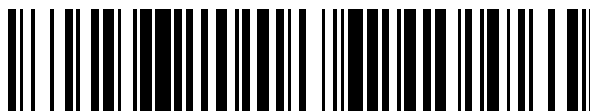


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 753**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2009** **E 09003076 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014** **EP 2098537**

54 Título: **Identificación de proteínas de unión específicas al antígeno o al ligando**

30 Prioridad:

05.03.2008 EP 08004096

29.04.2008 US 125886 P

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

12.02.2015

73 Titular/es:

4-ANTIBODY AG (100.0%)

Hochbergerstrasse 60C

4057 Basel, CH

72 Inventor/es:

GRAWUNDER, ULF y

STITZ, JÖRN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 528 753 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

Identificación de proteínas de unión específicas al antígeno o al ligando.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos métodos para la generación, expresión y detección de diversas colecciones de proteínas de unión en células de vertebrados *in vitro*, que permiten la identificación y el aislamiento de proteínas de unión reactivas al ligando o al antígeno. En particular, la presente invención describe métodos para la expresión retroviral, el aislamiento y la identificación de por lo menos una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo o fragmento de este, específico para un antígeno o ligando deseado.

Antecedentes

Las tecnologías de expresión han desempeñado un papel fundamental en el aislamiento de proteínas de unión específicas de alta afinidad con fines diagnósticos y terapéuticos en un gran número de trastornos y enfermedades. Estas tecnologías alcanzan el vasto campo de la ingeniería de anticuerpos, enzimas sintéticas, proteómicas y síntesis de proteínas *in vitro*. Las tecnologías de expresión biomoleculares que permiten la construcción de una gran reserva de biomoléculas codificadas modularmente, su expresión con fines de selección según sus propiedades y la rápida caracterización (decodificación) de sus estructuras, son especialmente útiles para acceder y analizar una diversidad de proteínas a gran escala. Recientemente han adquirido importancia las tecnologías de expresión *in vitro* debido al aislamiento de anticuerpos por expresión de fago, expresión de ribosomas y expresión microbiana que actualmente se han convertido en las plataformas dominantes en el campo de la ingeniería de proteínas y anticuerpos. Sin embargo, la expresión microbiana y los sistemas de expresión tienen limitaciones, especialmente para la expresión de grandes proteínas dimericas de vertebrados, tales como los anticuerpos. Esto se debe a la incapacidad general de expresar anticuerpos de longitud completa en dichos sistemas de expresión, que requiere la expresión de fragmentos de anticuerpos modificados genéticamente, pero también debido a la falta de glicosilación, la ausencia de proteínas chaperonas, la falta de compartimientos subcelulares y de tráfico de proteínas específicas a las células eucariotas, que individual y colectivamente dan como resultado artefactos plegables de proteínas en proteínas de mamíferos expresadas microbianamente. Recientemente se han desarrollado también métodos de expresión *in vitro* empleando células anfitrionas eucariotas, entre ellas, células de levadura, de vegetales y mamíferos. Los sistemas de expresión de células de levadura y de vegetales también carecen de chaperones específicos de glicosilación y específicos para células de vertebrados y mamíferos, de modo que las mismas limitaciones relativas al plegado de proteínas rigen con respecto a la expresión de proteínas de vertebrados en dichos sistemas. Sólo puede esperarse que la expresión, el plegamiento de proteínas y la modificación postraduccion de grandes proteínas recombinadas, como los anticuerpos, tenga lugar con razonable eficiencia y calidad en los sistemas de expresión de vertebrados, que idealmente expresan proteínas en los sistemas celulares más estrechamente relacionados desde el punto de vista filogenético.

Por lo tanto, las proteínas interesantes desde el punto de vista terapéutico, como los anticuerpos de roedores o de humanos, idealmente son expresadas en células de roedores o de humanos y no sorprende que las autoridades reguladoras aprueben sólo los sistemas de expresión provenientes de dichas especies para la producción de anticuerpos terapéuticos de longitud completa aptos para uso clínico. Sin embargo, los sistemas de expresión basados en células de mamíferos y vertebrados son trabajosos, requieren marcos a largo plazo para establecer clones y líneas celulares producidas en forma estable y la modificación genéticamente controlada y eficiente de dichas células generalmente no es simple y por lo tanto hace que estos sistemas sean menos atractivos para los métodos de detección y expresión. Por ejemplo, los métodos de transfección de ADN no pueden ser controlados en cuanto al número de construcciones de ADN que son incorporadas a las células transfectadas, ya sea en forma transitoria o estable, lo cual impide la expresión clonal de colecciones de proteínas y por lo tanto una detección gen a fenotipo precisa. Los sistemas virales de alternativa carecen de un control adecuado de la expresión clonal, de un mantenimiento estable de las construcciones genéticas y/o sufren el hecho de que dichos sistemas a menudo producen efectos citopáticos en las células objetivo (por ejemplo, la expresión de virus vacuna) de modo tal que los clones de las proteínas no pueden ser expresados y/o enriquecidos secuencialmente para un fenotipo particular como, por ejemplo, la unión específica a un antígeno.

Por ende, un objetivo de la presente invención es proporcionar un método que supere claramente todas las limitaciones y obstáculos anteriormente mencionados de los sistemas de selección y expresión de genes eucariotas y procariotas del arte previo. El método de conformidad con la invención utiliza la expresión retroviral estable de los anticuerpos en linfocitos B precursores, de modo que se logra la expresión estable y preferiblemente clonal de las proteínas de anticuerpos en presencia de proteínas chaperonas de glicosilación y tráfico de proteínas apropiados, garantizando así el plegamiento de las proteínas apropiadas y permitiendo la detección eficiente y, si se desea, repetida de los clones de anticuerpo de unión al antígeno. Habida cuenta que el método de conformidad con la invención está basado en la expresión retroviral de los anticuerpos o fragmentos de los mismos en los linfocitos B precursores, la tecnología descrita en el presente se denomina 'Retrocyte Display' (por *retroviral preB lymphocyte display* (expresión retroviral de linfocito preB)).

