169.
 83. Mates et al., Nature genetics. 2009;41(6):753-61.
 84. Vidal et al., PNAS. 1996;93(19):10315-20. PubMed PMID: 8816797.
 85. Gietz & Schiestl, Nature protocols. 2007;2(1):31-4.
 86. Boeke et al., Methods in enzymology. 1987;154:164-75.
 20 87. Mockli & Auerbach, BioTechniques. 2004;36(5):872-6.
 88. Bartel & Fields, The yeast two-hybrid system. New York: Oxford University Press; 1997. xi, 344 p. p

LISTA DE SECUENCIAS

- 25 <110> Fred Hutchinson Cancer Research Center
 <120> PROCEDIMIENTOS PARA CREAR SISTEMAS DE PROTEÍNAS DE DIMERIZACIÓN INDUCIDOS QUÍMICAMENTE PARA LA REGULACIÓN DE EVENTOS CELULARES
 30 <130> F053-0028PCT
 <150> 62/245,756
 <151> 2015-10-23
 35 <160> 117
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 40 <211> 74
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Secuencia de cribado de vector de mamífero
 <400> 1
 tcattttggc aaagaattac ttaatacgac tcactatagg ctcgagaagg ccattacggc 60
 50 cttagatcta atct 74
 <210> 2
 <211> 74
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cribado de vector de mamífero
 60 <400> 2
 agagcggccg cgctagcaca ggtcaccgtg tcgacaggcg gatcggtgag caagggcgag 60
 gaggtgatca agga 74
 65 <210> 3

<211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Secuencia de cribado de vector de mamífero
 <400> 3
 10 Ala Ala Ala Leu Ala Gln val Thr val Ser Thr Gly Gly Ser val Ser
 1 5 10 15
 Lys Gly Glu Glu val Ile Lys Glu
 15 20
 <210> 4
 <211> 58
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cribado de vector de levadura
 25 <400> 4
 taaaacacca gaacttagtt tcgactcgag aaggccatta cggccttaga tctaattct 58
 30 <210> 5
 <211> 74
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Secuencia de cribado de vector de levadura
 <400> 5
 40 agagcggccg cgctagcaca ggtcaccgtg tcgacaggcg gatcggtagag caagggcgag 60
 gaggtgatca agga 74
 <210> 6
 45 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Secuencia de cribado de vector de levadura
 <400> 6
 55 Ala Ala Ala Leu Ala Gln val Thr val Ser Thr Gly Gly Ser val Ser
 1 5 10 15
 Lys Gly Glu Glu val Ile Lys Glu
 60 20
 <210> 7
 <211> 75
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de vector de expresión bacteriana

ES 2 923 755 T3

<400> 7
 taatacgact cactataggg gaattgtgag cggataacaa ttcccctcta gaaataattt 60
 5 tgtttaactt taaga 75

<210> 8
 <211> 73
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de vector de expresión bacteriana
 15 <400> 8
 aggagatata catatgaaat acctgctgcc gaccgctgct gctggctctgc tgctcctcgc 60
 20 tgcccagccg gcg 73

<210> 9
 <211> 72
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Secuencia de vector de expresión bacteriana
 30 <400> 9
 atggccatgg cggccgcgct agcacaggct accgtgtcga caggcggatc gctcgagggc 60
 ctgaacgata tt 72

35 <210> 10
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Secuencia de vector de expresión bacteriana
 45 <400> 10
 tttgaagccc agaaaattga atggcatgaa caccaccacc accaccactg agat 54

50 <210> 11
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Secuencia de vector de expresión bacteriana
 <400> 11
 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 60 Ala Gln Pro Ala
 20

65 <210> 12
 <211> 24
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de vector de expresión bacteriana
 5 <400> 12
 Met Ala Met Ala Ala Ala Leu Ala Gln Val Thr Val Ser Thr Gly Gly
 1 5 10 15
 10 Ser Leu Glu Gly Leu Asn Asp Ile
 20
 15 <210> 13
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia de vector de expresión bacteriana
 <400> 13
 25 Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu His His His His His His
 1 5 10 15
 30 <210> 14
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Secuencia de vector de Gal4 DBD de mamífero
 <400> 14
 aagggccagc ggcagctgac cgtgggtgga 30
 40
 <210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de vector Gal4 DBD de mamífero
 50 <400> 15
 Lys Gly Gln Arg Gln Leu Thr Val Gly Gly
 1 5 10
 55 <210> 16
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Secuencia de vector Gal4 DBD de mamífero
 <400> 16
 65 agcggcagtg cggccgcgct agcacaggct accgtgtcga caggcggatc ggggtgaaggc 60
 agaggctctc tcctc 75

5 <210> 17
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de vector Gal4 DBD de mamífero
 10 <400> 17
 Ser Gly Ser Ala Ala Ala Leu Ala Gln Val Thr Val Ser Thr Gly Gly
 1 5 10 15
 15 Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu
 20 25
 20 <210> 18
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Secuencia de vector Gal4 DBD de levadura
 <400> 18
 agacagttga ctgtatcgcc ggaatttgta atacgactca ctatagggcg agccgccatc 60
 30
 <210> 19
 <211> 20
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de vector Gal4 DBD de levadura
 40 <400> 19
 Arg Gln Leu Thr Val Ser Pro Glu Phe Val Ile Arg Leu Thr Ile Gly
 1 5 10 15
 45 Arg Ala Ala Ile
 20
 50 <210> 20
 <211> 79
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Secuencia de vector Gal4 DBD de levadura
 <400> 20
 atggaggagc agaagctgat ctcagaggag gacctggcgg ccgcgctagc acaggtcacc 60
 60 gtgtcgacat gagatgggc 79
 65 <210> 21
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de vector Gal4 DBD de levadura
 <400> 21
 5 Met Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ala Ala Ala Leu
 1 5 10 15
 10 Ala Gln Val Thr Val Ser Thr
 20
 <210> 22
 15 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Secuencia de vector de dominio de activación de mamífero
 <400> 22
 ttagatctaa tctagagcgg ccgcgctagc acaggtcacc gtgtcgacag gcgga 55
 25
 <210> 23
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia de vector de dominio de activación de mamífero
 <400> 23
 35 Ala Ala Ala Leu Ala Gln Val Thr Val Ser Thr Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 24
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Secuencia de vector de dominio de activación de mamífero
 <400> 24
 50 tcgggaggta gtccaaaaaa gaagagaaag gtaggaacgc cgatggagtt ccagtacctg 60
 <210> 25
 <211> 20
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de vector de dominio de activación de mamífero
 60 <400> 25
 Ser Gly Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Gly Thr Pro Met Glu
 1 5 10 15
 65 Phe Gln Tyr Leu
 20

5 <210> 26
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de vector de dominio de activación de levadura
 10 <400> 26
 agatacccca ccaaaccaca aaaaagagat ctttaatacg actcactata gggcgagcgc 60
 cgccatg 67
 15 <210> 27
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia de vector de dominio de activación de levadura
 <400> 27
 25 Asp Thr Pro Pro Asn Pro Lys Lys Glu Ile Phe Asn Thr Thr His Tyr
 1 5 10 15
 30 Arg Ala Ser Ala Ala Met
 20
 35 <210> 28
 <211> 71
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Secuencia de vector de dominio de activación de levadura
 <400> 28
 gattacccat acgacgtacc agattacgct gcggccgcgc tagcacaggt caccgtgtcg 60
 45 acatgaatac t 71
 50 <210> 29
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Secuencia de vector de dominio de activación de levadura
 <400> 29
 Glu Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ala Ala Ala Leu Ala Gln
 1 5 10 15
 60 Val Thr Val Ser Thr
 20
 65 <210> 30
 <211> 23
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador directo de VHH de camello/llama
 5 <400> 30
 gtcctggctg ctcttctaca agg 23
 10 <210> 31
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Camel/llama VHH primer rev
 <400> 31
 20 ggtacgtgct gttgaactgt tcc 23
 <210> 32
 <211> 53
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador directo de VHH de camello/llama
 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(9)
 <223> n es a, c, g, o t
 35 <400> 32
 nnnnnnnng cggccgccac catggatgtg cagctgcagg agtctggrgg agg 53
 40 <210> 33
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador directo de VHH de camello/llama
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (1)..(9)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 33
 55 nnnnnnnng cggccgccac catggctsak gtgcagctgg tggagtctgg 50
 <210> 34
 <211> 29
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso de VHH de camello/llama
 65 <220>
 <221> misc_feature

<222> (1)..(9)
 <223> n es a, c, g, o t

 <400> 34
 5 nnnnnnnnnc tggagacggt gacctgggt 29

 <210> 35
 <211> 15
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador directo de VHH de Alpaca
 15
 <400> 35
 ggtgggtcctg gctgc 15

 20 <210> 36
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Cebador inverso de VHH de Alpaca

 <400> 36
 30 gatcactagt ggggtcttcg ctgtgggtgcg 30

 <210> 37
 <211> 53
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador directo de VHH de Alpaca
 40

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(9)
 45 <223> n es a, c, g, o t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (48)..(48)
 50 <223> n es a, c, g, o t

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 55 <223> n es a, c, g, o t

 <400> 37
 nnnnnnnnng cggccgccac catggctcag ktgcagctcg tggagtcngg ngg 53
 60
 <210> 38
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>
 <223> Cebador inverso de VHH de Alpaca

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(9)
 5 <223> n e s a, c, g, o t

 <400> 38
 nnnnnnnnnc tggagacggt gacctgggt 29

 10 <210> 39
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Cebador directo del promotor CAG

 <400> 39
 20 ctacagctcc tgggcaacgt g 21

 <210> 40
 <211> 25
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador inverso de TdTomato
 30 <400> 40
 tgatcacctc ctcgcccttg ctcac 25

 35 <210> 41
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Cebador directo del promotor TDH3

 <400> 41
 45 acaccagaac ttagtttcga ctcg 24

 <210> 42
 <211> 22
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador inverso de p65 AD

 55 <400> 42
 ggcaggtact ggaactccat cg 22

 <210> 43
 60 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> Cebador de promotor T7

 <400> 43
 taatacgact cactatagg 19

5 <210> 44
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de secuenciación inversa
 10 <400> 44
 gtggtggtgt tcatgccatt c 21

 15 <210> 45
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> VH, cebador enlazador largo de sentido 5'

 <400> 45
 25 ggtggttcct ctagatcttc ctctcttggt ggcggtggct cgggcggtgg tgggcaggtg 60
 cagctggtgc agtctgg 77

 30 <210> 46
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> VH, cebador enlazador largo de sentido 5'

 <400> 46
 ggtggttcct ctagatcttc ctctcttggt ggcggtggct cgggcggtgg tgggcagatc 60
 40 accttgaagg agtctgg 77

 <210> 47
 <211> 77
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> VH, cebador enlazador largo de sentido 5'
 50 <400> 47
 ggtggttcct ctagatcttc ctctcttggt ggcggtggct cgggcggtgg tggggaggtg 60
 cagctggtgs agtctgg 77
 55

 <210> 48
 <211> 76
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> VH, cebador enlazador largo de sentido 5'

 <400> 48
 65 ggtggttcct ctagatcttc ctctcttggt ggcggtggct cgggcggtgg tggggaggtg 60
 cagctgktgg agtctg 76

5 <210> 49
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 10 <223> VH, cebador enlazador largo de sentido 5'

 <400> 49
 ggtggttcct ctagatcttc ctctcttggg ggcgggtggct cgggcgggtgg tgggcaggtg 60
 cagctgcagg agtcggg 77
 15

 <210> 50
 <211> 77
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> VH, cebador enlazador largo inverso 3'
 25 <400> 50
 ggtggttcct ctagatcttc ctctcttggg ggcgggtggct cgggcgggtgg tgggcaggtg 60
 cagctacagc agtgggg 77
 30

 <210> 51
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> VH, cebador enlazador largo inverso 3'

