

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 612**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2003 E 03780645 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014 EP 1565558**

54 Título: **Método para aislar anticuerpos intracelulares capaces de neutralizar interacciones proteicas**

30 Prioridad:

21.11.2002 IT RM20020588

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

13.01.2015

73 Titular/es:

**ROTTAPHARM BIOTECH S.R.L. (100.0%)
Via Valosa di Sopra 3
20052 Monza, IT**

72 Inventor/es:

**VISINTIN, MICHELA y
CATTANEO, ANTONINO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 526 612 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

Método para aislar anticuerpos intracelulares capaces de neutralizar interacciones proteicas

5 La presente invención se refiere a un método para el aislamiento de anticuerpos intracelulares estables capaces de neutralizar interacciones proteicas. En particular, la invención se refiere a una biblioteca de fragmentos de anticuerpo para aislar y expresar anticuerpos funcionales en el ambiente intracelular (anticuerpos intracelulares), capaces de interactuar con proteínas diana específicas en el ambiente intracelular. La invención se refiere a un método para el aislamiento de un conjunto de fragmentos de anticuerpo contra una parte significativa de las interacciones proteína-proteína de una célula dada (interactoma) o contra las interacciones proteicas que constituyen una ruta o red intracelular.

15 Se sabe que los anticuerpos pueden usarse para interferir de una manera altamente específica con procesos biológicos dentro de la célula (Cattaneo y Biocca 1997) (Cattaneo y Biocca 1999) (Biocca, Neuberger *et al.* 1990). Una expresión intracelular específica puede dar como resultado la inhibición de la función proteica diana (anulación proteica). De esta manera, un anticuerpo intracelular adecuado puede conferir un fenotipo de interés a una célula o a un organismo. En particular, la anulación proteica representa un método ventajoso para aprovechar y resolver el cuello de botella en genómica funcional (de genes a función). De hecho, los programas genómicos y proteómicos proporcionan una gran cantidad de información para la identificación de genes y proteínas pero no de su función. La solución del problema de la técnica anterior podría facilitar la identificación y validación de proteínas diana también para el desarrollo de fármacos. La anulación proteica tiene ventajas notables con respecto a métodos alternativos (anulación génica o anulación de ARN, antisentido, ribozimas o ARNi) (Rossi 1999; Capecchi 1989; Fire 1999; Tavernarakis, Wang *et al.* 2000) ya que:

- 25 - la proteína está directamente correlacionada con su función biológica;
- permite anular versiones modificadas después de la transducción de la proteína o las subpoblaciones compartimentalizadas de la proteína;
- permite la modulación de la intensidad de anulación (anulación gradual o silenciamiento). Dado que la función proteica depende con mucha frecuencia de las interacciones proteína-proteína específicas, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo capaces de interferir con las interacciones proteína-proteína permitirán una neutralización de la función proteica selectiva y específica, permitiendo a la vez otras funciones de la misma proteína, dependiendo de otras interacciones proteicas.

35 La tecnología de anticuerpos intracelular puede ser extremadamente útil para genómica funcional ya que aprovecha:

- un repertorio prácticamente limitado de los anticuerpos contra cualquier proteína;
- la posibilidad de dirigir estos anticuerpos a sitios en los que la proteína ejerce su función dentro de la célula, y
- la posibilidad de obtener una anulación proteica específica y localizada.

40 Sin embargo, su aplicación a la genómica funcional y a la proteómica global requiere la tecnología simplemente en un proceso de alto rendimiento. Por eso la tecnología de anticuerpos intracelulares no es aplicable en la actualidad a la genómica funcional.

45 La tecnología de anticuerpos intracelulares usa genes para anticuerpos específicos que se modifican adecuadamente y se obtienen del sistema inmunitario natural (de ratón o humano) o de bibliotecas de anticuerpos (sintéticas o naturales) expuestas en las superficies de fagos filamentosos como fragmentos de anticuerpo (tecnologías de presentación de fagos, ScFv).

50 Con respecto a afinidad, estabilidad y solubilidad, la calidad de los fragmentos de anticuerpo aislados con tecnología de presentación de fagos es proporcional al tamaño de la biblioteca usada para selección *in vitro* (Vaughan, Williams *et al.* 1996), ya que la probabilidad de hallar un anticuerpo con las propiedades de interés es proporcional a la diversidad de la biblioteca. Por esto es necesario tener grandes bibliotecas de anticuerpos para obtener anticuerpos de alta afinidad capaces de reconocer cualquier antígeno (Griffiths, Malmqvist *et al.* 1993) (Griffiths, Williams *et al.* 1994) (Sheets, Amersdorfer *et al.* 1998) (Vaughan, Williams *et al.* 1996) (Sblattero y Bradbury 2000). Estas bibliotecas se ensayan con los antígenos de interés, ligados en la fase sólida; los anticuerpos se seleccionan después por ciclos secuenciales de absorción, lavado, elución y crecimiento. Este procedimiento de selección, sin embargo, no asegura que los anticuerpos seleccionados sean adecuados para la expresión intracelular, ya que no todos los anticuerpos son capaces de actuar en el ambiente intracelular. En el estado actual de la técnica, el rendimiento de los anticuerpos adecuados para expresión intracelular no es predecible a priori (Biocca, Ruberti *et al.* 1995; Proba, Worn *et al.* 1998), ya que las condiciones físico químicas intracelulares (de citoplasma y núcleo) difieren en gran medida de en las que los anticuerpos se encuentran en la naturaleza y se sintetizan normalmente (rutas de retículo endoplásmico y secretoras).

65 Por lo tanto, una aplicación de la tecnología a la genómica funcional requiere un método robusto y predecible para seleccionar a priori anticuerpos capaces de actuar en el ambiente intracelular. Se ha conseguido una mejora con el método de selección basado en un sistema de doble híbrido (IACT o Tecnología de Captura de Anticuerpos

Intracelulares) (Visintin *et al.* 1999; Visintin *et al.* 2002) y se describe en la solicitud de patente internacional PCT WO 00/54057. Los anticuerpos en el formato de IACT son capaces de interactuar con el antígeno correspondiente y resultan ser eficaces y funcionales cuando se expresan como anticuerpos intracelulares ordinarios en el sistema de usuario final. La estrategia de selección por IACT es eficaz en el diagnóstico y predicción para la identificación de anticuerpos intracelulares funcionales partiendo de bibliotecas grandes. La tecnología IACT también se ha usado en un procedimiento derivado para identificar rápida y eficazmente los epítomos reconocidos por los anticuerpos seleccionados en sus antígenos respectivos (mapeo de epítomos *in vivo*, IVEM, solicitud de patente RM2000A00561) (Visintin *et al.* 2002).

Sin embargo, el desarrollo de IACT no permite aún aplicar la tecnología de anticuerpos intracelulares a genómica funcional, lo que requiere un rendimiento paralelo de al menos 500 a 1000 genes hasta varios miles de genes. Además, el procedimiento de IACT no asegura que los fragmentos de anticuerpos seleccionados sean capaces de neutralizar la función de la proteína diana. Solamente un subconjunto de los anticuerpos seleccionados, como mucho tendrán la propiedad de ser anticuerpos neutralizantes.

La solución a este problema constituye el objetivo de la invención, que permite un procesamiento rápido, eficaz de alto volumen de genes para anticuerpos intracelulares validados que se expresan después en modelos celulares apropiados para estudiar y neutralizar la función de proteínas correspondientes.

En una implementación específica, el procedimiento descrito en la presente invención permite el aislamiento directo de fragmentos de anticuerpo capaces de alterar específicamente interacciones proteína-proteína, que tienen de este modo la capacidad de neutralizar selectiva y específicamente la función proteica. Por lo tanto, el procedimiento descrito permite aislar fragmentos de anticuerpo que se validan intracelularmente y neutralizan la función proteica.

Como ya se ha mencionado, el uso de IACT para aislar anticuerpos intracelulares validados está gravemente limitada por la baja eficacia de transformación celular (de levadura o mamífero) cuando se maneja la selección de doble híbrido, que, a su vez, no permite la introducción de bibliotecas de anticuerpo (de scFv o anticuerpos de un único dominio) con una diversidad mayor de 10^5 anticuerpos, un intervalo lejos del requerido para asegurar una probabilidad significativa de hallar un clon con las propiedades deseadas (10^{10} - 10^{11}).

En la actualidad, la etapa de IACT se precede de un enriquecimiento de la biblioteca para reducir la diversidad hasta niveles compatibles con la transformación en células para la selección de doble híbrido (Figura 1) usando:

- uno o dos ciclos de absorción en columnas de antígenos en la fase sólida en el caso de una biblioteca de anticuerpos en fagos, o
- inmunización de un ratón con el antígeno si la biblioteca de anticuerpos se prepara a partir de linfocitos de ratón.

Estas etapas son extremadamente costosas y lentas. Además, para la primera etapa es necesaria una buena biblioteca de presentación de fagos. En ambos casos la etapa de enriquecimiento requiere la disponibilidad de una proteína codificada por el gen de interés. Esto crea un cuello de botella altamente significativo ya que los programas genómicos funcionales proporcionan los genes (ADNC, EST, ORF, etc.) pero no una proteína. Los posibles proyectos en el estado actual de la técnica están, por lo tanto, limitados por el hecho de que para cada grupo de genes de interés debe llevarse a cabo cada vez una preselección ad hoc.

La solución a este problema se consigue mediante la construcción de una biblioteca de anticuerpos expresada directamente en el doble híbrido en lugar de en el formato de presentación de fagos. El procedimiento completo para obtener anticuerpos intracelulares a partir de los genes como aportación se facilita, se reduce, se acelera, y se hace más paralelo ya que los genes de interés podrían insertarse directamente en el vector para selección de IACT o sus modificaciones, evitando de este modo la necesidad de expresar y purificar las proteínas correspondientes.

Una implementación adicional, con respecto al sistema de IACT, es garantizar el aislamiento de anticuerpos intracelulares neutralizantes. De hecho, el sistema de IACT solo garantiza el aislamiento de anticuerpos biológicamente funcionales en un ambiente intracelular pero no selecciona anticuerpos neutralizantes.

Descripción de la invención

En lo sucesivo, un anticuerpo intracelular es un anticuerpo sintético recombinante en un formato monocatenario (scFv), Fab o anticuerpo de un único dominio (dAb), capaz de plegarse y ser funcional en un ambiente intracelular (es decir citoplasma, núcleo).

Una biblioteca de anticuerpos intracelulares comprenderá: a) biblioteca de anticuerpos intracelulares en la que los genes de anticuerpo son regiones V derivadas de i) linfocitos de ratón; ii) linfocitos derivados de pacientes con enfermedad autoinmunitaria; iii) linfocitos derivados de personas sanas; b) una biblioteca de anticuerpos intracelulares del punto a) obtenida con el método de la recombinación genética por dos sitios de recombinación homóloga (BIG-SPLINT); c) una biblioteca de anticuerpos intracelulares modificados por ingeniería genética en armazones particulares diseñados basándose en las secuencias consenso intracelulares presentes en anticuerpos

intracelulares.

Es un objetivo de la invención un método para aislar anticuerpos intracelulares capaces de neutralizar una interacción entre un ligando proteico x y un ligando proteico y conocido dentro de una célula, que comprende las etapas de:

a) obtener una cepa de levadura recombinante en la que:

i) **una secuencia que codifica el** ligando proteico x y **una secuencia que codifica el** ligando proteico y **se clonan en un** primer vector de expresión de levadura, pero

ii) al menos uno de x o y se expresan de una manera inducible, y

iii) la interacción entre el ligando proteico x y el ligando proteico y conduciría a la producción de un represor de una función esencial de la célula de levadura o de un agente tóxico, de modo que se obtendrían células de levadura no viables;

b) transformar la cepa de levadura recombinante del punto a) con una biblioteca de expresión de anticuerpos intracelulares por medio de un segundo vector de expresión de levadura;

c) seleccionar una cepa de levadura recombinante transformada del punto b) induciendo la expresión tanto del ligando x como del ligando y; y aislando clones de levadura receptores capaces de crecer;

d) aislar anticuerpos intracelulares capaces de neutralizar la interacción entre el ligando proteico x y el ligando proteico y de los clones de levadura recombinantes receptores capaces de crecer,

en el que la biblioteca de expresión de anticuerpos intracelulares se obtiene a partir de linfocitos de ratones no inmunizados y se expresa directamente en las células de levadura sin utilizar el cribado de presentación de fagos.

Otro objetivo de la invención es un método para aislar anticuerpos intracelulares capaces de neutralizar una interacción entre un ligando proteico x y un ligando proteico y conocido dentro de una célula, que comprende las etapas de:

a) obtener una cepa de levadura recombinante que tiene una competencia sexual mat-a o mat-alfa en la que:

i) **una secuencia que codifica el** ligando proteico x y **una secuencia que codifica el** ligando proteico y **se clonan en un** primer vector de expresión de levadura, pero

ii) al menos uno de x o y se expresa de una manera inducible, y

iii) la interacción entre el ligando proteico x y el ligando proteico y conduciría a la producción de un represor de una función esencial de la célula de levadura o de un agente tóxico, de modo que se obtendrían células de levadura no viables;

b) obtener una biblioteca de expresión de anticuerpos intracelulares por medio de un segundo vector de expresión de levadura en una cepa de levadura con una competencia sexual opuesta a la de la cepa de levadura en el punto a);

c) exponer las levaduras del punto a) y las levaduras recombinantes del punto b) a condiciones capaces de promover el apareamiento sexual y la expresión de los ligandos x e y;

d) seleccionar clones de levadura transformados induciendo la expresión tanto del ligando x como del ligando y; y aislando receptores de clones de levadura capaces de crecer;

e) aislar anticuerpos intracelulares capaces de neutralizar la interacción entre el ligando proteico x y el ligando proteico y de los clones de levadura recombinantes receptores capaces de crecer,

en el que la biblioteca de expresión de anticuerpos intracelulares se obtiene de linfocitos de ratones no inmunizados y se expresa directamente en las células de levadura sin utilizar el cribado de presentación de fagos.

En una realización preferida la cepa de levadura recombinante se obtiene:

a) clonando una primera secuencia que codifica el ligando proteico x y una segunda secuencia que codifica el ligando proteico y en **el primer** vector de expresión de levadura, estando cada primera y segunda secuencia bajo el control de cada una de dos partes de un promotor bidireccional, estando la primera secuencia fusionada con una secuencia que codifica una primera molécula, y estando la segunda secuencia fusionada con una secuencia que codifica una segunda molécula, de modo que cuando el ligando proteico x y el ligando proteico y interaccionan **se induce** la producción de un represor de una función esencial de la célula de levadura o de un agente tóxico;

b) transformando la cepa de levadura receptora con el vector de **expresión de levadura** del punto a); y

c) seleccionando levaduras transformadas.

Preferentemente **los** promotores bidireccionales **son** los promotores Gal 1 y Gal 10.

Preferentemente las primera y segunda moléculas conducen a la producción de un represor capaz de suspender la transcripción del gen HIS3 de levadura.

5 Preferentemente la biblioteca de expresión de anticuerpos intracelulares se obtiene en un formato de anticuerpo de un único dominio o scFv.

Otro objetivo de la invención es un método para identificar simultáneamente tanto un ligando proteico x capaz de unirse con un ligando proteico conocido y dentro de una célula eucariota, como un anticuerpo intracelular capaz de neutralizar dicha interacción entre el ligando proteico x y el ligando proteico conocido y, que comprende las etapas de:

- 15 a) clonar una biblioteca de ADNc que contenga secuencias que codifiquen el ligando proteico x y una secuencia que codifique el ligando proteico y en un primer vector de expresión de levadura, estando las secuencias de la biblioteca de ADNc bajo el control de una de las dos partes de un promotor inducible bidireccional, estando las secuencias de la biblioteca de ADNc fusionadas a una secuencia que codifica una primera molécula; y estando la secuencia que codifica el ligando proteico y bajo el control de la otra de las dos partes del promotor bidireccional, y estando fusionada a una secuencia que codifica una segunda molécula, de tal manera que cuando el ligando proteico x y el ligando proteico y interaccionan dicha primera molécula y dicha segunda molécula interaccionan también, de una manera que se induce la producción bien de un represor de una función esencial de la célula de levadura o de un agente tóxico;
- 20 b) transformar una cepa de levadura con una competencia sexual mat a o mat alfa con el primer vector de expresión de levadura recombinante del punto a);
- c) seleccionar las levaduras transformadas;
- 25 d) obtener una biblioteca de expresión de anticuerpos intracelulares en una cepa de levadura que tiene una competencia sexual opuesta a la de la cepa de levadura del punto a) mediante un segundo vector de expresión de levadura;
- e) someter las levaduras del punto c) y las levaduras del punto d) a condiciones tales que se promueve la reproducción sexual y la expresión del promotor direccional en un entorno capaz de inducir la expresión del ligando proteico x y del ligando proteico y;
- 30 f) seleccionar clones de levadura viables en los que el anticuerpo intracelular altera la interacción entre el ligando proteico x y el ligando proteico y;
- g) identificar el ligando proteico x y el anticuerpo intracelular,

35 **en el que la biblioteca de expresión de anticuerpos intracelulares se obtiene de linfocitos de ratones no inmunizados y se expresa directamente en las células de levadura sin utilizar el cribado de presentación de fagos.**

Descripción detallada de la invención

40 Los autores han desarrollado una biblioteca de anticuerpos intracelulares de acuerdo con un método que comprende las siguientes etapas (Figura 2):

- 45 a) recuperar ADN que codifica las regiones naturales de inmunoglobulina de linfocitos B de células del bazo o linfocitos periféricos por aislamiento de ARN, síntesis de ADN complementario y amplificación de ADN que codifica cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas;
- b) clonar dicho ADN usando cebadores diseñados para contener sitios de restricción adecuados para un vector de expresión que comprende:
 - 1) un gen de resistencia a antibióticos diferente del vector que expresa los ligandos proteicos x e y, es decir ampicilina;
 - 50 2) un marcador nutricional diferente del vector que expresa los ligandos proteicos x e y, es decir LEU2; 3) orígenes de replicación tanto para *E. coli* (es decir ColEI, fl) como para la levadura (es decir 2μ); 4) un polienlazador adecuado para la inserción de una biblioteca de anticuerpos; 5) una o más señales de localización nuclear cadena arriba de la secuencia que codifica el scFv, pero también FAb y dominios de anticuerpo;
 - c) caracterizar la biblioteca obtenida identificando la huella genética de colonias por PCR, y
 - 55 d) seleccionar el SPLINT por IACT (SPLINT-2HY) en un panel conocido de antígenos.

El vector del punto b) es el vector pVP16/mv1 (Figura 3).

60 Para superar la limitación impuesta por la baja eficacia de la transformación de levaduras los autores han preparado una tecnología, denominada BIG-SPLINT (Figura 4a, Figura 4b), que usa acontecimientos de recombinación para obtener una biblioteca intracelular mayor después de crear bibliotecas primarias más pequeñas. Se ha descrito una estrategia de recombinación como una alternativa para crear bibliotecas de fragmentos scFv expresadas en fagos (Sblattero y Bradbury, 2000; documento PCT WO 00311246), pero nunca se ha aplicado para obtener bibliotecas de anticuerpos intracelulares en células eucariotas. El acontecimiento de recombinación se aplica a la biblioteca intracelular SPLINT y se basa en una modificación del vector pVP 16 para clonar dos sitios de recombinación lox (lox P y lox P511) entre los genes VH y VL (vector (pVP/16mv1-lox, Figura 5). Este sistema introduce un gen que codifica

la recombinasa CRE inducida por el promotor GAL1 solamente en presencia de galactosa, integrado en el genoma de levadura. Inicialmente, se obtienen dos minibibliotecas en dos vectores pVP16/mv1-lox que difieren solamente en sus marcadores nutricionales y antibióticos. Las cadenas VH y VL se recombinan después tras la transformación (o apareamiento) en la cepa de levadura que contiene el gen de recombinasa CRE, cuya actividad se induce solamente tras la introducción de las dos bibliotecas de scFv en la cepa de levadura (Figura 4a, Figura 4b).

La invención supera los problemas técnicos previos evitando completamente las etapas de manipulación de proteínas en el proceso "gen - anticuerpo intracelular", permitiendo de este modo el aislamiento de anticuerpos intracelulares contra cualquiera de las proteínas codificadas por un genoma, y permitiendo el aislamiento de anticuerpos intracelulares contra todas las interacciones proteína-proteína en una célula.

La tecnología SPLINT de la invención predice secuencias preferidas por anticuerpos en ambientes intracelulares, aumentando de este modo el conocimiento de la estructura adoptada por los anticuerpos intracelulares en ambientes fisiológicamente incompatibles, y conduciendo la formulación de una familia de secuencias consenso de armazones de anticuerpos validados para la expresión intracelular.

Una realización preferida de la invención hace uso de secuencias de anticuerpo ya validadas por el procedimiento de IACT de acuerdo con el siguiente método:

SUPER-SPLINT

A medida que se implementan los procedimientos de selección para anticuerpos intracelulares, se adquiere información sobre secuencias de anticuerpos intracelulares validados. Por lo tanto pueden obtenerse diversas generaciones de SPLINT (SUPER-SPLINT) usando secuencias de anticuerpos validados con la tecnología IACT actual, como se desvelan en la solicitud WO0054057, aumentando de este modo la estabilidad y afinidad intracelular de los anticuerpos seleccionados *in vivo*. La denominada biblioteca SUPER-SPLINT se obtiene después injertando bibliotecas de CDR (región determinante de complementariedad) en armazones de anticuerpos diseñados basándose en información adquirida del estudio de los anticuerpos intracelulares validados. De esta manera, el tamaño de la biblioteca de entrada es menor, permitiendo de este modo que aumente la diversidad de anticuerpos en una estructura de anticuerpo que se dirige más a la expresión intracelular.

Las bibliotecas SPLINT constituyen una fuente limitada de anticuerpos para diversos usos en diagnóstico, investigación, industria y terapia y, en general, para todas las aplicaciones que requieren anticuerpos más estables.

La tecnología SPLINT puede adaptarse a otros tipos celulares además de levadura, incluyendo células de *E. coli* y de mamífero, para impedir la posible limitación de tener anticuerpos contra proteínas expresadas por la célula hospedadora.

La tecnología SPLINT ofrece un nuevo campo de aplicación para anticuerpos intracelulares que no eran posibles antes, en la llamada genómica funcional inversa o AntiGENómica (Figura 6), que conduce a la identificación de proteínas implicadas en una función celular de interés. En este formato, las bibliotecas de anticuerpos intracelulares derivadas por SPLINT (SUB-SPLINT) se usan en líneas celulares adecuadas, por ejemplo líneas celulares de mamífero, para inducir un fenotipo de interés y para identificar las proteínas responsables de los procesos biológicos subyacentes. El método de AntiGENómica permite por lo tanto la identificación de las proteínas implicadas en una función biológica dada, y resuelve un cuello de botella típico de cribados proteómicos, concretamente asignar una función a las proteínas identificadas.

La invención se describe ahora de acuerdo con los siguientes ejemplos.

Figuras

Figura 1. Diagrama de tecnología IACT. Los anticuerpos intracelulares pueden aislarse después de la combinación entre el sistema de dos híbridos y la tecnología de presentación de fagos o después de inmunización de un ratón y la construcción posterior de una biblioteca de scFv o dominios de anticuerpo (Tomlinson y Holliger, 2000) (Wu y Yazaki, 2000; Kortt *et al.*, 2001; Todorovska *et al.*, 2001) (Tanaka *et al.*, 2003)) en un vector que ha expresado un dominio de activación. Después de selección *in vivo* en la célula de levadura, los clones con resultados positivos se aíslan y puede usarse el scFv para aplicaciones *in vitro* e *in vivo*.

Figura 2. Diagrama de la construcción de una biblioteca SPLINT: las regiones variables de anticuerpo pueden clonarse directamente de un ratón no inmunizado en un vector que expresa el dominio de activación y dos NLS fusionados en tándem después del fragmento de anticuerpo scFv. La biblioteca SPLINT se inserta después en la cepa de levadura en una forma episómica y después puede usarse para cribado de IACT inmediatamente después de la transformación del antígeno que se va a usar como cebo.

Figura 3. Diagrama de los vectores plinker220 y pVP16mv1. Los vectores presentan 2 NLS fusionados en los extremos 3' y 5' de scFv para plinker220 o 2 NLS fusionados en tándem después del scFv en pVP16mv1. La biblioteca de scFv se transcribe por el promotor ADH1. Cadena debajo de la biblioteca, hay una secuencia de terminación de ADH. El vector también contiene la secuencia que codifica el gen de ampicilinas (bla), la

secuencia génica LEU2 (marcador nutricional para selección en levadura), un origen de replicación f1 de *E. coli* y un origen de replicación 2 μ de levadura.

Figura 4 a-b. Diagrama de la tecnología usada para crear una biblioteca BIG-SPLINT. En este sistema, se usan dos bibliotecas SPLINT clonadas en dos vectores pVP16mv1 que difieren solamente en resistencia a antibióticos para *E. coli*. Los vectores presentan sitios lox para recombinación heteróloga entre las cadenas de anticuerpos. El gen que codifica la recombinasa CRE puede insertarse o como un gen expresarse por un promotor Gall inducible clonado en un vector episómico o puede estar presente en la cepa de levadura previamente construida para este fin.

Figura 5. Diagrama de los vectores pVP16mv1-lox y pVP16m2 kan. Los dos vectores son conceptualmente idénticos al vector pVP16mv1. La única diferencia es que cadena arriba y cadena debajo de la construcción scFv-VP16 hay dos secuencias lox511-loxPWT que se reconocen por la enzima CRE que comienza a recombinar las cadenas variables directamente en el ambiente intracelular.

Figura 6. Diagrama de la tecnología AntiGENómica. La tecnología usa selección *in vivo* de una biblioteca de ADNc creada a partir de una línea celular y la biblioteca de anticuerpos SPLINT. Después del aislamiento de un gran panel de pares Ag-scFv, los genes aislados se identifican y se secuencian los scFv que reconocen. Estos scFv se expresan después como una biblioteca específica de célula (SUB-SPLINT) *in vivo*, en la célula diana de interés y se usan para recapturar *in vivo* las proteínas expresadas en la célula, bien directamente o bien después de una selección fenotípica. Los complejos de scFv-proteína intracelulares se inmunoprecipitaron después usando el marcador de secuencia de scFv y se analizan usando técnicas proteómicas clásicas tales como 2Degel y MS.

Figura 7. Diagrama de los vectores pMIC-BD1 y pMIC-BD2. Los siguientes vectores se construyeron para expresar el antígeno usado como cebo cadena debajo de un dominio de unión a ADN (lexA). Los dos vectores difieren solamente en la falta de NLS en pMIC-BD2, que se retiró antes de la mutagénesis. El promotor ADH1 promueve la transcripción de la proteína de fusión lexA-Ag. Cadena debajo de esta construcción hay una secuencia de destrucción de ADHIterm. El vector también tiene la secuencia que codifica el gen de cloranfenicol (cam), la secuencia del gen TRP1 (marcador nutricional para selección en levadura), un origen de replicación f1 en *E. coli* y un origen de replicación 2 μ para la levadura.

Figura 8. Diagrama de la construcción de la biblioteca anti GFP. Se inmuniza un ratón con la proteína GFP. El bazo de ratón se usa después como una fuente de linfocitos para extraer el ARN que codifica las cadenas variables de inmunoglobulina. Una vez que se ha preparado el ADNc, las cadenas variables se amplifican con cebadores degenerados específicos. La biblioteca anti GFP en el formato scFv se clona después en el vector pVP16mv1 y se criba contra la GFP clonada en el vector pBMIC-BD1.

Figura 9. Ensayo de X-gal e identificación de PCR-BSTNI en clones anti CH2-Shc aislados de la biblioteca hiperinmunitaria obtenida después de inmunización de ratones con proteína GFP y seleccionada con el método de IACT.

Figura 10. La figura muestra las diversas etapas de clonación de la biblioteca SPLINT: en el primer panel a la izquierda se puede ver el análisis de ARN total extraído del bazo de ratón no inmunizado. A la derecha, se puede ver el producto de RT-PCR reamplificado con una mezcla de cebadores específicos para las cadenas variables. El fin de esta etapa es evaluar la calidad del ADNc antes de proceder a la amplificación programada con los diversos pares de cebadores (véase tabla I). Debajo se puede ver el análisis de las amplificaciones para la VH y VL con cada par de cebadores degenerados. Finalmente, después de haber cuantificado cada amplificación individual para la VH y para la VL, cada producto amplificado se mezcla en concentraciones iguales; el resultado final se ilustra en la fotografía superior derecha.

Figura 11. Fotografía del desplazamiento de la cadena VH y VL.

Figura 12. a. Fotografía del ensamblaje de la biblioteca SPLINT en el formato scFv. **b.** Identificación de la huella genética por PCR-BstNI de la biblioteca SPLINT después de electroporación en la cepa DH5 α F'.

Figura 13. Ensayo de X-gal e identificación de la huella por PCR-BstNI en clones anti-SH2-Shc aislados de la biblioteca SPLINT seleccionados con el método de IACT.

Figura 14. Ensayo de X-gal e identificación de la huella genética por PCR-BstNI en clones anti-K-RAS aislados de la biblioteca SPLINT seleccionada con el método de IACT.

Figura 15. Ensayo de X-gal para cribado secundaria en clones anti-SH2-SHc y anti-K-RAS con antígenos respectivos usados como cebos.

Figura 16. Ensayo de X-gal e identificación de la huella genética por PCR-BstNI en clones anti-Syk aislados de la biblioteca SPLINT seleccionados con el método de IACT.

Figuras 17. Se reintroducen plásmidos de scFv de rescate en la cepa de selección original y en diferentes cepas cebo para verificar la especificidad. El plásmido aislado que expresa los scFv (es decir anti LT β 4) se reintroducen en cepas que contienen antígeno diana (LT β 4) y otro antígeno no relacionado (lamina). Como un ejemplo los clones b y h resultan ser específicos solamente para LT β 4 y no consiguen interaccionar con el antígeno lamina, confirmando de este modo su especificidad por LT β 4.

Figura 18. El fragmento scFv anti LT β 4 reconoció específicamente LT β 4 y no consiguió reconocer el cebo UT β 4. Las timosinas son una familia de proteínas pequeñas compuestas completamente por un único dominio WH2, un motivo de unión a monómero de actina de ~35 restos, que se encuentra en muchos reguladores diferentes del citoesqueleto de actina. La timosina específica de linfocito codifica una extensión NH2 terminal de seis restos extra. Se ensayaron cinco fragmentos de anticuerpo obtenidos del cribado de LT β 4 con respecto a su capacidad para unirse con UT β 4. Como se muestra en la Figura, todos los scFv ensayados resultaron ser específicos

solamente para la forma linfoide y no para la ubicua.

Figura 19. Diagrama del método usado con SPLINT en el sistema de tres híbridos (véase la explicación en los Resultados).