Sumario de la invención

La presente invención se relaciona generalmente con la provisión de anticuerpos con fines diagnósticos o terapéuticos o fragmentos de estos. En particular, se relaciona con la identificación y la selección de los anticuerpos reactivos al antígeno con secuencias de aminoácidos completamente humanos de interés para aplicaciones terapéuticas. Las realizaciones de la invención involucran vectores de expresión retroviral que permiten la expresión de diversas colecciones de anticuerpos o fragmentos de estos, en linfocitos B precursores de vertebrados, y métodos eficaces de aislamiento de moléculas reactivas al antígeno. La presente invención proporciona métodos novedosos para la generación de diversas colecciones de anticuerpos o fragmentos de estos mediante tres métodos alternativos. Primero, mediante barajado de cadenas de al menos una molécula de cadena pesada o ligera contra una colección diversa (banco) de cadenas ligeras o pesadas (enfoque de barajado de cadenas), o segundo, mediante la diversificación de al menos una combinación de una cadena pesada y ligera de un anticuerpo después de la transducción retroviral en las células de vertebrados *in situ* mediante la mutación somática de las construcciones de expresión transducidas en forma retroviral (enfoque de mutación somática), o tercero, mediante la recombinación V(D)J de construcciones de expresión transducidas retroviralmente que contienen las regiones codificantes de los dominios de unión variables en configuración "cuasi-línea germinal" es decir, todavía separada en segmentos génicos V, opcionalmente D y J (enfoque de recombinación V(D)J). Se entenderá que las diversas colecciones de anticuerpos o fragmentos de estos pueden generarse también mediante cualquier combinación de los métodos mencionados anteriormente. De conformidad con la invención, dichos anticuerpos o fragmentos de los mismos se expresan en la superficie de los linfocitos B precursores.

La presente invención proporciona, específicamente, métodos que permiten la expresión estable y opcionalmente clonal de diversas colecciones de anticuerpos en células de vertebrados que utilizan la transducción retroviral, esto facilita de gran manera la amplificación, el aislamiento y la clonación de genes que codifican anticuerpos, en comparación con los sistemas alternativos de expresión de vertebrados, no integradores, basados en virus o en plásmidos, conocidos en la técnica. Se describe la transducción retroviral de linfocitos B precursores (de murino) que expresan de forma endógena moléculas de Igα e Igβ, que facilitan la deposición en membrana de dicho anticuerpo o fragmento del mismo y que son incapaces de expresar polipéptidos de anticuerpos endógenos y al menos un componente de la cadena ligera sustituta, de manera que solo los anticuerpos recombinantes heterólogos se expresan en las células anfitrionas como anticuerpos unidos a la membrana. Además, la invención ilustra cómo las células que expresan los anticuerpos reactivos al antígeno o fragmentos de estos, pueden aislarse y opcionalmente expandirse *in vitro*, para enriquecer iterativamente una población de células de unión reactivas al antígeno a partir de las cuales se pueden clonar y secuenciar los genes que codifican anticuerpos reactivos al antígeno o fragmentos de estos mediante procedimientos de biología molecular estándares conocidos en la técnica (Fig. 1).

A pesar de que una realización preferida del método según la invención está dirigida a la expresión retroviral de preferiblemente anticuerpos humanos de longitud completa como proteínas de unión, también puede utilizarse para la expresión de cualquier fragmento de estos (por ejemplo, fragmentos de anticuerpos F_v o F_{ab} de cadena única). Se describen protocolos de transducción retroviral que opcionalmente permiten (i) el suministro de construcciones que codifican proteínas de unión únicas en células objetivo únicas para garantizar la expresión clonal de las proteínas de unión en las células anfitrionas; (ii) el barajado de al menos una construcción de expresión que codifica una segunda cadena de polipéptido con al menos una construcción de expresión que codifica una segunda cadena de polipéptido, generando así una proteína de unión funcional multimérica (por ejemplo, una molécula de anticuerpo); (iii) la mutación somática de al menos una construcción de expresión que codifica una proteína de unión tras la transducción de células de vertebrados *in situ*; y (iv) la generación de expresión de proteína de unión a partir de al menos una construcción de expresión mediante el mecanismo de recombinación V(D)J tras la transducción retroviral en células de vertebrados *in situ*.

Para lograr la mutación somática de la proteína de unión que codifica construcciones *in situ*, se describen los vectores de expresión retroviral y su utilización, en donde dichos vectores contienen elementos genéticos *cis*-reguladores que dirigen la hipermutación somática de las secuencias que codifican proteínas, preferiblemente por medio de una ruta que utiliza la desaminasa de citidina inducida por activación (AID) (Papavasiliou & Schatz, 2002), o mediante el uso de otras enzimas que dirigen las mutaciones somáticas de las secuencias que codifican las proteínas de unión. Para la generación de diversas colecciones de proteínas de unión, es decir, anticuerpos o fragmentos de estos, mediante recombinación V(D)J *in situ*, se describen las construcciones de vectores retrovirales y su utilización, en las que dichas construcciones contienen segmentos génicos variables (V), opcionalmente de diversidad (D), y de acoplamiento (J) dispuestos en configuración "cuasi línea germinal" permitiendo el ensamblaje de las regiones codificantes para las inmunoglobulinas por medio de la reordenación mediada por RAG (gen de activación de recombinación) de los segmentos génicos mediante el proceso conocido como recombinación V(D)J (Grawunder *et al.*, 1998).