 <400> 51
 40 gccactagtg agtcgacacg accgatgggc ccttggtgga rgc 43

 <210> 52
 <211> 43
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> VH, cebador enlazador largo inverso 3'
 50 <400> 52
 gccactagtg agtcgacaca aggggtgggg cggtatgcact ccc 43

 <210> 53
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55

 <220>
 <223> VH, cebador enlazador largo inverso 3'

 <400> 53
 60 gccactagtg agtcgacacg accttggggc tggtcgggga tgc 43
 65

 <210> 54
 <211> 43

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 5 <220>
 <223> VH, cebador enlazador largo inverso 3'

 <400> 54
 gccactagtg agtcgacacc acatccggag ccttggtggg tgc 43

 10 <210> 55
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> VH, cebador enlazador largo inverso 3'

 <400> 55
 20 gccactagtg agtcgacacg acggatgggc tctgtgtgga ggc 43

 <210> 56
 <211> 37
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Vkappa, cebador enlazador largo de sentido 5'
 30 <400> 56
 aagcggccgc caccatggtg cagatgaccc agtctcc 37

 35 <210> 57
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Vkappa, cebador enlazador largo de sentido 5'

 <400> 57
 45 aagcggccgc caccatggtg gtgatgacgc agtctcc 37

 <210> 58
 <211> 37
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Vkappa, cebador enlazador largo de sentido 5'

 <400> 58
 55 aagcggccgc caccatggtg gtgwtgacgc agtctcc 37

 <210> 59
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> Vkappa, cebador enlazador largo de sentido 5'

 <400> 59
 65 aagcggccgc caccatggtg acactcacgc agtctcc 37

5 <210> 60
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Vkappa, cebador enlazador largo inverso 3'

 <400> 60
 ggaagatcta gaggaaccac ctttgatytic caccttggtc cc 42

15 <210> 61
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Vkappa, cebador enlazador largo inverso 3'

 <400> 61
 ggaagatcta gaggaaccac ctttgatctc cagcttggtc cc 42

25 <210> 62
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Vkappa, cebador enlazador largo inverso 3'

 35 <400> 62
 ggaagatcta gaggaaccac ctttgatatc cactttggtc cc 42

40 <210> 63
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Vkappa, cebador enlazador largo inverso 3'

 <400> 63
 ggaagatcta gaggaaccac ctttaatctc cagtcgtggtc cc 42

50 <210> 64
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>
 <223> Vlambda, cebador enlazador largo de sentido 5'

 <400> 64
 60 aagcggccgc caccatggtg gtgbtgacgc agccgccctc 40

65 <210> 65
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>

<223> vlambda, cebador enlazador largo de sentido 5'
 <400> 65
 5 aagcggccgc caccatgggtg gtgctgactc agccaccctc 40
 <210> 66
 <211> 43
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> vlambda, cebador enlazador largo de sentido 5'
 15 <400> 66
 aagcggccgc caccatgggtg gccctgactc agcctccctc cgt 43
 <210> 67
 20 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> vlambda, cebador enlazador largo de sentido 5'
 <400> 67
 aagcggccgc caccatgggtg ctgactcagc caccctcagt gtc 43
 30 <210> 68
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> vlambda, cebador enlazador largo de sentido 5'
 <400> 68
 40 aagcggccgc caccatgggtg gtgctgactc aatcgccctc 40
 <210> 69
 <211> 40
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> vlambda, cebador enlazador largo de sentido 5'
 <400> 69
 aagcggccgc caccatgggtg atgctgactc agccccactc 40
 55 <210> 70
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> vlambda, cebador enlazador largo de sentido 5'
 <400> 70
 65 aagcggccgc caccatgggtg gtggtgacyc aggagccmtc 40
 <210> 71
 <211> 40

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> vlambda, cebador enlazador largo de sentido 5'

<400> 71
 aagcggccgc caccatgggtg gtgctgactc agccaccttc 40

10 <210> 72
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> vlambda, cebador enlazador largo de sentido 5'

20 <400> 72
 aagcggccgc caccatgggtg gggcagactc agcagctctc 40

25 <210> 73
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> vlambda, cebador enlazador largo inverso 3'

<400> 73
 ggaagatcta gaggaaccac cgcctaggac gggtcasccttg gtsc 45

35 <210> 74
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> vlambda, cebador enlazador largo inverso 3'

<400> 74
 ggaagatcta gaggaaccac cgcctaaaat gatcagctgg gttcc 45

45 <210> 75
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> vlambda, cebador enlazador largo inverso 3'

55 <400> 75
 ggaagatcta gaggaaccac cgccgaggac gggtcagctsg gtsc 45

60 <210> 76
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> overlap extension RSC-F for primer

<220>

<221> misc_feature
 <222> (1)..(9)
 <223> n e s a, c, g, o t

5 <400> 76
 nnnnnnnnna agcggccgcc accatggtg 29

10 <210> 77
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Overlap extension RSC-B rev primer

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(9)
 <223> n e s a, c, g, o t

25 <400> 77
 nnnnnnnnng ccactagtga gtcgacac 28

30 <210> 78
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> VH, Cebador directo de primera ronda

35 <400> 78
 caggtkcagc tggtgcagtc tggggc 26

40 <210> 79
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> VH, Cebador directo de primera ronda

45 <400> 79
 caggtccagc ttgtgcagtc tgg 23

50 <210> 80
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> VH, Cebador directo de primera ronda

60 <400> 80
 caggtccagc tggtacagtc tgg 23

65 <210> 81
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH, Cebador directo de primera ronda
 <400> 81
 5 caratgcagc tgggtgcagtc tgg 23
 <210> 82
 <211> 23
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> VH, Cebador directo de primera ronda
 15 <400> 82
 gaggtccagc tgggtacagtc tgg 23
 <210> 83
 20 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> VH, Cebador directo de primera ronda
 <400> 83
 cagrtcacct tgaaggagtc tgg 23
 30 <210> 84
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> VH, Cebador directo de primera ronda
 <400> 84
 40 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtccag 39
 <210> 85
 <211> 39
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> VH, Cebador directo de primera ronda
 50 <400> 85
 caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtcaag 39
 <210> 86
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> VH, Cebador directo de primera ronda
 <400> 86
 65 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtaaag 39
 <210> 87
 <211> 39

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 5 <220>
 <223> VH, Cebador directo de primera ronda

 <400> 87
 gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggt gtggtacgg 39

 10 <210> 88
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> VH, Cebador directo de primera ronda

 <400> 88
 20 caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccag 39

 <210> 89
 <211> 39
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> VH, Cebador directo de primera ronda
 30 <400> 89
 gaggtgcagc tggtggagac tggaggaggc ttgatccag 39

 35 <210> 90
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> VH, Cebador directo de primera ronda

 <400> 90
 45 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaag 39

 <210> 91
 <211> 39
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> VH, Cebador directo de primera ronda
 55 <400> 91
 cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaag 39

 60 <210> 92
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 65 <220>
 <223> VH, Cebador directo de primera ronda

 <400> 92
 caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaag 39

5 <210> 93
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> VH, Cebador directo de primera ronda

 <400> 93
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagca 27

 15 <210> 94
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> VH, Cebador directo de primera ronda

 <400> 94
 gaagtgcagc tgggtgcagtc tggagca 27
 25

 30 <210> 95
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> VH, Cebador directo de primera ronda

 35 <400> 95
 caggtacagc tgcagcagtc agg 23

 40 <210> 96
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> VH, Cebador directo de segunda ronda

 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (1)..(9)
 <223> n es a, c, g, o t

 <400> 96
 nnnnnnnnna agcggccgcc accatggccc aggtkcagct ggtgcag 47
 55

 <210> 97
 <211> 47
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> VH, Cebador directo de segunda ronda

 65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(9)

<223> n e s a, c, g, o t
 <400> 97
 5 nnnnnnnnna agcggccgcc accatggccc aggtccagct tgtgcag 47
 <210> 98
 <211> 47
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> VH, Cebador directo de segunda ronda
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(9)
 <223> n e s a, c, g, o t
 20
 <400> 98
 nnnnnnnnna agcggccgcc accatggccc aggtccagct ggtacag 47
 25 <210> 99
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> VH, Cebador directo de segunda ronda
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (1)..(9)
 <223> n e s a, c, g, o t
 <400> 99
 40 nnnnnnnnna agcggccgcc accatggccc aratgcagct ggtgcag 47
 <210> 100
 <211> 47
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> VH, Cebador directo de segunda ronda
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(9)
 55 <223> n e s a, c, g, o t
 <400> 100
 nnnnnnnnna agcggccgcc accatggccc aggtccagct ggtacag 47
 60
 <210> 101
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>
 <223> VH, Cebador directo de segunda ronda

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(9)
 5 <223> n es a, c, g, o t

 <400> 101
 nnnnnnnnna agcggccgcc accatggccc agrtcacctt gaaggag 47

 10 <210> 102
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> VH, Cebador directo de segunda ronda

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(9)
 <223> n es a, c, g, o t

 25 <400> 102
 nnnnnnnnna agcggccgcc accatggccg aggtgcagct ggtggag 47

 30 <210> 103
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> VH, Cebador directo de segunda ronda

 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(9)
 <223> n es a, c, g, o t

 45 <400> 103
 nnnnnnnnna agcggccgcc accatggccc aggtgcagct ggtggag 47

 50 <210> 104
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>
 <223> VH, Cebador directo de segunda ronda

 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(9)
 <223> n es a, c, g, o t

 65 <400> 104
 nnnnnnnnna agcggccgcc accatggccc aggtgcagct gcaggag 47

 <210> 105
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VH, Cebador directo de segunda ronda
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(9)
 <223> n es a, c, g, o t
 10
 <400> 105
 nnnnnnnnna agcggccgcc accatggccc agctgcagct gcaggag 47
 15
 <210> 106
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> VH, Cebador directo de segunda ronda
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(9)
 <223> n es a, c, g, o t
 30
 <400> 106
 nnnnnnnnna agcggccgcc accatggccc aggtgcagct acagcag 47
 35
 <210> 107
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> VH, Cebador directo de segunda ronda
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(9)
 <223> n es a, c, g, o t
 50
 <400> 107
 nnnnnnnnna agcggccgcc accatggccg aggtgcagct ggtgcag 47
 55
 <210> 108
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> VH, Cebador directo de segunda ronda
 65
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(9)
 <223> n es a, c, g, o t
 70
 <400> 108
 nnnnnnnnna agcggccgcc accatggccg aagtcagct ggtgcag 47

<210> 109
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> VH, cebador directo de segunda ronda
 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(9)
 <223> n es a, c, g, o t
 15 <400> 109
 nnnnnnnna agcggccgcc accatggccc aggtacagct gcagcag 47
 20 <210> 110
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> VH, cebador inverso de primera ronda
 <400> 110
 tgaggagacr gtgaccaggg tg 22
 30 <210> 111
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> VH, cebador inverso de primera ronda
 <400> 111
 40 tgaagagacg gtgaccattg t 21
 45 <210> 112
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> VH, cebador inverso de primera ronda
 50 <400> 112
 tgaggagacg gtgaccaggg tt 22
 55 <210> 113
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> VH, cebador inverso de primera ronda
 <400> 113
 65 tgaggagacg gtgaccgtgg tcc 23
 <210> 114
 <211> 37

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> VH, Cebador inverso de segunda ronda
 <400> 114
 gccactagtg agtcgacact gaggagacrg tgaccag 37
 10
 <210> 115
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> VH, Cebador inverso de segunda ronda
 <400> 115
 20 gccactagtg agtcgacact gaagagacgg tgaccat 37
 <210> 116
 <211> 37
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> VH, Cebador inverso de segunda ronda
 30
 <400> 116
 gccactagtg agtcgacact gaggagacgg tgaccag 37
 35
 <210> 117
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> VH, Cebador inverso de segunda ronda
 <400> 117
 45 gccactagtg agtcgacact gaggagacgg tgaccgt 37
 50