Figura 20. Diagrama de los vectores pBiDi3HY, pBiDi3HYlexA-VP16 y pSLINT. pBiDi3HYlexA-VP16 contiene un promotor bidireccional para la expresión de dos bibliotecas de ADNc (1 y 2). La biblioteca ADNc1 se expresa como una proteína de fusión con lexA, mientras que la biblioteca ADNc2 se expresa como un vector de fusión con VP16. Ambas bibliotecas tienen dos secuencias de parada diferentes. El vector se expresa como un marcador nutricional para selección en la levadura TRP1. El vector también tiene la secuencia que codifica el gen de cloranfenicol (cam), un origen de replicación f1 en *E. coli* y un origen de replicación 2 μ para la levadura. pSPLINT es un vector idéntico a pVP16mv1 pero sin el dominio de activación VP16. Este vector se usa solamente para expresar scFv en el ambiente intracelular.

Figura 21. Análisis de transferencia de Western de las proteínas lexA y VP16 expresadas tras la inducción con galactosa en el vector pBiDi3HYlexA-VP16. Después de la transferencia, se detectó lexA con el anticuerpo policlonal anti lexA (Invitrogen) y VP16 con el anticuerpo policlonal anti VP16 (Clontech).

Figura 22. Análisis de transferencia de Western de las proteínas de fusión lexA y VP16-p65 expresadas tras la inducción con galactosa en el vector pBiDi3HYlexA-VP16. Después de la transferencia, se detectó lexA-p65 con el anticuerpo policlonal anti lexA (Invitrogen) y VP16-p65 con el anticuerpo policlonal anti VP16 (Clontech).

Figura 23. Interacciones de scFv anti p65-monómero p65 en el sistema de IACT de levadura. Se transformaron conjuntamente células de levadura L40 con el vector cebo lexA-p65 y/o cebo de lamina con anti p65 A1 o fusiones anti p65 A2 - VP16 en el vector plinker220. Se cultivaron colonias de levadura en sus placas y se puntuaron con respecto al ensayo de β -ga1. El clon A2 presenta una interacción positiva con el monómero p65, lo que indica su especificidad con la proteína diana. Por el contrario, el clon A1 solamente fue capaz de reconocer el dominio de unión a ADN lexA.

Figura 24. Microscopia de inmunofluorescencia del scFv anti p65 A2 transfectado de forma transitoria en células HEK. Las células se hicieron reaccionar con el anticuerpo monoclonal marcador anti SV5 seguido de incubación con un anti-ratón conjugado con anti-FITC (Vector).

Figura 25. Las células HEK2973T se transfectaron de forma transitoria con anti p65 A2 clonado en el vector scFvex cyto-SV5. Se ensayaron lisados celulares con respecto a expresión de proteínas p65 y p50 (controles, c) y análisis de inmunoprecipitación con anti p65 A2 o un anticuerpo irrelevante.

Se detectó proteína p65 con anticuerpo policlonal anti p65 (carril superior) y anti p50 (carril inferior) (Santa Cruz).

Vectores

plinker220 (Figura 3).

El vector para la expresión de los scFv o una biblioteca de fragmentos scFv se diseñó para contener un polienlazador que puede usarse para clonar fragmentos de anticuerpo que contienen en sus extremos sitios de restricción únicos idénticos a los presentes en el polienlazador. Para crear este vector, se clonó el polienlazador del vector pDAN3 (Sblattero *et al.* 2000) en VP16* (Hollenberg *et al.* 1995). Para obtener este vector, se cortó el vector VP16* con la enzima NcoI, se trató con Fosfatasa Intestinal de Ternero (CIP) y se purificó con una preparación de gel de agarosa al 0,75 %. Se amplificó el polienlazador pDAN3 (en el que se clonó un scFv previamente) usando los siguientes oligonucleótidos:

oligonucleótido POLI INVERSO:

**TCGATTTCCACCATGGCGCCGAAAAAAAAAGAGAAAAGTGGCCCAGCCGAGCG
CGCATGCCGATATTGTG**

oligonucleótido POLI DIRECTO:

**TTCTTGGGTGCCATGGCGGAGCTCGAAACGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCG
TGGT**

El fragmento amplificado se digirió después con la enzima de restricción NcoI y se purificó con gel de agarosa al 1,5 %. Los dos fragmentos se ligaron usando ADN ligasa T4. Para confirmar la orientación perfecta del inserto y para confirmar la clonación, se secuenció el vector. El dominio de activación de VP16 se modificó después retirando varios aminoácidos no esenciales. Para hacer esto, se usó el plinker200 como un molde y se amplificó VP16 usando los siguientes nucleótidos:

VP16-220 inverso: TCGAGCGGTACCGCTAGCGTTTCGAGCTCCGCCATGG
MIC-AD2 directo: CGGCCAGTGAATTCCTACTACCCACCGTACTCGTCAAT

El fragmento que contiene el dominio de activación de VP16 se digirió después usando las enzimas de restricción NheI y EcoRI y se clonó en el vector VP16 modificado, se cortó de la misma manera, se trató con Fosfatasa Intestinal de Ternero (CIP) y se purificó con una preparación de gel de agarosa al 0,75 %. Los dos fragmentos se ligaron usando ADN ligasa T4. El vector resultante se denominó después plinker220.

pVP16/mv1 (Figura 3)

El vector de expresión de los scFv o una biblioteca de fragmentos scFv, pVP16/mv1, se diseñó para contener un polienlazador que pudiera usarse para clonar fragmentos de anticuerpo que contengan en sus extremos sitios de restricción únicos idénticos a los presentes en el polienlazador. Las dos señales de localización nuclear se desplazaron para permitir su expresión en tándem cadena abajo del scFv e inmediatamente cadena arriba del dominio de activación de VP16. Este desplazamiento produce un scFv sin impedimento estérico en su extremo 5', aumentando de este modo la especificidad y el plegamiento del fragmento de anticuerpo fusionado con el dominio de activación de VP16 en su extremo 3'. Se construyó pVP16/mv1 de la siguiente manera:

oligonucleótido MIC-AD1 inverso:

CAAACCGAAAAGCTTATGAGCGCGCATGCCGATATC

y una mezcla de oligonucleótidos VL de ratón para la mezcla (Orlandi *et al.*, 1992) se usó para amplificar una cadena ligera clonada en plinker220. MIC-AD1 inverso contiene el codón de transcripción de inicio ATG y los sitios de restricción HindIII y BssHIII, mientras que la mezcla de oligonucleótidos de ratón VL para la mezcla contienen sitios de restricción Sall. El fragmento de ADN amplificado con estos nucleótidos se cortó usando las enzimas HindIII y Sall y se purificó con una preparación de gel de agarosa al 1,5 %. El vector plinker220 se cortó de la misma manera, se trató con Fosfatasa Intestinal de Ternero (CIP) y se purificó con una preparación de gel de agarosa al 0,75 %. Los dos fragmentos se ligaron usando ADN ligasa T4. El vector resultante se llamó después pMIC-AD1.

pMIC-AD1 se usó para preparar el vector pVP16/mv1 final. Se usaron los siguientes oligonucleótidos:

MIC-AD2 inverso

**CAAACCGCTAGCGCACCCAAGAAGAAGCGGAAGGTCGCACCCAAGAAGAAG
CGGAAGGTCCCAGGTGTACCGAGCTCG.**

Este nucleótido contiene dos secuencias de localización nuclear (NLS) y el sitio de restricción NheI.
MIC-AD2 directo:

CGGCCAGTGAATTCTACTACCCACCGTACTCGTCAAT.

Este nucleótido contiene un sitio de restricción EcoRI.

Se usaron los siguientes nucleótidos para amplificar el dominio de activación de VP16 del vector plinker220 y para añadir cadena arriba a partir de este las dos NLS codificadas en tándem. El fragmento de ADN resultante se cortó usando NheI-EcoRI y se purificó con una preparación de gel de agarosa al 1,5 %. El vector plinker220 se cortó de la misma manera, se trató con Fosfatasa Intestinal de Ternero (CIP) y se purificó con una preparación de gel de agarosa al 0,75 %. Los dos fragmentos se ligaron usando ADN ligasa de T4 para crear el vector pVP16/mv1.

pMIC-BD1 (Figura 7)

Los vectores de expresión pVP16/mv y pMIC-BD se diseñaron para cambiar selectivamente la resistencia para expresión en *E. coli*. La introducción de dos resistencias a antibióticos diferentes (ampicilina y cloranfenicol, respectivamente) permite la retirada del plásmido cebo de las células cotransformadas con los dos plásmidos, eliminando de esta manera la necesidad de una segregación clásica en levadura clásica en levadura, que es muy larga y costosa.

El vector para la expresión de antígeno en levadura se diseñó para contener un marcador procariota seleccionable por el antibiótico cloranfenicol. El vector pMIC-BD1 se construyó de la siguiente manera: la secuencia que contenía la región que codificaba el dominio de unión de ADN lexA, la secuencia de parada de la transcripción del gen ADH1 y una parte del gen de levadura TRP1 se aisló del vector pBTM116 (Bartel, Chien *et al.* 1993) digiriendo el plásmido con HindIII. El fragmento se purificó con gel de agarosa al 1,5 %. El vector de expresión usado como una cadena principal, pBD-GAL4 Cam (Stratagene), también se cortó usando HindIII, se desfosforiló con Fosfatasa Intestinal de Ternero (CIP), se purificó con gel de agarosa al 0,75 % y se ligó con el fragmento lexA-ADH1-TRP1 para crear el pMIC-BD1. La orientación correcta del inserto se confirmó por análisis de secuencia.

pMIC-BD2 (Figura 7)

La proteína *lexA* clonada en pMIC-BD1 se cambió para anular la señal de localización nuclear presente dentro de la proteína.

5

ts -lexA GTT ACC GTT AAG CGC CTG AAA AAA CAG GGC AAT

V T V K R L K K Q G N

mut-lexA GTT ACC GTT AAG GGC CTG GAA AAA CAG GGC AAT

V T V K G L E K Q G N

(Rhee *et al.*, 2000).

10 Los codones CGC y AAA de la región que codifica *lexA* se mutaron después de la siguiente manera:

oligonucleótido *lexA*-NLS inverso
AAGATGAAAGCGTTAACGGCCAGGCAACAAGAGGTG
que contiene el sitio de restricción HpaI, y
15 *lexA*-NLS directo

AACGACAATTGGTTTAAACTCGCTATTTTCTGGCAACAGTTCGACTTTATTGC
CCTGTTTTTCCAGGCCCTAACGGT

20 que contiene las dos mutaciones y los sitios de restricción PmeI se usaron para amplificar una parte de *lexA*. El fragmento de ADN amplificado con estos oligonucleótidos se cortó con las enzimas HpaI y PmeI y se purificó con una preparación en gel de agarosa al 2 %. El vector pMIC-BD1 se cortó de la misma manera, se trató con Fosfatasa Intestinal de Ternero (CIP) y se purificó con una preparación en gel de agarosa al 0,75 %. Los dos fragmentos se ligaron usando ADN ligasa T4. El vector resultante se llamó después pMIC-BD2.

pVP16mv1-lox y pVP16mv2-kan (Figura 5)

25 Como se describe en Sblattero D. *et al* 2000, se insertaron las siguientes secuencias de recombinación en los vectores pVP16mv1:

loxP511 ATA ACT TCG TAT AAT GTA TAC TAT ACG AAG TTA T
30 loxPWT ATA ACT TCG TAT AAT GTA TGC TAT ACG AAG TTA T

El polienlazador del vector se modifica de la siguiente manera:

enlazador loxP511

35

TCC CGA GGG TCG ACC ATA ACT TCG TAT AAT GTA TAC TAT ACG AAG TTA TCC TCG AGC GGT ACC
BspEI Sall loxP511 XhoI KpNI

El primer sitio de lox (loxP511) se añade por desplazamiento de las cadenas variables VL y VH. Los cebadores para desplazamiento de cadena variable fueron:

40

VH PTL lox inverso

GGA GGG TCG ACC ATA ACT TCG TAT AAT GTA TAC TAT ACG AAG TTA
TCC TCG AGC GGT A

45

VH PTMIC directo
CCA GGC CCA GCA GTG GGT TTG GGA TTG GTT TGC CGC TA
VL PTL lox directo

ACC GCT CGA GGA TAA CTT CGT ATA GTA TAC ATT ATA CGA AGT TAT
GGT CGA CCC TCC

VL PTMIC inverso
CGC TGG ATT GTT ATT ACT CGC AGC AAG CGG CGC GCA TGC C

5 El segundo sitio lox (loxPWT) se añade directamente en el vector pVP 16 en el extremo 3' del dominio de activación de VP16. El gen VP16 se amplifica a partir de pVP16mv1 con los siguientes cebadores:

VP16loxPWT directo (cortando con BamHI)

CTA TCT ATC TAg gat ccA TAA CTT CGT ATA GCA TAC ATT ATA CGA AGT

10 **TAT CCC ACC GTA CTC GTC AAT**

VP16 inverso (cortando con HindIII)
GGC TAA AGC TTA TTT AGG TGA CAC TAT

15 Los productos de amplificación se añaden directamente después como fragmentos Hind III-Bam HI en los vectores cortados con las mismas enzimas pVP16mv1 y pVP16mv1-kan. El gen kan + ColE1 se insertan en el vector pVP16* como un producto de amplificación amplificado por el plásmido pZero-2 (Invitrogen) y se clonan en los sitios DraIII y AaTII.

Kan DraIII inverso

20 Ccg atc gga cac CAG GTG CTG TCA GAA GAA CTC GTC AAG AAG GC

ColE1 AaTII directo

AA TGA AAT GCA TCG GGA CGT CCT TCC GCT TCC TCG CTC ACT GAC

25 Habiendo clonado colE1 y el gen para resistencia a kanamicina el vector se cambia como se ha descrito previamente para obtener el vector pVP16mv2-kan.

La recombinación de las cadenas variables tiene lugar *in vivo* en la célula de levadura. El gen de CRE, que codifica recombinasa, se transcribe por el promotor inducible por Gal1. pGal1-CRE puede ser un plásmido integrado en la cepa de levadura o puede introducirse un vector episómico con resistencia a antibióticos (neomicina) que expresa CRE bajo el promotor Gall. CRE puede, por ejemplo, clonarse en un vector pESC (Stratagene) controlado por el promotor Gall. En este vector, la resistencia a antibióticos (G418, neomicina) puede clonarse para promover la selección de este plásmido en la célula de levadura. El gen G418 se transcribe por el promotor Gal10, que es un promotor bidireccional con respecto a Gal1. Ambos promotores se inducen en presencia de galactosa en un medio de cultivo, permitiendo de este modo el control de la expresión de enzima recombinasa CRE.

35 **Vector pBiDi3HY (Figura 18):**

Para construir el vector pBiDi3HY se usaron 2 vectores. El vector pESC-TRP (Stratagene) se cortó con PvuII para aislar los promotores bidireccionales Gal1-Gal10. El vector pMIC-BD1 se cortó con SphI y ADN polimerasa I, el fragmento Grande (Klenow) se usó posteriormente para retirar los salientes 3' para formar extremos romos. El vector también se desfosforiló con fosfatas alcalina intestinal de ternero para impedir la recircularización del vector de clonación. La clonación de Gal1-Gal10 digerido con PvuII en pMIC-BD1 cortado con SphI y romo generó pBiDi3HY.

45 **Vector pBiDi3HYlexA-VP16 (Figura 18):**

El fragmento de ADN VP 16 se amplificó del vector VP16* (Hollenberg *et al.*, 1995) y se clonó entre el BamHI/ApaI de plásmido pBiDi3HY.

50 El fragmento de ADN lexA se amplificó de pMIC-BD1 y se clonó entre el EcoRI/SpeI del vector pBiDi3HY-VP16. El vector final pBiDi3HY-lexA-VP16 se secuenció y se verificó la expresión de las proteínas lexA y VP16 por análisis de transferencia de western de extracto en bruto de levadura después de inducción de promotores con galactosa al 20 % (véase Figura 23).

55 **Vector pBiDi3HYlexAp65-VP16p65:** el miembro de la familia de NF-κB/Rel proteína p65, se clonó como la proteína de fusión C terminal con dominios lexA y VP16. El fragmento de ADN p65 se amplificó del plásmido pRSV NF-κB relA (p65) y se clonó en SpeI para producir la proteína de fusión lexA-p65 y entre ApaI/SalI para producir la proteína de fusión VP16-p65. La expresión de ambas proteínas de fusión de p65 se verificó por análisis de transferencia de western y secuencias (véase Figura 24).

60 Todos los clones se secuenciaron, usando el kit Epicentre Sequitherm Excel II (Alsbyte, Mill Valley, CA), con un secuenciador automático Li-Cor 4000L (Lincoln, NE).

Construcción de una biblioteca de un ratón inmunizado (anti GFP) (Figura 8)

- 5 En el trabajo preparatorio que ha conducido a la presente invención, dentro del desarrollo de la tecnología IACT, se han construido bibliotecas de anticuerpos a partir de los bazos de ratones inmunizados contra diversos antígenos de interés, incluyendo la EGFP (proteína verde fluorescente) (Prasher *et al.*, 1992), la proteína humana A β 1-42 y otros antígenos. La selección de estas bibliotecas contra los antígenos inmunizados no constituye un aspecto nuevo pero se menciona ya que introduce el resultado inesperado descrito en el siguiente párrafo.
- 10 La proteína EGFP se expresó en *E. coli* y se purificó de acuerdo con un protocolo convencional desarrollado por (Baird *et al.*, 1999). Después, la EGFP se conjugó con BSA (albúmina de suero bovino) para aumentar su inmunogenicidad en la medida en que GFP es una proteína muy compacta. Se usaron 0,7 mg de la proteína purificada (tanto GFP nativa como conjugada) para la inmunización inicial de tres ratones. Los refuerzos posteriores contenían 1,0-1,7 mg de la proteína purificada (~200-500 μ g de proteína purificada por ratón).
- 15 Después de aproximadamente 2 meses, los sueros de los ratones inmunizados se analizaron por ELISA. Los resultados mostraron que los ratones presentaban un alto título de anticuerpos contra GFP (se pueden encontrar anticuerpos anti GFP específicos en sueros analizados también a mayores diluciones, es decir 1:10000). Los bazos se extrajeron después y se usaron para la extracción de ARN.
- 20 Las regiones variables de inmunoglobulina se amplificaron usando PCR de región V (Orlandi *et al.*, 1992), con los siguientes cebadores (Tabla I):

Tabla I. Panel de cebadores degenerados usados para la construcción de bibliotecas SPLINT VH de ratón INVERSO:

TTA TCC TCG AGC GGT ACC GAK GTR MAG CTT CAG GAG TC HB1
 TTA TCC TCG AGC GGT ACC GAG GTB CAG CTB CAG CAG TC HB2
 TTA TCC TCG AGC GGT ACC CAG GTG CAG CTG AAG SAS TC HB3
 TTA TCC TCG AGC GGT ACC GAG GTC CAR CTG CAA CAR TC HB4
 TTA TCC TCG AGC GGT ACC CAG GTY CAG CTB CAG CAR TC HB5
 TTA TCC TCG AGC GGT ACC CAG GTY CAR CTG CAG CAG TC HB6
 TTA TCC TCG AGC GGT ACC CAG GTC CAC GTG AAG CAG HB7
 TTA TCC TCG AGC GGT ACC GAG GTG AAS STG GTG GAA T HB8
 TTA TCC TCG AGC GGT ACC GAV GTG AWG YTG GTG GAG TC HB9
 TTA TCC TCG AGC GGT ACC GAG GTG CAG SKG GTG GAG TC HB10
 TTA TCC TCG AGC GGT ACC GAK GTG CAM CTG GTG GAG TC HB11
 TTA TCC TCG AGC GGT ACC GAG GTG AAG CTG ATG GAR TC HB12
 TTA TCC TCG AGC GGT ACC GAG GTG CAR CTT GTT GAG TC HB13
 TTA TCC TCG AGC GGT ACC GAR GTR AAG CTT CTC GAG TC HB14
 TTA TCC TCG AGC GGT ACC GAA GTG AAR STT GAG GAG TC HB15
 TTA TCC TCG AGC GGT ACC CAG GTT ACT CTR AAA GWG TST G HB16
 TTA TCC TCG AGC GGT ACC CAG GTC CAA CTV CAG CAR CC HB17
 TTA TCC TCG AGC GGT ACC GAT GTG AAC TTG GAA GTG TC HB18
 TTA TCC TCG AGC GGT ACC GAG GTG AAG GTC ATC GAG TC HB19

VH de ratón DIRECTO:

GAT TGG TTT GCC GCT AGC TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT HF1
GAT TGG TTT GCC GCT AGC TGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT HF2
GAT TGG TTT GCC GCT AGC TGC AGA GAC AGT GAC CAG AGT HF3
GAT TGG TTT GCC GCT AGC TGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT HF4

VL de ratón INVERSO:

AGC AAG CGG CGC GCA TGC CGA YAT CCA GCT GAC TCA GCC LB1
AGC AAG CGG CGC GCA TGC CGA YAT TGT TCT CWC CCA GTC LB2
AGC AAG CGG CGC GCA TGC CGA YAT TKT GMT VAC TCA GTC LB3
AGC AAG CGG CGC GCA TGC CGA YAT TGT GYT RAC ACA GTC LB4
AGC AAG CGG CGC GCA TGC CGA YAT TGT RAT GAC MCA GTC LB5
AGC AAG CGG CGC GCA TGC CGA YAT TMA GAT RAM CCA GTC LB6
AGC AAG CGG CGC GCA TGC CGA YAT TCA GAT GAY DCA GTC LB7
AGC AAG CGG CGC GCA TGC CGA YAT YCA GAT GAC ACA GA LB8
AGC AAG CGG CGC GCA TGC CGA YAT TGT TCT CAW CCA GTC LB9
AGC AAG CGG CGC GCA TGC CGA YAT TGW GCT SAC CCA ATC LB10
AGC AAG CGG CGC GCA TGC CGA YAT TST RAT GAC CCA RTC LB11
AGC AAG CGG CGC GCA TGC CGA YRT TKT GAT GAC CCA RAC LB12
AGC AAG CGG CGC GCA TGC CGA YAT TGT GAT GAC BCA GKC LB13
AGC AAG CGG CGC GCA TGC CGA YAT TGT GAT AAC YCA GGA LB14
AGC AAG CGG CGC GCA TGC CGA YAT TGT GAT GAC CCA GWT LB15
AGC AAG CGG CGC GCA TGC CGA YAT TGT GAT GAC ACA ACC LB16
5 AGC AAG CGG CGC GCA TGC CGA CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TC LBL

VL de ratón DIRECTO:

GAA GTT ATG GTC GAC CCT CCG GAA CGT TTK ATT TCC AGC TTG G LF1/2
GAA GTT ATG GTC GAC CCT CCG GAA CGT TTT ATT TCC AAC TTT G LF4
GAA GTT ATG GTC GAC CCT CCG GAA CGT TTC AGC TCC AGC TTG G LF5
GAA GTT ATG GTC GAC CCT CCG GAA CCT AGG ACA GTC AGT TTG G LFL

10 Para crear una biblioteca que sea tan representativa como sea posible, se realizaron amplificaciones individuales usando cada oligonucleótido descrito anteriormente según los siguientes esquemas:

	HB1	HB2	HB3	HB4	HB5	HB6	HB7	HB8	HB9	HB10	HB11	HB12	HB13	HB14	HB14	HB15	HB16	HB17	HB18	HB19	
HF1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
HF2	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
HF3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
HF4	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

	LB1	LB2	LB3	LB4	LB5	LB6	LB7	LB8	LB9	LB10	LB11	LB12	LB13	LB14	LB15	LB16	LBL
LF1/2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
HF3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
HF4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
HF5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
LFL																	X

ES 2 526 612 T3

Este procedimiento permite la verificación de la calidad de la biblioteca, sin tener que introducir una prevalencia de regiones variables determinadas que se amplifican más fácilmente que otras. En este caso específico, se llevan a cabo 141 amplificaciones individuales, comenzando desde el ADNc obtenido del ARN total extraído del bazo de ratón inmunizado. Las condiciones usadas para amplificar las cadenas variables fueron:

5 ADNc 0,5 μ l; H₂O 30,5 μ l; tampón de PCR 10X 5 μ l; dNTP 2,5 mM cada uno 5 μ l; MgCl₂ 25 mM 3 μ l; Oligo1 (10 pmol/ μ l) 2,5 μ l; Oligo 2 (10 pmol/ μ l); se mezclan 2,5 μ l de Taq polimerasa 1 μ l.

10 Se añade aceite mineral (50-100 μ l) para impedir la evaporación en el tubo de ensayo que contiene la mezcla de reacción. El tubo se coloca después en un termociclador programado de la siguiente manera: 94 °C -5', (94 °C -1' 60 °C -1' 72 °C-1') durante 30 ciclos; 72 °C -10'; 4 °C -24 h.

15 Después de haberse amplificado las regiones variables, estas se analizan en un gel de agarosa al 1,5 % y se cuantifican. Después, para la clonación, se usa la misma cantidad de ADN para cada uno de los productos amplificados. Se usa después de un total de 10 μ g de una cadena variable para cada clonación

Se crea una biblioteca de VL inicial.

Las cadenas ligeras se procesan de la siguiente manera:

20 Mezcla de ADN de VL 10 μ g; BssHII (NEB 20 U/ μ l) 1,5 μ l; Tampón 3 (NEB) 10 μ l; H₂O Q.S. (V final =100 μ l).

25 La mezcla de reacción se incuba a 50 °C durante 8 h. La cadena digerida se purifica después con gel al 1,5 % usando un kit de purificación (kit de extracción en Gel, Qiagen). El ADN purificado se digiere después usando la enzima Sall según el siguiente esquema: mezcla de ADN VL BssHII 100 μ l; Sall (NEB 20 U/ μ l) 1,5 μ l; Tampón Sal (NEB) 2 μ l; H₂O 78,5 μ l.

30 La mezcla de reacción se incuba a 37 °C durante 8 h. Las cadenas digeridas se purifican después con un gel al 1,5 % usando un kit de purificación (kit de extracción en Gel, Qiagen). Después de purificación, el ADN se cuantifica en gel de agarosa al 1,5 % y se analiza con espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm.

Se cortan 10 μ g del vector pVP16/mv1 de la misma manera: ADN de pVP16/mv1 10 μ g; BssHII (NEB 20 U/ μ l) 1,5 μ l; Tampón 3 (NEB) 10 μ l; H₂O Q.S. (V final =100 μ l).

35 La mezcla de reacción se incuba a 50 °C durante 8 h. Las cadenas digeridas se purifican después con gel al 0,75 % usando un kit de purificación (kit de extracción en Gel, Qiagen). El ADN purificado se digiere después usando la enzima Sall según el siguiente esquema: pVP16/mv1 BssHII 100 μ l; Sall (NEB 20 U/ μ l) 1,5 μ l; Tampón Sal (NEB) 20 μ l; H₂O 78,5 μ l.

40 La mezcla de reacción se incuba a 37 °C durante 8 h. El vector digerido se desfosforila con Fosfatasa Intestinal de Ternero (CIF) y se purifica con gel de agarosa al 0,75 %. Después de la purificación, el ADN se cuantifica en gel de agarosa al 0,75 % y se analiza con espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm. Después se ensaya pVP16/mv1 (BssHII-Sall-CIP) en *E. coli* para verificar la digestión total y desfosforilación por electroporación de una cantidad conocida de ADN digerido incubado durante una noche con ligasa o solamente en H₂O. Después de haberse verificado el fondo del vector de una digestión parcial del vector o su nuevo ligamiento (el fondo debe ser igual a o tan cerca como sea posible de 0), se liga después pVP16/mv1 (BssHII-Sall-CIP) con las regiones variables ligeras purificadas en una proporción de inserto: vector=5:1.

50 Se usan aproximadamente 6 μ g del vector en la mezcla de ligasa. La reacción de ligasa se deja después durante una noche a 16 °C, después se inactiva la ligasa durante 10 minutos a 70 °C, la mezcla de ligasa se purifica después de la siguiente manera: 1 etapa de purificación con fenol (1:1); 1 etapa de purificación con fenol-cloroformo (1:1); 1 etapa de purificación con precipitación de ADN con cloroformo-isoamilo (25:24:1) con 3 volúmenes de acetato sódico/etanol (solución de 1 ml de NaAc pH 5,2 + 27,5 ml de EtOH). Se lava el ADN precipitado con 200 μ l de EtOH al 70 %. Después, el sedimento de ADN se suspende de nuevo en 20-30 μ l de H₂O destilada.

55 Después se usan 10-40 ng de la ligasa purificada para cada electroporación. Después DH5 α F' o TG1 se hace electrocompetente con el siguiente método (Engberg *et al.*, 1996) se inoculan aproximadamente 3-4 colonias de *E. coli* en 100 ml de 2YT y se cultivan a 37 °C hasta una D.O. de 0,8-1. Se llenan dos tubos falcon de 50 ml y se dejan en hielo durante aproximadamente 10 minutos. A continuación, todas las etapas se llevan a cabo en la cámara frigorífica a 4 °C. Los tubos se centrifugan durante 8 minutos a 3500 rpm a 4 °C. Se retira el sobrenadante. Cada sedimento se suspende de nuevo en 2 ml de tampón de glicerol helado al 10 % (glicerol estéril al 10 % en H₂O estéril destilada). Las bacterias resuspendidas se llevan después a un volumen de 50 ml en un tampón de glicerol. Los tubos se centrifugan durante 8 minutos a 3500 rpm a 4 °C. Se elimina el sobrenadante. Los sedimentos se suspenden de nuevo en 2 ml de tampón de glicerol helado al 10 % y se transfieren a un tubo falcon. Las bacterias se llevan después a un volumen de 50 ml en un tampón de glicerol. Se realizan dos lavados adicionales según el

65

esquema descrito de los puntos 6 a 8. Finalmente, el sedimento final se suspende de nuevo en 1 ml y se lleva a 3 ml en tampón de glicerol al 10 %. Los tubos se centrifugan durante 8 minutos a 3500 rpm a 4 °C. Se retira el sobrenadante. El sedimento final se suspende de nuevo en 125 µl de tampón de glicerol al 10 %. Las bacterias se dividen después en alícuotas (30 µl por tubo) en tubos Eppendorf de 0,5 ml y se conservan durante

5

aproximadamente 1 mes a -80 °C.

El electroporador se ajusta a 1800 V y las células electrocompetentes, junto con las cubetas, se sitúan en hielo y se enfrían durante aproximadamente 10-15 minutos.

10 Para cada electroporación, se usan 30 µl de bacterias más 1 µl de mezcla de ligasa (10-40 ng de ADN). Después de la transformación, las bacterias vuelven a suspenderse en 1 ml de medio SOC + MgCl₂ 10 mM y se incuban durante 1 h a 37 °C. Las bacterias se siembran después en placas LB + ampicilina. Al día siguiente, se evalúa la eficacia de la transformación. Para controlar la diversidad de la biblioteca de VL, se toman muestras de 100 colonias aleatoriamente de la placa y se analizan por identificación de la huella genética por PCR usando la enzima de restricción BstNI. Después de confirmarse la diversidad, las bacterias se recogen de la placa y se congelan a -80 °C

15

El ensamblaje de las cadenas VH con las cadenas VL se realiza directamente en la biblioteca de VL. Se retiran aproximadamente 10 µl de glicerolato de la biblioteca de VL y se inoculan en 50 ml de LB + Amp durante una noche. Al día siguiente, se prepara el ADN para clonación de la cadena VH. Las cadenas variables pesadas se procesan de la siguiente manera: mezcla de ADN de VH 10 µg; XhoI (NEB 20 U/µl) 1,5 µl; NheI (NEB 20 U/µl) 1,5 µl; Tampón 2 (NEB) 10 µl; BSA (10 mg/ml) 1 µl; H₂O Q.S. (V final =100 µl). La mezcla de reacción se incubaba a 37 °C durante 8 horas. Las cadenas digeridas se purifican después con un gel al 1,5 % usando un kit de purificación (kit de extracción en Gel, Qiagen). Después de la purificación, el ADN se cuantifica en gel de agarosa al 1,5 % y se analiza con espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm.