De conformidad con otro aspecto, la presente invención ilustra además cómo las células transducidas retroviralmente que expresan de manera estable diversas colecciones de proteínas de unión recombinadas son posteriormente marcadas mediante la unión a por lo menos un ligando o antígeno de interés y cómo las células que se unen al ligando o antígeno antes mencionado son detectadas mediante los reactivos secundarios apropiados. Se describen los métodos para el marcado específico de las células reactivas al ligando o al antígeno y su

enriquecimiento o aislamiento, preferiblemente mediante separación de células activadas por fluorescencia de alta velocidad (FACS, por su sigla en inglés). Debido al fenotipo de expresión estable de las células transducidas retroviralmente, se describe la forma en que las células reactivas al antígeno pueden opcionalmente aislarse y expandirse nuevamente en histocultivos, de modo tal que es posible realizar ciclos opcionalmente iterativos de marcado, enriquecimiento dirigido al antígeno y expansión de las células reactivas al ligando o al antígeno hasta la subclonación de las células permitiendo la identificación de la región codificante de nucleótido para los anticuerpos reactivos al antígeno mediante métodos de clonación PCR estándar (Fig. 1).

Los métodos descritos en la presente permiten la expresión de las diversas colecciones de cadenas de anticuerpos o fragmentos de los mismos a partir de al menos una construcción de vector, que opcionalmente puede dar lugar a colecciones de proteínas de unión diversas tras la transferencia y expresión en el interior de células de vertebrados *in situ*. La expresión de cadenas de anticuerpos en células de vertebrados es mediada por transducción retroviral.

Como tal, una primera realización de la presente invención se refiere a un método para el aislamiento e identificación de al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo o fragmento del mismo específico para un antígeno o ligando deseado, que comprende las etapas de:

(a) transducir al menos una construcción de expresión retroviral que codifica un anticuerpo o fragmento del mismo en células anfitrionas de vertebrados mediante el uso de partículas retrovirales incompetentes para la replicación, donde la al menos una construcción se integra de forma estable en el genoma de la célula anfitriona de modo que las células anfitrionas transducidas son capaces de expresar y presentar dicho anticuerpo o fragmento del mismo en su superficie celular y donde las células anfitrionas de vertebrados son linfocitos B precursores que expresan de forma endógena moléculas de Ig α e Ig β que facilitan la deposición en membrana de dicho anticuerpo o fragmento del mismo y que son incapaces de expresar polipéptidos de anticuerpos endógenos y al menos un componente de la cadena ligera sustituta;

(b) expresar de forma estable dicho anticuerpo o fragmento del mismo en dichas células anfitrionas de vertebrados y presentar el mismo en su superficie celular;

(c) enriquecer las células anfitrionas de vertebrados que expresan dicho anticuerpo o fragmento del mismo sobre la base de su capacidad para unirse a dicho antígeno o ligando deseado mediante la separación de células que exhiben una unión al antígeno específica a partir de una población de células que no se unen, de este modo se aíslan selectivamente anticuerpos enlazantes potentes con una afinidad elevada por dicho antígeno o ligando deseado; y

(d) aislar e identificar dicha al menos una secuencia de nucleótidos que codifica dicho anticuerpo o fragmento de este a partir de las células anfitrionas de vertebrados transducidas y enriquecidas retroviralmente.

Además de las etapas anteriormente mencionadas, la etapa (d) puede ser precedida de la etapa de expandir las células anfitrionas de vertebrados enriquecidas en histocultivos. Asimismo, la etapa (c) puede ser seguida de un paso de expansión de las células anfitrionas de vertebrados enriquecidas en histocultivos, después de lo cual se repite la etapa (c) al menos una vez antes de llevar a cabo la etapa (d).

Para lograr la expresión clonal de al menos un anticuerpo es preferible controlar la transducción retroviral de modo tal que la mayoría de las células retroviralmente transducidas sean genéticamente modificadas por una sola construcción retroviral recombinada por cadena de anticuerpo integrándola al genoma de la célula anfitriona. Por lo tanto, en una realización de la presente invención, la transducción retroviral se lleva a cabo a una multiplicidad de infección (MOI) menor o igual a 0,1.

Un anticuerpo de conformidad con un método de la presente invención es preferiblemente un anticuerpo de longitud completa. Un fragmento de un anticuerpo puede seleccionarse del grupo integrado por: una cadena pesada, una cadena ligera, un dominio V_H único, un dominio V_L único, un fragmento scFv, un fragmento Fab y un fragmento F(ab')₂. El anticuerpo o fragmento(s) del mismo puede(n) tener una secuencia natural de aminoácidos, una secuencia de aminoácidos diseñada artificialmente o una combinación de estas.

En tanto el método de la presente invención se usa preferiblemente para el aislamiento e identificación de al menos una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena de anticuerpo, resultará evidente para un experto en la materia que el método de la presente invención puede utilizarse también para el aislamiento y la identificación de al menos una secuencia de nucleótidos que codifica cualquier receptor de superficie celular, monomérico o multimérico, perteneciente a la superfamilia Ig y cualquier fragmento funcional de este, o un receptor de superficie celular, monomérico o multimérico, perteneciente a la superfamilia de receptores TNF α o cualquier fragmento de este.

Además, en el caso que la proteína de unión sea un anticuerpo de longitud completa, dicho anticuerpo de longitud completa se selecciona del grupo integrado por un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo humanizado en el cual las regiones CDR de un anticuerpo o anticuerpos no humanos han sido injertadas en un marco de anticuerpo humano y un anticuerpo híbrido en el cual los dominios de región variables de una especie de vertebrados se combinan con los dominios de región constantes de otra especie de vertebrados, en que el dominio constante del anticuerpo híbrido deriva preferiblemente de un anticuerpo o anticuerpos humanos.