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para crear un sistema de proteínas de dimerización inducido químicamente que comprende:
 - a. seleccionar un dominio de unión de anticuerpo metatipo (AB2) que se une a una parte de un primer dominio de unión de anticuerpo (AB1), pero solo cuando AB1 se une a una molécula pequeña para formar un complejo AB1/molécula pequeña; y
 - b. expresar AB1 como una proteína de fusión con una primera molécula efectora y expresar AB2 como una proteína de fusión con una segunda molécula efectora.
2. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que AB1 y/o AB2 son fragmentos de dominios de unión a anticuerpo, preferiblemente en el que los fragmentos de dominios de unión a anticuerpo son fragmentos solo de cadena pesada (VHH) o un fragmento de anticuerpo de cadena única (scFV), más preferiblemente, en el que el scFV consiste esencialmente en una cadena pesada variable y una cadena ligera variable.
3. Procedimiento de la reivindicación 1 o 2, que comprende además:
 - seleccionar AB1; y/o
 - seleccionar la molécula pequeña.
4. Procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la selección se basa en confirmar la unión de AB2 al complejo de AB1/molécula pequeña y/o la unión de AB1 a la molécula pequeña.
5. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que AB1 y la molécula pequeña se unen con alta afinidad para formar el complejo AB1/molécula pequeña.
6. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además humanizar AB2 y/o AB1, preferiblemente, en el que la humanización reduce la inmunogenicidad de AB2 y/o AB1 en un sujeto humano.
7. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además optimizar AB2 y/o AB1 para aumentar la afinidad de unión entre AB1 y la molécula pequeña, para aumentar la afinidad de unión entre AB2 y el complejo AB1/molécula pequeña; y/o para aumentar la semivida in vivo de AB2 y/o AB1.
8. Procedimiento de la reivindicación 6 o 7, que comprende además confirmar que la afinidad de unión entre AB2 y el complejo AB1/molécula pequeña y entre AB1 y la molécula pequeña no ha sido reducida por la humanización u optimización.
9. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-8:
 - que comprende además unir la molécula pequeña a una proteína o sustrato sólido, preferiblemente, que comprende además confirmar que AB1 no se une a la proteína o sustrato sólido; y/o
 - que comprende:
 - transcribir de forma inversa ARN de células B que han sido aisladas de un animal en ADNc; y/o
 - amplificar ADNc transcrito de forma inversa a partir de ARN de células B que han sido aisladas de un animal.
10. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende ligar el ADNc que codifica AB1 o AB2 en un vector de cribado.
11. Procedimiento de la reivindicación 10, que comprende transfectar el vector de cribado en células de una colonia de crecimiento, preferiblemente, en el que las células de la colonia de crecimiento son *E. coli* electrocompetentes.
12. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-11:
 - en el que se identifican los dominios de unión a anticuerpo AB1 que han sido formados por un animal en respuesta a la inmunización, y en el que dicha identificación incluye el cribado de células transfectadas de la reivindicación 11 en busca de dominios de unión que se unen específicamente a la molécula pequeña con alta afinidad; y/o
 - en el que la primera y/o segunda molécula efectora es una proteína del dominio de unión al ADN, una proteína del dominio de activación de la transcripción, una proteína del dominio represor de la transcripción, una parte intracelular de un receptor, un receptor intracelular, una caspasa, una quinasa, una enzima o una proteasa.
13. Cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión del dominio de unión a anticuerpo (AB1), una proteína de fusión del dominio de unión a anticuerpo metatipo (AB2) y una molécula pequeña de un sistema de proteínas de dimerización inducido químicamente, en la que AB2 se une a una parte de AB1, pero solo cuando AB1 se une a una molécula pequeña para formar un complejo de AB1/molécula pequeña, en el que la proteína de fusión AB1 comprende AB1 y una primera molécula efectora y la proteína de fusión AB2 comprende AB2 y una segunda molécula efectora, para usar en un procedimiento de tratamiento de una afección mediante la regulación de eventos celulares, comprendiendo el procedimiento administrar la cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión AB1 y la proteína de fusión AB2 del sistema de proteínas de dimerización inducido químicamente a un sujeto y administrar de forma controlada la cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula pequeña del sistema al sujeto, tratando así la afección mediante la regulación de eventos celulares.

14. Cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión AB1, la proteína de fusión AB2 y la molécula pequeña de un sistema de proteínas de dimerización inducido químicamente para usar según la reivindicación 13:
- 5 en la que la primera y/o segunda molécula efectora es una proteína del dominio de unión a ADN, una proteína del dominio de activación de la transcripción, una proteína del dominio represor de la transcripción, una parte intracelular de un receptor, un receptor intracelular, una caspasa, una quinasa, una enzima o una proteasa; y/o
- 10 en la que el evento celular regulado es la expresión génica, la señalización del receptor intracelular y/o la muerte celular, y/o
- en la que la afección se selecciona entre: cáncer, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, SIDA, una alteración o déficit sensorial, parálisis, entumecimiento, una enfermedad desmielinizante, una enfermedad metabólica, una enfermedad autoinmune, una enfermedad neurológica, una afección cardíaca, diabetes, rechazo de órganos o tejidos, quemaduras, un trastorno de la piel y un trastorno óseo.
15. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-12 o una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión AB1, la proteína de fusión AB2 y la molécula pequeña de un sistema de proteínas de dimerización inducido químicamente para usar según la reivindicación 13 o 14, en los que AB1 es solo una cadena pesada (VHH) o un fragmento variable de cadena única (scFv).
- 15

FIG. 1A

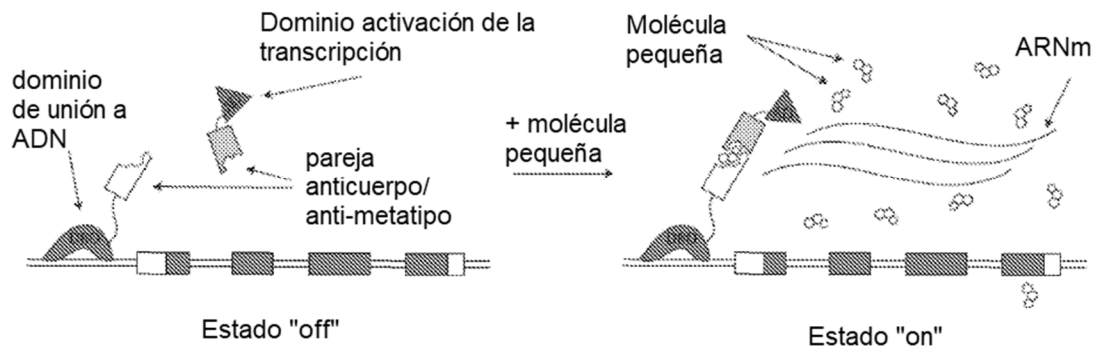


FIG. 1B

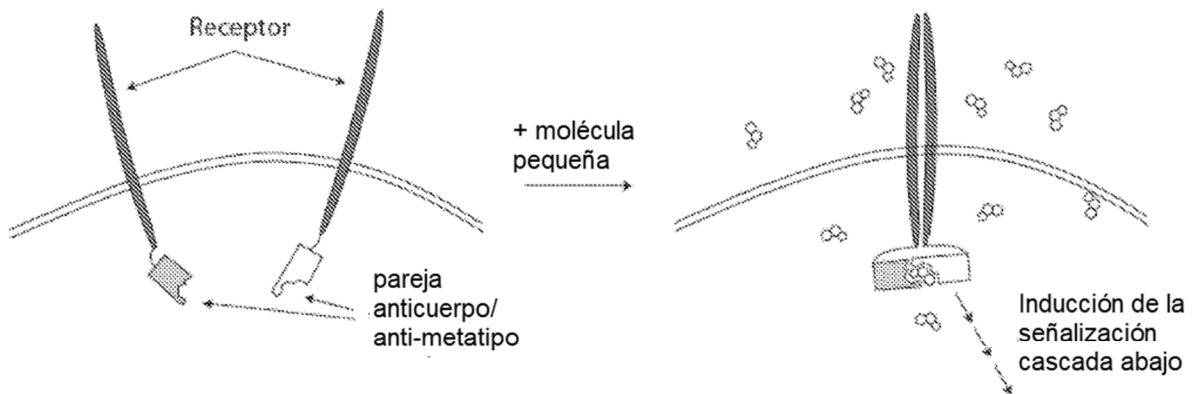


FIG. 1C

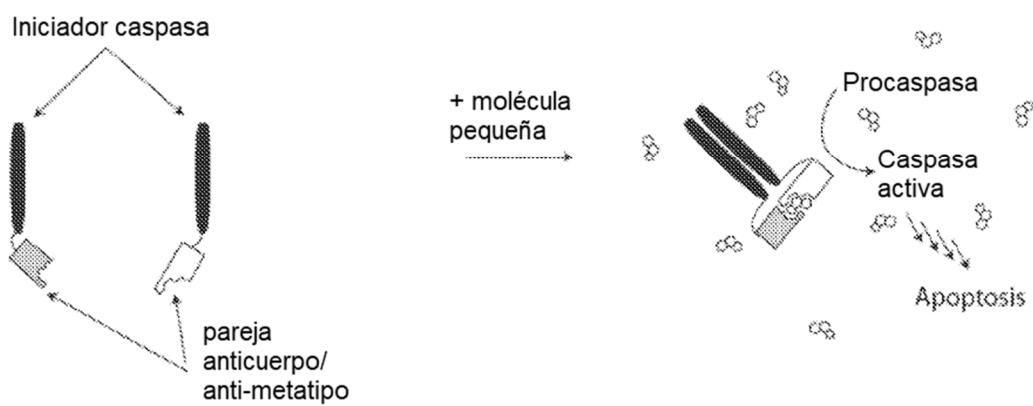


FIG. 2A

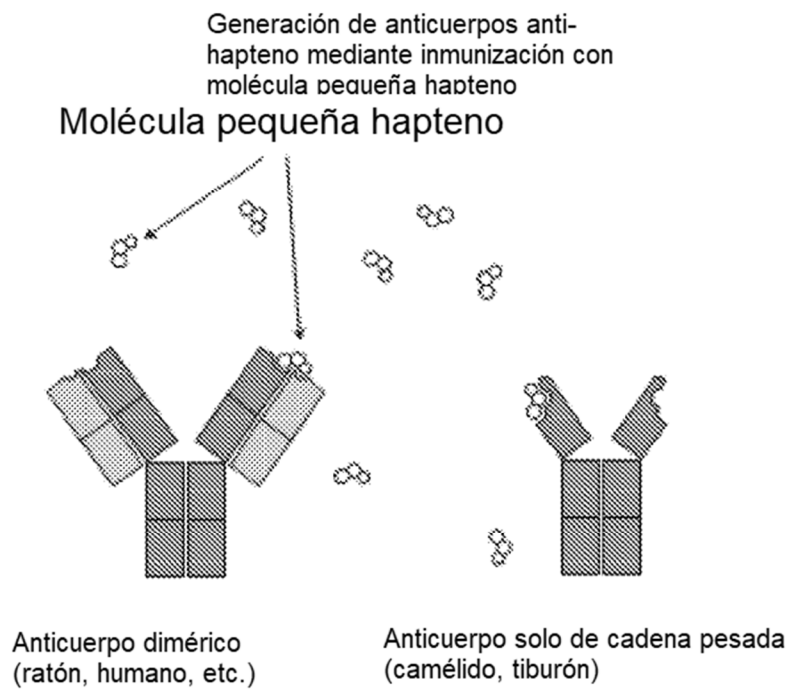


FIG. 2B

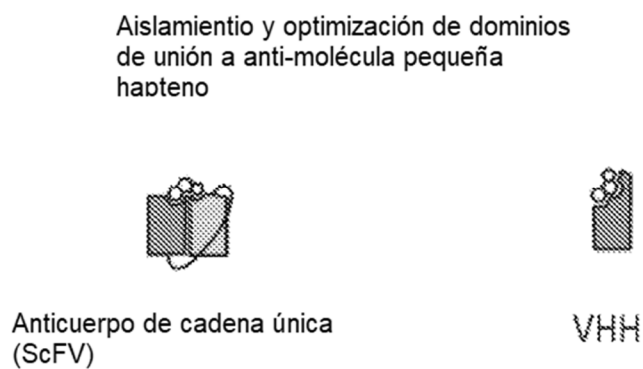


FIG. 2C

Inmunización de animal con VHH o scFv
complejados con molécula pequeña hapteno
para generar anticuerpos anti-metatipo