20

25

Se cortan 10 µl de la biblioteca de VL de la misma manera: mezcla de ADN de VH 10 µg; XhoI (NEB 20 U/µl) 1,5 µl; NheI (NEB 20 U/µl) 1,5 µl; Tampón 2 (NEB) 10 µl; BSA (10 mg/ml) 1 µl; H₂O Q.S. (V final=100 µl). La mezcla de reacción se incubaba a 37 °C durante 8 h. El vector digerido se desfosforila con Fosfatasa Intestinal de Ternero (CIF) y se purifica con gel de agarosa al 0,75 %. Después de la purificación, el ADN se cuantifica en gel de agarosa al 0,75 % y se analiza con espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm. Después se ensaya la biblioteca de VL (XhoI-NheI-CIP) en *E. coli* para verificar la digestión total y la desfosforilación por electroporación de una cantidad conocida de ADN digerido incubado durante una noche con ligasas o solamente en H₂O. Después se verifica el fondo del vector de una digestión parcial del vector (el fondo debe ser igual a o tan cerca como sea posible de 0), la biblioteca se liga después con las regiones variables pesadas purificadas en una proporción de inserto: vector=5:1.

30

35

A continuación, se continúa el procedimiento como se ha descrito anteriormente por la preparación de la biblioteca de VL. Una buena biblioteca debería tener aproximadamente 10⁶-10⁷ scFv diferentes/µg del ADN usado. La biblioteca del vector pVP16/mv1 se ensaya después con cebo de GFP (antígeno inmunizador).

40

El cebo de GFP se amplifica a partir de pEGFP-N1. Los cebadores de amplificación del gen de GFP fueron: GFP con sentido: CCG GTC GAA TTC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG y GFP antisentido: TGA TCT GGA TCC GCG GCC GCT TTA AGT GAT CCC GGC. Ya que los experimentos previos han mostrado que GFP solo era capaz de transactivar la transcripción de los genes indicadores en el sistema de levadura, se usó un mutante de la delección de GFP para este experimento. La bibliografía indica que la retirada de los últimos 8 aminoácidos del GFP mantiene la actividad fluorescente de la proteína y su conformación sin cambios (Siegel y Isacoff, 1997).

45

El fragmento de ADN amplificado con estos oligonucleótidos se cortó después con las enzimas EcoRI y BamHI y se purificó con una preparación en gel de agarosa al 1,5 %. El vector pmIC-BD1 se cortó de la misma manera, se trató con Fosfatasa Intestinal de Ternero (CIP) y se purificó con una preparación de gel de agarosa al 0,75 %. Los dos fragmentos se ligaron usando ADN ligasa T4.

50

Para verificar la transactivación de la GFP cebo, se ensayó la autoactivación de la transcripción del gen indicador según las etapas de transformación mostradas a continuación:

55

cebo	Presa	Medio de selección de YC	Fenotipo de HIS3	Fenotipo de LacZ
LexA-GFP		-W	/	blanco
LexA-GFP		-WHUK	/	
LexA-GFP	VP16/mv1	-WL		blanco
LexA-GFP	VP16/mv1	-WHULK	/	

Habiendo confirmado la ausencia de transactivación de la GFP cebo y su buena expresión en la cepa de levadura (un extracto de levadura transformado con GFP cebo se ensaya por análisis de transferencia de western usando un anticuerpo primario que reconoce la proteína *lexA*), se realiza selección de la biblioteca en células de levadura. Se transforma L40 que expresa GFP cebo con 100 µg de biblioteca de scFv anti GFP según el protocolo descrito a continuación:

Día 1: inoculación de L40 que contiene cebo GFP en 5 ml de YC-UW durante una noche;

Día 2: inoculación de 100 ml de YC-UW con una alícuota del cultivo de una noche para tener una dilución que permita alcanzar la fase de crecimiento algorítmico al día siguiente;

Día 3: el cultivo de una noche se transfiere en 11 de YPAD calentados para obtener un cultivo con una DO 600=0,3; la levadura se cultiva a 30 °C durante 3 horas, las células se centrifugan a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente; el sedimento de levadura se lava con 500 ml de TE 1 x y después se centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente; el sedimento vuelve a suspenderse en 20 ml de LiAc 1 x, TE 0,5 x y se transfiere a un matraz nuevo; se añaden 10 µg de biblioteca de scFv anti GFP y 1 ml de esperma de salmón desnaturalizado; se mezclan 140 ml de LiAc 1 x, PEG 3350 40 %, TE 1 x; y se incuban en un agitador a baja velocidad durante 30 minutos a 30 °C; se añaden 17,6 ml de DMSO y se mezcla. Se realiza choque térmico durante 10 minutos a 42 °C con agitación ocasional. El producto se enfría rápidamente añadiendo 400 ml de YPA. La levadura se sedimenta por centrifugación y se lava una vez con 500 ml de YPA. Después de la centrifugación, el sedimento vuelve a suspenderse en 11 de YPAD precalentados a 30 °C. El producto se incuba durante 1 hora a 30 °C; se aísla 1 ml del cultivo y el sedimento obtenido por centrifugación de este ml se suspende de nuevo en 1 ml de YC-UWL. Para calcular la eficacia de la transformación se siembran diluciones de 1:10, 1:100 y 1:1000 en placas YC-UWL. El sedimento obtenido del cultivo restante se lava dos veces con YC-WHULK. El sedimento final vuelve a suspenderse en 10 ml de YC-WHULK. Las alícuotas se siembran en placas de YC-WHULK y después de 3-4 días las colonias que se han cultivado se analizan para determinar la interacción.

Se analizaron 96 colonias cultivadas en YC-WHULK y que daban resultado azul en el ensayo de beta-GAL por análisis de identificación de la huella genética por PCR usando la enzima de restricción BstNI. El análisis de los patrones de digestión y las secuencias de scFv aisladas de las colonias HIS+lacZ+ permiten el aislamiento de aproximadamente una docena de scFv diferentes que reconocen el cebo (además también para una segunda cribado en células de levadura, se transforma el mismo cebo que expresa GFP con scFv aislado en L40) para cada selección. Después se clonaron los scFv aislados en un vector de expresión de scFv (Persic, Righi *et al.* 1997) para expresión en células de mamífero y simultáneamente en pUC119CAT para expresión y producción de la proteína en *E. coli*. Se analizó la afinidad de unión de las proteínas purificadas con la columna de afinidad usando resonancia de plasmón superficial. En promedio, los scFv aislados con IACT tienen una constante de afinidad de 100-500 nM. Los scFv expresados *in vivo* en células de mamífero (COS, CHO, PC 12, C6, etc.) se unen con la proteína diana y en la mayoría de los casos consiguen desalojarla de su ambiente de expresión celular si se expresan con señales de localización que difieren de las de la expresión del antígeno. Además, pueden encontrarse scFv neutralizantes que inhiban la función del antígeno o el antígeno puede neutralizarse llevándolo a otro compartimento celular usando la unión específica de Ag-Ab.

Los resultados de esta selección demuestran que el enriquecimiento obtenido por inmunización permite la construcción de la biblioteca con un tamaño adecuado para transformación de levaduras y con una diversidad suficientemente amplia para asegurar el aislamiento de un panel de numerosos anticuerpos contra la proteína inmunizadora.

Se han obtenido resultados similares con una biblioteca creada a partir de los bazos de ratones inmunizados contra proteína Aβ 1-42, una proteína humana, de la que han derivado numerosos anticuerpos contra la proteína inmunizadora (véase tabla 2).

En este punto, surgió un resultado sorprendente y completamente inesperado del cribado de las bibliotecas derivadas de bazo hiperinmunitarias con cebo construido a partir de proteínas no relevantes para la inmunización.

Selección de una biblioteca de SPLINT hiperinmunitaria contra antígenos diferentes de los usados para la inmunización

Las bibliotecas obtenidas de bazos de ratones inmunizados (ratones inmunizados con GFP), como se describe en el párrafo anterior, se cribaron contra la proteína She (una proteína que regula el crecimiento, la apoptosis y la esperanza de vida celular) y Aβ1-42 humana (la acumulación del componente altamente amiloidogénico ligada a la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer).

Se clonó un dominio funcional de la proteína Shc (CH2-Shc) y la Aβ1-42 en el vector pMIC-BD1 y se expresó en levadura para controlar la capacidad de los dos antígenos para transactivar los genes indicadores.

Construcción de los cebos:

CH2-Shc/MIC-BD1: el fragmento de ADN CH2-Shc se amplificó por PCR de pGEX4T1p66Shc y se clonó entre los sitios de restricción EcoRI/BamHI del plásmido pMIC-BD1.

Aβ 1-42/MIC-BD1: el fragmento de ADN del dominio beta amiloide 1-42 se sintetizó por cebadores que hibridaban y después se clonaban en sitios de restricción BamHI/PstI del plásmido pMIC-BD1.

El vector pMIC-BD se construyó para usarlo en una cepa de levadura que mantenía los genes indicadores bajo el control del sitio operador para la proteína lexA. Este vector también permite una rápida extracción de clones positivos, después de la verificación de una interacción anticuerpo-antígeno en un sistema de dos híbridos que usa como un vector que contiene el dominio de activación un plásmido resistente a ampicilina por que utiliza cloranfenicol como el marcador fenotípico en *E. coli*. Todos los antígenos se ensayaron *in vivo* como se ha descrito en otra parte (Visintin y Cattaneo 2001) (Visintin, Tse *et al.* 1999) y la expresión de las proteínas de fusión se ensayó después de extraerse las proteínas de la cepa de levadura transformada. Se descubrió que todos los antígenos se expresaban en cantidades óptimas en la levadura y que no transactivaban los genes indicadores (HIS3 y lacZ).

Como antígeno para el cribado de biblioteca se seleccionó a CH2-Shc. La eficacia de la transformación de la biblioteca fue de aproximadamente $2,5 \times 10^4$ clones/ μ g de ADN. Inesperadamente, también se obtuvieron cientos de colonias positivas (Tabla III) tras sembrarse la biblioteca en placas después del primer día de transformación (véase protocolo en Visintin y Cattaneo 2001). El protocolo usado aquí fue el mismo que el descrito anteriormente (véase Construcción de la biblioteca de un ratón inmunizado anti GFP).

Después de aproximadamente 15 minutos, las colonias se volvieron azules en el ensayo de X-Gal, un indicio de que las interacciones observadas eran bastante fuertes. Se aislaron veinte colonias azules y se aislaron rápidamente los plásmidos que contenían los fragmentos scFv para analizar después de extracción de ADN total de la levadura y se transformaron en *E. coli*. El análisis por identificación de PCR-BstNI y una segunda identificación de dos híbridos produjo los siguientes resultados (Figura 9): 19 scFv, 9 clases de scFv diferentes. De las 9 clases de scFv, 8 dieron resultados específicos contra CH2-Shc y no contra un antígeno irrelevante (laminina) usado para el cribado. De forma similar, en una selección distinta de una biblioteca derivada de un bazo hiperinmunitario para un antígeno no relacionado, y expuesto al cebo Aβ 1-42, se aisló un gran número de dominios de anticuerpo diferentes contra la proteína Aβ 1-42 (datos no mostrados, tabla III).

Tabla III. Selección de ICAb con diferentes especificidades de antígeno.

Antígeno	ufc/ μ g de ADN SPLINT en L40	Nº de clones rescatados His3 ⁺ -lacZ ⁺	Nº de clones His3 ⁺ -lacZ ⁺ analizados	Nº de clones positivos
CH2-Shc	2,4e10 ⁶	430	20	8
SH2-Shc	3,7e10 ⁶	189	20	5
K-RAS	4,4e10 ⁶	27	27	2
Syk	1,4e10 ⁶	3000	10	6
UTβ34	3e10 ⁷	300	96	3
LTβ4	2,1e10 ⁶	123	123	13
Gefirina	2,6e10 ⁶	5824	50	5
TFII-I	1,29e10 ⁶	1000	96	4
Aβ 1-42	1,2e10 ⁶	900	66	6
ORFX5	6,8e10 ⁵	34	34	6
SARK-CoV				

Estos resultados se obtuvieron en tan solo 1 mes desde el comienzo de la clonación del cebo (controles de vector y re-cribado incluidos) y demostraron la rapidez y precisión del sistema al obtener anticuerpos contra cualquier proteína de interés. Los anticuerpos se clonaron después en un vector de fagémido para producir scFv soluble para los ensayos de especificidad *in vitro* ELISA y resonancia de plasmón superficial.

La conclusión es que aunque las bibliotecas de selección eran hiperinmunitarias para los antígenos inmunizadores respectivos (y contenían numerosos anticuerpos contra las proteínas inmunizadoras, como se ha demostrado en el párrafo anterior), también representan una fuente óptima de anticuerpos intracelulares contra proteínas genéricas. Por lo tanto, representan bibliotecas de SPLINT y demuestran que las bibliotecas derivadas del bazo tienen propiedades inesperadas requeridas para bibliotecas SPLINT, es decir un tamaño adecuado para la transformación de células de levadura, aunque con una diversidad suficientemente amplia para permitir el aislamiento de anticuerpos contra antígenos genéricos.

El resultado inesperadamente positivo obtenido de una biblioteca hiperinmunitaria, que debería enriquecerse solamente con respecto a anticuerpos contra antígenos inmunizadores, estableció la base para el experimento descrito posteriormente, es decir la construcción de una biblioteca SPLINT a partir de un grupo de bazo de ratón que no estaban inmunizados expresamente.

5

Biblioteca SPLINT de linfocitos de ratón no inmunitarios (Fig. 2)

Construcción de biblioteca SPLINT

10 El bazo es rico en linfocitos B y es un tejido óptimo del que pueden extraerse con relativa facilidad linfocitos sin necesidad de purificarlos por métodos largos y laboriosos. Se lavaron y limpiaron bazo de ratón (extirpados de ratones de 3-6 meses de vida, recién sacrificados) en PBS y los linfocitos se liberaron presionando el bazo con una aguja hipodérmica y una espátula estéril. La suspensión celular se transfirió después a un tubo estéril y se dejó reposar durante 5 minutos. Después se retiró el sobrenadante y las células se lavaron dos veces en PBS y H₂O para retirar los glóbulos rojos. Las células se usaron inmediatamente para extracción de ARN total. El ARN total se extrajo usando un kit (Kit Rneasy Mini, Qiagen) según el protocolo del fabricante. Después de la extracción, se cuantificó el ARN (aproximadamente 30 µg de 10 mg de tejido original) y se usó para síntesis de ADNc usando cebadores aleatorios (GIBCO Brl). La síntesis del ADN complementario a filamentos de ARN individuales se obtuvo usando la enzima Transcriptasa Inversa Rnasa H Superscript II (GIBCO Brl).

20

Se usó el siguiente protocolo para la producción de ADNc: cebadores aleatorios (3 µg/µl); 1 µl (100 µg); ARN total 5 µl; mezcla de dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP 10 mM cada uno a pH fisiológico) 1 µl; H₂O DEPC 5 µl. La mezcla se calienta a 65 °C durante 5 minutos, después se enfría rápidamente en hielo. El contenido del tubo se recoge después de una centrifugación breve y se añade tampón de primera cadena 5 x 4 µl, DTT 0,1 M 2 µl. El contenido del tubo se mezcla y después se incuba durante 2 minutos a 42 °C, después de lo cual se añade 1 µl (200 U) de Superscript II y se incuba durante 50 minutos a 42 °C. La reacción se inactiva a 70 °C durante 15 minutos. Se añade 1 µl (2 U) de RNasaH para retirar el ARN residual unido al ADN formado y se deja durante 20 minutos a 37 °C. El ADNc puede usarse después para amplificar las cadenas variables.

25

30 Para obtener ADNc de las regiones variables de inmunoglobulina, se amplificaron las regiones V por PCR usando cebadores 5' y 3' degenerados (Tabla I) que permiten la amplificación de una gran cantidad de cadenas variables.

30

Los cebadores de amplificación de las cadenas variables son idénticos a los descritos en la sección de Construcción de una biblioteca de un ratón inmunizado anti GFP.

35

Se realizó un total de 141 amplificaciones para tener la seguridad de que se expresaba un gran número de familias de anticuerpos en la biblioteca final. Las amplificaciones de cadena de anticuerpo individual se muestran en la Figura 10.

40 Después de haberse amplificado todas las regiones variables VL y VH del ADNc, se volvieron a amplificar para aumentar la cantidad de ADN para clonación y para añadir sitios extra a cada extremo de la región variable previamente amplificada con los cebadores degenerados. Después de haber sometido a desplazamiento las cadenas variables (PTVL y PTVH), los productos amplificados se purifican con geles (véase Figura 11). Después de la purificación, se usan la PTVL y la PTVH para ensamblaje *in vitro*. El desplazamiento se usa para insertar una cadena polipeptídica pequeña (denominada enlazador) que, después del ensamblaje *in vitro*, es a su vez necesaria para reconstruir la secuencia monocatenaria (Figura 12). El ensamblaje se realizó en una sola etapa en lugar de en dos etapas como se describe en la sección de clonación de biblioteca anti GFP y que se observó un problema en la clonación secuencial de las cadenas variables en el vector VP16mv. Una posible explicación de esto es la escasa capacidad de transformación del vector pLinker220 en *E. coli* y la posible amplificación parcial de varias familias de cadenas variables que hacen la clonación en este vector particularmente difícil.

50

Los cebadores usados para el desplazamiento fueron:

VH PTL 220 INVERSO

55

GGA GGG TCG ACC AGC GGT TCT GGG AAA CCA GGT TCC GGT GAA GGC
TCG AGC GGTA

VH PTMIC DIRECTO

CCA GGC CCA GCA GTG GGT TTG GGA TTG GTT TGC CGC TA

VL PTL 220 FOR

ACC GCT CGA GCC TTC ACC GGA ACC TGG TTT CCC AGA ACC GCT GGT

CGA CCC TCC

5 VL PTMIC INVERSO
CGC TGG ATT GTT ATT ACT CGC AGC AAG CGG CGC GCA TGC C

10 El protocolo de desplazamiento fue: VL 5 μ l (~100 ng); VL PTL 220 DIRECTO 5 μ l; VL PTMIC INVERSO 5 μ l; MgCl₂ 2 μ l; dNTP 10 μ l; tampón 10X 10 μ l; Taq polimerasa 2 μ l; H₂O 61 μ l; VH 5 μ l (~100 ng); VH PTL 220 INVERSO 5 μ l; VH PTMIC DIRECTO 5 μ l; MgCl₂ 2 μ l; dNTP 10 μ l; tampón 10X 10 μ l; Taq polimerasa 2 μ l; H₂O 61 μ l.

15 Se añade aceite mineral (50-100 μ l) para impedir la evaporación en el tubo de ensayo que contiene la mezcla de reacción. El tubo se coloca después en un termociclador programado de la siguiente manera: 94 °C -5'; (94 °C -30", 60 °C -30", 72 °C -30") durante 20 ciclos; 72 °C -10'; 4 °C -24 h. Después de aislarse la banda de desplazamiento para el VH y VL, las cadenas se purifican con gel y se usan los productos amplificados para ensamblaje *in vitro*. En total, se usan aproximadamente 200 ng de ADN para la reacción (100 ng de PTVL y 100 ng de PTVH).

Los cebadores de reacción de reacción de ensamblaje son:

20 VH PT2 DIRECTO
TGG TGA TGG TGA GTA CTA TCC AGG CCC AGC AGT GGG TTT G
VL PT2 INVERSO
TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC

25 La reacción es: PTVL 100 ng; PTVH 100 ng; VL PT2 BACK (100 mM) 0,5 μ l; VH PT2 DIRECTO (100 μ M) 0,5 μ l; dNTP 10 μ l; Tampón 10X 10 μ l; MgCl₂ 2 μ l; Taq polimerasa 2 μ l; adición de H₂O hasta 100 μ l. Se añade aceite mineral (50-100 μ l) para impedir la evaporación en el tubo de ensayo que contiene la mezcla de reacción. Después se coloca el tubo en un termociclador programado de la siguiente manera: 94 °C -5'; (94 °C -30", 68 °C -30", 72 °C -30") durante 8 ciclos sin cebadores y 12 ciclos con cebadores; 72 °C -10'; 4 °C -24 h.

30 Después del ensamblaje de la VH y la VL, la biblioteca de scFv ensamblada se purifica con gel como se ha descrito anteriormente. Después de la purificación, el ADN se digiere con las enzimas NheI y BssH2 de la siguiente manera: mezcla de ADN 10 μ g; NheI (NEB 20 U/ μ l) 1,5 μ l; Tampón 2 (NEB) 10 μ l BSA (10 μ g/ml) 1 μ l; H₂O Q.S. (V final=100 μ l), y se deja digerir durante 4 h a 37 °C.

35 Después de la digestión y de la purificación con gel, el ADN se corta con BssH2: mezcla de ADN 10 μ g BssH2 (NEB 20 U/ μ l) 1,5 μ l; Tampón 3 (NEB) 10 μ l; H₂O Q.S. (V final=100 μ l).

40 La mezcla de reacción se incubó a 50 °C durante 4 h. Las cadenas digeridas se purifican después con gel 1,5 % usando un kit de purificación (kit de extracción en Gel, Qiagen). Después de la purificación, el ADN se cuantifica en agarosa al 1,5 % usando espectrometría a una longitud de onda de 260 nm. La biblioteca se liga después en el vector pLinker220: se usaron aproximadamente 200 ng de vector para esta etapa; se realizó el ligamiento en gradiente para optimizar la reacción. La mezcla de reacción es: pLinker220: 1 μ l (200 ng); ensamblaje VL-VH: 2 μ l (250 ng); Ligasa: 1 μ l (400 U/ μ l); Tampón: 1 μ l; H₂O: 5 μ l; la mezcla de reacción se colocó en un tubo de Eppendorf y se incubó durante una noche en un vaso de precipitados lleno de agua a 18 °C en la cámara frigorífica. Al día siguiente, el tubo de reacción se retira de la cámara frigorífica y se añade 1 μ l de ligasa y se deja a temperatura ambiente durante 2 h. Después de la incubación, la mezcla de reacción se purifica con fenol-cloroformo (como se ha descrito anteriormente), se suspende de nuevo en 10 μ l de H₂O, y después se introduce por electroporación en la cepa bacteriana.

50 Para cada electroporación, se usan 30 μ l de bacteria más 1 μ l de mezcla de ligasa (máximo 100 ng por electroporación). Después de la transformación, las bacterias se resuspenden en 1 ml de medio SOC + MgCl₂ 10 nM y se incubó durante 1 h a 37 °C, después de lo cual se siembran en placas de ampicilina LB+. Al día siguiente, se evalúa la eficacia de la transformación. Se estimó que la biblioteca obtenida de este modo era de aproximadamente 4.10⁵ UFC.

55 En este punto, se usó la biblioteca SPLINT para ensayar el control tal como identificación de huella genética por PCR para ensayar la diversidad de la biblioteca, secuencias de anticuerpos tomadas aleatoriamente, análisis de transferencia de western para comprobar la expresión de las cadenas individuales en levadura y cribado en un panel

de antígenos conocidos.

Los resultados demuestran que incluso a partir de esta biblioteca SPLINT inicial pueden aislarse anticuerpos intracelulares contra una amplia diversidad de antígenos.

5

Descripción y lista de antígenos (tabla II):

La biblioteca SPLINT se seleccionó contra los siguientes antígenos: dos dominios de Shc (Figura 13, 15), K-RAS (Figura 14, 15), Syk (Figura 16), β 4-timosina ubicua, β 4-timosina linfoide (Figura 17, 18), amiloide β 2-42, gefirina, TFII-I y proteínas SARS-CoV ORF X5.

10

Construcción de los cebos:

SH2-Shc/MIC-BD1: el fragmento de ADN SH2-Shc se amplificó por PCR a partir de pGEX4T1-p66Shc y se clonó entre los sitios de restricción EcoRI/BamHI del plásmido pMIC-BD1.

15

CH2-Shc/MIC-BD1: el fragmento de ADN CH2-Shc se amplificó por PCR a partir de pGEX4T1-p66Shc y se clonó entre los sitios de restricción EcoRI/BamHI del plásmido pMIC-BD1.

Syk/MIC-BD2: se subclonó el fragmento EcoRI/BamHI de Syk/BTM116 (Visintin *et al.*, 1999) entre los sitios de restricción EcoRI/BamHI del plásmido pMIC-BD2.

20

K-RAS/MIC-BD1 y K-RAS/MIC-BD2: se subclonó K-RAS BamHI/PstI de K-RAS/BTM116 (Visintin *et al.*, 1999) entre los sitios de restricción BamHI/PstI de pMIC-BD1 y pMIC-BD2, respectivamente.

25

LT β 4/MIC-BD1: el fragmento de ADN LT β 4 se amplificó a partir del vector LT β 4/pCI-neo y se clonó entre los sitios de restricción EcoRI/BamHI del plásmido pMIC-BD1. **UT β 4/MIC-BD1:** el fragmento de ADN LT β 4 se amplificó a partir del vector UT β 4/pCI-neo y se clonó entre los sitios de restricción EcoRI/BamHI del plásmido pMIC-BD1.

Gefirina/MIC-BD1: el fragmento de ADN del dominio 153-348 de la proteína gefirina se amplificó y se clonó entre los sitios de restricción EcoRI/BamHI del plásmido pMIC-BD1. Antes de comenzar la selección de la biblioteca SPLINT todos los cebos se ensayaron con respecto a transactivación de genes indicadores como se ha descrito (Visintin y Cattaneo, 2001). Todos los cebos resultaron ser no transactivadores y por lo tanto se usaron para las selecciones.

30

A β 1-42/MIC-BD1: el fragmento de ADN del dominio 1-42 de β amiloide se sintetizó por cebadores que hibridaban y después se clonaban en sitios de restricción BamHI/PstI del plásmido pMIC-BD1.

35

TFII-I 1-397/MIC-BD1: El fragmento de ADN del dominio 1-397 del factor de transcripción TFII-I se amplificó a partir de ADNc de TFII-I humano y se clonó en el sitio de restricción Bam HI del plásmido pMIC-BD1)

SARS-CoV ORF X5/MIC-BD1: el fragmento de ADN de la ORF X5 de SARS-Coronavirus se sintetizó por cebadores que hibridaban y después se clonaban en sitios de restricción EcoRI/Sall del plásmido pMIC-BD1.

40

Selección de anticuerpos intracelulares scFv con diferentes especificidades por IACT.

Para verificar si a partir de esta biblioteca podían seleccionarse anticuerpos intracelulares contra proteínas de señalización, y otras proteínas intracelulares, la biblioteca se cribó frente a un panel de cebos diferentes (Tabla II). Estos incluyen dos dominios de Shc, K-RAS, Syk, β 4-timosina ubicua, β 4-timosina linfoide, β amiloide 1-42, gefirina, TFII-I y proteínas SARS-CoV ORF X5.

45

Tabla II. Panel de diferentes cebos usados para selección de SPLINT-2HY.

50

- domino CH2 de p66Shc humana (CH2-Shc)
- dominio SH2 de p66Shc humana (SH2-Shc)
- K-RAS humana
- Syk humana
- β 4-Timosina ubicua de ratón (TU β 4)
- β 4-Timosina linfoide de ratón (TL β 4)
- Amiloide β 1-42 humano
- Gefirina de Rata
- TFII-I humana
- SARS-CoV ORF X5

55

60

Los cebos seleccionados para la validación de la biblioteca SPLINT incluyen proteínas de diferentes especies, de origen viral y de función y localización celular muy diferentes:

65

Dos dominios diferentes (CH2 y SH2) de la proteína adaptadora p66^{Shc} humana (Ventura *et al.*, 2002), que contiene una región única rica en prolina aminoterminal (CH2), un dominio de unión a fosfotirosina (PTB) NH2 terminal seguido de un dominio de homología de colágeno (CH1) y un dominio SH2 COOH terminal. En virtud de sus dominios PTB y SH2, la activación de proteína tirosina quinasa receptora y no receptora ligada a proteínas de Shc con respecto a citoplasma corriente abajo pueden unirse con receptores activados que se han fosforilado en tirosina. Esta proteína está implicada en rutas activadas por tensiones ambientales y en la regulación de la esperanza de vida.

La K-Ras humana es una proteína G monomérica de 21 kd localizada en membranas que actúa como un acontecimiento molecular o nuclear. La ruta de señalización de ras es una diana atractiva para la terapia contra el cáncer debido a su importante papel en la carcinogénesis.

La proteína tirosina quinasa Syk se ha involucrado en diversas respuestas celulares hematopoyéticas, en particular acontecimientos de señalización de inmunorreceptores que median en respuestas celulares diversas incluyendo la proliferación, diferenciación y fagocitosis. Syk también parece desempeñar una función fisiológica general en una amplia diversidad de células incluyendo células neuronales en las que se sugiere que desempeñe un papel importante en etapas de señalización para la extensión de neuritas (Yanagi *et al.*, 2001).

La timosina β4 codifica tanto una proteína de unión a actina ubicua (UTβ4) con capacidad demostrada para inhibir la infiltración de neutrófilos, como una variante de corte y empalme limitada al tejido linfóide (LTβ4) que se ha mostrado que es sensible a activación expresada por linfocitos T epidérmicos dendríticos, y otros linfocitos intraepiteliales, para regular negativamente la inflamación local (Girardi, 2003).

La gefirina es una proteína de 93 kDa que se purificaba conjuntamente con el receptor de glicina (GlyR) y se descubrió que estaba localizada en el lado postsináptico de las sinapsis glicinérgicas (Prior *et al.*, 1992) (Sassoe-Pognetto y Fritschy, 2000; Craig y Lichtman, 2001).

El constituyente principal de las placas seniles en la enfermedad de Alzheimer es un péptido de 42 aa, denominado beta amiloide (Abeta). Abeta se genera a partir de una familia de proteínas que contienen dominio transmembrana (TM) de tipo 1, con corte y empalme diferencial, denominadas APP, por procesamiento endoproteolítico. La ruta principal, relativamente ubicua del metabolismo de APP en el cultivo celular implica la escisión por la alfa secretasa, que escinde dentro de la secuencia Abeta, impidiendo de este modo la formación de Abeta y su deposición. El péptido beta amiloide (1-42) (Butterfield, 2002) puede ser principal para la patogénesis de la EA (Sinha y Lieberburg, 1999).

El TFII-I es un factor de transcripción multifuncional inducible que se activa en respuesta a diversas señales extracelulares y se trasloca al núcleo para activar los genes inducidos por señales (Roy, 2001).