En una realización de los métodos descritos en el presente, las células anfitrionas de vertebrados pueden derivarse de un grupo de especies integrado por peces cartilaginosos, peces teleósteos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos. El grupo de especies de mamíferos puede incluir cerdos, ovejas, ganado vacuno, caballos y roedores. El grupo de roedores puede además incluir ratones, ratas, conejos y cobayos. En una realización preferida de la presente invención, la especie de células anfitrionas de vertebrados es el ratón (*Mus musculus*).

Las células anfitrionas de vertebrados para uso en un método de la presente invención son del linaje de células B, porque estas células expresan las proteínas chaperonas específicas para el anticuerpo y porque las moléculas accesorias, tales como la Igα e Igβ necesarias para mediar en el anclaje a la superficie celular de los anticuerpos, son expresadas en estas células, a saber, los linfocitos B precursores ya que las células preB pueden no expresar cualquier cadena de anticuerpos endógenos. De hecho, los linfocitos B precursores tal como se utilizan en la presente invención son incapaces de expresar los polipéptidos de anticuerpos endógenos que incluyen componentes de la llamada cadena ligera sustituta, codificada por los genes lambda-5, VpreB1 y VpreB2. Por lo tanto, estos linfocitos expresan proteínas de membrana accesorias que facilitan el depósito en la membrana de las moléculas de anticuerpo, tales como las moléculas Igα e Igβ específicas para los linfocitos B, pero carecen de la expresión de cualquier polipéptido de anticuerpo endógeno o de componente de cadena ligera sustituta. Sin embargo, se apreciará que puede ser posible expresar moléculas de Igα e Igβ ectópicamente mediante los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, la transfección estable con vectores de expresión para estas proteínas. En una realización de la presente invención, las moléculas de anticuerpo son ancladas a la membrana celular de los linfocitos por medio de las proteínas Igα e Igβ expresadas en forma endógena, que son expresadas naturalmente en los linfocitos pre-B de muridos.

Los métodos descritos en la presente, incluyen procedimientos que permiten el aislamiento de las células que exhiben las características de unión deseadas para un ligando o antígeno de interés y el aislamiento de los genes que codifican una proteína de unión de interés deseada. El método de expresión retroviral de un anticuerpo en las células de vertebrados descrito aquí permite la expresión estable y preferiblemente clonal de los anticuerpos, que facilita enormemente la amplificación, el aislamiento y la clonación de genes que codifican anticuerpos en comparación con sistemas de expresión en vertebrados alternativos, basados en plásmidos o no integradores basados en virus conocidos en la técnica. Los métodos descritos permiten la generación eficaz de diversas colecciones de moléculas de anticuerpo *in vitro* mediante:

- (i) el barajado de al menos una construcción de expresión que codifica al menos una cadena de polipéptido de un anticuerpo multimérico (como, por ejemplo, una cadena pesada), con al menos una construcción de expresión que codifica al menos una cadena de polipéptido compatible (como, por ejemplo, una cadena ligera de un anticuerpo) que genera un anticuerpo funcional multimérico;
- (ii) la mutación somática de al menos un vector de expresión que codifica al menos una molécula de anticuerpo tras la transferencia a células de vertebrados *in situ*;
- (iii) la recombinación somática de los segmentos génicos V (variables), opcionalmente D (diversidad) y J (de acoplamiento) que codifican dominios de unión variables de inmunoglobulinas contenidas en al menos un vector de expresión tras la transferencia a células de vertebrados *in situ*, mediante el proceso conocido como recombinación V(D)J; o
- (iv) mediante cualquier combinación de los procedimientos (i), (ii) y (iii).

De conformidad con una realización preferida, la al menos una secuencia de nucleótidos es una pluralidad de secuencias de nucleótido que comprende una secuencia de cadena pesada de anticuerpo y múltiples secuencias de cadena ligera de anticuerpo o, alternativamente, comprende una secuencia de cadena ligera de anticuerpo y múltiples secuencias de cadena pesada de anticuerpo.

De conformidad con otra realización preferida, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende un dominio de unión variable codificado por al menos una construcción de expresión retroviral que permite la recombinación V(D)J a fin de generar una secuencia codificante para un dominio de unión variable tras la transducción retroviral o

En otra realización preferida, la etapa (b) del método anterior se lleva a cabo bajo condiciones de mutagénesis, preferiblemente por medio de la expresión de la desaminasa de citidina inducida por activación (AID) que se expresa en forma endógena o ectópica, en la que la expresión ectópica de AID se lleva a cabo en condiciones inducibles.

En un aspecto del método anterior, la al menos una construcción de expresión retroviral que codifica dicho anticuerpo o fragmento del mismo contiene una combinación de elementos promotores cis-reguladores y potenciadores que permiten dirigir la mutación somática mediada por AID al dominio de unión variable codificado por la construcción de expresión, en la que los promotores y potenciadores se seleccionan del grupo integrado por

- (a) un promotor de cadena pesada de inmunoglobulina, un potenciador de intrón (E_μH) y potenciadores 3'α,
- (b) un promotor de cadena ligera κ de inmunoglobulina, potenciador de intrón κ (κiE) y potenciadores 3'κ (3'κE),
- (c) un promotor de cadena ligera λ de inmunoglobulina, potenciadores λ2-4 y λ3-1, y
- (d) cualquier combinación funcional de estos.