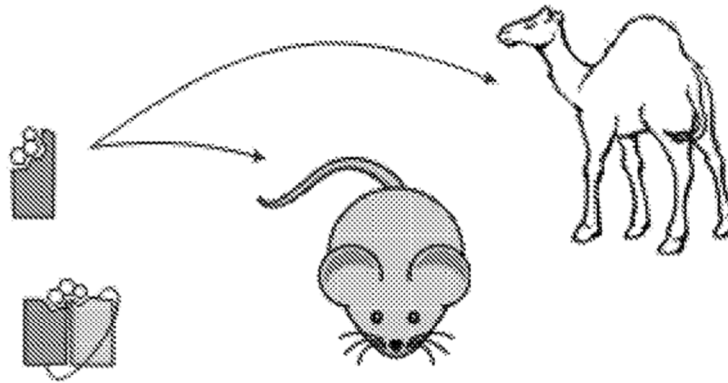


FIG. 2D

Aislamiento y optimización de
dominios de unión de anticuerpo
anti-metatipo (scFv o VHH)

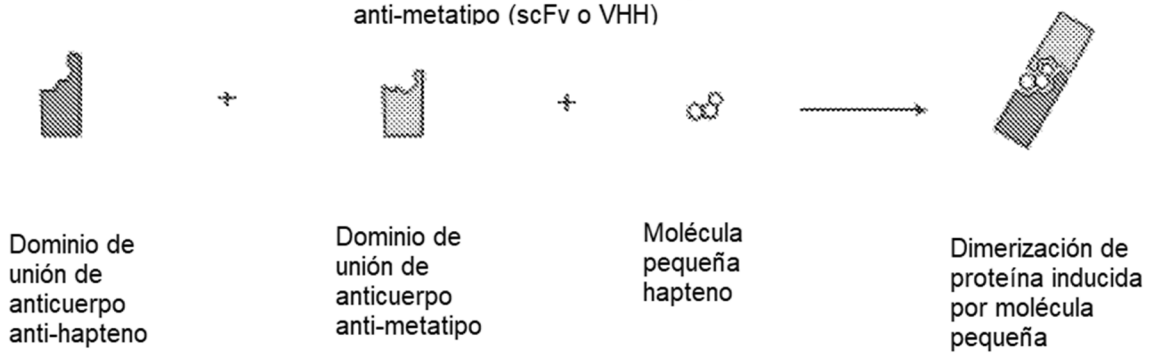


FIG. 3

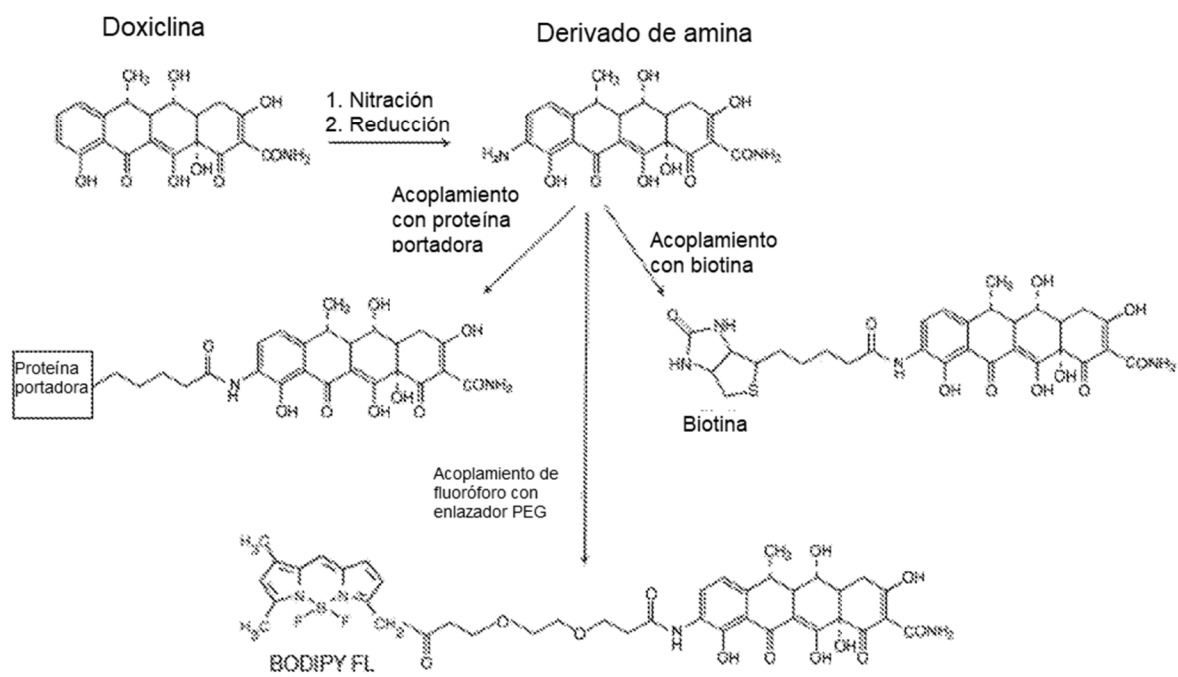


FIG. 4A

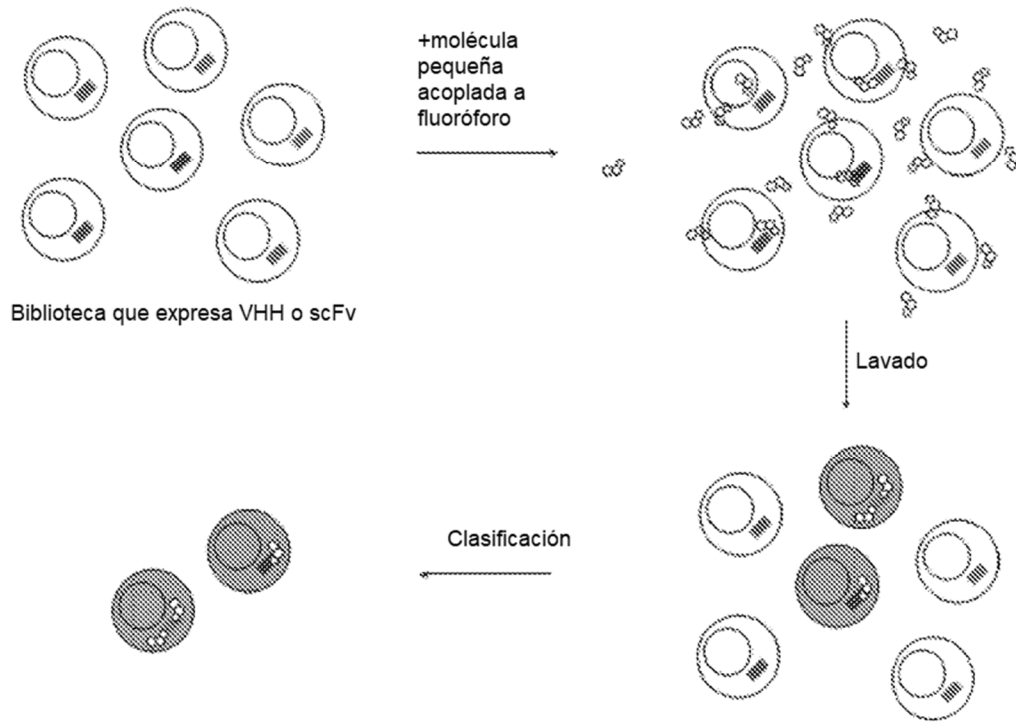