El síndrome respiratorio agudo grave (SARS) es una forma letal de la neumonía atípica. El genoma SARS-CoV tiene una longitud de ~29,7 kb y contiene 14 fases de lectura abiertas (ORF) flanqueadas por regiones no traducidas 5' y 3'. Los coronavirus codifican varias proteínas no estructurales. Estas proteínas no estructurales, que varían ampliamente entre las diferentes especies de coronavirus, son de función desconocida y parecen ser prescindibles para la replicación viral (Rota *et al.*, 2003; Snijder *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2003).

Se introdujeron secuencias de ADN que codifican cada una de estas proteínas, fusionadas con la proteína lexA para crear cebos específicos de antígeno, por transformación en células de levadura que expresaban la biblioteca SPLINT y se realizó selección por IACT como se ha descrito (Visintin *et al.*, 2002). Debería observarse que no se realizó ninguna manipulación en absoluto de la proteína correspondiente. Se seleccionaron transformantes dobles en busca de prototropía de histidina y de actividad lacZ. En la búsqueda de fragmentos scFv de unión a antígeno, se analizaron aproximadamente 10-20 clones diferentes His+/lacZ+ para cada antígeno en una segunda cribado de dos híbridos, excepto para UTβ4, LTβ4, Ab1-42, Gefirina y TFII-I (Tabla II) cuya cribado fue más exhaustiva (más de 90 clones diferentes His+/lacZ+). Específicamente se obtuvieron clones de unión en cada caso, demostrando que podrían expresarse anticuerpos monocatenarios específicos de cebo en el citoplasma y en el núcleo de las células de levadura (Tabla III). El cribado secundaria posterior confirmó que podrían identificarse positivos verdaderos que interaccionaron específicamente con el cebo original, pero no con otras fusiones de lexZ (lexA-lamina). Se identificaron 8 clones para CH2-Shc, 5 clones para SH2-Shc, 2 para K-RAS, 6 para Syk, 11 para LTβ4, 2 para UTβ4 y 6 para gefirina, 6 para Aβ 1-42, 4 para TFII-I y 6 para SARS-CoV ORF X5 que interaccionaban con sus antígenos pero no interaccionaban con lexA-lamina.

También se analizó un subconjunto de fragmentos de anticuerpo obtenido a partir del cribado de LTβ4 con respecto a la unión con UTβ4 (Figura 18).

La timosina específica de linfóide codifica una extensión NH2 terminal de seis restos en relación con la forma ubicua de timosina. Para verificar si sería posible aislar el scFv específico solamente para la forma linfóide, los inventores ensayaron cinco fragmentos de anticuerpo obtenidos del cribado de LTβ4 que se había mostrado que tenían las

secuencias de aminoácidos más diferentes entre los scFv aislados, con respecto a su capacidad para unirse con UTβ4. Todos los scFv ensayados resultaron ser altamente específicos para la forma linfoide y no consiguieron unirse con la forma ubicua (Figura 18). La selección paralela de SPLINT en UTβ4 resultó ser muy rigurosa; se encontraron muy pocos patrones de identificación de huella genética diferentes entre los 96 clones analizados. Además se

5 mostró que la selección de SPLINT contra el cebo UTβ4 era capaz de aislar scFv cuyas secuencias de aminoácidos correspondían a algunos scFv previamente aislados contra LTβ4, indicando de este modo que la selección de SPLINT contra LTβ4 era suficientemente exhaustiva para encontrar anticuerpos específicos contra ambas formas de la proteína timosina.

10 En conclusión, los resultados obtenidos confirmaron que, en efecto, la biblioteca SPLINT construida, representa una buena fuente de anticuerpos intracelulares validados, contra una amplia diversidad de proteínas diferentes. El procedimiento para aislar dichos anticuerpos, que depende directamente del formato de la biblioteca, no requiere en absoluto realizar ninguna manipulación de la proteína diana, obviando de este modo la necesidad de la expresión y purificación de proteínas, que representa un cuello de botella experimental significativo para aumentar el rendimiento

15 del aislamiento de anticuerpos. El procedimiento descrito, que depende de la construcción de la biblioteca SPLINT, permite aislar anticuerpos validados estables directamente de secuencias génicas.

Mejora de la rigurosidad de las selecciones.

20 Los resultados resumidos en la Tabla III muestran que, para cada proteína diana elegida, podrían aislarse varios anticuerpos específicos de antígeno directamente de secuencias génicas. El procedimiento se ha optimizado experimentalmente y se ha refinado y es muy sólido, rápido y eficaz.

25 Para encontrar agentes de unión muy fuertes y para mejorar la rigurosidad de las selecciones, si se requiere, los inventores también ensayaron su biblioteca SPLINT usando un cebo modificado, fusionado con una proteína lexA mutante. La proteína LexA bacteriana del vector pMIC-BD1 se modificó (mLexA) para anular su NLS intrínseca, como se ha descrito previamente (Rhee *et al.*, 2000) (Figura 7). De esta manera, solamente el complejo de anticuerpo/antígeno formado en el citoplasma tiene la información para dirigirlo al núcleo. Para comprobar si sería posible cribar SPLINT también con antígeno expresado solamente en el citoplasma de levadura (como sucede con el vector pMIC-BD2) los inventores eligieron la proteína K-RAS como antígeno diana. La elección de RAS también se debió a la dificultad aparente de aislar anticuerpos intracelulares en el procedimiento de selección convencional (Tabla III). En este procedimiento de selección modificado, la interacción entre el antígeno y el scFv debe suceder en el citoplasma, debido a que el antígeno se expresa en células de levadura sin la señal de localización nuclear intrínseca de lexA. scFv y el antígeno interaccionan en el citoplasma celular antes de trasladarse el complejo al

30 núcleo y activar la transcripción. Los inventores intentaron, al mismo tiempo, realizar la selección de K-RAS como proteína de fusión lexA-cebo con o sin señal de localización nuclear. En ambos casos obtuvieron el mismo número de anticuerpos intracelulares funcionales.

35 Esto indica que la tecnología fue suficientemente fuerte para permitir la selección de scFv con dicha afinidad para llevar el complejo de anticuerpo-antígeno al núcleo y para activar la transcripción de genes indicadores.

40 Como un comentario general, la selección de K-RAS con o sin NLS proporcionó muy pocos clones positivos en comparación con otros antígenos (Tabla II). Debería observarse que también se obtuvieron muy pocos clones positivos en otras estrategias de selección de IACT indicadas cuando se usó RAS como un cebo (Tanaka y Rabbitts, 2003). Esto podría indicar que el antígeno tendría dificultad para entrar en el núcleo, y esta dificultad interfiere con el procedimiento de selección normal. Como alternativa, la interferencia con la proteína RAS endógena podía explicar este bajo número de colonias obtenido de esta selección.

45 En conclusión los inventores establecieron que los ICAb específicos de antígeno funcionales se seleccionaban de la biblioteca SPLINT natural contra un amplio espectro de antígenos proteicos muy diferentes, incluyendo proteínas virales. Debería observarse que el procedimiento de selección optimizado asegura que los anticuerpos seleccionados sean todos funcionales también cuando se expresan en células de mamífero. De hecho la selección por IACT predice la propiedad de ser un intracuerpo funcional en todos los casos (Visintin *et al.*, 2002) (Tse *et al.*, 2002). Esto se confirmó para varios de los ICAb seleccionados de SPLINT, que mostraban buena solubilidad y semivida cuando se expresaban en células de mamífero (datos no mostrados). Por lo tanto, las bibliotecas SPLINT

50 representan una buena fuente rica para anticuerpos para actuar en el ambiente intracelular.

BIG SPLINT: aumento del tamaño de SPLINT

55 El tamaño de la biblioteca es una variable crítica para el aislamiento de fragmentos de anticuerpo. Sin embargo, la verdadera diversidad de una biblioteca no es fácilmente determinable; esta depende de hecho no solamente del número de clones contados independientes sino también del número de clones que de hecho expresan proteínas scFv.

65

A pesar del hecho de que los inventores han demostrado en el presente documento que es posible seleccionar anticuerpos intracelulares funcionales de una biblioteca SPLINT de 10^6 - 10^7 clones, Los ICAB funcionales podrían seleccionarse más fácilmente directamente realizando una biblioteca SPLINT más grande. Esto se ha conseguido por aumento directo de la escala (es decir repetición varias veces del procedimiento descrito anteriormente) o por métodos de recombinación (figura 4 a-b), como se ha realizado en bacterias (Sblattero y Bradbury, 2000) y en levadura para realizar grandes bibliotecas de anticuerpos de fragmentos Fab presentados en superficie (Feldhaus *et al.*, 2003). La biblioteca BIG-SPLINT obtenida de esta manera permite no solamente aislar anticuerpos intracelulares estables sino también aumentar el número de posibles anticuerpos candidatos para expresión intracelular.

10 **Biblioteca basada en el armazón de secuencia consenso**

Se llevará a cabo un refinamiento adicional de la biblioteca SPLINT con el estudio de secuencias de scFv aisladas por IACT.

15 Se ha observado que el conjunto de anticuerpos seleccionados con estas tecnologías se caracteriza por varios restos altamente conservativos. Estos restos críticos representan un tipo de marca registrada que identifica los anticuerpos capaces de expresarse en el ambiente intracelular por una multitud de scFv que son, de otro modo, incapaces de actuar en él. La tecnología IACT combinada con SPLINT también es capaz de seleccionar los scFv que poseen una secuencia óptima muy similar a una secuencia consenso presente en la base de datos de inmunoglobulinas presentes en la naturaleza. A medida que crece la base de datos de anticuerpos intracelulares seleccionados con esta tecnología, se reducirá el número de restos conservados. Será por lo tanto posible conseguir un armazón genérico final en el que puede elaborarse una biblioteca de anticuerpos para uso intracelular. Esto permitirá la creación de una biblioteca compatible con la baja capacidad de transformación de la levadura y, de forma más general, una biblioteca de fagémidos o fagos de scFv altamente estables que son funcionales para expresión en cualquier ambiente celular o no celular. Puede concluirse que tanto IACT como SPLINT son dos tecnologías con la capacidad de superar su potencial intrínseco y por lo tanto crear bibliotecas cada vez más sofisticadas y validadas.

30 **Bibliotecas SPLINT como una fuente de anticuerpos superestables, que pueden aislarse rápidamente, directamente de secuencias génicas.**

Se ha demostrado anteriormente que una biblioteca SPLINT, como se ha descrito anteriormente, representa una buena fuente genérica de anticuerpos intracelulares, que es de anticuerpos/dominios de anticuerpo que son capaces de unirse con cualquier antígeno de interés en condiciones de expresión intracelular. A la luz del hecho de que estos anticuerpos intracelulares validados se pliegan en el ambiente intracelular a pesar del hecho de que no consiguen formar el enlace disulfuro intracatenario que une los dos restos de cisteína presentes en todas las regiones variables de anticuerpo conocidas (Visintin *et al* 1999; Biocca *et al* 1995), y a la luz del hecho de que este enlace disulfuro contribuye en aproximadamente 4,5 kCal/mol a la estabilidad del plegamiento de un dominio de anticuerpo (Proba *et al.*, 1997), se puede concluir que los anticuerpos generados a través del procedimiento de IACT de bibliotecas SPLINT son mucho más estables que los anticuerpos promedio en cualquier repertorio dado. De hecho, cuando se expresan anticuerpos derivados de SPLINT en las condiciones de oxidación normales, permitiendo de este modo que se formen sus enlaces disulfuro intracatenarios, su estabilidad de plegamiento en condiciones desnaturalizantes controladas experimentalmente, (tales como desnaturalización por urea, guanidinio o térmica) es mucho mayor que la de los anticuerpos promedio (datos no mostrados). Por lo tanto, las bibliotecas SPLINT permiten el aislamiento de anticuerpos de estabilidad superior. Esta propiedad, junto con la posibilidad de aislar anticuerpos directamente de secuencias génicas, hace a las bibliotecas SPLINT la herramienta elegida para resolver el cuello de botella para la generación de alto rendimiento de anticuerpos estables, en aplicaciones tales como matrices de anticuerpos, para usar como herramientas de diagnóstico avanzadas y para la realización de perfiles de expresión de proteínas en proteómica.

50 **Anticuerpos dirigidos a la interacción proteína-proteína de bibliotecas SPLINT:**

La demostración inesperada de que una biblioteca SPLINT, como se ha descrito anteriormente, representa una buena fuente de anticuerpos intracelulares, representa el requisito previo esencial para el desarrollo final de la presente invención, en concreto, el aprovechamiento de la biblioteca SPLINT, después de ingeniería genética adecuada, para el aislamiento de anticuerpos que son neutralizantes de forma intrínseca. De hecho, los anticuerpos aislados de SPLINT no están dotados necesariamente de la propiedad de inhibir la función biológica de su proteína diana. De hecho, la neutralización de la función proteica (PKO) es una propiedad añadida, que hay que introducir por ingeniería genética o implantar caso a caso *ad hoc*, con estrategias tales como, por ejemplo, desviación del tránsito.

Estos métodos no son generales, y por lo tanto solo podría usarse un subconjunto de anticuerpos para neutralizar la función proteica, a pesar de su propiedad inherente de ser anticuerpos intracelulares validados.

Se describe a continuación el uso de bibliotecas SPLINT para generar anticuerpos rápidamente (directamente de secuencias génicas) que están intrínsecamente dotados de la capacidad para interferir con una interacción proteína-proteína dada. Estos serán anticuerpos neutralizantes de forma intrínseca.

Las interacciones proteicas desempeñan un papel crucial en el descubrimiento de diversas funciones biológicas. La interpretación de genes secuenciados del genoma humano está conduciendo a los investigadores a desarrollar nuevas tecnologías para la interpretación de funciones impredecibles de genes aún no descubiertos. Se han cribado diversos interactomas (interacciones proteicas en un solo organismo). Se ha visto que el sistema de dos híbridos puede usarse para crear una inmensa red de conexiones que pueden validarse adicionalmente por otro sistema biotecnológico, tal como geles 2D, espectrometría de masas, etc.. Los enfoques disponibles en la actualidad para estudiar la función proteica están limitados y son escasamente genéricos. Por el contrario, con la metodología adoptada para el estudio de ADN, las proteínas son tan variables que el estudio del genoma por interacción proteica no puede realizarse usando una sola metodología.

Por esta razón, los investigadores están examinando si la tecnología intracelular de anticuerpos puede ofrecer un enfoque adecuado para diversos campos de la genómica funcional.

Por ejemplo, se puede imaginar la construcción de una biblioteca *ad hoc* de fragmentos de anticuerpo seleccionados en un determinado proteoma (Figura 6). La tecnología implicaría una primera etapa en la que se crea una biblioteca de ADNc a partir de un tipo celular, un tejido, un virus o una bacteria, etc. La biblioteca se clonaría después directamente en el vector de dos híbridos fusionado con una proteína que se une con ADN (por ejemplo pMIC-BD2) y se ensayaría frente a una biblioteca de SPLINT *in vivo*. Después de haberse obtenido clones positivos, los scFv implicados en una interacción se aíslan y se clonan (en grupos en un formato de biblioteca) en un vector de expresión eucariota (por ejemplo scFvexpress). Después de crearse la nueva subbiblioteca, el scFv se puede expresar en el tipo celular, tejido, virus o bacteria del que se construyó originalmente la biblioteca de ADNc. Una vez que se introduce la biblioteca, se prepara un extracto proteico y se usa en experimentos de inmunoprecipitación. Las proteínas inmunoprecipitadas se separan con un gel bidireccional (gel 2D) y las proteínas aisladas pueden después analizarse por espectrometría de masas. Con esta tecnología (IntrAP), pueden obtenerse anticuerpos dirigidos contra el proteoma celular completo en una sola etapa.

Otra posible consideración es las interacciones y redes de la regulación genética al nivel de un genoma completo. De esta manera, sería posible concebir el genoma como un complejo de funciones expresadas por proteínas programadas para estabilizar las interacciones específicas. A la luz de esto, el número total de genes en un organismo parecería menos importante que el repertorio completo de interacciones que pueden codificarse potencialmente por el mismo genoma (interactoma). Por esta razón, se puede concebir la construcción de un subconjunto de bibliotecas de scFv (similares a la descrita en el párrafo anterior) aislando solamente el scFv que reconoce módulos de proteínas o secuencias peptídicas reconocidas como partes funcionales de una interacción. La biblioteca podría usarse después para interferir directamente en un interactoma conocido mediante una metodología basada en el sistema de tres híbridos (Figura 19). La estrategia de 3HY-SPLINT se basa en diversas publicaciones del campo de los sistemas de tres híbridos (Vidal M, *et al.* 1996; Huang J, *et al.* 1997; Leanna CA, *et al.* 1996; Shi HM, *et al.* 1996; Vidal M, *et al.* 1999).

La estrategia usa una selección genética en la que la disociación de una interacción se convierte en una ventaja selectiva para la cepa de levadura usada para este fin. Para reiterar el concepto, la unión entre la proteína X-DNA-BD y la proteína Y-AD es letal para una célula de levadura ya que en este sistema, como gen indicador, se usa un gen tóxico. La disociación por un anticuerpo que se une con uno de los dos dominios de interacción entre X e Y confiere una ventaja selectiva que puede identificarse convenientemente.

En el sistema de 3-HY de los inventores, la expresión del represor de tetraciclina reprime la expresión del gen de HIS3. En estas condiciones, la interacción entre X e Y confiere un fenotipo auxotrófico para histidina. Cuando un anticuerpo altera la interacción entre X e Y, el represor TetR no se expresa y la cepa puede sobrevivir también en ausencia de histidina ya que ya no se reprime la transcripción del gen HIS3.

Una novedad del sistema de los inventores es el uso de dos vectores en lugar del conjunto clásico de tres vectores para expresar las dos proteínas que interactúan y la biblioteca de anticuerpos neutralizantes. Esto permite simplificar la metodología, evitando la dificultad que entraña la modificación por ingeniería genética de tres vectores con diferentes marcadores nutricionales y diferentes resistencias a antibióticos y la necesidad de obtener por ingeniería genética también una cepa de levadura particular en la que deben anularse más de tres genes. Además debería evaluarse un protocolo altamente optimizado para la transformación de las células de levadura dando como resultado de este modo una muy escasa reproducibilidad de los experimentos. La metodología de tres híbridos de los inventores permite mantener la metodología actual de la tecnología de IAC con pocas modificaciones y por lo tanto es accesible a investigadores no especializados.

Los resultados obtenidos hasta ahora son:

ETAPA 1: *lexA*-p65 y VP16-p65 interactúan en un sistema de dos híbridos

Construcción del cebo y de la presa:

p65/MIC-BD1: el fragmento de ADN del miembro de proteína p65 de la familia NF- κ B/Rel se amplificó a partir del plásmido pRSV NF- κ B relA (p65) y se clonó entre los sitios de restricción BamHI/Sall de pMIC-BD1.

5 **p65/VP16c-t:** el fragmento de ADN de p65 se amplificó a partir del plásmido pRSV NF- κ B relA (p65) y se clonó entre los sitios de restricción BamHI/NotI de VP16c-t.

10 **Interacción intracelular de proteínas de fusión lexA-p65 y VP16-p65:** se cotransfectaron células de levadura L40 con vectores cebo y presa usando un protocolo de transformación de acetato de litio. Se verificó la interacción positiva usando marcadores auxotróficos para ambos plásmidos y para fototropía de histidina. Se lisaron colonias positivas para histidina y controles en nitrógeno líquido y se ensayaron con respecto a actividad b-gal en filtros como se ha descrito (Visintin y Cattaneo, 2001).

15 **ETAPA 2: lexA-p65 y VP16-p65 interactúan en un sistema de dos híbridos cuando se clonan en el vector pBiDi3HYlexA-VP16**

20 **Construcción del vector pBiDi3HY:** para construir el vector pBiDi3HY se usaron 2 vectores. El vector pESC-TRP se cortó con PvuII para aislar los promotores bidireccionales Gall-Gal10. El vector pMIC-BD1 se cortó con SphI y el fragmento grande (Klenow) de ADN polimerasa I, se usó posteriormente para retirar los salientes 3' para formar extremos romos. El vector también se desfosforiló con fosfatasa alcalina intestinal de ternero para impedir la recircularización del vector de clonación. La clonación de Gal1-Gal10 digerido con PvuII en pMIC-BD1 cortado con SphI y enrodamado generó pBiDi3HY.

25 **Construcción del vector pBiDi3HYlexA-VP16:** el fragmento de ADN VP16 se amplificó a partir del vector VP16* (Hollenberg *et al.*, 1995) y se clonó entre el BamHI/ApaI del plásmido pBiDi3HY.

30 El fragmento de ADN lexA se amplificó a partir de pMIC-BD y se clonó entre el EcoRI/SpeI del vector pBiDi3HY-VP16. El vector final pBiDi3HY-lexA-VP16 se secuenció y se verificó la expresión de las proteínas lexA y VP16 por análisis de transferencia de western de extracto en bruto de levadura después de la inducción de los promotores con galactosa al 20 % (véase la figura 20).

35 **Construcción del vector pBiDi3HYlexAp65-VP16p65:** el miembro de la familia NF- κ B/Rel proteína p65, se clonó como una proteína de fusión C terminal con los dominios lexA y VP16. El fragmento de ADN p65 se amplificó a partir de plásmido pRSV NF- κ B relA (p65) (proporcionado amablemente por la Doctora Francesca Demarchi) y se clonó en SpeI para producir la proteína de fusión lexA-p65 y entre ApaI/Sall para producir la proteína de fusión VP16-p65. La expresión de ambas proteínas de fusión p65 se verificó por análisis de transferencia de western y secuencias (véase la figura 21).

40 Todos los clones se secuenciaron, usando el kit Epicentre Sequitherm Excel II (Alsby, Mill Valley, CA) con un secuenciador automático Li-Cor 4000L (Lincoln, NE).

45 **Construcción del vector pSPLINT** (Figura 20): para la construcción del plásmido pSPLINT, se aplicó la siguiente estrategia de clonación. Se realizó una PCR de V_k y V_H clonadas con el enlazador 220 de pLINKER220 usando estos oligonucleótidos: con sentido 5'-CATCATCATAAGCTTATTTAGGTGACACTA-3' y antisentido 5'-ACCCGGGATCCCTAATGGTGATGGTGAGTACTATCCAGGCCAGCAGTGGGTTTGGGATTGGTTT GCCGACCTCCGCTTCTT-3'. El producto de la PCR resultante se digirió con HindIII/BamHI y se ligó con un vector VP16* digerido con HindIII/BamHI (Hollenberg *et al.*, 1995) para proporcionar pSPLINT. El dominio de activación VP16 se retiró manteniendo a la vez ambas señales de localización nuclear entre scFv. Se añadió una señal marcadora SV5 en el extremo C terminal del enlazador scFv.

50 **Construcción de la biblioteca SPLINT-3HY.**

También se clonó un grupo de scFv ensamblado a partir de la biblioteca SPLINT en pSPLINT digerido con BssHIII/NheI para obtener una biblioteca SPLINT/pSPLINT de 1,5 a $\sim 10^5$ clones diferentes en *E. coli*.

55 **ETAPA 3: la interacción de lexA-p65 y VP16-p65 puede anularse por un anticuerpo neutralizante en una estrategia de selección de SPLINT-3HY**

60 **Transformación conjunta del vector pBiDi3HYlexAp65-VP16p65 con biblioteca SPLINT-3HY en la cepa de levadura Y1596.**

El genotipo de la cepa indicadora de *Saccharomyces cerevisiae* Y1596 es MATa/a, his3A200/his3A200, trp1-901 leu 2-3, 112/leu2-3, 112ade2/ade2, URA::lexAOp₈-TetRLYS2::ADH(Tet Op)₂-HIS.

65

El sistema construido es un método de selección positivo diseñado para identificar dominios de anticuerpo que alteran la alteración proteína-proteína *in vivo*. Las proteínas de interés (homodímeros p65) se expresan como fusión con el dominio de unión a ADN de *lexA* y el activador transcripcional, VP16 bajo el control de los promotores bidireccionales inducibles Gal1-Gal10. La interacción entre *lexA*-p65 y VP16-p65 conducen a la expresión de la proteína represora de tetraciclina (TetR) que impide la transcripción del gen indicador HIS3 que conduce a la incapacidad de células de levadura para crecer en medios sin histidina. La alteración de la homodimerización de la proteína p65 por un anticuerpo neutralizador restaura la capacidad para crecer en dichos medios. Se ha mostrado que la proteína de fusión *lexA*-p65 presenta capacidad de activación. Para bloquear la producción de histidina que suprime el crecimiento de fondo en medio sin histidina se realizó una modulación del sistema con tetraciclina/3-AT. Después de la identificación de las condiciones de cultivo del homodímero *lexA*p65-VP16p65 esta construcción se usó para la selección de la biblioteca SPLINT para identificar el anticuerpo neutralizante que altera la formación del homodímero p65 *in vivo*.

Se introduce la biblioteca SPLINT en la cepa Y1595 por un protocolo modificado de transformación de levadura (Visintin y Cattaneo, 2001). Cada transformante contiene supuestamente un plásmido de biblioteca individual que codifica un scFv además de las proteínas del homodímero p65. Se seleccionarán células que contengan el plásmido que codifica un scFv que se une con una o ambas proteínas que interaccionan con p65 en SG-Raf-WHULK. Los procedimientos de transformación deben seguirse cuidadosamente para asegurar una alta eficacia de transformación.

Transformación de SPLINT-3HY

El siguiente protocolo de transformación es una modificación del método publicado (Visintin y Cattaneo, 2001).

Materiales: 500 µg de biblioteca SPLINT/pSPLINT; 150 ml de YC-UKW; 21 YPAD; 11YPA; 1,51 YC-UKWL + 10 placas YC-UKWL (100 mm); 11YC-WHULK; 11SG-Raf-WHULK + 3AT 25 mM (véase receta posteriormente); 20 SG-Raf-WHULK + 3AT 25 mM placas de 100 ml TE 10X; 20 ml de LiAc 10X; 1 ml de esperma de salmón desnaturalizado 10 mg/ml; 150 ml de PEG 4000 50 %; 20 ml de DMSO.

Procedimiento:

Día 1: cultivo de levadura Y1595 que contiene el plásmido de homodímero p65 en YC-UKW O/N

Día 2: inoculación de 100 ml de YC-UKW con una alícuota del cultivo de una noche para encontrar una dilución que sitúa los 100 ml de cultivo en fase logarítmica al día siguiente

Día 3: transferencia de suficiente cultivo de una noche en 11 de los YPAD precalentados a 30 °C para producir una $DO_{600} = 0,3$. Cultivo a 30 °C durante 3 horas. Centrifugación de las células 1500 X g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Lavado del sedimento en 500 ml de TE 1X, después centrifugación de nuevo de las células a 1500 X g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Resuspensión del sedimento en 20 ml de LiAc 1X, TE 0,5X y transferencia a un nuevo matraz. Adición de 500 µg de biblioteca de ADN y 1 ml de esperma de salmón desnaturalizado. Adición de 140 ml de LiAc 1, PEG 3350 40 %, TE 1X; mezcla e incubación durante 30 minutos a 30 °C con agitación suave. Adición de 17,6 ml de DMSO; agitación para mezclar. Choque térmico durante 10 minutos a 42 °C en un baño de agua con agitación ocasional para mezclar. Enfriamiento rápido a temperatura ambiente de células en un baño de agua diluyendo 400 ml de YPA. Sedimentación de las células por centrifugación y lavado con 500 ml de YPA. Después de la centrifugación resuspensión del sedimento en 11 YPAD precalentados. Incubación durante 1 hora a 30 °C con agitación suave. Sedimentación de células de 1 ml: resuspensión en 1 ml de YC-UKWL; extensión de 100 µl de diluciones 1:1000, 1:100, 1:10 para controles de la eficacia de transformación. Sedimentación de células del cultivo restante. Lavado del sedimento con 500 ml de YC-UWL. Resuspensión en 11 de YC-UWL precalentados e incubación durante una noche a 30 °C con agitación

Día 4: sedimentación de células y lavado con 500 µl de YC-WHULK. Sedimentación de células y lavado con 500 ml de SG-Raf-WHULK + 3AT 25 mM. Resuspensión del sedimento final en 10 ml de SG-Raf-WHULK + 3AT 25 mM. Extensión de diluciones del total en placas YC-UKWL para comparar con el número de transformantes primarios. Extensión de la suspensión de transformación restante en placas de SG-Raf-WHULK + 3AT 25 mM.

Medio mínimo de galactosa sintética (medio de retirada de SG)

1. YNB sin aa y $(NH_4)_2SO_4$: 1,2 g de base nitrogenada de levadura, sin aminoácidos y sulfato de amonio (Difco N° 0335-15-9); 20 g de bacto-agar; Adición de H₂O hasta 800 ml. Autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

2. Sales: 5,4 g de NaOH; 10 g de ácido succínico (Sigma N° S-7501); 5 g de sulfato de amonio (Sigma N° A-3920).

3. Gal-Raf: 20 g de galactosa; 10 g de rafinosa

Adición de H₂O hasta 100 ml y disolución de todos los componentes uno por uno. Adición de galactosa y rafinosa y H₂O para componer un volumen final de 150 ml.

4. MEZCLA de aminoácidos: 5,8 g de NaOH; 1 g de sales de hemisulfato de Adenina; 1 g de L-Arginina HCl (Sigma N° A-5131); 1 g de L-Cisteína (Sigma N° C-8277); 1 g de L-Treonina (Sigma N° T-8625); 0,5 g de L-ácido Aspártico (Sigma N° A-4534); 0,5 g de L-Isoleucina (Sigma N° I-7383) 0,5 g de L-Metionina (Sigma N° M-9625); 0,5 g de L-Fenilalanina (Sigma N° P-5030) 0,5 g de L-Prolina (Sigma N° P-4655); 0,5 g de L-Serina (Sigma N° S-

5511). Disolución en 80 ml de H₂O

5. **L-Tirosina:** 0,5 g de L-Tirosina (Sigma N° T-3754); 0,2 g de NaOH; Disolución en 10 ml por calentamiento.

6. **Soluciones de aminoácidos omitidas:**

- 5 L-Histidina (Sigma N° H-9511): H₂O 5 g/l
Uracilo (Sigma N° U-0750): H₂O 10 g/l (+2 sedimentos de NaOH)
L-Leucina (Sigma N° L-1512): H₂O 10 g/l
L-Lisina HCl (Sigma N° L-1262): H₂O 10 g/l
L-Triptófano (Sigma N° T-0254): H₂O 10 g/l

10 Añadir a la MEZCLA de aa (4) la solución de L-Tirosina (5) y H₂O hasta componer un volumen final de 100 ml. Esterilización por filtrado, separación en alícuotas y almacenamiento a -20 °C durante hasta 1 año. Esterilización por filtrado y separación en alícuotas individualmente de soluciones de aminoácidos (aa) omitidas (H, W, L, K, U) y almacenamiento a -20 °C durante hasta 1 año. Antes de preparar las placas de SG-Raf o los medios mezclando soluciones apropiadas, los medios deben ajustarse a pH 5,8 y esterilizarse por sales de filtración + mezcla final de aa.

Resultados de selecciones de SPLINT-2HY

20 Ya se ha demostrado que la IACT es un método de selección genética que permite el aislamiento de intracuerpos solubles directamente a partir de secuencias génicas de antígenos (Visintin *et al.*, 2002).