Descripción de las Figuras

Fig.1: Esta figura ilustra el principio de la tecnología "Retrocyte Display" que permite la identificación y aislamiento de una proteína de unión, tal como un anticuerpo, específica para un antígeno o ligando deseado. En una primera etapa, al menos una construcción de expresión retroviral que puede dar lugar a la expresión de una colección diversa de proteínas de unión es transducida en forma estable en células anfitrionas de vertebrados adecuadas ("células selectoras"). Esto se logra transfectando al menos un vector retroviral que codifica al menos una proteína de unión en células empaquetadoras retrovirales (etapa 1), que puede expresar, ya sea en forma constitutiva o transitoria, las proteínas retrovirales Gag, Pol y Env. Las células empaquetadoras transfectadas con la al menos una construcción de proteína de unión retroviral producirá luego partículas retrovirales recombinadas dentro de las 24-72 horas posteriores a la transfección, conteniendo la al menos una construcción de expresión retroviral. Las partículas retrovirales resultantes se acumulan en el sobrenadante del cultivo celular de las células empaquetadoras retrovirales, y pueden utilizarse para transducir células anfitrionas de vertebrados adecuadas ("células selectoras") (etapa 2), que luego expresan la proteína de unión. En el método preferido, las proteínas de unión, tales como anticuerpos o fragmentos de estos, se expresan en la superficie celular de las "células selectoras" y luego las células se marcan con un antígeno o ligando deseado (etapa 3). Las células de unión del antígeno o ligando se analizan preferiblemente mediante separación de células activadas por fluorescencia (FACS) y las células que exhiben unión al antígeno específico son separadas de la población de células que no se unen, preferiblemente por FACS preparativa de alta velocidad (etapa 4). Las células reactivas al antígeno o al ligando pueden opcionalmente expandirse nuevamente en el histocultivo y, debido al fenotipo de expresión estable de las células transducidas retroviralmente, pueden repetirse los ciclos de separación de células dirigida al antígeno y expansión del histocultivo, hasta obtener una población de células reactivas al antígeno o al ligando detectable. Esta población de células reactivas al antígeno o al ligando puede someterse a un paso final, preferible, de separación de una sola célula o puede utilizarse directamente para la clonación de genes que codifican proteínas de unión tomando como base una población. En la etapa siguiente (etapa 5), las regiones codificantes de los dominios de unión pertinentes se clonan a partir de los grupos de células o clones de células seleccionados por antígeno o ligando mediante RT-PCR o PCR genómica utilizando pares de cebadores que se unen a secuencias específicas para la colección de proteínas de unión y/o específicas para otras secuencias de vectores mediante métodos estándar conocidos en la técnica. Las regiones clonadas y secuenciadas para las proteínas de unión pueden luego expresarse opcionalmente como proteínas recombinadas en cualquier sistema de expresión que se elija para la posterior caracterización funcional y para confirmar la especificidad de unión al antígeno o al ligando (etapa 6).

Fig.2: (a) Esta figura ilustra la estructura esquemática de los anticuerpos o inmunoglobulinas y fragmentos de estos, que son las proteínas de unión de conformidad con la invención descrita. La Fig. 2a) muestra la estructura esquemática de un anticuerpo IgG (izquierda), que está caracterizado por una estructura en forma de Y típica y compuesto por dos cadenas pesadas y ligeras idénticas de inmunoglobulina (Ig), que comprenden cuatro dominios (V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3) y dos dominios de inmunoglobulina (V_L - C_L), respectivamente. Los dominios V son las regiones de unión al antígeno altamente variables de las cadenas IgH e IgL, en tanto los dominios C_H y C_L representan los dominios de región constantes. Los dominios de región variables de las cadenas de IgH son codificados por los segmentos génicos V, D y J, en tanto los dominios de región variables de las cadenas de IgL son codificados sólo por los segmentos génicos V y J que deben ser ensamblados a partir de los locus de los genes de inmunoglobulinas de la línea germinal (Figs. 2b) y 2c)) durante la primera etapa de la formación de linfocitos B, mediante el proceso conocido como recombinación V(D)J.

Las cadenas IgH e IgL de anticuerpos están unidas mediante enlaces covalentes por puentes disulfuro que unen las cadenas idénticas de IgH en una ubicación próxima a la región bisagra flexible, es decir, entre los dominios C_H1 y C_H2 , en tanto otros puentes disulfuro entre los dominios C_H1 y C_L unen covalentemente a las cadenas IgH e IgL (Fig. 2a izquierda).

Los fragmentos Fab son fragmentos univalentes de anticuerpos de longitud completa que contienen únicamente los dominios V_H - C_H1 / V_L - C_L unidos por un puente disulfuro natural que pueden derivarse por escisión enzimática de papaína a partir de anticuerpos de longitud completa o que pueden expresarse como proteínas recombinadas mediante la expresión de cadenas C_H2 - C_H3 de IgH suprimidas conjuntamente con las cadenas IgL. Otros fragmentos de anticuerpos de longitud completa son los fragmentos de dominio variable de cadena única (fragmentos scFv) que sólo comprenden los dominios de región variables de las cadenas IgH e IgL unidos por un conector sintético o un puente de disulfuro artificial. La expresión de anticuerpos de longitud completa o de fragmentos de anticuerpos, tal como los fragmentos Fab y scFv descritos, también puede expresarse como proteínas de unión para realizar la invención.

La Fig. 2b) describe esquemáticamente el proceso de recombinación V(D)J que tiene lugar en un alelo de cadena IgH de línea germinal que da como resultado el ensamblaje de las regiones codificantes de los dominios V_H del anticuerpo. Los dominios variables de las cadenas IgH en las especies de vertebrados son codificados por una multitud de segmentos génicos V, D y J, que están separados en configuración de línea germinal. Durante la recombinación V(D)J que tiene lugar durante las primeras etapas de formación de linfocitos B, un segmento génico V, D y J seleccionado se reordena en un sitio específico a fin de generar una región codificante excepcional para un dominio V_H del anticuerpo. La recombinación V(D)J en el locus de la cadena de IgH es un proceso ordenado y

comienza con la reordenación de un segmento génico D seleccionado a un segmento génico J seleccionado, habitualmente en ambos alelos de la cadenas IgH. Sólo después de la reordenación génica D a J, una región V seleccionada se acopla de manera específica a la región ya ensamblada DJ, generando así un marco de lectura abierto (ORF) V-D-J que codifica el dominio V_H. El proceso de recombinación V(D)J depende de la expresión de los genes de activación de recombinación específicos de linfocitos precursores(RAG) 1 y 2.