FIG. 4B

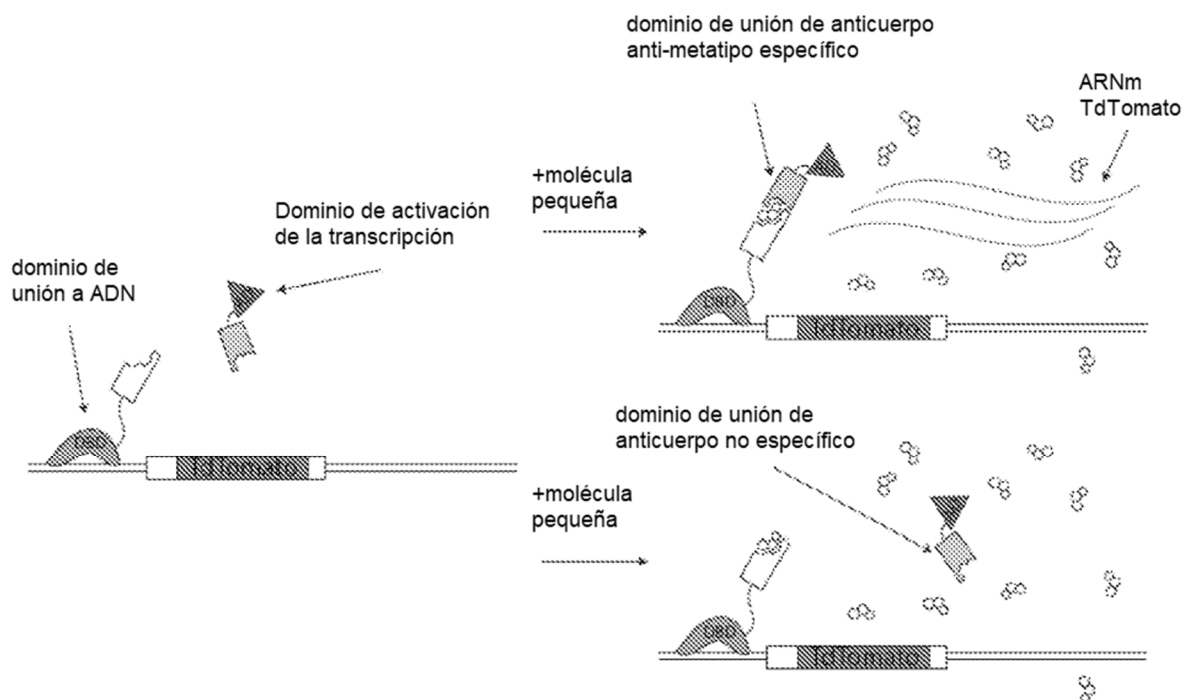


FIG. 5A

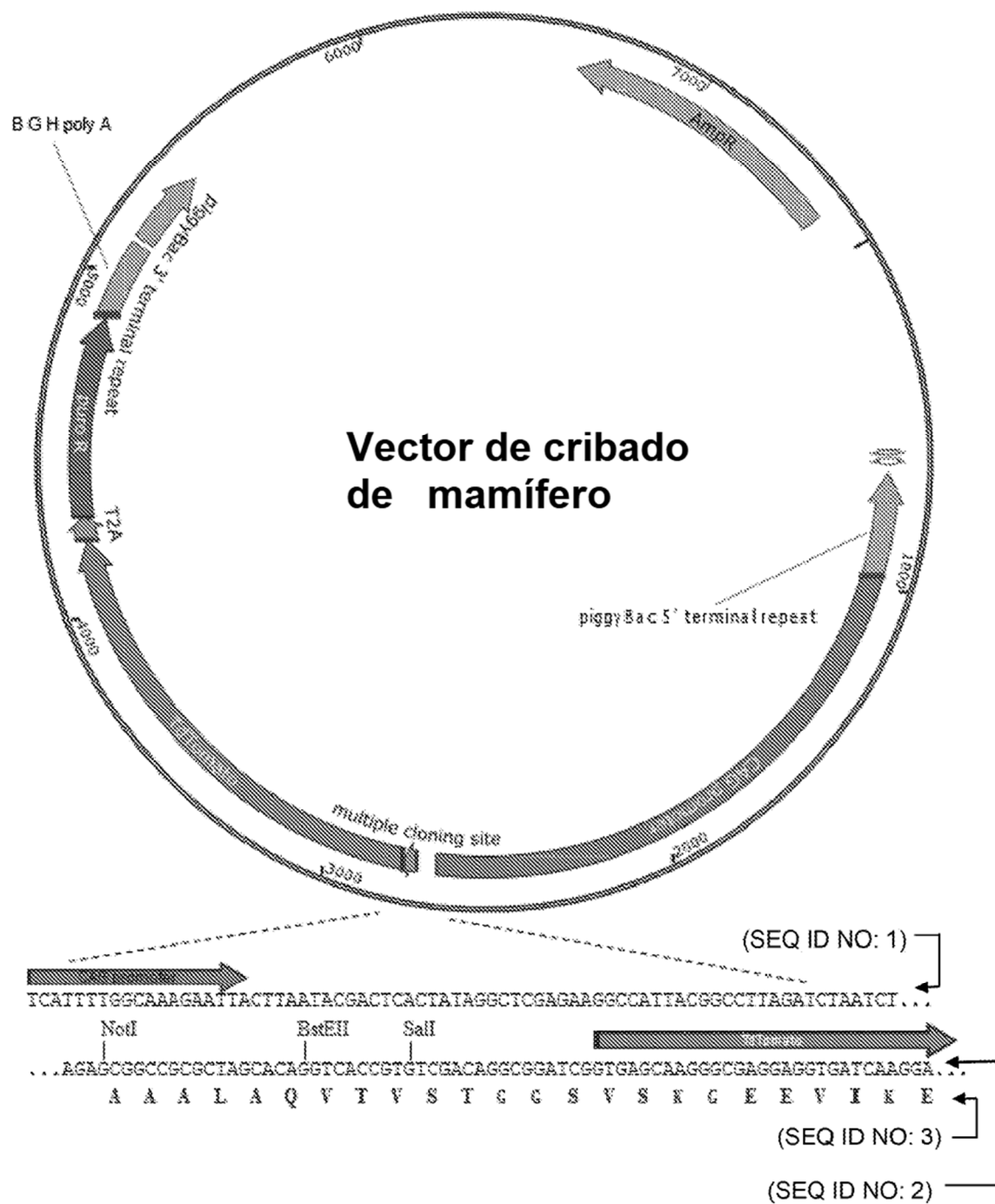


FIG. 5B

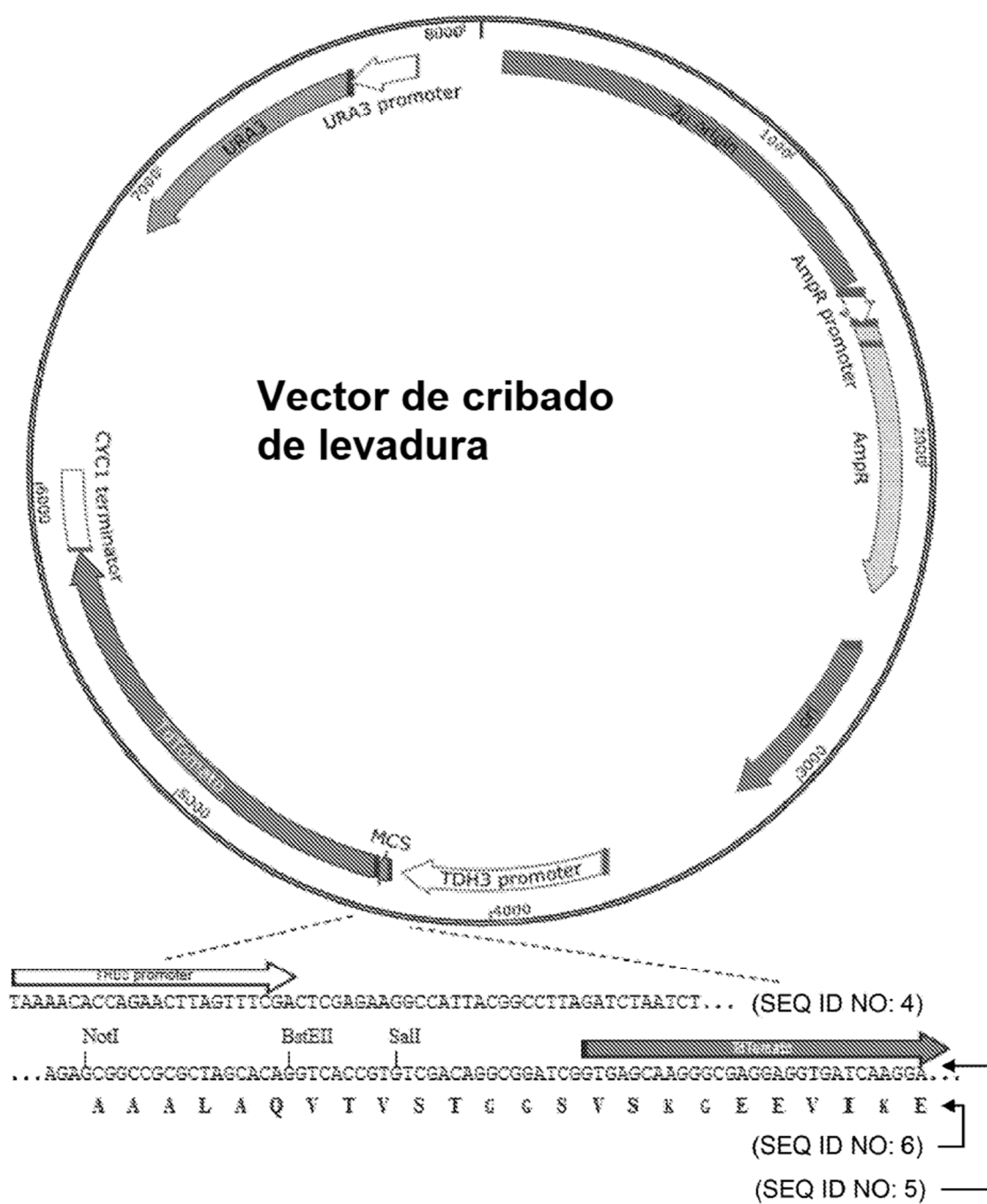


FIG. 6

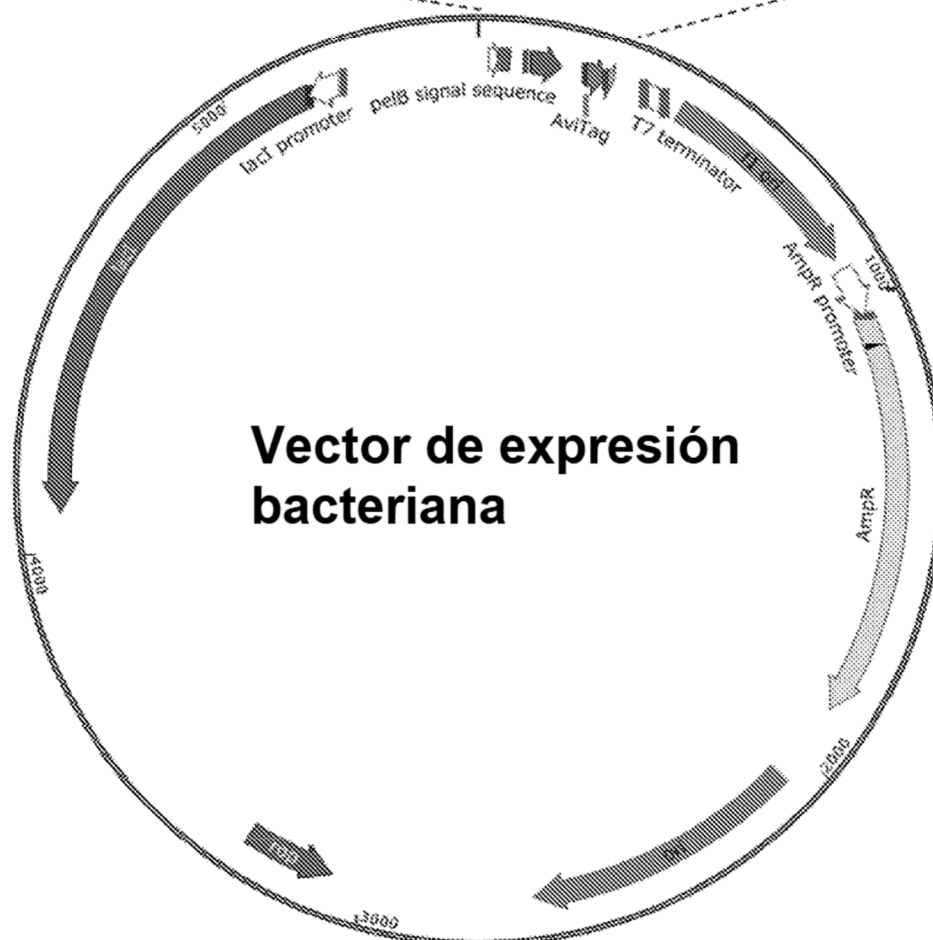
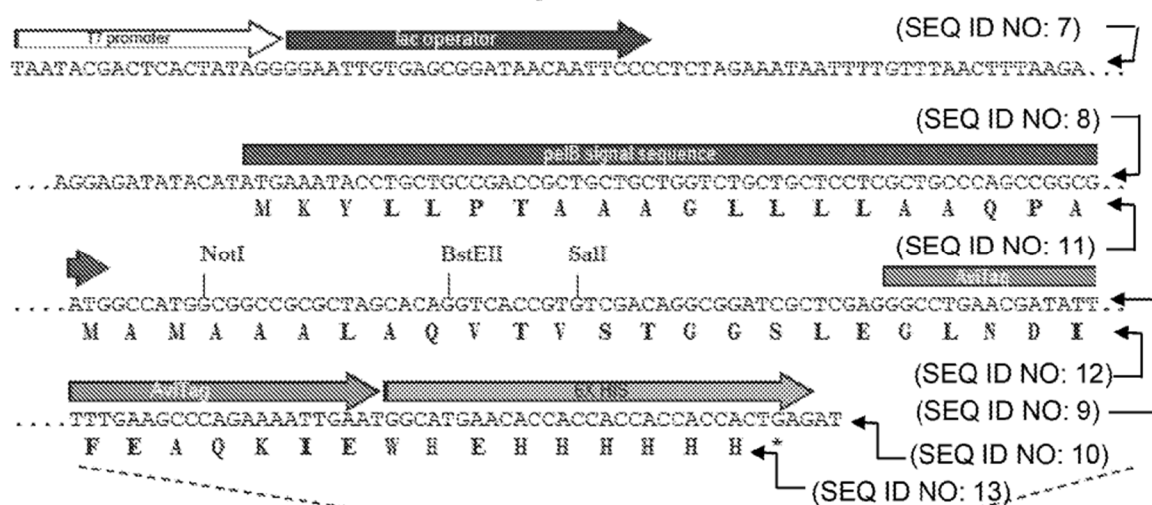