25 El principal objetivo de la tecnología de IAC fue desarrollar bibliotecas de scFv intracelulares en un solo tubo de suficiente tamaño y diversidad para facilitar el aislamiento de anticuerpos de cada especificidad concebible, incluyendo anticuerpos con alta solubilidad, estabilidad y buena afinidad para expresión intracelular. Un determinante importante de la composición y diversidad de este sistema inmunitario *in vitro* alternativo es la fuente de genes de anticuerpo usados como componentes básicos para construir la biblioteca. Para cribar la probabilidad de aislar intracuerpos directamente del repertorio de anticuerpos de ratones primarios los inventores han obtenido por ingeniería genética una biblioteca de anticuerpos en un solo tubo en un vector de dominio de activación y lo
30 ensayado en una estrategia de selección de dos híbridos usando un amplio panel de antígenos diferentes.

35 Los resultados obtenidos de todas las selecciones diferentes han indicado que la biblioteca SPLINT es una buena fuente de fragmentos de anticuerpo. De hecho, fue posible seleccionar varios scFv contra cada antígeno expuesto a la tecnología de IAC. Para algunos antígenos diana fue posible también aislar varios anticuerpos, lo que indica de este modo que aunque la biblioteca no es muy compleja la diversidad obtenida es aún suficiente para adquirir reactivos inmunológicos que reconocen antígenos particulares como por ejemplo proteínas que están altamente conservadas entre especies.

40 Los inventores han demostrado que una pequeña biblioteca que se ha demostrado que está enriquecida en anticuerpos funcionales aún puede proporcionar una buena fuente de anticuerpos para expresión ectópica ya que el método para seleccionar los fragmentos de anticuerpo actúa como un embudo de filtración. SPLINT ha demostrado que contiene una fuente de anticuerpos superiores estables, presentes de forma natural en repertorios sin tratamiento previo pero difícil de encontrar si la metodología usada no está especializada.

45 En el formato original, SPLINT-2HY garantiza que los anticuerpos seleccionados son buenos agentes de unión intracelular pero no puede asegurar los anticuerpos neutralizantes.

50 Para generar un método que proporcione fácilmente anticuerpos neutralizantes, se ha modificado la tecnología de IAC y la biblioteca SPLINT para generar un nuevo sistema denominado SPLINT-3HY.

Resultados de las selecciones de 3-HY

55 En el formato original de la tecnología de IAC, una interacción de antígeno de un anticuerpo pone las dos proteínas híbridas juntas y da como resultado la activación de los genes indicadores.

En la nueva generación de la tecnología, la versión de tres híbridos, se pueden identificar dominios de anticuerpo que dosifican o anulan interacciones macromoleculares definidas.

60 Para conseguir la prueba de principio de esa tecnología se usó SPLINT-3HY para realizar la selección de novo de fragmentos de anticuerpo scFv contra la proteína NF-κB RelA p65.

65 La NF-κB de mamíferos es una familia de proteínas estructuralmente relacionadas, que incluye p65/RelA, que forma homo y heterodímeros. La regulación de la expresión génica por la familia de NF-κB/rel de factores de transcripción está controlada principalmente por las proteínas IκB inhibitorias. El complejo activo de NF-κB está compuesto de homodímeros y heterodímeros de p50, RelA, RelB y c-Rel. Estos complejos se secuestran en el

citoplasma de IκB. La fosforilación inducida por señal extracelular y posterior degradación de IκB es esencial para la traslocación nuclear de NF-κB. NF-κB se une con los elementos de reconocimiento en la región promotora de genes diana y activa transcripción. Las proteínas IκB determinan la duración de la transactivación por NF-κB. IκBa está implicada en la activación transitoria de NF-κB debido a que se degrada rápidamente tras la estimulación y se vuelve a sintetizar por NF-κB activada. La mayoría de los inductores de NF-κB provocan degradación de IκBα. La IκBα de nueva síntesis secuestra NF-κB en el citoplasma y determina la señal.

p65 tiene una región rel homóloga que se une a un ADN de estructura bipartita y un dominio de activación de la transcripción C-terminal. Estas dos regiones funcionales están ligadas por un segmento que contiene una señal de transporte nuclear (Chen *et al.*, 2000).

La degradación de IκB activa esta PKAc que fosforila la subunidad p65 de NF-κB en Ser 276 haciendo que NF-κB entre en el núcleo transcripcionalmente activo mediante el reclutamiento de la proteína de unión CREB (CBP)/p300 (Zhong *et al.*, 1997; Zhong *et al.*, 1998).

Se cree que los homodímeros de p50 compiten por la unión con el sitio κB con complejos de NF-κB que contienen subunidades tales como p65 que tienen dominios de transactivación; sin embargo, es poco probable que este sea su mecanismo primario de represión, ya que su afinidad por sitios κB clásicos es menor que la de heterodímeros tales como p50:p65 (Kunsch *et al.*, 1992). Un posible mecanismo que se ha demostrado para otras proteínas de unión a ADN represivas (Glass y Rosenfeld, 2000) es que p50 nuclear puede interactuar con proteínas inhibitoras separadas que reclutan complejos correpresores que contienen HDAC para promotores génicos.

El homodímero de la proteína p65 se cotransformó en células de levadura YI595 con la biblioteca de scFv SPLINT/pSPLINT después del procedimiento a gran escala descrito en (Visintin y Cattaneo, 2001). La biblioteca cotransformada se extendió en placas de SG-Raf-WHULK +25 mM para permitir la activación de promotores de Gal 1-10 y la selección del plásmido que codifica un scFv que se une con una o ambas proteínas que interactúan con p65 debido a la represión del represor de tetraciclina que restaura la transcripción del gen de His3. La alta eficacia de la transformación ($2,6 \times 10^7$) obtenida en este experimento aseguró que el rendimiento de los transformantes primarios era tres veces la complejidad de la biblioteca, por lo tanto la complejidad de la biblioteca asegura que el 95 % de los clones representados en la biblioteca se han examinado (Clarke y Carbon, 1976). Después de tres días se seleccionaron 4 clones que crecieron en placas -HIS y se cultivaron en una red de placas -HIS nuevas para una segunda verificación de la activación transcripcional de este gen. Después de 4 días solamente se pudo rescatar dos clones de los 4 clones iniciales seleccionados en el primer ciclo de selección en placas SG-Raf-WHULK +25 mM. Ambos clones del cribado secundaria se seleccionaron y se cultivaron para el aislamiento de ADN. Se analizaron plásmidos scFv/pSPLINT aislados por identificación de huella génica de PCR-BstNI y secuencias. La conclusión de esta primera parte de los experimentos es que ambos scFv seleccionados de SPLINT-3HY eran capaces de anular la interacción entre el dímero p65-p65. Para verificar que los dos scFv aislados también eran capaces de reconocer p65 como un monómero ambos fragmentos de anticuerpo se clonaron en fusión con VP16 en el vector pLINKER220.

ETAPA 4: ¿son los scFv aislados anti p65 agentes de unión para monómeros p65?

Construcción del plásmido anti p65 (A1 y A2)/pLinker220. Se subclonaron fragmentos scFv anti p65 en pLinker220 entre los sitios de restricción BssHII-NheI.

Como se muestra en la figura 23 el clon A2 presenta una interacción positiva con el monómero p65, lo que indica de este modo su especificidad con la proteína diana.

Por el contrario, el clon A1 solamente fue capaz de reconocer el dominio de unión a ADN reconocido lexA. Aunque el clon A1 resulta ser específico para la proteína lexA el resultado obtenido indica que scFvA1 es probablemente capaz de inhibir el dominio de unión a p65 o el dominio de unión a ADN de p65 de una manera no convencional o por impedimento estérico.

Se clonó posteriormente scFv A2 en el vector de expresión de mamíferos scFvexcyto-SV5.

ETAPA 5: estudios de células de mamífero *in vivo*

Construcción del plásmido anti p65A2/scFvexcyto-SV5. Se subclonaron fragmentos scFv anti p65 en scFvexcyto-Sv5 entre los sitios de restricción BssHII-NheI.

Se expresó A2 anti p65 en la línea celular HEK como una proteína citoplasmática sin líder. Las células transfectadas presentan una tinción intracelular difusa, típica de la proteína citoplasmática soluble (véase figura 24).

Para evaluar si la inhibición de A2 anti p65 interfiere con la asociación física entre el dímero de p65 y p50, se llevó a cabo un experimento de coimmunoprecipitación (Figura 25). La Figura 25 muestra los controles (carril 1-3-5- p65 y

p50 expresados por HEK en no transfectado (c), transfectado con anti p65 (carril 3) y transfectado con un scFv irrelevante (carril 5) inmunoteñido con anti p65 (parte superior de la imagen) e inmunoteñido con un anti p50 (parte inferior). El carril 4 muestra la banda coimmunoprecipitada correspondiente al monómero de p65 (parte superior) y la proteína p50 (parte inferior). La conclusión para este experimento es que anti p65 es capaz de reconocer p65 endógeno en líneas celulares HEK. En este experimento también interaccionó la proteína p50 con p65 indicando de este modo que la interacción entre anti p65 y p65 no interfiere con los sitios de unión naturales de p65 y p50. También se expuso SPLINT-3HY a un panel de pares de interacción (véase Tabla IV). De cada estrategia de selección se aislaron varios anticuerpos neutralizantes (datos o mostrados) indicando de este modo que la estrategia de SPLINT-3HY debería proporcionar una metodología robusta para dilucidar los mecanismos celulares en numerosos campos, particularmente importantes en el área de la transducción de señales. La evaluación de la función génica puede realizarse usando las herramientas de anulación proteica incluyendo péptidos, aptámeros y anticuerpos. Estos enfoques se han sustituido por la tecnología de anticuerpos intracelulares, que muestra muchas más potencia para la investigación de la función proteica que las técnicas enumeradas anteriormente. De hecho puede bloquear o estabilizar las interacciones macromoleculares, modular la función enzimática ocluyendo un sitio activo, secuestrando el sustrato o fijando la enzima en una conformación activa o inactiva. Pueden desviar proteínas de sus compartimentos celulares habituales, dirigirse específicamente a una versión modificada posttraducionalmente de una proteína dada (incluyendo heterodimerización), pueden dirigirse específicamente a la localización subcelular de una proteína dada, y finalmente pueden dirigirse selectivamente a antígenos no proteicos.

SPLINT-3HY no solamente proporciona una buena fuente de anticuerpos estables sino que también proporciona en una etapa de selección una buena fuente de anticuerpos intracelulares y neutralizantes, convirtiéndose de este modo en la primera estrategia de selección basada en anticuerpos elaborada con este fin.

Tabla IV. Panel de pares de interacción usados para selección de SPLINT-3HY

Ligando de proteína x	Ligando de proteína y
p65 RelA	p65 RelA
p65 RelA	p50 NF-κB1
<i>β</i> amiloide aa. 1-42	<i>β</i> amiloide aa.1-42
JX-TK TrkA	PTB p66 Shc
Sinucleína	Sinfilina

Biblioteca basada en el armazón de secuencia consenso

Se llevará a cabo un refinamiento adicional de la biblioteca SPLINT con el estudio de secuencias de scFv aisladas por IACT.

Se ha observado que el conjunto de anticuerpos seleccionado con esas tecnologías se caracteriza por varios restos altamente conservativos. Estos restos críticos representan una especie de marca que identifica los anticuerpos capaces de expresarse en el ambiente **intracelular** por una multitud de scFv que de otro modo serían incapaces de actuar en el. La tecnología IACT combinada con SPLINT también es capaz de seleccionar el scFv que posee una secuencia óptima muy similar a una secuencia consenso presente en la base de datos de inmunoglobulinas presentes en la naturaleza. A medida que crece la base de datos de anticuerpos intracelulares seleccionados con esta tecnología, se reducirá el número de restos conservados. Será por lo tanto posible conseguir un armazón genérico final en el que puede desarrollarse por ingeniería genética una biblioteca de anticuerpos para uso intracelular. Esto permitirá la creación de una biblioteca compatible con la baja capacidad de transformación de la levadura y, de forma más general, una biblioteca de fagémidos o fagos de scFv altamente estables que son funcionales para la expresión en cualquier ambiente celular o no celular. Puede concluirse que tanto IACT como SPLINT son dos tecnologías con la capacidad de superar su potencial intrínseco y por lo tanto crear bibliotecas cada vez más sofisticadas y validadas.

Secuencias:

URA3 (marcador nutricional que codifica la enzima orotidin-5' fosfato descarboxilasa. Esta enzima es activa en la última etapa de la biosíntesis del uracilo y es responsable de la conversión del compuesto C en uracilo).

ATGTCGAAAGCTACATATAAGGAACGTGCTGCTACTCATCCTAGTCCTGTTGCTGCCAAGCTAT
 TTAATATCATGCACGAAAAGCAAACAACTTGTGTGCTTCATTGGATGTTTCGTACCAACCAAGG
 AATTACTGGAGTTAGTTGAAGCATTAGGTCCCAAATTTGTTTACTAAAAACACATGTGGATA
 TCTTGACTGATTTTTCCATGGAGGGCACAGTTAAGCCGCTAAAGGCATTATCCGCCAAGTACA
 ATTTTTACTCTTCGAAGACAGAAAATTTGCTGACATTGGTAATACAGTCAAATTGCAGTACTC
 TCGGGTGTATACAGAATAGCAGAATGGGCAGACATTACGAATGCACACGGTGTGGTGGGCC
 CAGGTATTGTTAGCGGTTTGAAGCAGGCGGCAGAAGAAGTAACAAAGGAACCTAGAGGCCTT
 TTGATGTTAGCAGAATTGTCATGCAAGGGCTCCCTATCTACTGGAGAATATACTAAGGGTACT
 GTTGACATTGCGAAGAGCGACAAAGATTTTGTATCGGCTTTATTGCTCAAAGAGACATGGGT
 GGAAGAGATGAAGGTTACGATTGGTTGATTATGACACCCGGTGTGGGTTTAGATGACAAGGG
 AGACGCATTGGGTCAACAGTATAGAACCGTGGATGATGTGGTCTCTACAGGATCTGACATTAT
 TATTGTTGGAAGAGGACTATTTGCAAAGGGGAAGGGATGCTAAGGTAGAGGGTGAACGTTACA
 GAAAAGCAGGCTGGGAAGCATATTTGAGAAGATGCGGCCAGCAAAACTAA

TRP1 (marcador nutricional que codifica la enzima N-(5-fosforibosil) antranilato isomerasa. Esta enzima se encuentra en la penúltima etapa del triptófano).

5

ATGTCTGTTATTAATTTACAGGTAGTTCTGGTCCATTGGTGAAAGTTTTCGGCTTGCAGAGCA
 CAGAGGCCGCAGAATGTGCTCTAGATCCGATGCTGACTTGCTGGGTATTATATGTGTGCCCA
 ATAGAAAGAGAACAATTGACCCGGTTATTGCAAGGAAAATTTCAAGTCTTGTAAGCATATA
 AAAATAGTTCAGGCACTCCGAAATACTTGGTTGGCGTGTTCGTAATCAACCTAAGGAGGATG
 TTTTGGCTCTGGTCAATGATTACGGCATTGATATCGTCCAACCTGCATGGAGATGAGTCGTGGCA
 AGAATACCAAGAGTTCCTCGGTTTGCCAGTTATTAAGACTCGTATTTCCAAAAGACTGCAA
 CATACTACTCAGTGCAGCTTACAGAAACCTCATTCGTTTATTCCCTTGTGTTGATTCAGAAGCA
 GGTGGGACAGGTGAACTTTTGGATTGGAACCTCGATTTCTGACTGGGTTGGAAGGCAAGAGAGC
 CCCGAAAGCTTACATTTTATGTTAGCTGGTGGACTGACGCCAGAAAATGTTGGTGTATGCGCTT
 AGATTAATGGCGTTATTGGTGTGATGTAAGCGGAGGTGTGGAGACAAATGGTGTAAAAGA
 CTCTAACAAAATAGCAAATTTTCGTCAAAAATGCTAAGAAATAG

LEU2 (un marcador nutricionalmente esencial que codifica la enzima β -isopropilamato deshidrogenasa. Leu3 es un regulador positivo de los 3 genes para la biosíntesis de leucina y se piensa que activa la expresión de los genes para isoleucil-valina ILV2 e ILV5).

10

ATGTCTGCCCTATGTCTGCCCTAAGAAGATCGTCGTTTTGCCAGGTGACCACGTTGGTCAAG
 AAATCACAGCCGAAGCCATTAAGGTTCTTAAAGCTATTTCTGATGTTTCGTTCCAATGTCAAGTT
 CGATTTTCGAAAATCATTTAATTGGTGGTGCTGCTATCGATGCTACAGGTGTCCCACCTCCAGAT
 GAGGCGCTGGAAGCCTCCAAGAAGGTTGATGCCGTTTTGTTAGGTGCTGTGGCTGGTCCTAAA
 TGGGGTACCGGTAGTGTAGACCTGAACAAGGTTTACTAAAAATCCGTAAAGAACTTCAATTG
 TACGCCAACTTAAGACCATGTAACCTTTCATCCGACTCTCTTTAGACTTATCTCCAATCAAGC
 CACAATTTGCTAAAGGTACTGACTTCGTTGTTGTCAGAGAATTAGTGGGAGGTATTTACTTTGG
 TAAGAGAAAGGAAGACGATGGTGATGGTGTCGCTTGGGATAGTGAACAATACACCGTTCCAG
 AAGTGCAAAGAATCACAGAATGGCCGCTTTCATGGCCCTACAACATGAGCCACCATTGCCTA
 TTTGGTCTTGGATAAAGCTAATCTTTTGGCCTCTTCAAGATTATGGAGAAAACTGTGGAGG
 AAACCATCAAGAACGAATCCCTACATTGAAGGTTCAACATCAATTGATTGATTCTGCCGCCA
 TGATCCTAGTTAAGAACCCAACCCACCTAAATGGTATTATAATCACCAGCAACATGTTTGGTG
 ATATCATCTCCGATGAAGCCTCCGTTATCCCAGGTTCCCTTGGGTTTGTGCCATCTGCGTCCTTG
 GCCTCTTTGCCAGACAAGAACACCGCATTGTTGTTGTACGAACCATGCCACGGTTCGTCTCCAG
 ATTTGCCAAAGAATAAGGTTGACCCTATCGCCACTATCTTGTCTGCTGCAATGATGTTGAAATT
 GTCATTGAACTTGCTGAAGAAGGTAAGGCCATTGAAGATGCAGTTAAAAAGGTTTTGGATGC
 AGGTATCAGAACTGGTGATTTAGGTGGTTCCAACAGTACCACCGAAGTCGGTGATGCTGTCCG
 CGAAGAAGTTAAGAAAATCCTTGCTTAA

HIS3 (marcador nutricional que codifica la enzima imidazolglicerol fosfato deshidratasa. Esta enzima está implicada en el ciclo de regulación de la biosíntesis de histidina).

5

ATGACAGAGCAGAAAGCCCTAGTAAAGCGTATTACAAATGAAACCAAGATTCAGATTGCGAT
 CTCTTTAAAGGGTGGTCCCCTAGCGATAGAGCACTCGATCTTCCCAGAAAGAGGCAGAAAGCAG
 TAGCAGAACAGGCCACACAATCGCAAGTGATTAACGTCACACAGGTATAGGGTTTCTGGACC
 ATATGATACATGCTCTGGCCAAGCATTCCGGCTGGTCGCTAATCGTTGAGTGCAATTGGTGACTT
 ACACATAGACGACCATCACACCACTGAAGACTGCGGGATTGCTCTCGGTCAAGCTTTTAAAGA
 GGCCCTAGGGGCCGTGCGTGGAGTAAAAAGGTTTGGATCAGGATTTGCGCCTTTGGATGAGGC
 ACTTCTAGAGCGGTGGTAGATCTTTCGAACAGGCCGTACGCAGTTGTCGAACTTGGTTTGCA
 AAGGGAGAAAGTAGGAGATCTCTTTCGAGATGATCCCGCATTCTTGAAGCTTTGCAGA
 GGCTAGCAGAATTACCCTCCACGTTGATTGTCTGCGAGGCAAGAATGATCATCACCGTAGTGA
 GAGTGCCTTCAAGGCTCTTGGCGTTGCCATAAGAGAAGCCACCTCGCCCAATGGTACCAACGA
 TGTTCCCTCCACCAAAGGTGTTCTTATGTAG

LYS2 (marcador nutricional que codifica la enzima α -aminoadípico semialdehído. Se piensa que el producto de la reacción controlada por LYS2 actúa como un co-inductor junto con el producto LYS14 para estimular la expresión de numerosos genes implicados en el mismo ciclo).

10

ATGACTAACGAAAAGGTCTGGATAGAGAAGTTGGATAATCCAACCTCTTTCAGTGTTACCAT
 GACTTTTTACGCCCAACAAGAACCCTTATACGAAACAAGCTACATATTCGTTACAGCTACCT
 CAGCTCGATGTGCCTCATGATAGTTTTCTAACAAATACGCTGTCGCTTTGAGTGTATGGGCTG
 CATTGATATATAGAGTAACCGGTGACGATGATATGTTCCTTATATTGCGAATAACAAAATCTT
 AAGATTCAATATTC AACCAACGTTGTCATTTAATGAGCTGTATTCTACAATTAACAATGAGTTG
 AACAAAGCTCAATTCTATTGAGGCCAATTTTTCCCTTTGACGAGCTAGCTGAAAAAATTC AAAGTT
 GCCAAGATCTGGAAAGGACCCCTCAGTTGTTCCGTTTGGCCTTTTGGAAAACCAAGATTTCA
 AATTAGACGAGTTCAAGCATCATTTAGTGGACTTTGCTTTGAATTTGGATACCAGTAATAATGC
 GCATGTTTTGAACTTAATTTATAACAGCTTACTGTATTGCAATGAAAGAGTAACCATTGTTGCG
 GACCAATTTACTCAATATTTGACTGCTGCGCTAAGCGATCCATCCAATTGCATAACTAAAATCT
 CTCTGATCACCGCATCATCCAAGGATAGTTTACCTGATCCAATAAGAACTTGGGCTGGTGCG
 ATTTTCGTGGGGTGTATTACGACATTTTCCAGGACAATGCTGAAGCCTTCCAGAGAGAACCT
 GTGTTGTGGAGACTCCAACACTAAATTCGACAAGTCCCGTTCTTTCACTTATCGCGACATCAA
 CCGCACTTCTAACATAGTTGCCATTATTTGATTAAAACAGGTATCAAAGAGGTGATGTAGT
 GATGATCTATTCTTCTAGGGGTGTGGATTTGATGGTATGTGTGATGGGTGTCTTGAAAGCCGGC
 GCAACCTTTTCAGTTATCGACCCTGCATATCCCCAGCCAGACAAACCATTACTTAGGTGTTG
 CTAACCACGTGGGTTGATTGTTATTAGAGCTGCTGGACAATTGGATCAACTAGTAGAAGATT
 ACATCAATGATGAATTGGAGATTGTTTCAAGAATCAATTCATCGCTATTCAAGAAAATGGTA
 CCATTGAAGGTGGCAAATTGGACAATGGCGAGGATGTTTTGGCTCCATATGATCACTACAAAG
 ACACCAGAACAGGTGTTGTAGTTGGACCAGATTCCAACCCAACCTATCTTTCACATCTGGTTC
 CGAAGGTATTCTAAGGGTGTCTTGGTAGACATTTTTCTTGGCTTATTATTTCAATTGGATGT
 CCAAAGGTTCAACTTAACAGAAAATGATAAATTCACAATGCTGAGCGGTATTGCACATGATC
 CAATTC AAAGAGATATGTTTACACCATTATTTTTAGGTGCCCAATTGTATGTCCCTACTCAAGA
 TGATATTGGTACACCGGGCCGTTTAGCGGAATGGATGAGTAAGTATGGTTGCACAGTTACCCA
 TTAAACACCTGCCATGGGTCAATTACTTACTGCOCCAAGCTACTACACCATTCCCTAAGTTACAT
 CATGCGTTCCTTGTGGGTGACATTTTAAACAAAACGTGATTGTCTGAGGTTACAAACCTTGGCAG
 AAAATTGCCGTATTGTTAATATGTACGGTACCACTGAAACACAGCGTGCAGTTTCTTATTTGGA
 AGTTAAATCAAAAATGACGATCCAAACTTTTTGAAAAAATTGAAAGATGTCATGCCTGCTGG
 TAAAGGTATGTTGAACGTTTACGCTACTAGTTGTTAACAGGAACGATCGTACTCAAATATGTGG
 TATTGGCGAAATAGGTGAGATTTATGTTTCGTGCAGGTGGTTTGGCCGAAGGTTATAGAGGATT
 ACCAGAATTGAATAAAGAAAAATTTGTGAACAACCTGGTTTGTGAAAAAGATCACTGGAATTA
 TTTGGATAAGGATAATGGTGAACCTTGGAGACAATCTGGTTAGGTCCAAGAGATAGATTGTA
 CAGAACGGGTGATTTAGGTCGTTATCTACCAAACGGTGACTGTGAATGTTGCGGTAGGGCTGA
 TGATCAAGTTAAAATTCGTGGGTTTCAGAATCGAATTAGGAGAAATAGATACGCACATTTCCCA
 ACATCCATTGGTAAGAGAAAACATTACTTTAGTTTCGCAAAAATGCCGACAATGAGCCAACATT
 GATCACATTTATGGTCCCAAGATTTGACAAGCCAGATGACTTGTCTAAGTTCCAAAGTGATGTT
 CCAAAGGAGGTTGAAACTGACCCTATAGTTAAGGGCTTAATCGGTTACCATCTTTTATCCAAG
 GACATCAGGACTTCTTAAAGAAAAGATTGGCTAGCTATGCTATGCCTTCCCTGATTGTGGTTA
 TGGATAAACTACCATTGAATCCAAATGGTAAAGTTGATAAGCCTAAACTTCAATTCCTCAACTC
 CCAAGCAATTAATTTGGTAGCTGAAAAATACAGTTTCTGAAACTGACGACTCTCAGTTTACCA

ATGTTGAGCGCGAGGTTAGAGACTTATGGTTAAGTATATTACCTACCAAGCCAGCATCTGTAT
 CACCAGATGATTCGTTTTTCGATTTAGGTGGTCATTCTATCTTGGCTACCAAAATGATTTTTACC
 TAAAGAAAAAGCTGCAAGTTGATTTACCATTGGGCACAATTTCAAGTATCCAACGATAAAG
 GCCTTTGCCGCGGAAATTGACAGAATTAATCATCGGGTGGATCATCTCAAGGTGAGGTCGTC
 GAAAATGTCACTGCAAATTATGCGGAAGACGCCAAGAAATTGGTTGAGACGCTACCAAGTTC
 GTACCCCTCTCGAGAATATTTTGTGTAACCTAATAGTGCCGAAGGAAAAACAACAATTAATGT
 GTTTGTTACCGGTGTCACAGGATTTCTGGGCTCCTACATCCTTGCAGATTTGTTAGGACGTTCT
 CCAAAGAACTACAGTTTCAAAGTGTTTGGCCACGTCAGGGCCAAGGATGAAGAAGCTGCATTT
 GCAAGATTACAAAAGGCAGGTATCACCTATGGTACTTGAACGAAAAATTTGCCTCAAATATT
 AAAGTTGTATTAGGCGATTTATCTAAAAGCCAATTTGGTCTTTCAGATGAGAAGTGGATGGAT
 TTGGCAAACACAGTTGATATAATTATCCATAATGGTGCCTTAGTTCACTGGGTTTATCCATATG
 CCAAATTGAGGGATCCAAATGTTATTTCAACTATCAATGTTATGAGCTTAGCCGCCGTCGGCA
 AGCCAAAGTTCTTTGACTTTGTTTCCCTCCACTTCTACTCTTGACACTGAATACTACTTTAATTTG
 TCAGATAAACTTGTAGCGAAGGGAAGCCAGGCATTTAGAATCAGACGATTAATGAACTCT
 GCAAGCGGGCTCACTGGTGGATATGGTCAGTCCAAATGGGCTGCTGAGTACATCATTAGACGT
 GCAGGTGAAAGGGGCCTACGTGGGTGATTGTCAGACCAGGTTACGTAACAGGTGCCTCTGCC
 AATGGTTCTTCAAACACAGATGATTTCTTATTGAGATTTTTGAAAGGTTCAAGTCCAATTAGGTA
 AGATTCCAGATATCGAAAATCCCGTGAATATGGTTCAGTAGATCATGTTGCTCGTGTGTTGT
 TGCTACGTCTTTGAATCCTCCCAAAGAAAATGAATTGGCCGTTGCTCAAGTAACGGGTCACCC
 AAGAATATTATTCAAAGACTACTTGTATACTTTACACGATTATGGTTACGATGTCGAAATCGA
 AAGCTATTCTAAATGGAAGAAATCATTGGAGGCGTCTGTTATIGACAGGAATGAAGAAAATGC
 GTTGTATCCTTTGCTACACATGGTCTTAGACAACCTTACCTGAAAGTACCAAAGCTCCGGAAC
 TACTGACGATAGGAACGCCGTGGCATCTTTAAAGAAAGACACCGCATGGACAGGTGTTGATTGGTCT
 AATGGAATAGGTGTTACTCCAGAAGAGGTTGGTATATATATTGCATTTTTAAACAAGGTTGGA
 TTTTACCTCCACCAACTCATAATGACAACTTCCACTGCCAAGTATAGAACTAACTCAAGCGC
 AAATAAGTCTAGTTGCTTCAAGGTGCTGGTGCCTGCGGAAGCTCCGCAGCAGCTTA

5 KAN (resistencia a antibióticos: es una aminoglucosidasa que actúa sobre la síntesis de proteínas uniéndose a la subunidad 30S del ribosoma para impedir el inicio del complejo con el ARNm. También puede causar un error de lectura del mensajero, lo que conduce a la formación de un péptido sin sentido. Otra función importante de la aminoglucosidasa es aumentar la permeabilidad de la membrana).

ATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGC
 TATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTTTCCGGCTGTCAGCGCAG
 GGGCGCCCGGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAATGAACTCCAAGACGAG
 GCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCAGCTGTGCTCGACGTTGTC
 ACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCT
 CACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGGCGGCTGCATACGCTT
 GATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTAAGCTCGG
 ATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGC
 CGAACTGTTCCGAGGCTCAAGGCGCGGATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGACCCATGG

CGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGC
 CGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAG
 CTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCGCAGC
 GCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGA

5 BLA (β -lactamasa: resistencia a antibióticos. El producto de este gen inhibe determinadas enzimas implicadas en la síntesis de la pared celular bacteriana. La β -lactamasa hidroliza la β -lactama contenido en el antibiótico ampicilina).

ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTT
 GCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGG
 TTACATCGAGCTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTT
 TCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGG
 CAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTC
 ACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCAT
 GAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCG
 CTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATG
 AAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGC
 AAATACTAATACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAG
 GCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATA
 AATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGATCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGC
 CCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGAC
 AGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAA

10 CAM (resistencia a antibióticos: el producto de este gen actúa uniéndose a la subunidad 50S del ribosoma, bloqueando por tanto la formación la unión peptídica e inhibiendo la actividad de la peptidil transferasa. Es un fuerte inhibidor de la síntesis de proteínas en células eucariotas).

ATGGAGAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACAT
 TTTGAGGCATTTAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGATATTACGG
 CCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATTCACATTCCTGC
 CCGCCTGATGAATGCTCATCCGGAATTTCTGATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTGGTGATATG
 GGATAGTGTTACCCCTTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAACCTGAAACGTTTTTCATCGCTCTGG
 AGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATATTCGCAAGATGTGGCGTGTTAC
 GGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAGAATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATC
 CCTGGGTGAGTTTACCAGTTTTGATTTAAACGTGGCCAATATGGACAACTTCTTCGCCCCCGT
 TTTACCATGGGCAAAATATTATACGCAAGGCGACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTACAGGT
 TCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCATGTCCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGC
 GATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAA

15 Tet R (resistencia a antibióticos: inhibe la unión de la aminoacil ARNt a la subunidad 30S del ribosoma en bacterias).

ATAGTGATGGCAGACTAAGCTTGGACGACGTAATTTCAATGGCGCTCACCTGCTGGACAGC
 GAAGGGCTAGAGGGCTTACTACGCGTAAGCTGGCGCAGTCCCTAAAAATTGAGCAACCGAC
 TCTGTATTGGCAGTGCGCAACAAGCAGACTCTTATGAACATGCTTTCAGAGGCAATACTGGC
 GAAGCATCACACCCGTTACGACCCGTTACCGACTGAGAGTTGGCAGCAGTTTCTCCAGGAAAA
 TGCTCTGAGTTCCGTAAGCATTACTGGTCCATCGTGATGGAGCCCGATTGCATATAGGGAC
 CTCTCCTACGCCCCCAGTTTGAACAAGCAGAGGCGCAACTACGCTGTCTATGCGATGCAGG
 GTTTTCGGTGAGGAGGCTCTTTTCATTCTGCAATCTATCAGCCATTTACGTTGGGTGCAGTA
 TTAGAGGAGCAAGCAACAAACCAGATAGAAAATAATCATGTGATAGACGCTGCACCACCATT
 ATTACAAGAGGCATTTAATATTCAGGCGAGAACCTCTGCTGAAATGGCCTTCCATTTCTGGGCT
 GAAATCATTAATATTTGGATTTTCTGCACAGTTAGATGAAAAAAGCATAACCCATTGAGGA
 TGGTAATAAATGA

G418-Neomicina (resistencia a antibióticos. Es una aminoglucósido fosfotransferasa. Se usa en vectores de eucariotas, mamíferos y levaduras).

5

ATGAGCCATATTC AACGGGAAACGTCTTGCTCGAGGCGCGATTAAATTCCAACATGATGCTG
 ATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCACAATCTATCGATT
 GTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGAAAGGTAGCGTTGCCAATGAT
 GTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGC
 ATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTACTCACCCTGCGATCCCCGGGAAAACAGCATT
 CAGGTATTAGAAGAATATCCTGATCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGC
 GCCGGTTGCATTCGATCCTGTTTGTAAATTGTCCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTTCTGCTCGCTC
 AGGCGCAACACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTATGACGAGCGTAATGG
 CGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAGCTTTTGCCATTCTCACCGGATTAGTCG
 TCACTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTATAGGTTGTATT
 GATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATAACCAGGATCTTGCTCCTATGGAACCTGCTCG
 GTGAGTTTTCTCCTTACATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATG
 AATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTCTA

Co1E1 (origen de replicación en *E. coli*)

CTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACITTCATTTTTAATTTAAAA
 GGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTT
 CCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGC
 GTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAA
 GAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTC
 CTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACTCG
 CTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGA
 CTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACAC
 AGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAA
 AGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGGAAC
 AGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCCGGTT
 TCGCCACCTCTGACTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAA

AAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTC
 TTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCG
 CTCGCCGACCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGA

2, (origen de replicación en *S. cerevisiae*)

CATTTAAGCATAAACACGCACTATGCCGTTCTTCTCATGTATATATATATACAGGCAACACGCA
 GATATAGGTGCGACGTGAACAGTGAGCTGTATGTGCGCAGCTCGCGTTGCATTTTCGGAAGCG
 CTCGTTTTTCGGAACGCTTTGAAGTTCCTATTCGGAAGTTCCTATTCTCTAGCTAGAAAGTATA
 GGAAGTTCAGAGCGCTTTTGAAAACCAAAAGCGCTCTGAAGACGCACTTTCAAAAAACAAA
 AACGCACCGGACTGTAACGAGCTACTAAAATATTGCGAATACCGCTTCCACAAACATTGCTCA
 AAAGTATCTCTTTGCTATATATCTCTGTGCTATATCCCTATATAACCTACCCATCCACCTTTTCG
 TCCTTGAACTTGCATCTAAACTCGACCTCTACATTTTTTATGTTTATCTCTAGTATTACTCTTTA
 GACAAAAAATTGTAGTAAGAACTATTCATAGAGTGAATCGAAAACAATACGAAAATGTAAA
 CATTTCTATACGTAGTATATAGAGACAAAATAGAAGAAACCGTTCATAATTTTCTGACCAAT
 GAAGAATCATCAACGCTATCACTTTCTGTTCAAAAGTATGCGCAATCCACATCGGTATAGAA
 TATAATCGGGGATGCCTTTATCTTGAAAAAATGCACCCGCAGCTTCGCTAGTAATCAGTAAAC
 GCGGGAAGTGGAGTCAGGCTTTTTTTATGGAAGAGAAAATAGACACCAAAGTAGCCITCTTCT
 AACCTTAACGGACCTACAGTGCAAAAAGTTATCAAGAGACTGCATTATAGAGCGCACAAAGG
 AGAAAAAAGTAATCTAAGATGCTTTGTTAGAAAAATAGCGCTCTCGGGATGCATTTTTGTAG
 AACAAAAAGAAGTATAGATTCCTTTGTTGGTAAAATAGCGCTCTCGCGTTGCATTTCTGTTCTG
 TAAAAATGCAGCTCAGATTCCTTTGTTTGA AAAATTAGCGCTCTCGCGTTGCATTTTGTTTTAC
 AAAAATGAAGCACAGATTCTTCGTTGGTAAAATAGCGCTTTCGCGTTGCATTTCTGTTCTGTAA
 AAATGCAGCTCAGATTCCTTTGTTTGA AAAATTAGCGCTCTCGCGTTGCATTTTTGTTCTACAAA
 ATGAAGCACAGATGCTTCGTT

LexA (dominio de unión al ADN)

ATGAAAGCGTTAACGGCCAGGCAACAAGAGGTGTTTGATCTCATCCGTGATCACATCAGCCAG
ACAGGTATGCCGCCGACGCGTGCGGAAATCGCGCAGCGTTTGGGGTTCCGTTCCCCAAACGCG
GCTGAAGAACATCTGAAGGCGCTGGCACGCAAAGGCGTTATTGAAATTGTTTCCGGCGCATCA
CGCGGGATTTCGTCTGTTGCAGGAAGAGGAAGAAGGGTTGCCGCTGGTAGGTCGTGTGGCTGCC
GGTGAACCACTTCTGGCGCAACAGCATATTGAAGGTCATTATCAGGTCGATCCTTCCTTATTCA
AGCCGAATGCTGATTTCTGCTGCGCGTCAGCGGGATGTCGATGAAAGATATCGGCATTATGG
ATGGTGACTTGCTGGCAGTGCATAAACTCAGGATGTACGTAACGGTCAGGTCGTTGTCCGAC
GTATTGATGACGAAGTTACCGTTAAGCGCCTGAAAAACAGGGCAATAAAGTCGAACTGTTGC
CAGAAAATAGCGAGTTTAAACCAATTGTCGTTGACCTTCGTCAGCAGAGCTTCACCATTGAAG
GGCTGGCGGTTGGGGTTATTCGCAACGGCGACTGGCTG

5 VP16 (dominio de activación)

CGGCCCCCGACCGATGTCAGCCTGGGGGACGAGCTCCACTTAGACGGCGAGGACGTGGCG
ATGGCGCATGCCGACGCGCTAGACGATTCGATCTGGACATGTTGGGGGACGGGGATTCCCCG
GGGCCGGGATTTACCCCCACGACTCCGCCCCCTACGGCGCTCTGGATATGGCCGACTTCGAG
TTTGAGCAGATGTTTACCGATGCCCTTGAATTGACGAGTACGGTGGG

10 B4.2 (dominio de activación)

ATGGGTGCTCCTCCAAAAAGAAGAGAAAGGTAGCTGGTATCAATAAAGATATCGAGGAGTG
CAATGCCATCATTGAGCAGTTTATCGACTACCTGCGCACCCGGACAGGAGATGCCGATGGAAAT
GGCGGATCAGGCGATTAACGTGGTGCCGGGCATGACGCCGAAAACCATTCTTCACGCCGGGCC
GCCGATCCAGCCTGACTGGCTGAAATCGAATGGTTTTTCATGAAATTGAAGCGGATGTTAACGA
TACCAGCCTCTTGCTGAGTGGAGATGCCTCCTACCCTTATGA

prom ADH1 (promotor)

ATGAAAGCGTTAACGGCCAGGCAACAAGAGGTGTTTGATCTCATCCGTGATCACATCAGCCAG
ACAGGTATGCCGCCGACGCGTGCGGAAATCGCGCAGCGTTTGGGGTTCCGTTCCCCAAACGCG
GCTGAAGAACATCTGAAGGCGCTGGCACGCAAAGGCGTTATTGAAATTGTTTCCGGCGCATCA
CGCGGATTTCGTCTGTTGCAGGAAGAGGAAGAAGGGTTGCCGCTGGTAGGTCGTGTGGCTGCCG
GTGAACCACTTCTGGCGCAACAGCATATTGAAGGTCATTATCAGGTCGACCTTCCTTATTCAAG
CCGAATGCTGATTTCTGCTGCGCGTCAGCGGGATGTCGATGAAAGATATCGGCATTATGGAT
GGTGACTTGCTGGCAGTGCATAAACTCAGGATGTACGTAACGGTCAGGTCGTTGTCCGACGT
ATTGATGACGAAGTTACCGTTAAGCGCCTGAAAAACAGGGCAATAAAGTCGAACTGTTGCC
AGAAAATAGCGAGTTTAAACCAATTGTCGTAGATCTTCGTCAGCAGAGCTTCACCATTGAAGG
GCTGGCGGTTGGGGTTATTCGCAACGGCGACTGGCTGGAATTCCCGGGGATCCGTCGACCATG
GCGGCCGCTCGAGTCGACCTGCAGCCAAGCTAATTCCGGGCGAATTTCTTATGATTTATGA

15

GAL1-10 promotor bidireccional (promotor bidireccional inducible)

GGATCCCCTTTCAAAAATTCTTACTTTTTTTTTGGATGGACGCAAAGAAGTTTAATAATCATAT
 TACATGGCATTACCACCATATACATATCCATATACATATCCATATCTAATCCTTACTTATATGTT
 GTGGAAATGTAAAGAGCCCCATTATCTTAGCCTAAAAAACCTTCTCTTTGGAACCTTTCAGTA
 ATACGCTTAACTGCTCATTGCTATATTGAAGTACGGATTAGAAGCCGCCGAGCGGGTGACAGC
 CCTCCGAAGGAAGACTCTCCTCCGTGCGTCCTCGTCTTCACCGGTGCGGTTCTGAAACGCAGA
 TGTGCCTCGCGCCGCACTGCTCCGAACAATAAAGATTCTACAATACTAGCTTTTATGGTTATGA
 AGAGGAAAAATTGGCAGTAACTGGCCCCACAAACCTTCAAATGAACGAATCAAATTAACAA
 CCATAGGATGATAATGCGATTAGTTTTTTAGCCTTATTTCTGGGGTAATTAATCAGCGAAGCGA
 TGATTTTTGATCTATTAACAGATATATAAATGCAAAAACCTGCATAACCACTTTAACTAATACTT
 TCAACATTTTCGGTTTGTATTACTTCTTATTCAAATGTAATAAAAAGTATCAACAAAAAATTGTT
 AATATACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAACCCGGG

5 prom GAL1 (promotor inducible)

ACGGATTAGAAGCCGCCGAGCGGGTGACAGCCCTCCGAAGGAAGACTCTCCTCCGTGCGTCCT
 CGTCTTCACCGGTGCGGTTCTGAAACGCAGATGTGCCTCGCGCCGCACTGCTCCGAACAATA
 AAGATTCTACAATACTAGCTTTTATGGTTATGAAGAGGAAAAATTGGCAGTAACTGGCCCCA
 CAAACCTTCAAATGAACGAATCAAATTAACAACCATAGGATGATAATGCGATTAGTTTTTTAG
 CCTTATTTCTGGGGTAATTAATCAGCGAAGCGATGATTTTTGATCTATTAACAGATATATAAAT
 GCAAAAACCTGCATAACCACTTTAACTAATACTTTCAACATTTTCGGTTTGTATTACTTCTTATTC
 AAATGTAATAAAAAGTATCAACAAAAAATTGTTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGA
 AAAAACC

10 term ADH1 (secuencia de terminación de la transcripción)

AAGCTTTTCATAGGGTAGGGGAATTTTCGGGCATGCCGGTAGAGGTGTGGTCAATAAGAGCGAC
 CTCATGCTATACCTGAGAAAGCAACCTGACCTACAGGAAAGAGTTACTCAAGAACAAGAATTT
 TCGTTTTAAAACCTAAGAGTCACTTTAAAATTTGTATACACTTATTTTTTTTATAACTTATTTAA
 TAATAAAAATCATAAATCATAAGAAATTCGCTTATTTAGAAAGTGTCAACAACGTATCTACCAA
 CGATTTGACCCTTTTCCATCTTTTCGTAAATTTCTGGCAAGGTAGACAAGCCGACAACCTTGAT
 TGGAGACTTGACCAAACCTCTGGCGAAGAA GTCCA

term ADH2 (secuencia de terminación de la transcripción)

GAATTCGACACTTCTAAATAAGCGGATCTCCTATGCCTTCACGATTTATAGTTTCCATTATCAA
 GTATGCCTATATTAGTATATAGCATCTTTAGATGACAGTGTTCGAAGTTTCACGAATAAAAGAT
 AATATTCTACTTTTGTCTCCACCGGTTTGTAGCAGAGTGAACACCATCCCTCGCCTGTGA
 GTTGTACCCATTCCTCTAAACTGTAGACATGGTAGCTTCAGCAGTGTTCGTTATGTACGGCATC
 CTCCAACAACAGTCGGTTATAGTTTGTCTGCTCCTCTGAATCGTCTCCCTCGATATTTCTCAT
 TTTCTTCGCATGCCCTCGAG

15

GEN CRE

ATGTCCAATTTACTGACCGTACACCAAAATTTGCCTGCATTACCGGTCGATGCAACGAGTGAT
 GAGGTTTCGCAAGAACCTGATGGACATGTTTCAGGGATCGCCAGGCGTTTTCTGAGCATACTGG
 AAAATGCTTCTGTCCGTTTGCCGGTTCGTGGGCGGCATGGTGCAAGTTGAATAACCGGAAATGG
 TTTCCGCGAGAACCTGAAGATGTTTCGCGATTATCTTCTATATCTTCAGGCGCGCGGTCTGGCAG
 TAAAACTATCCAGCAACATTTGGGCCAGCTAAACATGCTTCATCGTCCGTCCGGGCTGCCAC
 GACCAAGTGACAGCAATGCTGTTTCACTGGTTATGCGGGCGGATCCGAAAAGAAAACGTTGATG
 CCGGTGAACGTGCAAAACAGGCTCTAGCGTTGAAACGCACTGATTTGACCAGGTTTCGTTTAC
 TCATGGAAAATAGCGATCGCTGCCAGGATATACGTAATCTGGCATTCTGCGGGATTGCTTATA
 ACACCCTGTTACGTATAGCCGAAATTGCCAGGATCAGGGTTAAAGATATCTCACGTAAGTACG
 GTGGGAGAATGTTAATCCATATTGGCAGAACGAAAACGCTGGTTAGCACCGCAGGTGTAGAG
 AAGGCACTTAGCCTGGGGTAATAACTGGTTCGAGCGATGGATTTCCGTTCTGTTGTTAGCT
 GATGATCCGAATAACTACCTGTTTTGCCGGTTCAGAAAAATGGTGTTCGCGGCCATCTGCC
 ACCAGCCAGCTATCAACTCGCGCCCTGGAAGGGATTTTTGAAGCAACTCATCGATTGATTTAC
 GGCGCTAAGGATGACTCTGGTCAGAGATACCTGGCCTGGTCTGGACACAGTGCCCGTGTCCGA
 GCCGCGGAGATATGGCCCGCGCTGGAGTTTCAATACCGGAGATCATGCAAGCTGGTGGCTGG
 ACCAATGTAAATATTGTCATGAACTATATCCGTACCTGGATAGTGAACAGGGGCAATGGTG
 CGCCTGCTGGAAGATGGCGATTAG

5 PoliENLAZADOR pMIC-BD1 y pMIC-BD2 y pBTM116
 GAATCCCGGGGATCCGTCGACCTGCAG
POLIENLAZADOR pVP16
 GGCCAGCCGGCCGTCGACGCGGCCGCTCGAG
 POLIENLAZADORES plinker220 y pVP16mv1

10 **GCGCGCATGCC....(VL)....TCCGGAGGGTCGACCAGCGGTTCTGGGAAACCAGGTTCCGGTGAA**
GGCTCGAGCGGTACC....(VH)....GCTAGCGCAAACCAATCCCAAACCCACTGCTGGGCCTGGA
TAGTACT

REFERENCIAS

15 Baird, G. S., Zacharias, D. A. y Tsien, R. Y. (1999) Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 11241-6.
 Bartel, P. L., Chien, C., Sternglanz, R y Fields, S. (1993) Using the two-hybrid system to detect protein-protein interaction. In: D. A. Hartley (Ed) *Cellular interaction in development: a practical approach*. IRL Press, Oxford, páginas 153-179.

20 Biocca, S., Neuberger, M. S. y Cattaneo, A. (1990) Expression and targeting of intracellular antibodies in mammalian cells. *Embo J* 9, 101-8.
 Biocca, S., Ruberti, F., Tafani, M., Pierandrei-Amaldi, P. y Cattaneo, A. (1995) Redox state of single chain Fv fragments targeted to the endoplasmic reticulum, cytosol and mitochondria. *Biotechnology (N Y)* 13, 1110-5.
 Capecchi, M. R. (1989) Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244, 1288-92. Cattaneo, A. y Biocca, S. (1999) The selection of intracellular antibodies. *Trends in Biotechnology* 17, 115-121. Chen, Y. Q., Sengchanthalangsy, L. L., Hackett, A. y Ghosh, G. (2000) NF-kappaB p65 (Re1A) homodimer uses distinct mechanisms to recognize DNA targets. *Structure Fold Des* 8, 419-28.

25 Clarke, L. y Carbon, J. (1976) A colony bank containing synthetic Col EI hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* 9, 91-9.
 Engberg, J., Andersen, P. S., Nielsen, L. K., Dziegiel, M., Johansen, L. K. y Albrechtsen, B. (1996) Phage-display libraries of murine and human antibody Fab fragments. *Mol Biotechnol* 6, 287-310.
 Feldhaus, M. J., Siegel, R. W., Opresko, L. K., Coleman, J. R., Feldhaus, J. M., Yeung, Y. A., Cochran, J. R., Heinzelman, P., Colby, D., Swers, J., Graff, C., Wiley, H. S. y Wittrup, K. D. (2003) Flow-cytometric isolation of human antibodies from a nonimmune *Saccharomyces cerevisiae* surface display library. *Nat Biotechnol* 21, 163-70. Fire, A. (1999) RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet* 15, 358-63.

35

- Glass, C. K. y Rosenfeld, M. G. (2000) The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14, 121-41.
- Griffiths, A. D., Malmqvist, M., Marks, J. D., Bye, J. M., Embleton, M. J., McCafferty, J., Baier, M., Holliger, K. P., Gorick, B. D., Hughes-Jones, N. C. y *et al.* (1993) Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *Embo J* 12, 725-34.
- Griffiths, A. D., Williams, S. C., Hartley, O., Tomlinson, LM., Waterhouse, P., Crosby, W. L., Kontermann, R. E., Jones, P. T., Low, N. M., Allison, T. J. y *et al.* (1994) Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *Embo J* 13, 3245-60.
- Hollenberg, S. M., Sternglanz, R., Cheng, P. F. y Weintraub, H. (1995) Identification of a new family of tissue - specific basic helix-loop-helix proteins with a two-hybrid system. *Molecular and Cellular Biology* 15, 3813-3822.
- Kortt, A.A., Dolezal, O., Power, B. E. y Hudson, P.J. (2001) Dimeric and trimeric antibodies: high avidity scFvs for cancer targeting. *Biomol Eng* 18, 95-108.
- Kunsch, C., Ruben, S. M. y Rosen, C. A. (1992) Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12, 4412-21.
- Orlandi, R., Gussow, D. H., Jones, P. T. y Winter, G. (1992) Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. 1989. *Biotechnology* 24,527-31.
- Persic, L., Righi, M., Roberts, A., Hoogenboom, H. R., Cattaneo, A. y Bradbury, A. (1997) Targeting vectors for intracellular immunisation. *Gene* 187,1-8.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. y Cormier, M. J. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111, 229-33.
- Proba, K., Honegger, A. y Pluckthun, A. (1997) A natural antibody missing a cysteine in VH: consequences for thermodynamic stability and folding. *J Mol Biol* 265, 161-72.
- Proba, K., Worn, A., Honegger, A. y Pluckthun, A. (1998) Antibody scFv fragments without disulfide bonds made by molecular evolution. *J Mol Biol* 275, 245-53.
- Rhee, Y., Gurel, F., Gafni, Y., Dingwall, C. y Citovsky, V. (2000) A genetic system for detection of protein nuclear import and export. *Nat Biotechnol* 18, 433-7.
- Rossi, J. J. (1999) Ribozymes, genomics and therapeutics. *Chem Biol* 6, R33-7.
- Sblattero, D. y Bradbury, A. (2000) Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries. *Nat Biotechnol* 18, 75-80.
- Sheets, M. D., Amersdorfer, P., Finnem, R., Sargent, P., Lindquist, E., Schier, R., Hemingsen, G., Wong, C., Gerhart, J. C., Marks, J. D. y Lindqvist, E. (1998) Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens (Sheets *et al.*). *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6157-62.
- Siegel, M. S. e Isacoff, E. Y. (1997) A genetically encoded optical probe of membrane voltage. *Neuron* 19, 735-41.
- Tanaka, T., Chung, G. T., Forster, A., Lobato, M. N. y Rabbitts, T. H. (2003) De novo production of diverse intra-cellular antibody libraries. *Nucleic Acids Res* 31, e23.
- Tavernarakis, N., Wang, S. L., Dorovkov, M., Ryazanov, A. y Driscoll, M. (2000) Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nat Genet* 24,180-3.
- Todorovska, A., Roovers, R. C., Dolezal, O., Kortt, A. A., Hoogenboom, H. R. y Hudson, P. J. (2001) Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J Immunol Methods* 248, 47-66.
- Tomlinson, I. and Holliger, P. (2000) Methods for generating multivalent and bispecific antibody fragments. *Methods Enzymol* 326, 461-79.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S. y Rothberg, J. M. (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 403, 623-7.
- Vaughan, T. J., Williams, A. J., Pritchard, K., Osbourn, J. K., Pope, A. R, Earnshaw, J. C., McCafferty, J., Hodits, R. A., Wilton, J. y Johnson, K. S. (1996) Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library (Uetz *et al.*). *Nat Biotechnol* 14, 309-14.
- Visintin, M. and Cattaneo, A. (2001) Selecting intracellular antibodies using the two-hybrid system. In: R. Kontermann, 6 Dubel, S., eds (Ed) *Antibody Engineering*, Vol. 1, Springer Lab Manual. Springer, Heidelberg, Alemania, página 790.
- Visintin, M., Settanni, G., Maritan, A., Graziosi, S., Marks, J. D. y Cattaneo, A. (2002) The intracellular antibody capture technology (IACT): towards a consensus sequence for intracellular antibodies. *J Mol Biol* 317, 73-83.
- Visintin, M., Tse, E., Axelson, H., Rabbitts, T. H. y Cattaneo, A. (1999) Selection of antibodies for intracellular function using a two-hybrid in vivo system. In: *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 96, páginas 11723-8.
- Visintin, M., Tse, E., Axelson, H., Rabbitts, T. H. y Cattaneo, A. (1999) Selection of antibodies for intracellular function using a two-hybrid in vivo system. In: *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 96, páginas 11723-8.
- Wu, A. M. y Yazaki, P. J. (2000) Designer genes: recombinant antibody fragments for biological imaging. *Q J Nucl Med* 44,268-83.
- Zhong, H., SuYang, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. y Ghosh, S. (1997) The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell* 89,413-24.
- Zhong, H., Voll, R. E. y Ghosh, S. (1998) Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell* 1, 661-71.

REIVINDICACIONES

1. Un método para aislar anticuerpos intracelulares capaces de neutralizar una interacción entre un ligando proteico x conocido y un ligando proteico y conocido en el interior de una célula, que comprende las etapas de:

a) obtener una cepa de levadura recombinante en la que:

- i) una secuencia que codifica el ligando proteico x y una secuencia que codifica el ligando proteico y se clonan en un primer vector de expresión de levadura, pero
- ii) al menos uno de x o de y se expresa de manera inducible, y
- iii) la interacción entre el ligando proteico x y el ligando proteico y conduciría a la producción de un represor de una función esencial de la célula de levadura o de un agente tóxico, de modo que se obtendrían células de levadura no viables;

b) transformar la cepa de levadura recombinante del punto a) con una biblioteca de expresión de anticuerpos intracelulares por medio de un segundo vector de expresión de levadura;

c) seleccionar una cepa de levadura recombinante transformada del punto b) induciendo la expresión tanto del ligando x como del ligando y; y aislando clones de levadura receptores capaces de crecer;

d) aislar anticuerpos intracelulares capaces de neutralizar la interacción entre el ligando proteico x y el ligando proteico y de los clones de levadura recombinantes receptores capaces de crecer, en donde la biblioteca de expresión de los anticuerpos intracelulares se obtiene de linfocitos de ratones no inmunizados y se expresa directamente en las células de levadura sin utilizar el cribado de presentación de fagos.

2. Un método para aislar anticuerpos intracelulares capaces de neutralizar una interacción entre un ligando proteico x conocido y un ligando proteico y conocido en el interior de una célula, que comprende las etapas de:

a) obtener una cepa de levadura recombinante que tiene una competencia sexual mat-a o mat-alfa en la que:

- i) una secuencia que codifica el ligando proteico x y una secuencia que codifica el ligando proteico y se clonan en un primer vector de expresión de levadura, pero
- ii) al menos uno de x o y se expresa de una manera inducible, y
- iii) la interacción entre el ligando proteico x y el ligando proteico y conduciría a la producción de un represor de una función esencial de la célula de levadura o de un agente tóxico, de modo que se obtendrían células de levadura no viables;

b) obtener una biblioteca de expresión de anticuerpos intracelulares por medio de un segundo vector de expresión de levadura en una cepa de levadura con una competencia sexual opuesta a la de la cepa de levadura en el punto a);

c) exponer las levaduras del punto a) y las levaduras recombinantes del punto b) a condiciones capaces de promover el apareamiento sexual y la expresión de los ligandos x e y;

d) seleccionar clones de levadura transformados induciendo la expresión tanto del ligando x como del ligando y; y aislando receptores de clones de levadura capaces de crecer;

e) aislar anticuerpos intracelulares capaces de neutralizar la interacción entre el ligando proteico x y el ligando proteico y de los clones de levadura recombinantes receptores capaces de crecer, en donde la biblioteca de expresión de anticuerpos intracelulares se obtiene de linfocitos de ratones no inmunizados y se expresa directamente en las células de levadura sin utilizar el cribado de presentación de fagos.

3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la cepa de levadura recombinante se obtiene por:

a) clonación de una primera secuencia que codifica el ligando proteico x y una segunda secuencia que codifica el ligando proteico y en el primer vector de expresión de levadura, estando cada primera y segunda secuencias bajo el control de cada una de las dos partes de los promotores bidireccionales, estando la primera secuencia fusionada a una secuencia que codifica una primera molécula, y estando la segunda secuencia fusionada a una secuencia que codifica una segunda molécula, de modo que cuando el ligando proteico x y el ligando proteico y interaccionan se induce la producción de un represor de una función esencial de la célula de levadura o de un agente tóxico;

b) transformación de la cepa de levadura receptora con el vector de expresión de levadura del punto a); y

c) selección de las levaduras transformadas.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3 en el que los promotores bidireccionales son los promotores Gal 1 y Gal 10.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 3 en el que la primera y la segunda moléculas conducen a la producción de un represor capaz de suspender la transcripción del gen de levadura HIS3.

6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la biblioteca de expresión de anticuerpos intracelulares se obtiene en un formato de anticuerpo de un único dominio o scFv

5 7. Un método para identificar simultáneamente tanto un ligando proteico x capaz de unirse a un ligando proteico y conocido en el interior de una célula eucariota, como un anticuerpo intracelular capaz de neutralizar dicha interacción entre el ligando proteico x y el ligando proteico y conocido, que comprende las etapas de:

10 a) clonar una biblioteca de ADNc que contenga secuencias que codifiquen el ligando proteico x y una secuencia que codifique el ligando proteico y en un primer vector de expresión de levadura, estando las secuencias de la biblioteca de ADNc bajo el control de una de las dos partes de un promotor inducible bidireccional, estando las secuencias de la biblioteca de ADNc fusionadas a una secuencia que codifica una primera molécula; y estando la secuencia que codifica el ligando proteico y bajo el control de la otra de las dos partes del promotor bidireccional, y estando fusionada a una secuencia que codifica una segunda molécula, de tal manera que cuando el ligando proteico x y el ligando proteico y interaccionan dicha primera molécula y dicha segunda molécula interaccionan también, de una manera que se induce la producción bien de un represor de una función esencial de la célula de levadura o de un agente tóxico;

15 b) transformar una cepa de levadura con una competencia sexual mat-a o mat-alfa con el primer vector de expresión de levadura recombinante del punto a);

20 c) seleccionar las levaduras transformadas;

d) obtener una biblioteca de expresión de anticuerpos intracelulares en una cepa de levadura que tiene una competencia sexual opuesta a la de la cepa de levadura del punto a) mediante un segundo vector de expresión de levadura;

25 e) someter las levaduras del punto c) y las levaduras del punto d) a condiciones tales que se promueve la reproducción sexual y la expresión del promotor bidireccional en un entorno capaz de inducir la expresión del ligando proteico x y del ligando proteico y;

f) seleccionar clones de levadura viables en los que el anticuerpo intracelular altera la interacción entre el ligando proteico x y el ligando proteico y;

30 g) identificar el ligando proteico x y el anticuerpo intracelular,

en el que la biblioteca de expresión de anticuerpos intracelulares se obtiene de linfocitos de ratones no inmunizados y se expresa directamente en las células de levadura sin utilizar el cribado por presentación de fagos.