La Fig. 2c) describe esquemáticamente el proceso de recombinación V(D)J que tiene lugar en un alelo de cadena IgL de la línea germinal que da como resultado el ensamblaje de las regiones codificantes de los dominios V_L del anticuerpo. Los dominios variables de las cadenas IgL en las especies de vertebrados son codificados sólo por los segmentos génicos V y J, que están separados en configuración de línea germinal, similar a los segmentos génicos en el locus de la cadena IgH. La generación de los dominios V_L de un anticuerpo requiere sólo un evento de recombinación V(D)J específico para el sitio, tal como se describe.

Fig. 3: Esta figura ilustra esquemáticamente el principio de la modificación genética estable de las células objetivo para la expresión de una proteína de unión de interés (BPOI) tal como un anticuerpo (alternativamente marcado "X") mediante transducción retroviral.

La Fig. 3a) describe la organización esquemática de un genoma retroviral natural (arriba a la izquierda), en la cual los genes para las proteínas estructurales y funcionales Gag, Pol y Env están ubicados entre las llamadas secuencias de repetición terminal larga 5' y 3'(LTR) que flanquean el genoma retroviral. Las LTR 5' son importantes para la expresión de los genes retrovirales y también para la replicación del genoma retroviral en la célula anfitriona infectada. Otra región importante en el genoma retroviral es la señal de empaquetamiento ψ (Psi), que se requiere para el empaquetado del ARN retroviral durante la replicación y/o producción de las partículas retrovirales.

Para la generación de partículas retrovirales recombinadas, los genes *gag*, *pol* y *env* pueden ser eliminados de un genoma retroviral natural, de modo que solo queden las LTR 5' y 3' y la señal de empaquetamiento ψ (Psi). Para la construcción de vectores retrovirales recombinados es entonces conveniente introducir un sitio de clonación múltiple (MCS) que contenga varios sitios de restricción convenientes y excepcionales. Este diseño, tal como se describe arriba a la derecha, representa el vector de transferencia retroviral más simple.

Para la expresión de los retrovirus recombinados que permiten la expresión de una proteína recombinada (por ejemplo, una proteína de unión de interés (BPOI) "X") tal como un anticuerpo, se necesita mínimamente que un marco de lectura abierto (ORF) de una BPOI se inserte en un vector de transferencia retroviral "vacío", ya que la región LTR 5' tiene una actividad promotora capaz de generar la expresión de cualquier gen posicionado en dirección 3'. Sin embargo, para mejorar los niveles de expresión, la expresión de un gen de interés (por ejemplo, una BPOI-"X") puede ser opcionalmente provocada por un promotor heterólogo complementario (Prom.), y la adición opcional de un gen marcador, por ejemplo, en dirección 3' del promotor LTR 5' y de la señal de empaquetamiento ψ , tal como se describe aquí, puede permitir la selección y/o rastreo de las construcciones transducidas retroviralmente.

La Fig. 3b) ilustra esquemáticamente el procedimiento de transducción retroviral de las células objetivo que resulta en la expresión estable de una BPOI-"X" como un anticuerpo. Para esto, primero se transfecta transitoriamente una construcción retroviral recombinada que contiene un casete de expresión para una BPOI-"X" en una línea de células empaquetadoras retrovirales (PCL), que expresan las proteínas retrovirales estructurales y funcionales Gag, Pol y Env de un retrovirus natural (izquierda). Se puede generar una PCL retroviral transfectando ya sea en forma estable o transitoria construcciones de expresión para las proteínas Gag, Pol y Env en una línea celular apropiada y fácil de transfectar (por ejemplo, células 293 HEK humanas estándares o fibroblastos de ratón NIH 3T3). Dos o tres días después de la transfección, los genomas recombinados retrovirales que contienen el gen de la BPOI-"X" se empaquetan en partículas retrovirales de replicación incompetentes que se acumulan en el sobrenadante del cultivo celular de la PCL. Las partículas retrovirales son incompetentes para la replicación porque carecen de los genes para las proteínas funcionales retrovirales Gag, Pol y Env y por lo tanto, pueden transmitir su carga genética a una célula objetivo sólo una vez, proceso que se denomina transducción retroviral o una sola ronda de infección. Durante la transducción retroviral, el ARN empaquetado de un retrovirus recombinado se introduce en las células objetivo, donde se transcribe en forma inversa en el ADNc que luego es integrado en forma estable al genoma de las células objetivo. Dos o tres días después de la transducción retroviral, un gen de interés, como el de la BPOI-"X", es expresado en forma permanente por las células objetivo, debido a la integración de la construcción retroviral del ADNc al genoma de las células anfitrionas.

Fig. 4: Esta figura muestra el diseño esquemático de los tipos preferidos de construcciones de expresión retroviral que pueden utilizarse para realizar la invención. El dibujo representa el diseño esquemático de los vectores retrovirales contenidos en el esqueleto del plásmido de clonación de ADN estándar (línea negra cerrada); en el cual se resaltan los genes y regiones pertinentes para el genoma retroviral. Una generación de vector preferida, descrita en el cuadro (a), cuya clonación detallada se describe en las Figs 5 y 6, y se proporciona en el Ejemplo 1, contiene las regiones codificantes de ADNc para las cadenas Ig γ _H e Ig κ _L humanas impulsadas por un fuerte promotor CMV constitutivo (Prom) y flanqueadas en dirección 5' y dirección 3' por el potenciador de intrón Ig κ (kiE) y el potenciador 3' κ (3' κ E), promoviendo la hipermutación somática a las regiones codificantes V de las cadenas IgH e IgL. Las construcciones de expresión de cadena IgH e IgL contienen otros marcos de lectura abiertos para los marcadores

de resistencia a los antibióticos higromicina B (higro^R) y puomicina (puro^R), respectivamente, permitiendo la selección de la integración estable de las construcciones de cadena IgH e IgL por aplicación de la selección de los fármacos antibióticos respectivos a los cultivos de las células de vertebrados transducidas retroviralmente. Además, se resaltan los sitios de restricción convenientes y excepcionales, que permiten la sustitución directa de las regiones codificantes V con HindIII y Eco47III, o la sustitución de la totalidad de las regiones codificantes de cadena IgH e IgL utilizando las enzimas de restricción HindIII y NotI. De esta forma, se pueden clonar fácilmente diferentes regiones V o incluso colecciones completas de regiones V a partir de una construcción de expresión de cadena IgH o IgL existente, en los vectores de expresión descritos.