FIG. 7A

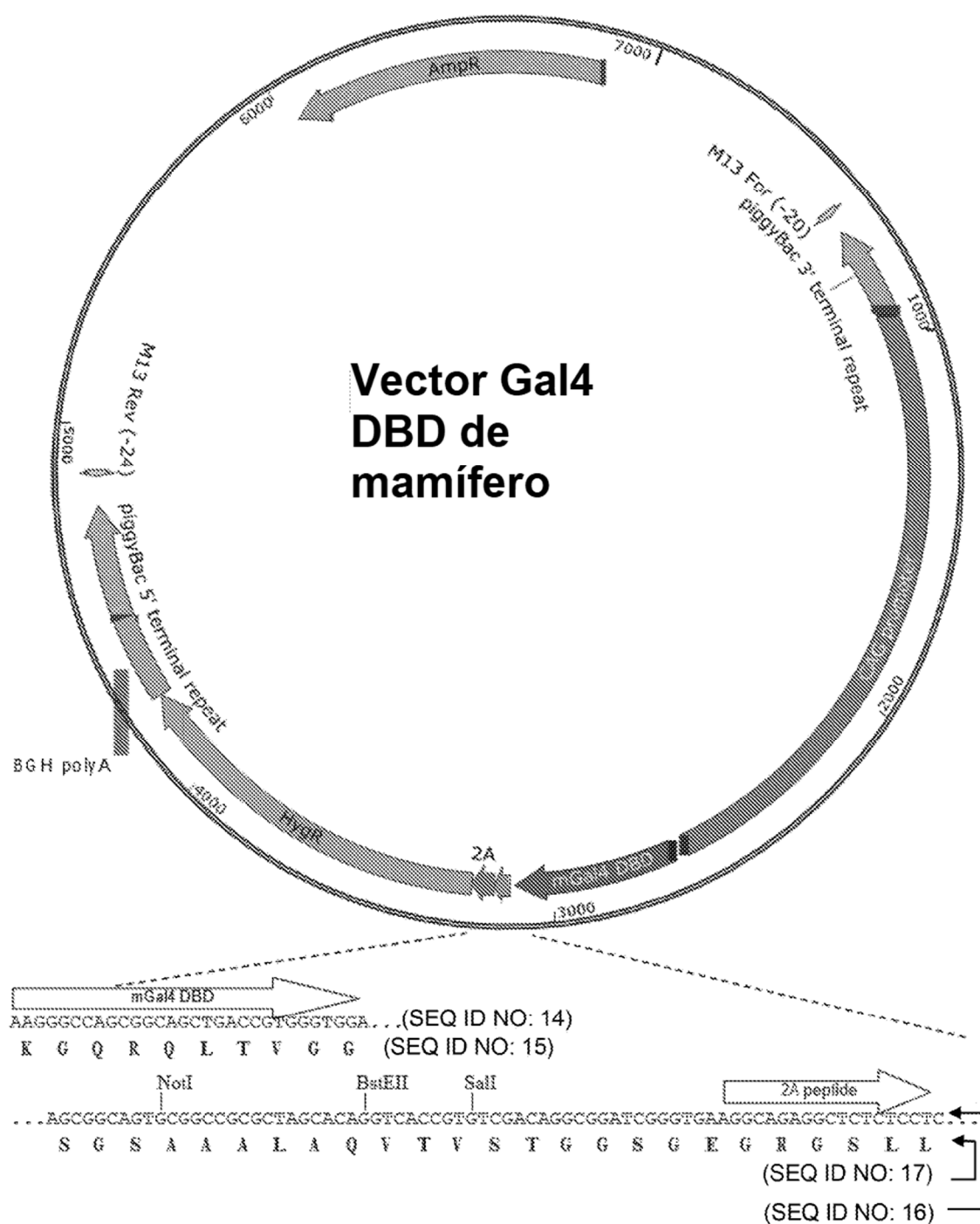


FIG. 7B

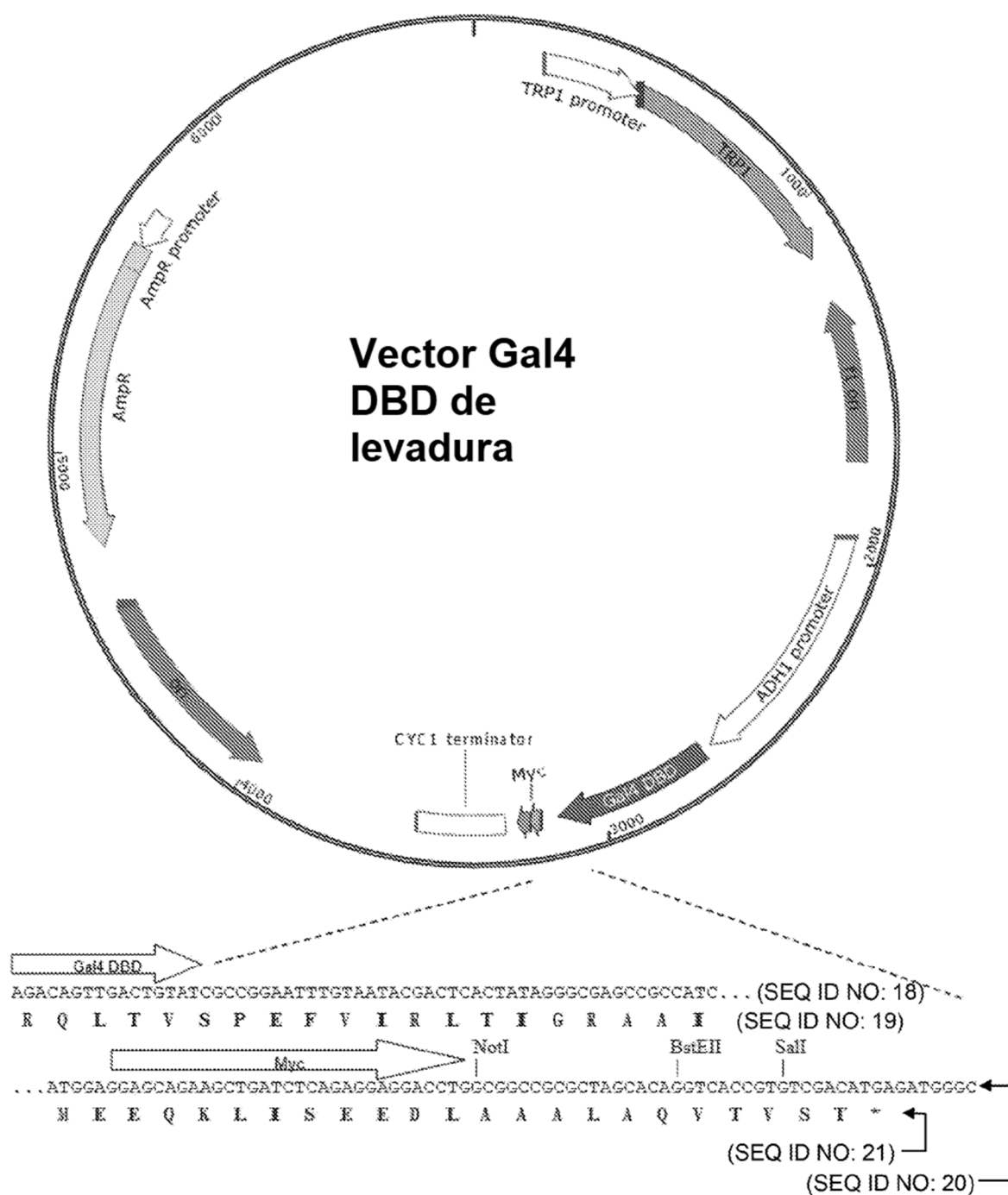


FIG. 8A

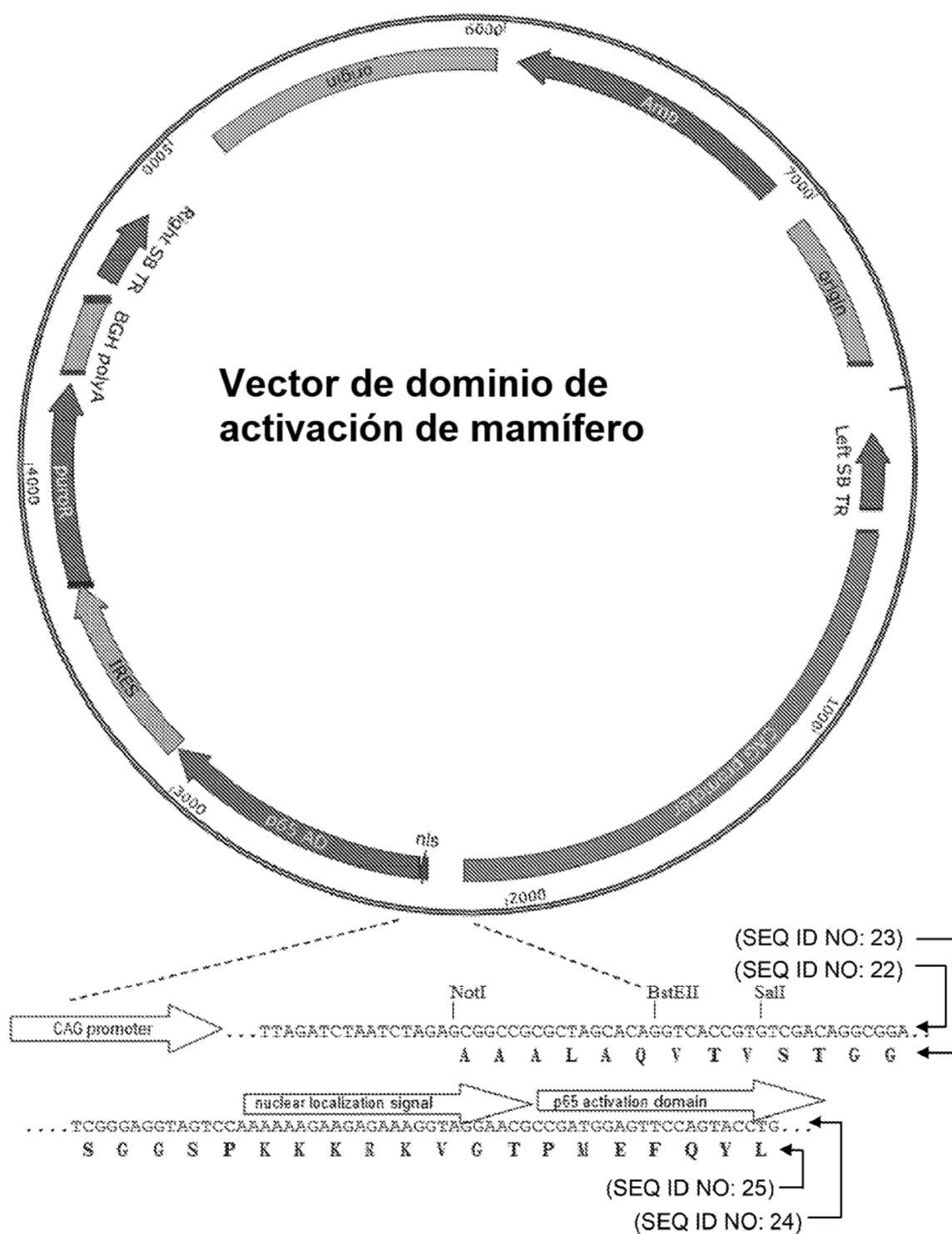


FIG. 8B

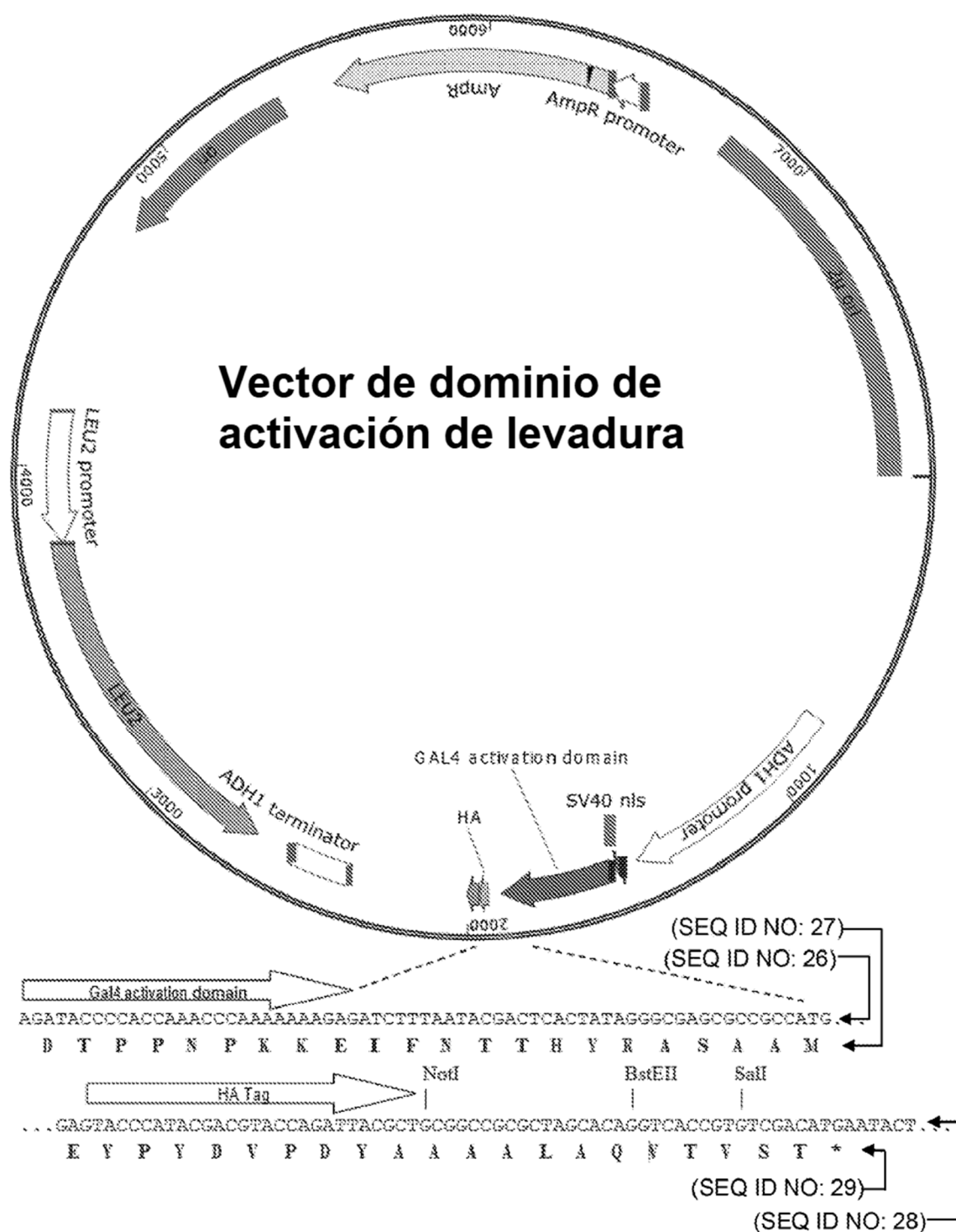


FIG. 9

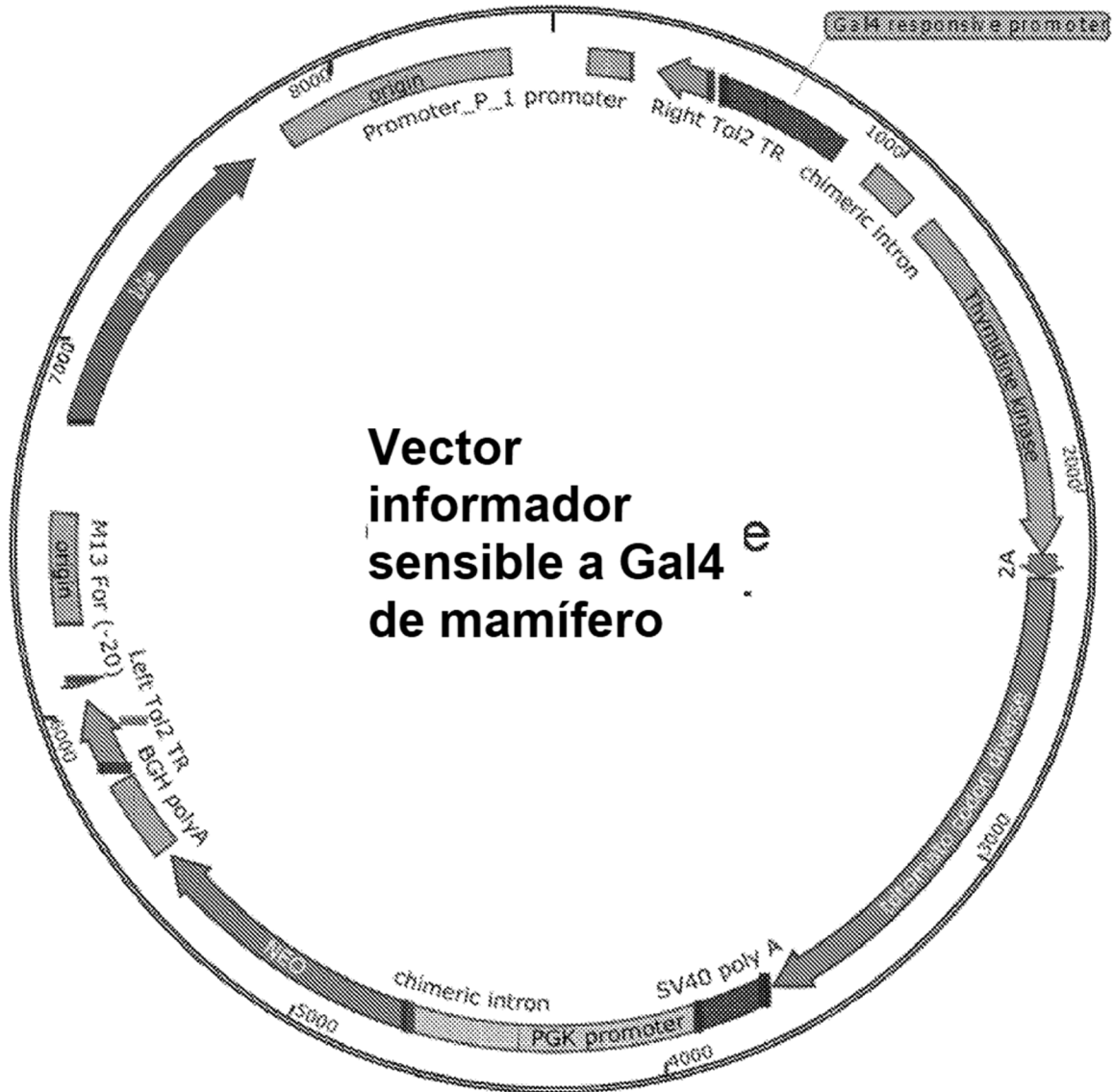


FIG. 9, cont.

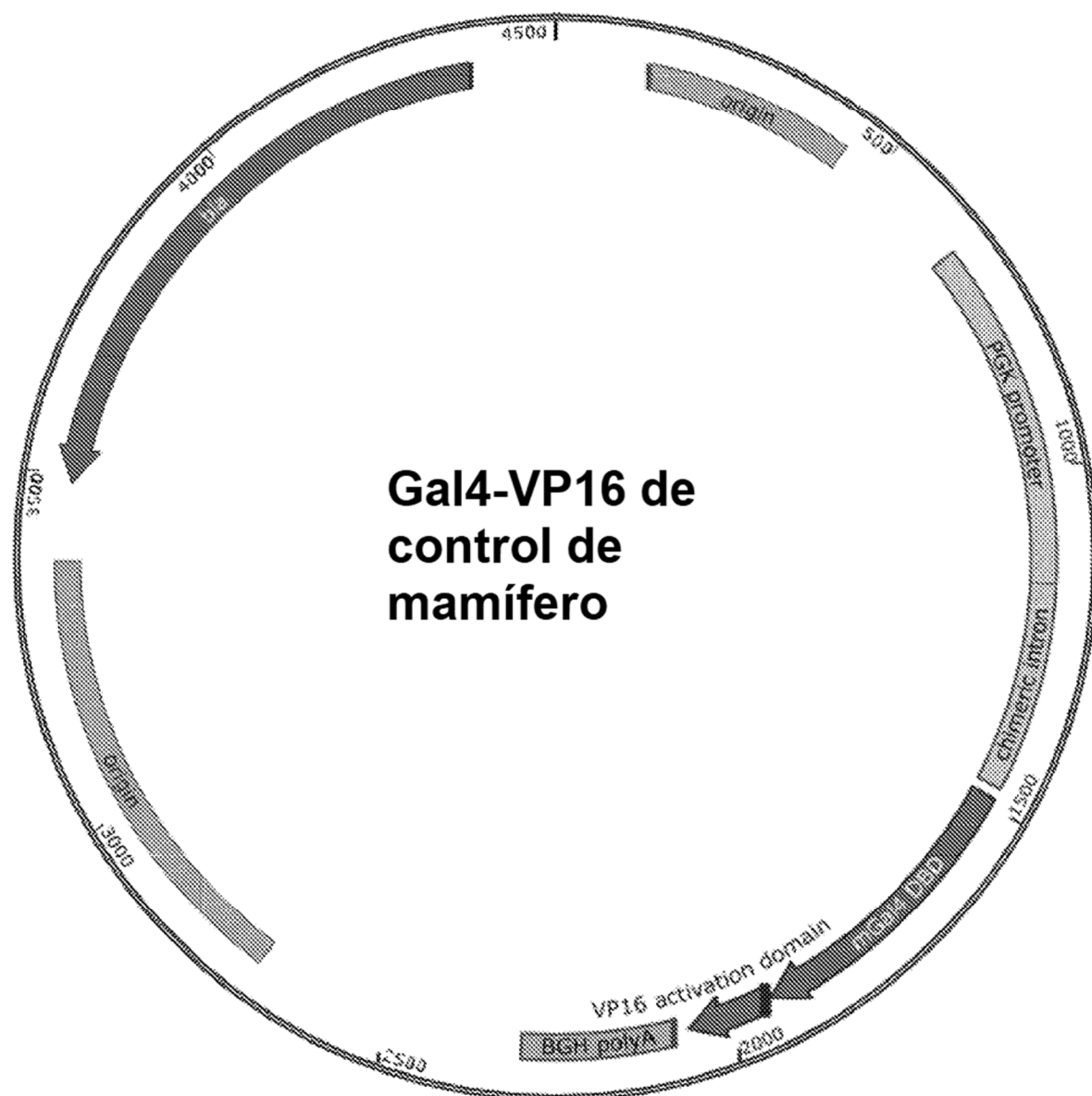


FIG. 10A

Camello/Llama VHH	Nombre de cebador	Secuencia
1ª Ronda PCR	Directo	GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG (SEQ ID NO: 30)
	Inverso	GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC (SEQ ID NO: 31)
2ª Ronda PCR	Directo	NNNNNNNNNGCGGCCGCCACCATGGATGT GCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG (SEQ ID NO: 32) O/ALTERNATIVA NNNNNNNNNGCGGCCGCCACCATGGCTSA KGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG (SEQ ID NO: 33)
	Inverso	NNNNNNNNNCTGGAGACGGTGACCTGGGT (SEQ ID NO: 34)

FIG. 10B

Alpaca VHH	Nombre de cebador	Secuencia
1ª Ronda PCR	Directo	GGTGGTCCTGGCTGC (SEQ ID NO: 35)
	Inverso	GATCACTAGTGGGGTCTTCGCTGTGGTG CG (SEQ ID NO: 36)
2ª Ronda PCR	Directo	NNNNNNNNNGCGGCCGCCACCATGGCT CAGKTGCAGCTCGTGGAGTCNGGNGG (SEQ ID NO: 37)
	Inverso	NNNNNNNNNCTGGAGACGGTGACCTGG GT (SEQ ID NO: 38)