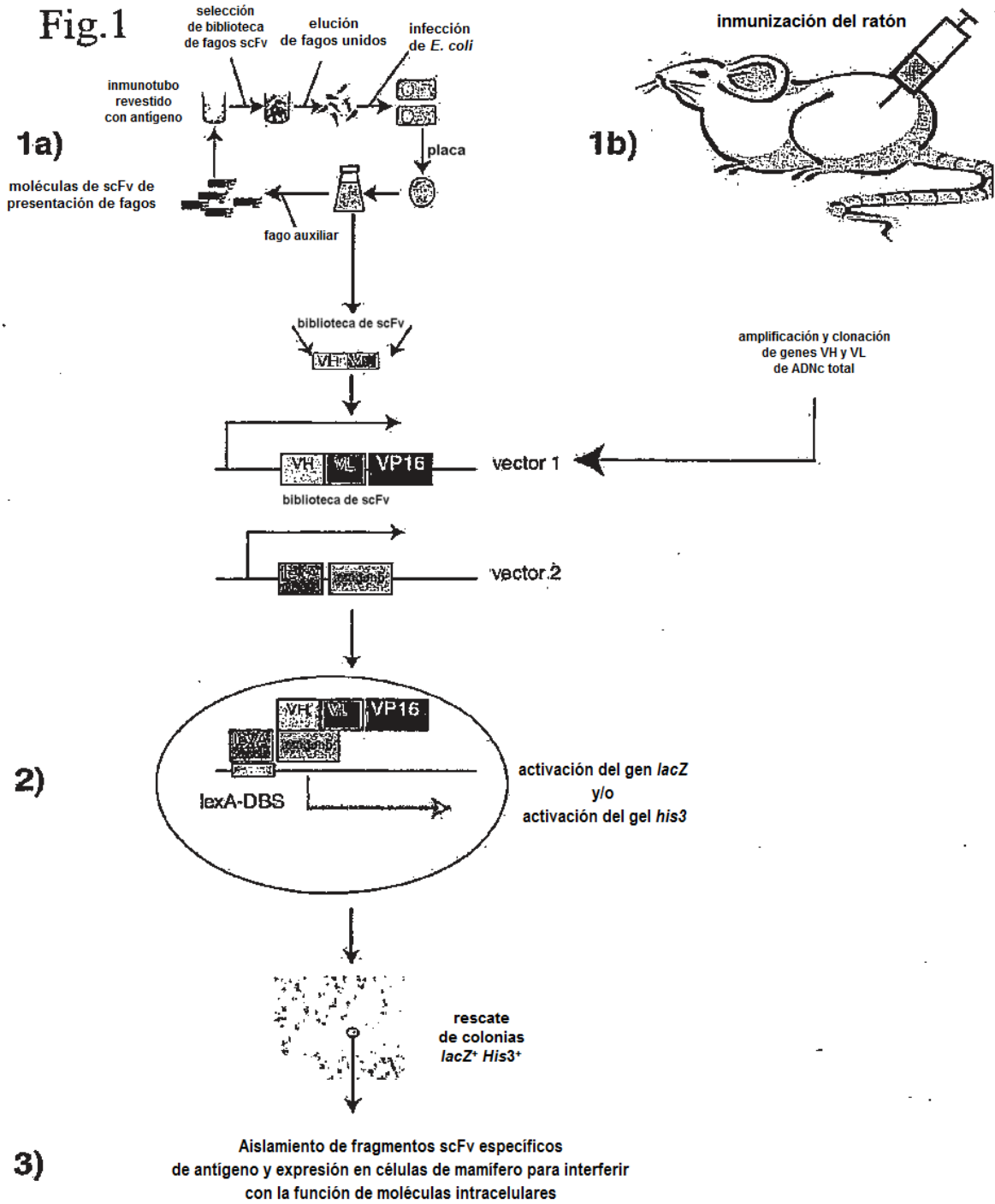


Fig.2

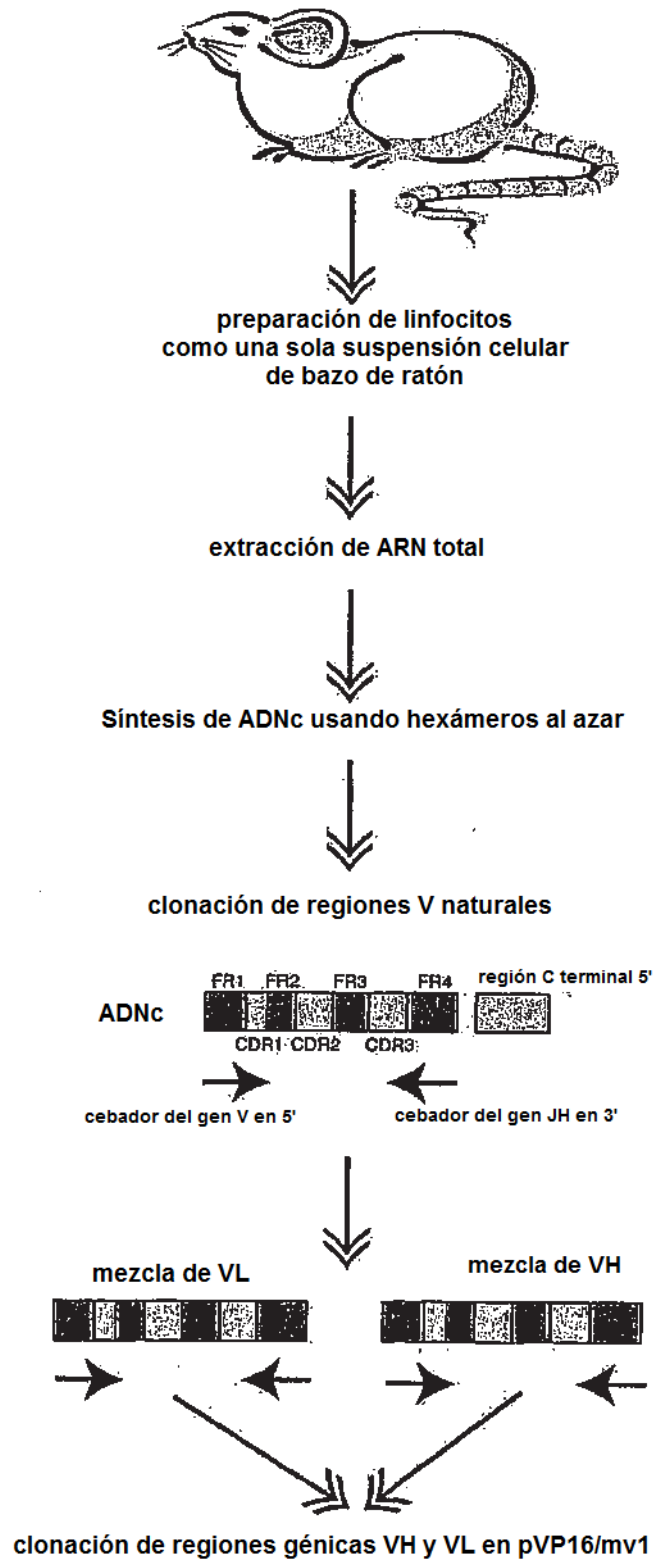


Fig.3

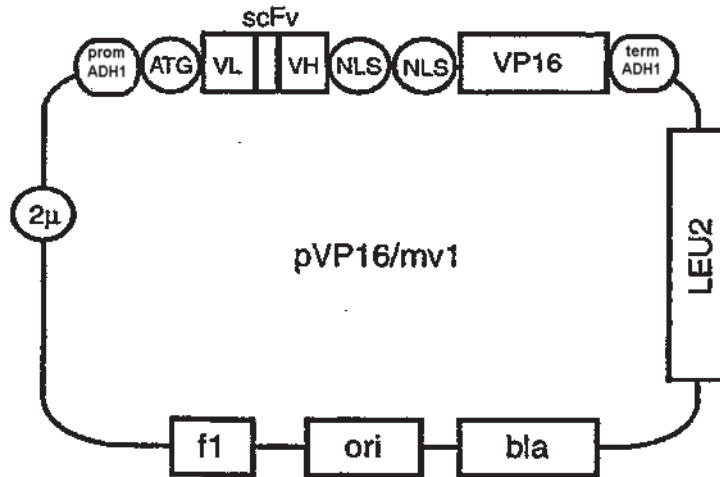
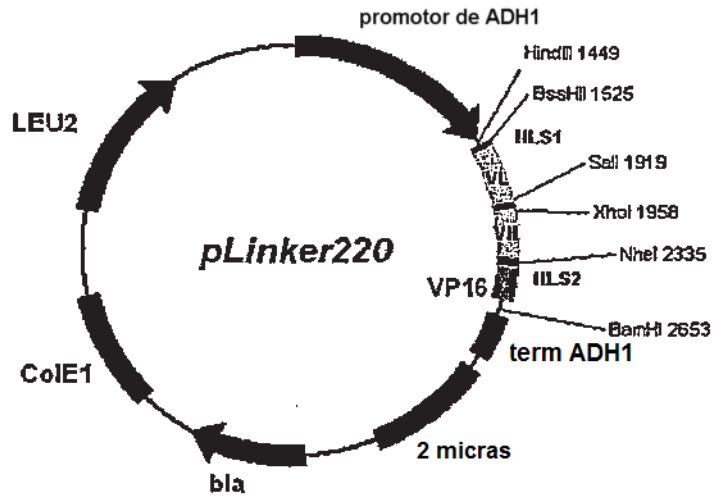
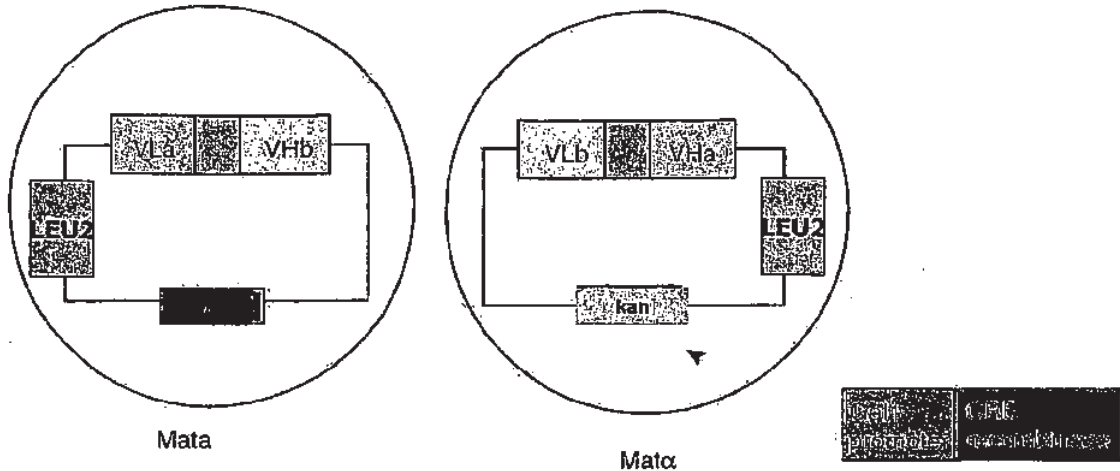


Fig.4a



es) cepa de levadura che abbia:
 Mat α , ura 3-52, léu 2-3112, his 3-200, trp 1-901,
 ade2-101, LYS::(lexAop)-HIS3, ura3::(lexAop)-LacZ,
 trp::(Gal1)-CRE

apareamiento

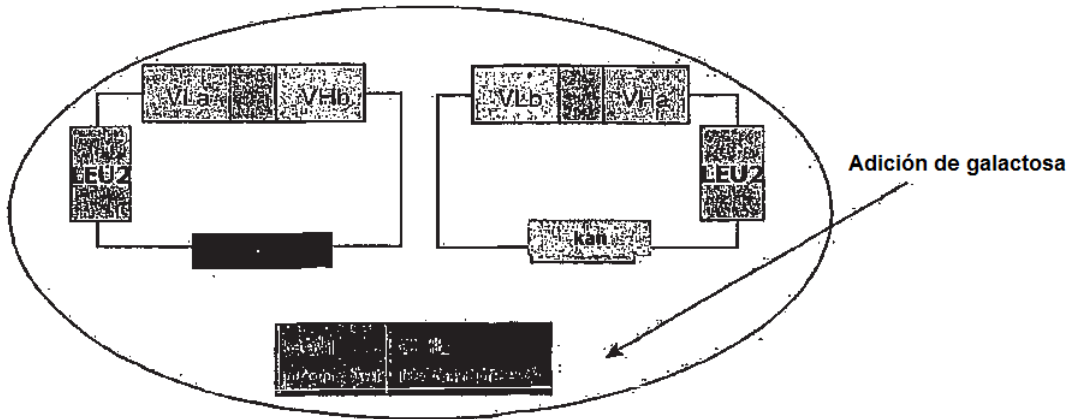


Fig.4b

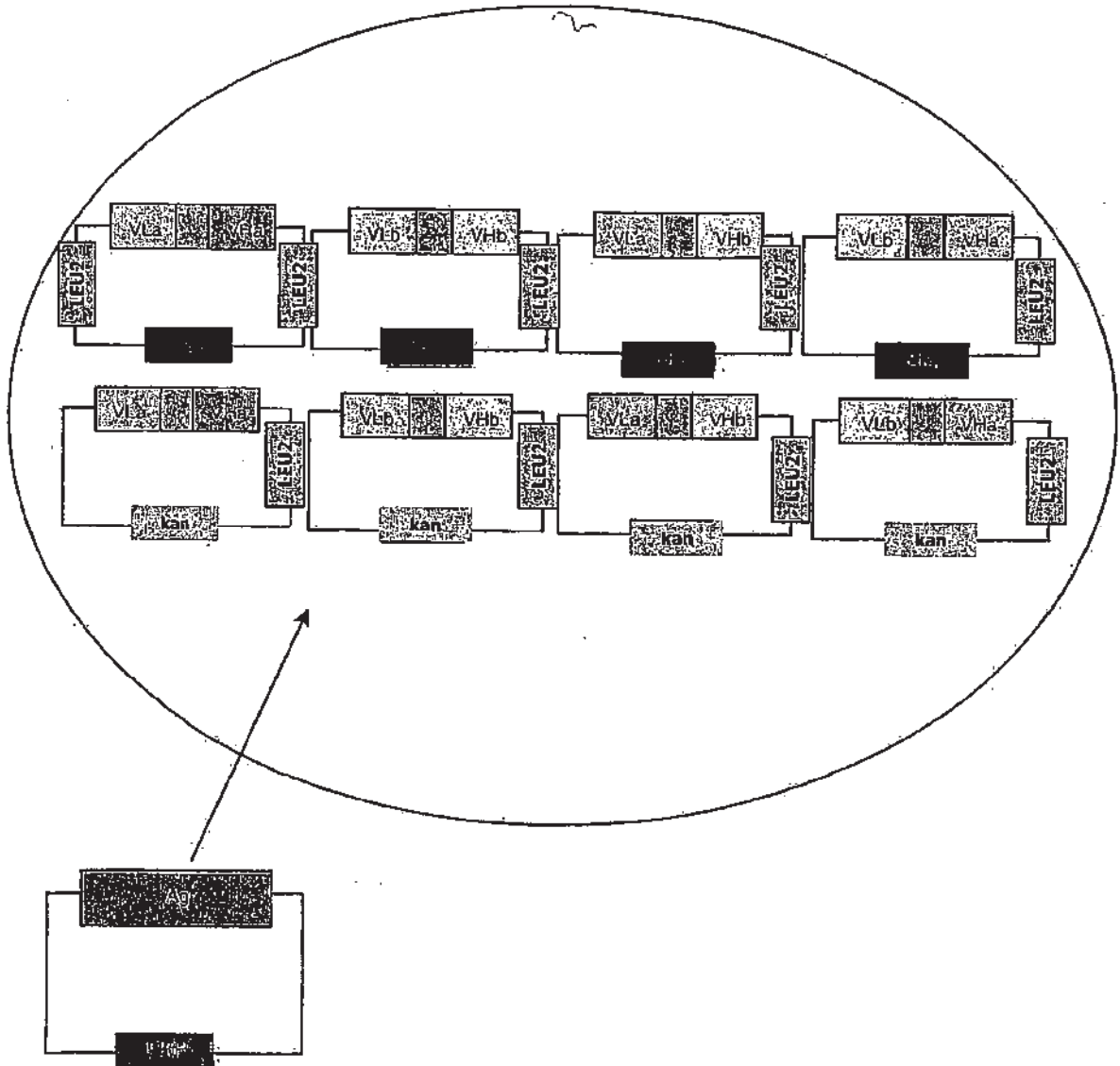


Fig.5

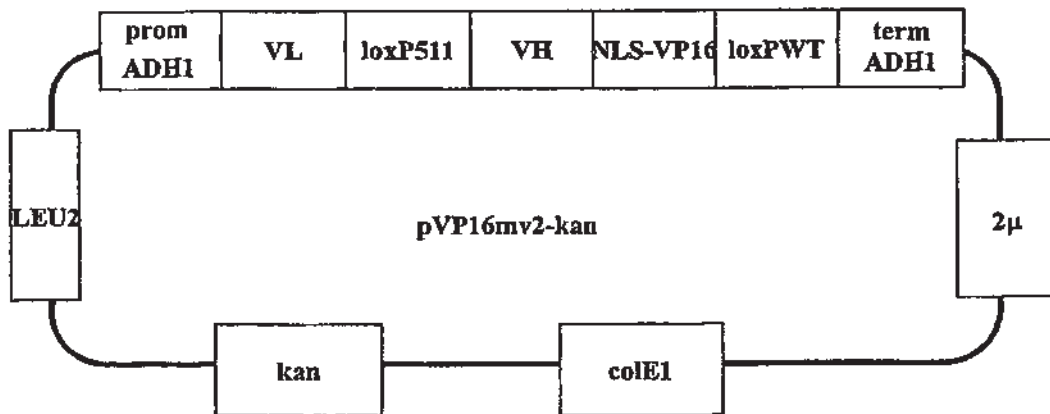
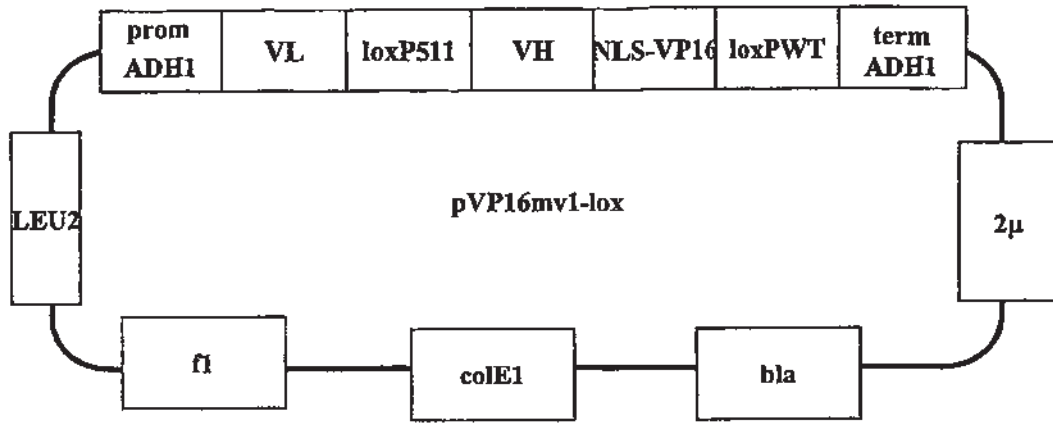
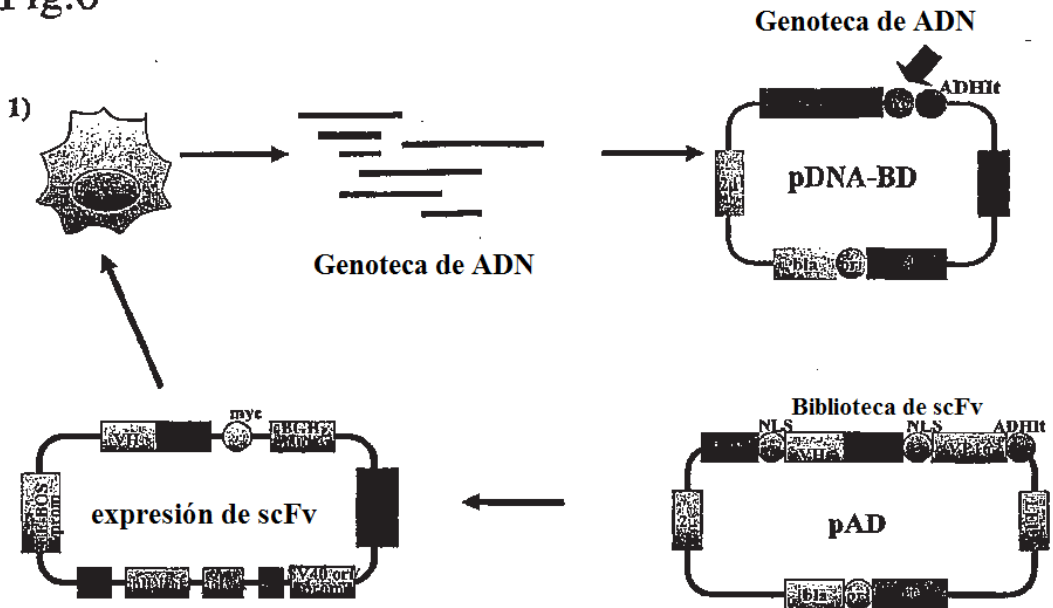
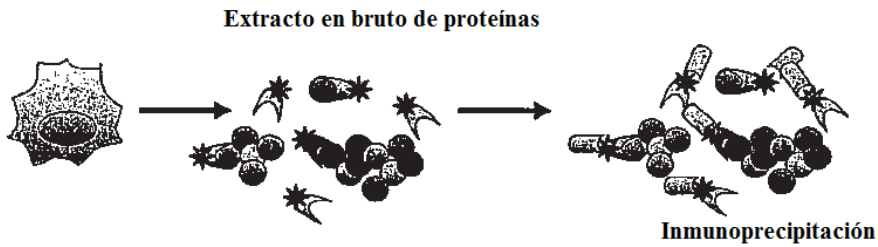


Fig.6



2)



**Caracterización de proteínas
obtenidas de geles 2DE por:**

- Espectrometría de masas (MS)
- Ionización por electropulverización (ESI)
- Desorción-ionización láser asistida por matriz (MALDI)

gel 2DE

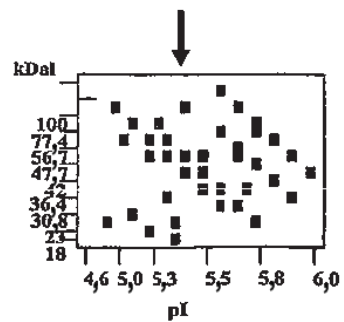
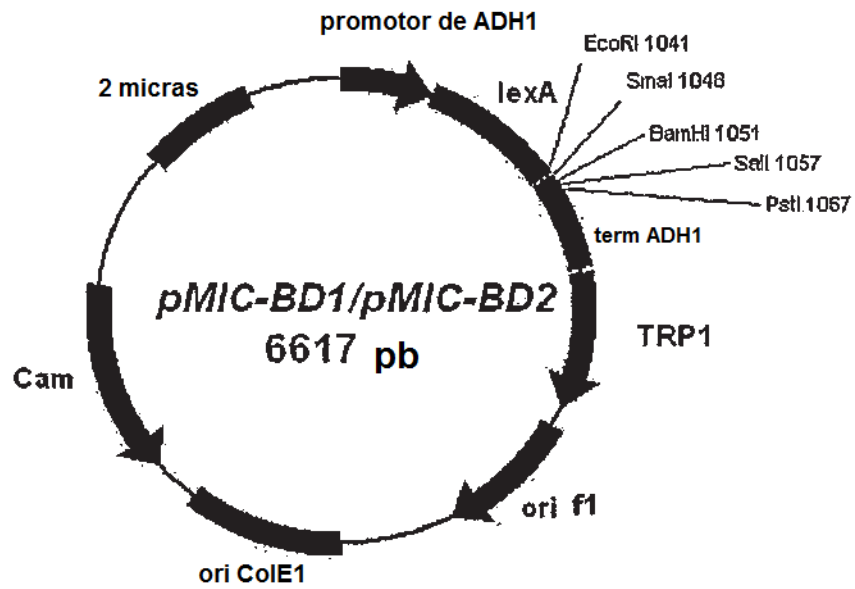


Fig.7



TS-lexA (pMIC-BD1)	GTT ACC GTT AAG CGC CTG AAA AAA CAG GGC AAT
	V T V K R L K K Q G N
mut-lexA (pMIC-BD2)	GTT ACC GTT AAG GGC CTG GAA AAA CAG GGC AAT
	V T V K G L E K Q G N

Fig.8

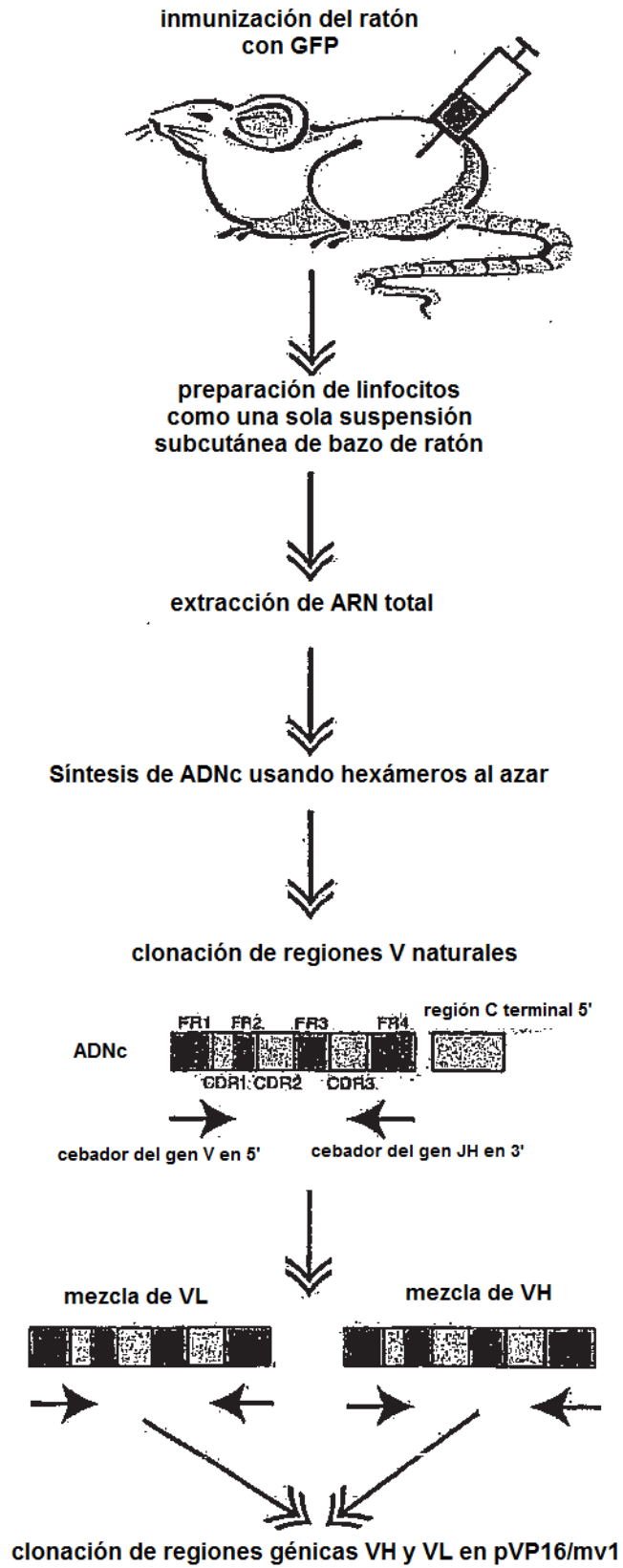


Fig.9

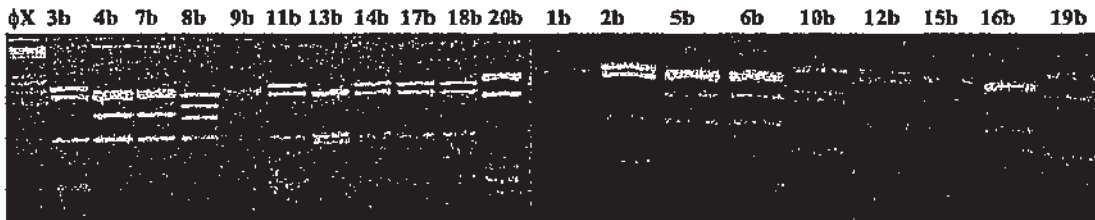
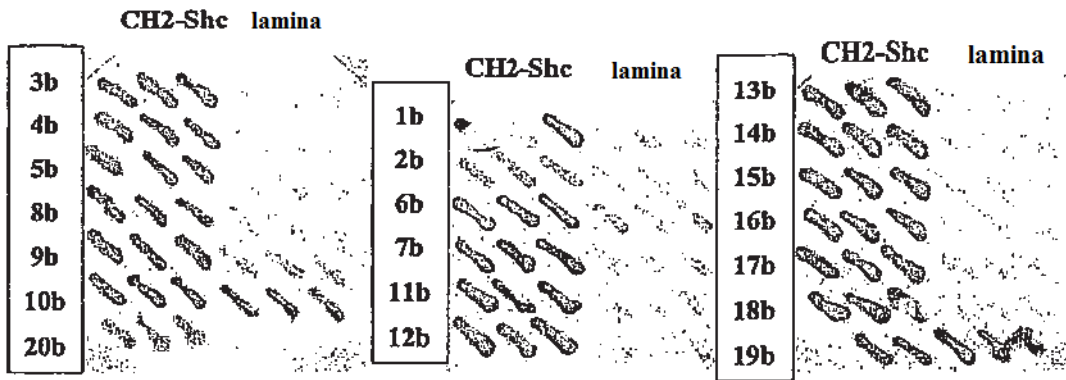