(b) En este cuadro, se describe otra clase de vectores preferidos que transportan una sustitución de la región codificante variable mediante un fragmento de ADN, en los que la región codificante variable está todavía separada en segmentos génicos V, D y J (para la construcción IgH) y los segmentos génicos V y J (para la construcción de la cadena de IgL) en configuración "cuasi línea germinal". A pesar de que en otros aspectos son idénticos a los vectores de expresión retroviral proporcionados en (a), estos vectores competentes de recombinación V(D)J deben primero ser reordenados en un sitio específico de los segmentos génicos V, opcionalmente D y J, para generar una región codificante para un dominio de unión variable de una cadena IgH o IgL. En la Figura 11 se describe la clonación detallada de dicho vector que permite la expresión de las cadenas IgH después de la recombinación V(D)J.

Una característica única de estas construcciones es su capacidad para generar diversas regiones codificantes de dominio V en células activas de recombinación V(D)J *in situ*, por ejemplo, en linfocitos precursores que expresan las proteínas endógenas RAG1 y RAG2. Habida cuenta que el proceso de recombinación V(D)J no es preciso, un vector retroviral individual dentro de un conjunto dado de segmentos génicos V, D y J para IgH, o un conjunto dado de segmentos génicos V y J para IgL puede dar como resultado una diversa colección de secuencias de región codificante variable. La diversidad en el acoplamiento de los segmentos génicos V, opcionalmente D y J se debe a una combinación de la actividad de la exonucleasa, la adición de la región N mediada por TdT y la generación del nucleótido P, que pueden contribuir individual o colectivamente a la diversificación de las uniones codificantes. Dado que los segmentos génicos V, D y J se clonaron en una manera tal que los diferentes miembros de la familia de los segmentos génicos V, D y J se pueden reemplazar fácilmente por sitios de restricción excepcionales, un número limitado de construcciones generadas e introducidas en células anfitrionas competentes de recombinación V(D)J puede dar como resultado una enorme diversidad de proteínas de unión generadas *in situ*. Como estos vectores contienen además los elementos κ E y $3'\kappa$ E que confieren hipermutación somática a una región codificante del dominio V reordenada por V(D)J, una primera colección de diversas proteínas de unión generadas *in situ* puede opcionalmente someterse a mutagénesis mediante un proceso de hipermutación somática dependiente de AID. De esta manera, el proceso completo de generación de diversidad de anticuerpos *in vivo*, se puede recapitular *in situ* e *in vitro* utilizando las construcciones retrovirales y células anfitrionas descritas exhiben actividad de recombinación V(D)J (por ejemplo, linfocitos precursores), y en el que la hipermutación somática mediada por AID está activa o puede ser activada.

(c) Este cuadro describe esquemáticamente otro diseño de construcciones retrovirales que se puede utilizar para realizar la invención. Aquí, la expresión de las regiones codificantes IgH e IgL es impulsada por el promotor LTR 5' del esqueleto retroviral y la expresión de las cadenas IgH e IgL se acopla a la expresión de los marcadores de autofluorescencia GFP e YFP, permitiendo el rastreo y aislamiento de las células que expresan IgH e IgL, simplemente analizando las células transducidas en cuanto a fluorescencia verde y amarilla. Estas construcciones son muy útiles para controlar la multiplicidad de infección de las "células selectoras" sin procedimientos de marcado ulteriores.

Se proporciona una referencia de los símbolos utilizados en las Figs 4a) a c) para las secuencias de ADN importantes incluidas en la construcción. A fin de comprender mejor las ilustraciones, se proporciona la subdivisión de las regiones codificantes IgH e IgL en dominios variables (V_H y V_L), todas ellas conteniendo secuencias endógenas líder (L), regiones codificantes bisagra (H), constantes (C_H1 , C_H2 , C_H3 , C_L) y regiones codificantes transmembranarias (M1/2, porque esta región es codificada por dos exones).

Las Figs. 5a-e ilustran la estrategia de clonación para la construcción de un vector de expresión retroviral de IgH (isotipo IgY₁ humano), descrito en detalle en el Ejemplo 1 y en el diseño básico proporcionado en la Fig. 4(a). Se describe la clonación de las construcciones de expresión para ambas IgG unidas a la membrana así como también la IgG secretada, tal como se detalla en el Ejemplo 1. Se proporcionan los sitios de restricción excepcionales en los mapas de plásmidos para referencia general. Basado en la construcción de expresión retroviral final de la cadena de IgY₁H, tal como se describe en la Fig. 5e de la presente, puede introducirse cualquier otra región codificante del dominio V_H , o una colección (banco) de diversas regiones codificantes de dominio V_H , en los vectores utilizando los sitios de restricción HindIII y Eco47III excepcionales, reemplazando la región V_H existente por cualquiera de dichas regiones codificantes de dominio V_H . La Fig. 5a ilustra una primera etapa de clonación preparatorio en el cual un sitio de restricción Eco47III (encerrado en un círculo) se elimina del esqueleto del vector pLHCX disponible comercialmente mediante mutagénesis dirigida al sitio, tal como se describe en el Ejemplo 1. Esto genera el esqueleto del vector retroviral pLHCXm1, en el cual el sitio de restricción Eco47III se puede volver a introducir posteriormente para la clonación y sustitución de las regiones codificantes de dominio V_H . Las ventajas de utilizar