FIG. 10C

Cebadores de amplificación de ADN genómico		
	Nombre del cebador	Secuencia
	promtoor CAG For (vector de mamífero)	CTACAGCTCCTGGGCAACGTG (SEQ ID NO: 39)
	TdTomato Rev (vector de mamífero y levadura)	TGATCACCTCCTCGCCCTTGCTC AC (SEQ ID NO: 40)
	Promotor TDH3 For (vector de levadura)	ACACCAGAACTTAGTTTCGACTC G (SEQ ID NO: 41)
	p65 AD Rev (vector de mamífero)	GGCAGGTACTGGAACCTCCATCG (SEQ ID NO: 42)

FIG. 10D

Secuenciación del vector de expresión bacteriana		
	Nombre del cebador	Secuencia
	Cebador de promotor T7	TAATACGACTCACTATAGG (SEQ ID NO: 43)
	Cebador de secuenciación inversa	GTGGTGGTGTTCATGCCATTC (SEQ ID NO: 44)

FIG. 11

scFv humana	Nombre cebador	Secuencia
Cebadores VH, sentido 5', enlazador largo		
	HSCVH1-FL	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTG GCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGCAGGTG CAGCTGGTGCAGTCTGG (SEQ ID NO: 45)
	HSCVH2-FL	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTG GCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGCAGATCA CCTTGAAGGAGTCTGG (SEQ ID NO: 46)
	HSCVH35-FL	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTG GCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGGAGGTG CAGCTGGTGSAGTCTGG (SEQ ID NO: 47)
	HSCVH3a-FL	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTG GCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGGAGGTG CAGCTGKTGGAGTCTG (SEQ ID NO: 48)
	HSCVH4-FL	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTG GCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGCAGGTG CAGCTGCAGGAGTCGGG (SEQ ID NO: 49)
	HSCVH4a-FL	GGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTG GCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGCAGGTG CAGCTACAGCAGTGGGG (SEQ ID NO: 50)
cebadores VH, enlazador largo inverso 3'		
	HSCG1234-B (correspondiente a isotipos 1-4 de IgG)	GCCACTAGTGAGTCGACACGACCGATGGGC CCTTGGTGGARGC (SEQ ID NO: 51)
	HSCM-B (correspondiente a dominio CH1 de IgM humana)	GCCACTAGTGAGTCGACACAAGGGTTGGGG CGGATGCACTCCC (SEQ ID NO: 52)
	HSCA-B (correspondiente a dominio CH1 de IgA humana)	GCCACTAGTGAGTCGACACGACCTTGGGGC TGGTCGGGGATGC (SEQ ID NO: 53)
	HSCD-B (correspondiente a dominio CH1 de IgD humana)	GCCACTAGTGAGTCGACACCACATCCGGAG CCTTGGTGGGTGC (SEQ ID NO: 54)
	HSCE-B (correspondiente a dominio CH1 de IgE humana)	GCCACTAGTGAGTCGACACGACGGATGGGC TCTGTGTGGAGGC (SEQ ID NO: 55)

FIG. 11, cont.

Cebadores Vk, enlazador largo sentido 5'		
	HSCk1-F	AAGCGGCCGCCACCATGGTGCAGATGACCCA GTCTCC (SEQ ID NO: 56)
	HSCk24-F	AAGCGGCCGCCACCATGGTGGTGTGATGACYCA GTCTCC (SEQ ID NO: 57)
	HSCk3-F	AAGCGGCCGCCACCATGGTGGTGTGWTGACRCA GTCTCC (SEQ ID NO: 58)
	HSCk5-F	AAGCGGCCGCCACCATGGTGACACTCACGCA GTCTCC (SEQ ID NO: 59)
Cebadores Vk, enlazador largo inverso 3'		
	HSCJK14o-B	GGAAGATCTAGAGGAACCACCTTTGATYTCCA CCTTGGTCCC (SEQ ID NO: 60)
	HSCJK2o-B	GGAAGATCTAGAGGAACCACCTTTGATCTCCA GCTTGGTCCC (SEQ ID NO: 61)
	HSCJK3o-B	GGAAGATCTAGAGGAACCACCTTTGATATCCA CTTTGGTCCC (SEQ ID NO: 62)
	HSCJK5o-B	GGAAGATCTAGAGGAACCACCTTTAATCTCCA GTCGTGTCCC (SEQ ID NO: 63)
Cebadores Vlamba, enlazador largo sentido 5'		
	HSCLam1a	AAGCGGCCGCCACCATGGTGGTGBTGACGCA GCCGCCCTC (SEQ ID NO: 64)
	HSCLam1b	AAGCGGCCGCCACCATGGTGGTGTGACTCA GCCACCCTC (SEQ ID NO: 65)
	HSCLam2	AAGCGGCCGCCACCATGGTGGCCCTGACTCA GCCTCCCTCCGT (SEQ ID NO: 66)
	HSCLam3	AAGCGGCCGCCACCATGGTGTGACTCAGCC ACCCTCAGTGTC (SEQ ID NO: 67)
	HSCLam4	AAGCGGCCGCCACCATGGTGGTGTGACTCA ATCGCCCTC (SEQ ID NO: 68)
	HSCLam6	AAGCGGCCGCCACCATGGTGTGACTGACTCA GCCCCACTC (SEQ ID NO: 69)
	HSCLam78	AAGCGGCCGCCACCATGGTGGTGGTGTGACYCA GGAGCCMTC (SEQ ID NO: 70)
	HSCLam9	AAGCGGCCGCCACCATGGTGGTGTGACTCA GCCACCTTC (SEQ ID NO: 71)
	HSCLam10	AAGCGGCCGCCACCATGGTGGGGCAGACTCA GCAGCTCTC (SEQ ID NO: 72)

FIG. 11, cont.

Cebadores Vlambda, inverso 3', enlazador largo		
	HSCJLam1236	GGAAGATCTAGAGGAACCACCGCCTAGGACGG TCASCTTGGTSCC (SEQ ID NO: 73)
	HSCJLam4	GGAAGATCTAGAGGAACCACCGCCTAAAATGAT CAGCTGGGTTC (SEQ ID NO: 74)
	HSCJLam57	GGAAGATCTAGAGGAACCACCGCCGAGGACGG TCAGCTSGGTSCC (SEQ ID NO: 75)
Cebadores de extensión solapados		
	RSC-F (directo)	NNNNNNNNNAAGCGGCCGCCACCATGGTG (SEQ ID NO: 76)
	RSC-B (inverso)	NNNNNNNNNGCCACTAGTGAGTCGACAC (SEQ ID NO: 77)

FIG. 12

Cadena pesada humana solo (VHH)	Nombre de cebador	Secuencia
Cebadores VH, 1ª ronda directa		
	VH1.1b 1°	CAGGTKCAGCTGGTGCAGTCTGGGGC (SEQ ID NO: 78)
	VH1.2 1°	CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGG (SEQ ID NO: 79)
	VH1.3 1°	CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGG (SEQ ID NO: 80)
	VH1.4 1°	CARATGCAGCTGGTGCAGTCTGG (SEQ ID NO: 81)
	VH1.5 1°	GAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGG (SEQ ID NO: 82)
	VH2 1°	CAGRTCACCTGAAGGAGTCTGG (SEQ ID NO: 83)
	VH3-1L 1°	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCT TGGTCCAG (SEQ ID NO: 84)
	VH3-2L 1°	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCT TGGTCAAG (SEQ ID NO: 85)
	VH3-3L 1°	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCT TGGTAAAG (SEQ ID NO: 86)
	VH3-4L 1°	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTG TGGTACGG (SEQ ID NO: 87)
	VH3-5L 1°	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCG TGGTCCAG (SEQ ID NO: 88)
	VH3-6L 1°	GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGAGGAGGCT TGATCCAG (SEQ ID NO: 89)
	VH4-1L 1°	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGAC TGGTGAAG (SEQ ID NO: 90)
	VH4-2L 1°	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGAC TGGTGAAG (SEQ ID NO: 91)
	VH4-3L 1°	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGAC TGTTGAAG (SEQ ID NO: 92)
	VH5.1b 1°	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCA (SEQ ID NO: 93)
	VH5.2b 1°	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCA (SEQ ID NO: 94)
	VH6 1°	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGG (SEQ ID NO: 95)

FIG. 12, cont.

Cebadores VH, 2ª Ronda Directa		
	VH1.1b 2°	NNNNNNNNNAAGCGGCCGCCACCATGGCCC AGGTKCAGCTGGTGCAG (SEQ ID NO: 96)
	VH1.2 2°	NNNNNNNNNAAGCGGCCGCCACCATGGCCC AGGTCCAGCTTGTGCAG (SEQ ID NO: 97)
	VH1.3 2°	NNNNNNNNNAAGCGGCCGCCACCATGGCCC AGGTCCAGCTGGTACAG (SEQ ID NO: 98)
	VH1.4 2°	NNNNNNNNNAAGCGGCCGCCACCATGGCCC ARATGCAGCTGGTGCAG (SEQ ID NO: 99)
	VH1.5 2°	NNNNNNNNNAAGCGGCCGCCACCATGGCCG AGGTCCAGCTGGTACAG (SEQ ID NO: 100)
	VH2 2°	NNNNNNNNNAAGCGGCCGCCACCATGGCCC AGRTCACCTTGAAGGAG (SEQ ID NO: 101)
	VH3-1,3,4,6L 2°	NNNNNNNNNAAGCGGCCGCCACCATGGCCG AGGTGCAGCTGGTGGAG (SEQ ID NO: 102)
	VH3-2,5L 2°	NNNNNNNNNAAGCGGCCGCCACCATGGCCC AGGTGCAGCTGGTGGAG (SEQ ID NO: 103)
	VH4-1L 2°	NNNNNNNNNAAGCGGCCGCCACCATGGCCC AGGTGCAGCTGCAGGAG (SEQ ID NO: 104)
	VH4-2L 2°	NNNNNNNNNAAGCGGCCGCCACCATGGCCC AGCTGCAGCTGCAGGAG (SEQ ID NO: 105)
	VH4-3L 2°	NNNNNNNNNAAGCGGCCGCCACCATGGCCC AGGTGCAGCTACAGCAG (SEQ ID NO: 106)
	VH5.1b 2°	NNNNNNNNNAAGCGGCCGCCACCATGGCCG AGGTGCAGCTGGTGCAG (SEQ ID NO: 107)
	VH5.2b 2°	NNNNNNNNNAAGCGGCCGCCACCATGGCCG AAGTGCAGCTGGTGCAG (SEQ ID NO: 108)
	VH6 2°	NNNNNNNNNAAGCGGCCGCCACCATGGCCC AGGTACAGCTGCAGCAG (SEQ ID NO: 109)

FIG. 12, cont.

Cebadores VH, primera ronda inversa		
	JH1-2 1°	TGAGGAGACRGTGACCAGGGTG (SEQ ID NO: 110)
	JH3 1°	TGAAGAGACGGTGACCATTGT (SEQ ID NO: 111)
	JH4-5 1°	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTT (SEQ ID NO: 112)
	JH6 1°	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCC (SEQ ID NO: 113)
Cebadores VH, segunda ronda inversa		
	JH1 2°	GCCACTAGTGAGTCGACACTGAGGAGACRGTGA CCAG (SEQ ID NO: 114)
	JH3 2°	GCCACTAGTGAGTCGACACTGAAGAGACGGTGA CCAT (SEQ ID NO: 115)
	JH4-5 2°	GCCACTAGTGAGTCGACACTGAGGAGACGGTGA CCAG (SEQ ID NO: 116)
	JH6 2°	GCCACTAGTGAGTCGACACTGAGGAGACGGTGA CCGT (SEQ ID NO: 117)