Fig.10

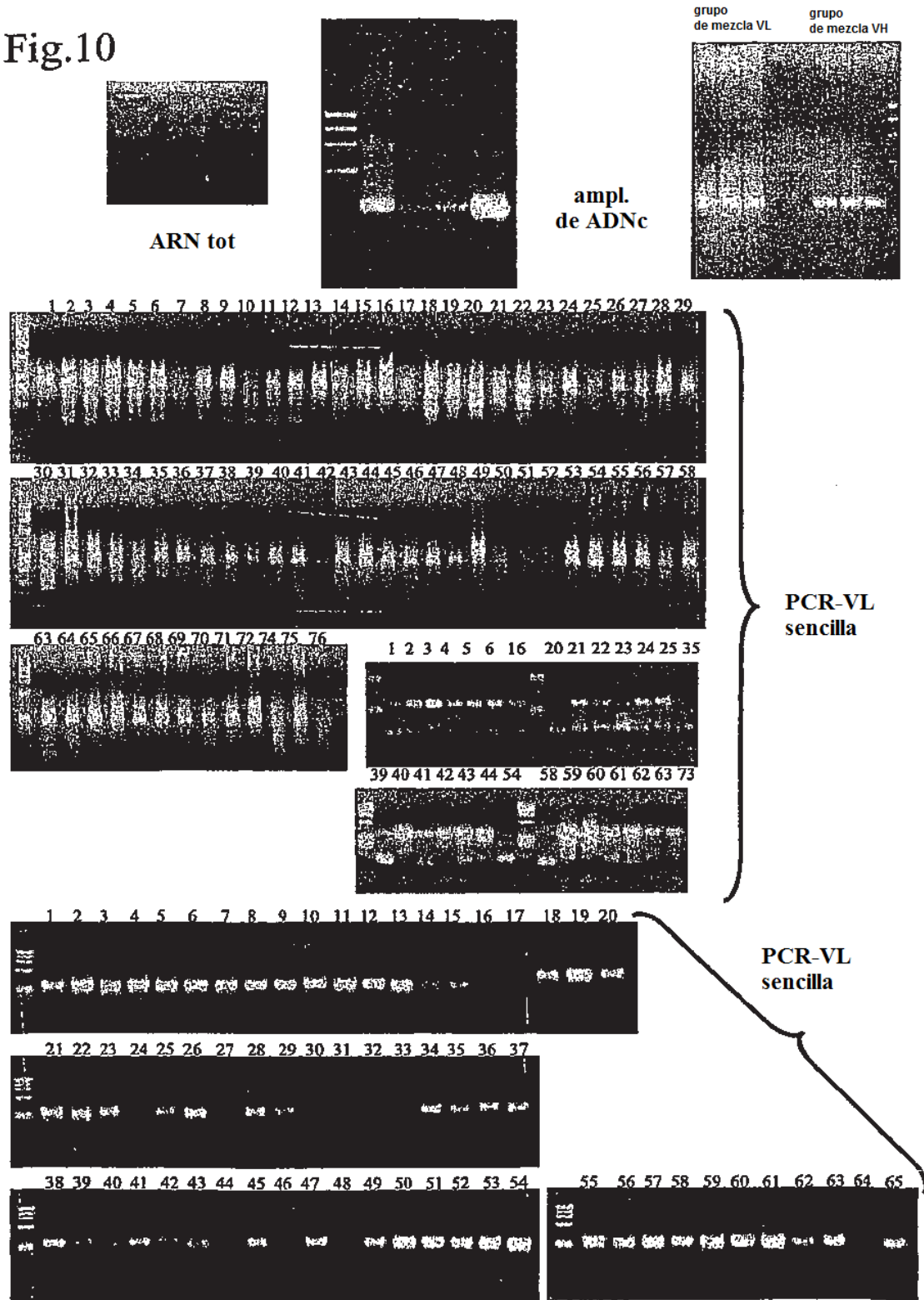


Fig.11

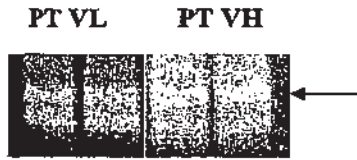


Fig.12a

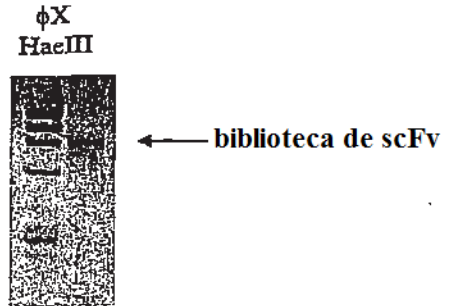
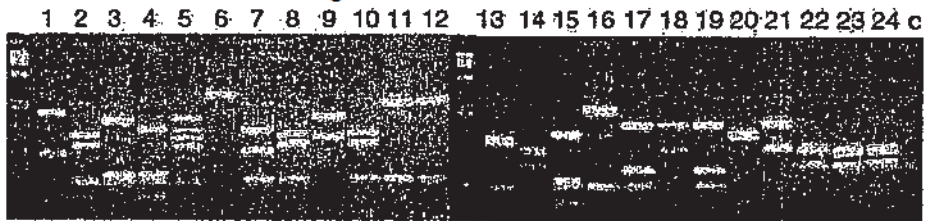
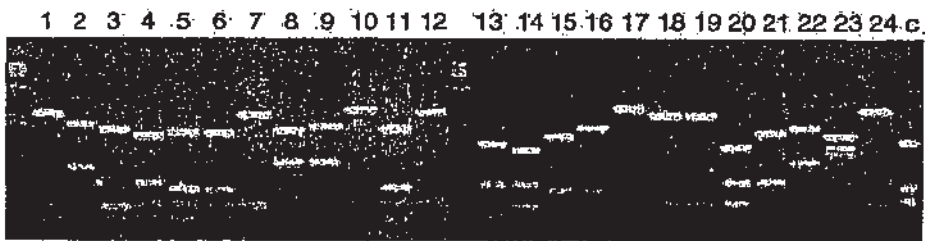


Fig.12b

Identificación de la huella genética de VL con BstNI



Identificación de la huella genética de VH con BstNI



Identificación de la huella genética de scFv con BstNI

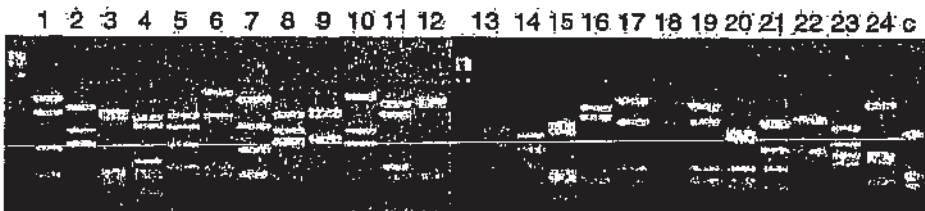
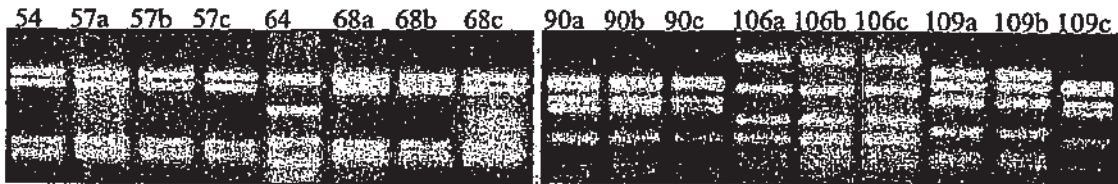
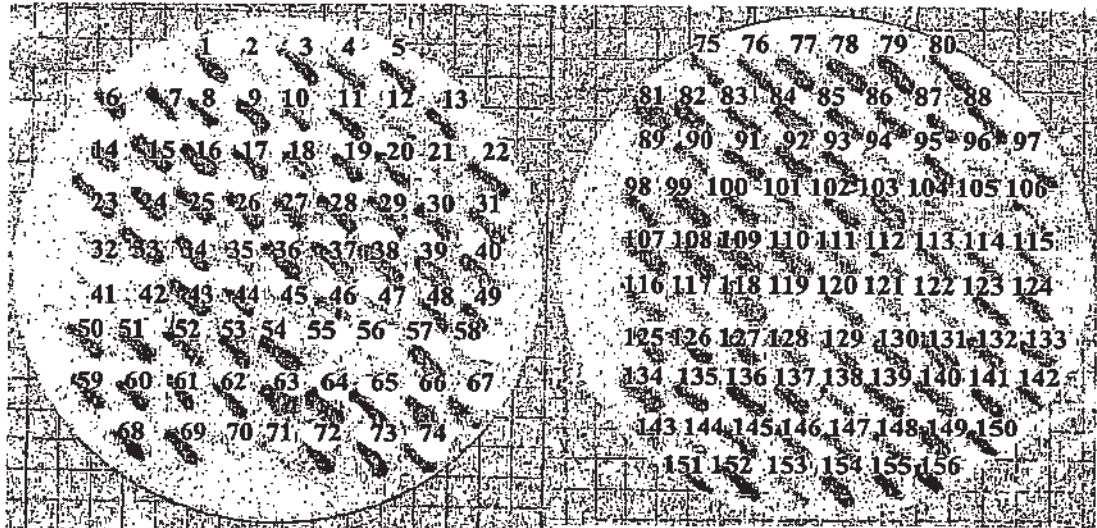
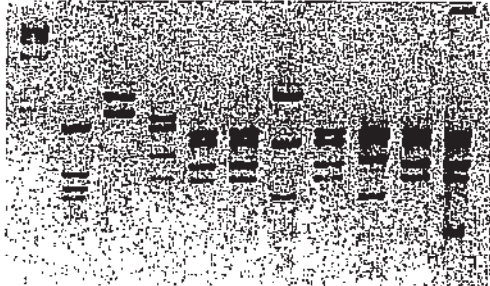


Fig.13

Identificación de la huella genética en anti-SH2-She



ϕ X 1 16 45 50 61 79 126 137 140 155

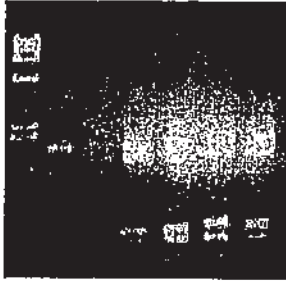


Ensayo β -gal en anti SH2-She

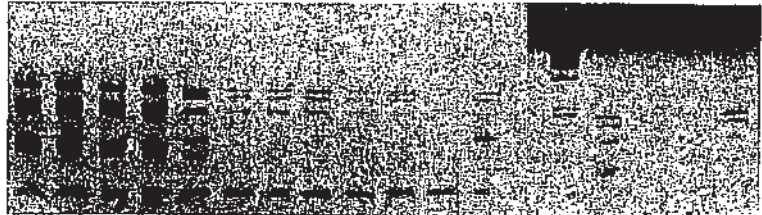
Fig.14

Identificación de la huella genética en anti-K-RAS

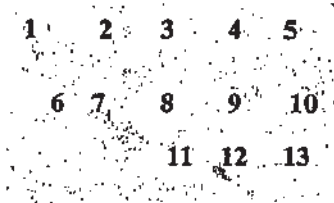
ϕ X 1a 1b 7a 7b 12a 12b



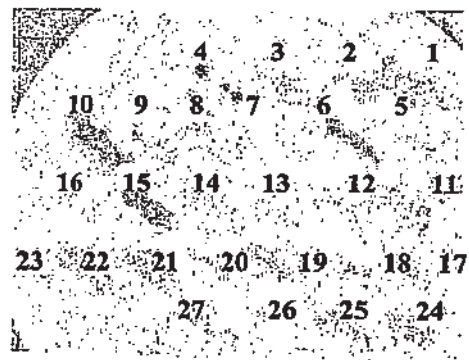
4a 4b 4c 4d 6a 6b 6c 6d 10a 10b 10c 10d ϕ X 15a 15b 15c 15d



Cribado A

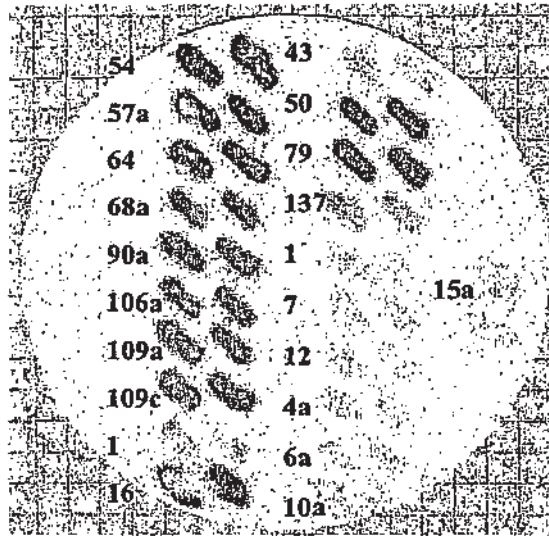


Ensayo β -gal en anti K-RAS



Cribado B

Fig.15



- 1 Cribado II: en negro SH2-MIC-BD1 + anti-SH2-Shc
en azul K-RAS-MIC-BD2 + anti-K-RAS

Fig.16



Ensayo β -gal en anti Syk



Identificación de la huella genética por PCR con BstNI en anti-Syk

Fig.17

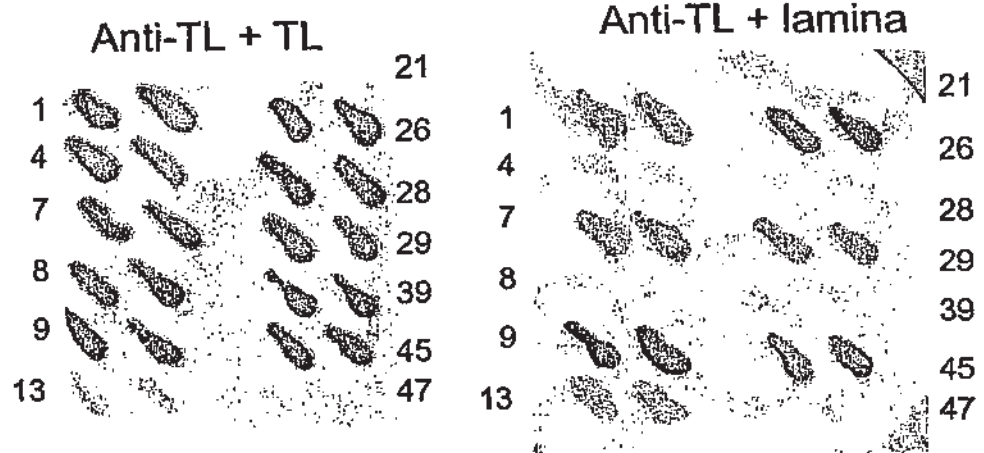


Fig.18

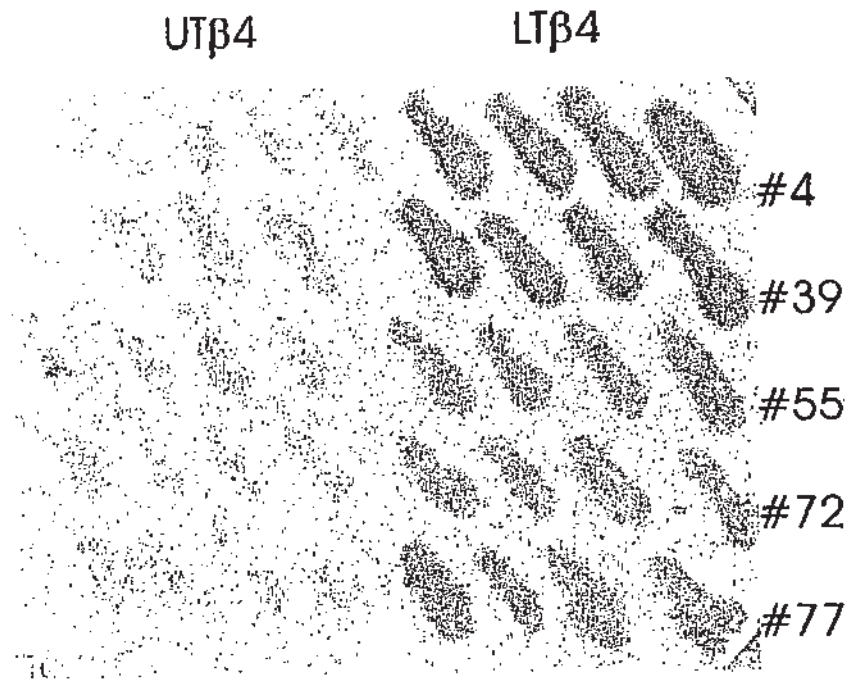


Fig.19

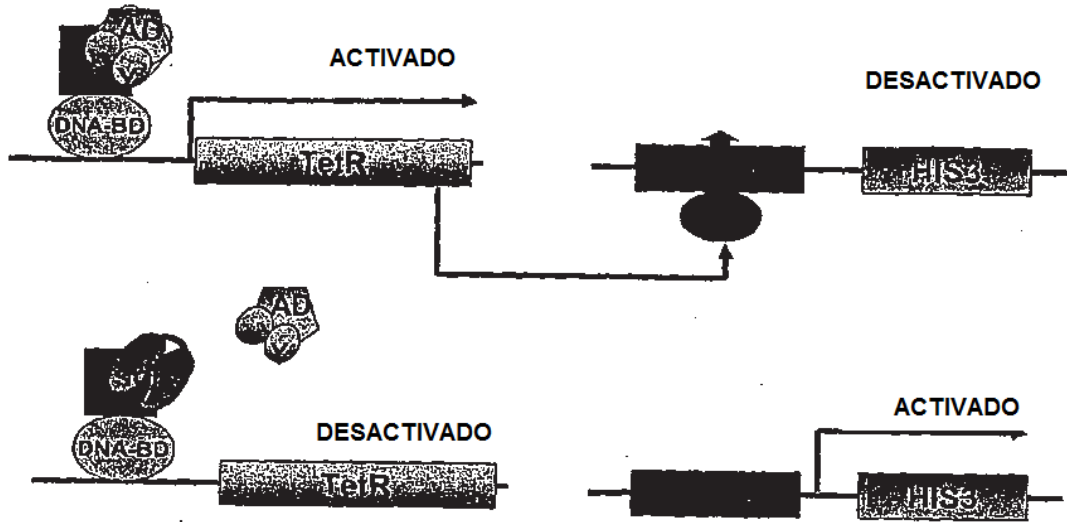


Fig.20

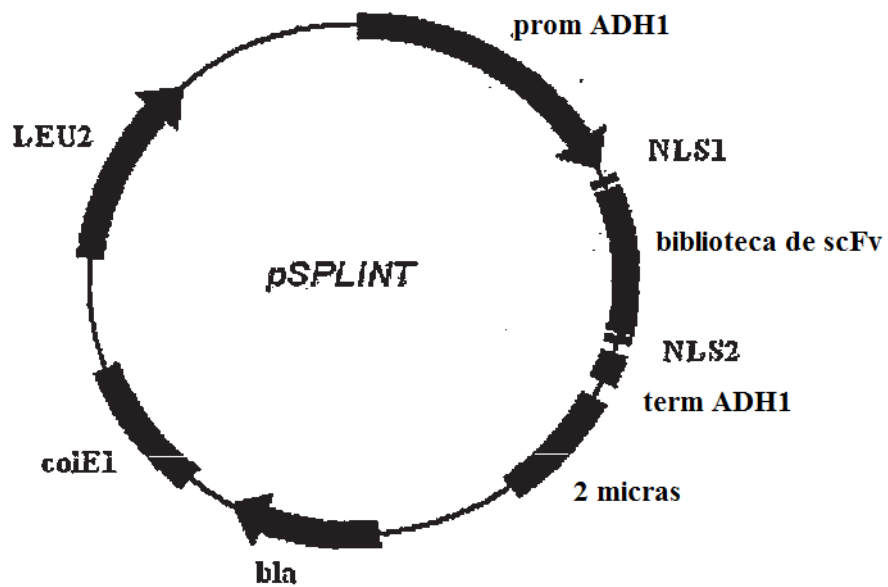
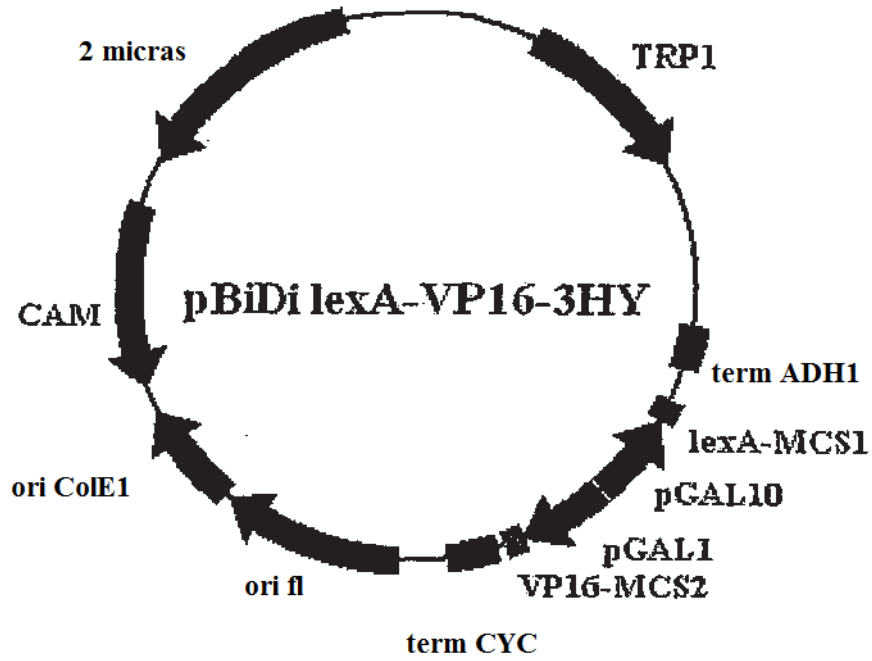


Fig.21

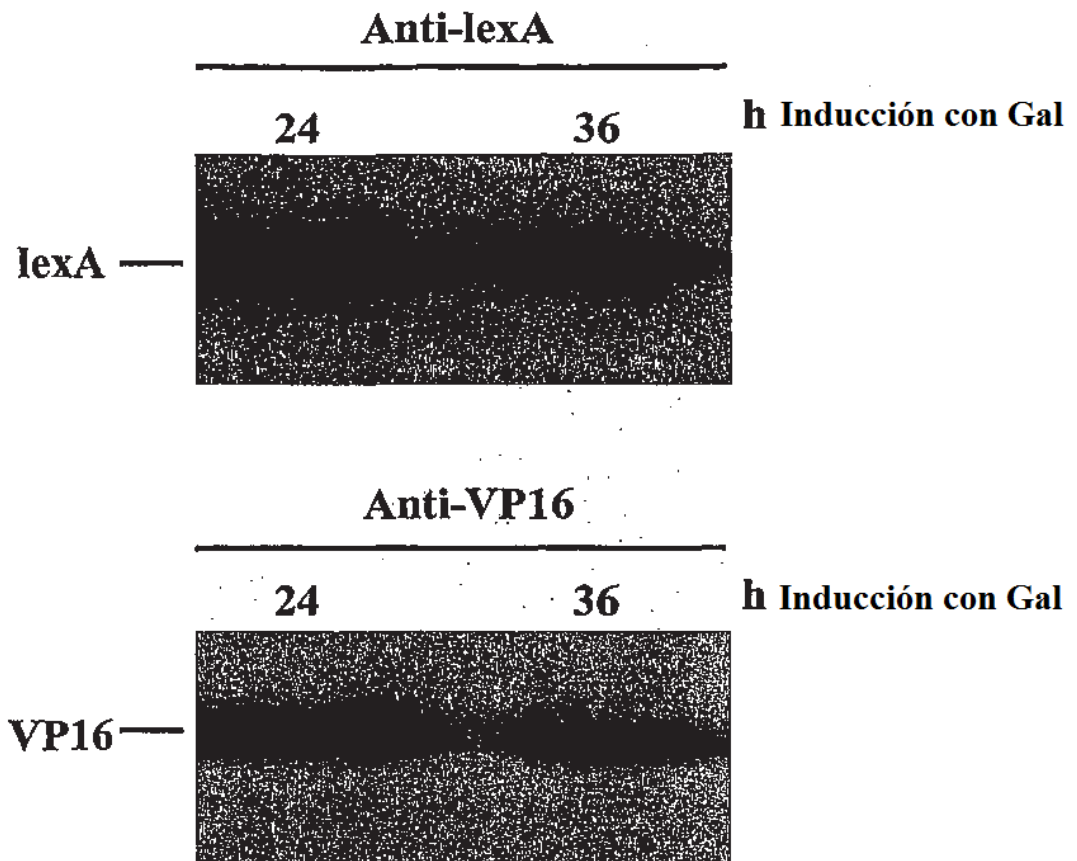


Fig.22

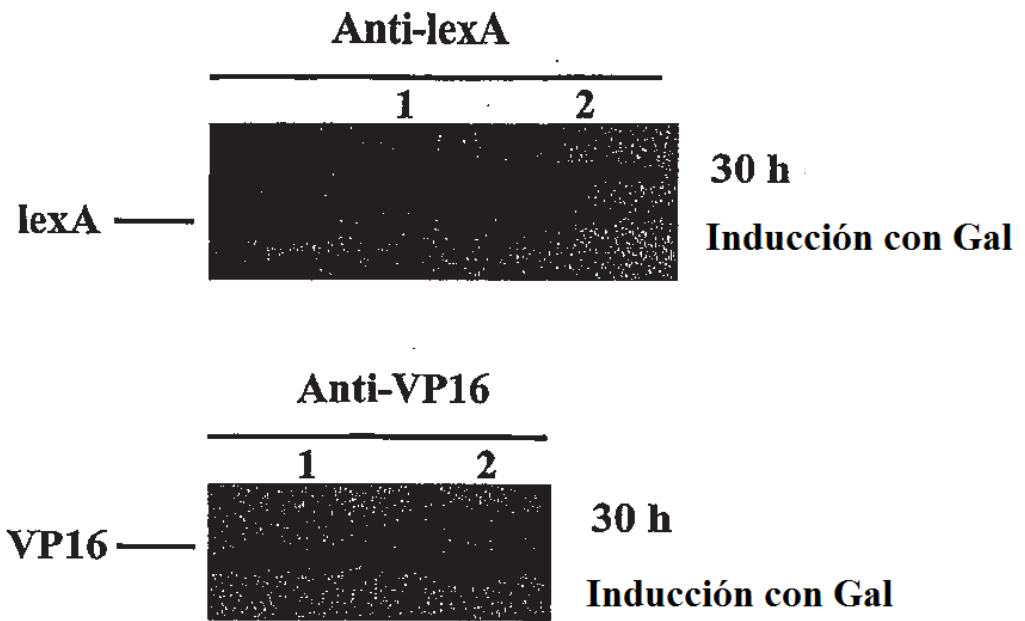


Fig.23

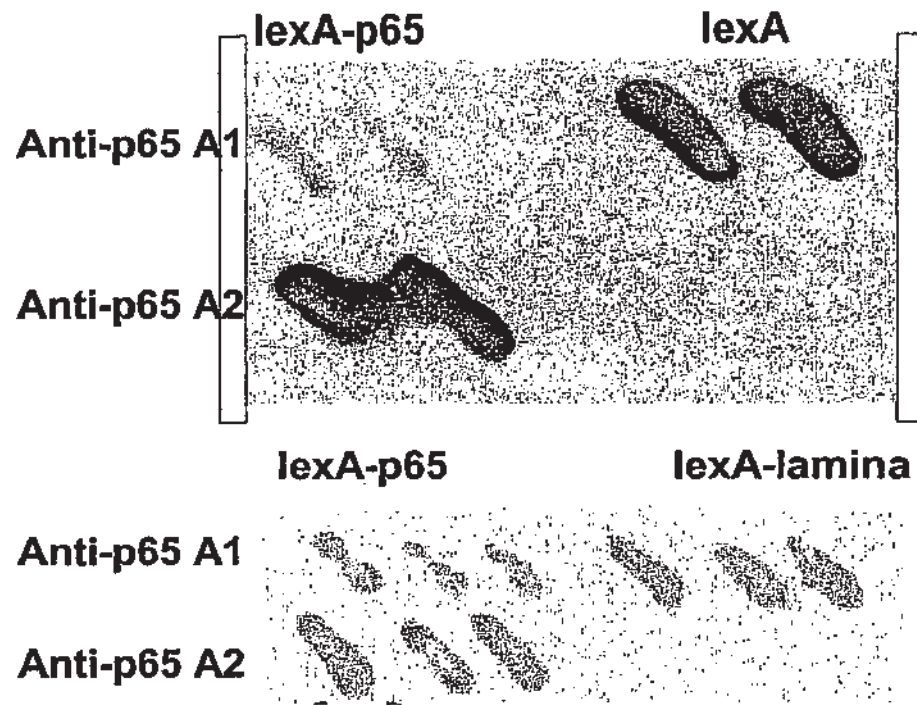


Fig.24

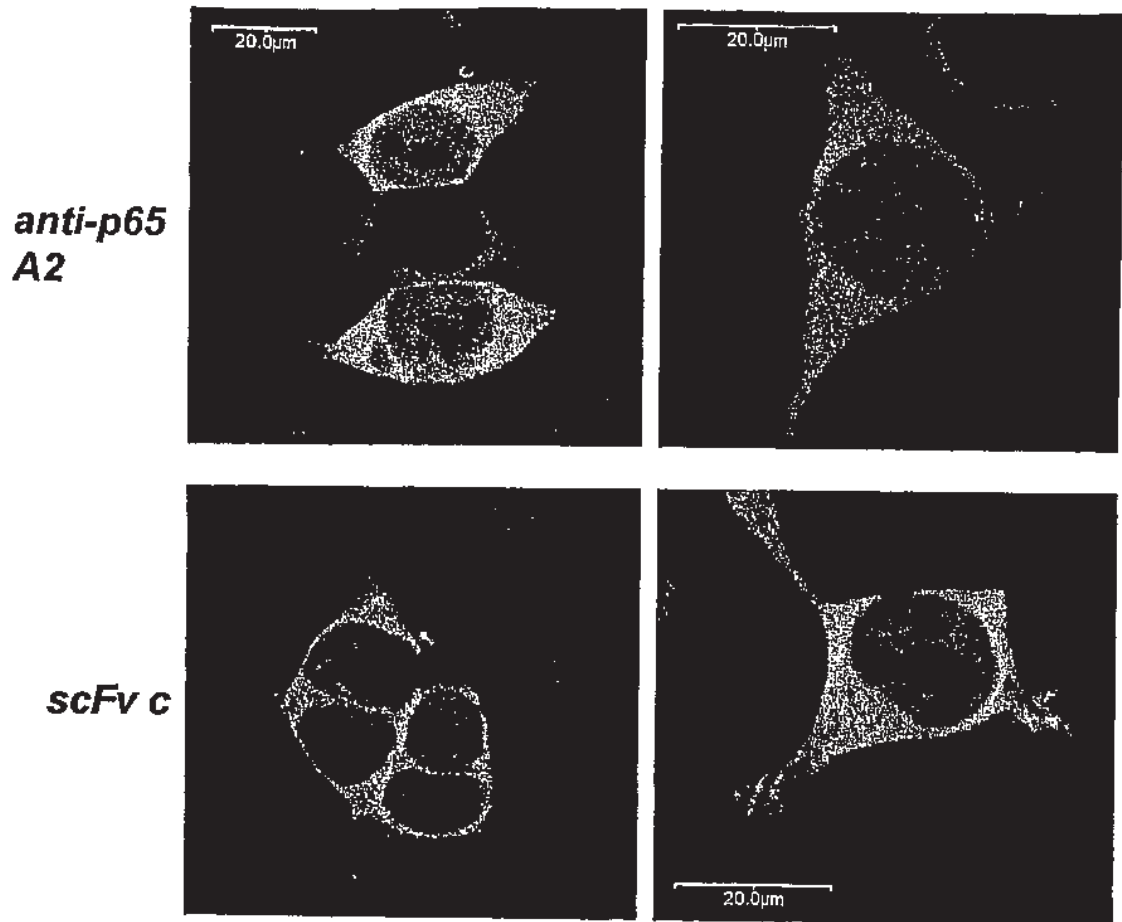


Fig.25