Eco47III para este fin radican en el hecho de que el Eco47III es el único sitio de restricción que puede introducirse directamente en el límite entre las regiones codificantes humanas V_H y $C\gamma_1$ sin cambiar la composición de los aminoácidos de las cadenas de $I\gamma_1H$ humanas expresadas. La Fig. 5a ilustra además, cómo los fragmentos clonados de los genes de la región constante humana γ_1 , con o sin exones transmembranarios M1/M2, son clonados en el esqueleto del pLHCXm1 utilizando los sitios de restricción excepcionales HindIII y ClaI presentes en los MCS del pLHCXm1. Los fragmentos fueron diseñados para contener los otros sitios de restricción flanqueadores Eco47III y NotI con fines de clonación, según se detalla en el Ejemplo 1. La Fig. 5b) muestra los mapas de plásmidos de los intermedios de clonación sin las regiones codificantes de dominio V_H , y se muestra cómo una región codificante del dominio V_H específica flanqueada por los sitios HindIII y Eco47III es clonada en las construcciones. Estas construcciones así generadas se ilustran en la Fig. 5c, y en principio serían suficientes para conferir la expresión de las cadenas $I\gamma_1H$ humanas a cualquier línea de células receptoras. Sin embargo, la posibilidad de realizar nuevamente la mutagénesis de las regiones codificantes V_H de una manera dependiente de AID, es un aspecto de esta invención y se describen otros dos pasos de clonación en los cuales el elemento central κ IE con otras dos secuencias flanqueadoras se clona en un sitio BglII excepcional secuencia arriba del promotor CMV del casete de expresión (Fig. 5c en la parte inferior y Fig. 5d) y en los cuales el elemento 3' κ E con alguna secuencia flanqueadora de ADN se clona en el sitio ClaI único secuencia abajo del casete de expresión para las cadenas $I\gamma_1H$ humanas. Esto resulta en el vector de expresión final para las cadenas $I\gamma_1H$ humanas, unidas a la membrana o secretadas, para el cual se proporcionan los mapas de plásmidos en la Fig. 5e. Estas construcciones corresponden a los mapas esquemáticos de plásmidos que ya se describieron en la Fig. 4a, pero en este caso con mapas de enzimas de restricción precisos y llevados a escala.

La Fig. 6a-d ilustra la estrategia de clonación detallada que se proporciona en el Ejemplo 1 para crear la construcción de expresión IgL (isotipo IgkL humano) retroviral cuyo diseño básico se proporcionó en la Fig. 4(b). Basándose en la construcción de expresión de la cadena IgkL retroviral final, como se revela en la Fig. 6d de la presente, se puede introducir cualquier otra región codificante del dominio V_L , o una colección (banco) de diferentes regiones codificantes del dominio V_L , en los vectores utilizando los sitios de restricción HindIII y Eco47III excepcionales, reemplazando la región V_L existente con dicha región (o regiones) codificante(s) del dominio V_L . La estrategia de clonación para los vectores de expresión de la cadena IgL requirió diferentes etapas preliminares de clonación de forma de generar un esqueleto de vector retroviral modificado en el que se pueden clonar los elementos deseados usando los sitios enzimáticos de restricción convenientes como se ilustró. En una primera etapa, del plásmido pLPCX comercial se eliminó un sitio Eco47III no deseado de la señal de empaquetamiento ψ (Psi) mediante mutagénesis dirigida al sitio como se describe en el Ejemplo 2, lo que dio como resultado el plásmido pLPCXm1 modificado (Fig. 6a). En una segunda etapa, se generó un esqueleto pLPCXm2 nuevo ligando un fragmento AscI-BlnI grande digerido proveniente de un plásmido pLHCX con un fragmento AscI-NcoI del pLPCXm1 (Fig. 6b). Para ambos fragmentos, fue necesario completar con nucleótidos los extremos de ADN BlnI y NcoI no compatibles usando un fragmento Klenow como se describe en el Ejemplo 1. Se insertó la región constante para una cadena κ L humana (Ck) en el esqueleto pLPCXm2 resultante por medio de los sitios HindIII y ClaI como se muestra (Fig. 6b). De forma similar a la estrategia de clonación para las cadenas IgH humanas, el fragmento Ck humano se flanqueó con los sitios Eco47III y NotI para facilitar los procesos de clonación posteriores. Después de insertar el fragmento Ck humano, se clonó un elemento V_k humano seleccionado en la construcción por medio de los sitios HindIII y Eco47III excepcionales (Fig. 6c). En principio, esta construcción sería suficiente para conferir la expresión de las cadenas IgkL humanas en cualquier línea celular receptora. Sin embargo, al igual que para las construcciones de expresión de la cadena IgH (Fig. 5a-e), se clonaron elementos κ IE y 3' κ E adicionales en la construcción, en los sitios BglII y ClaI excepcionales por encima y por debajo del casete de expresión de la cadena IgkL, de forma idéntica a la estrategia de clonación de las construcciones de la cadena IgH (Figs. 6c y 6d). En las construcciones finales, la región codificante del dominio V_k también se puede tomar como blanco de hipermutación somática mediada por AID. La construcción final corresponde al mapa esquemático del plásmido que se detalla en la Fig. 4(b), pero en la presente se incluyen y dibujan a escala los mapas precisos de las enzimas de restricción.

Fig. 7: Esta figura ilustra la estrategia de clonación para una construcción de expresión retroviral para la desaminasa de citidina inducida por activación (AID). Como se muestra, se utilizó el esqueleto del vector retroviral pLPCX y se clonó un fragmento RT-PCR específico de ADNc esplénico de ratón que contenía la región codificante AID en el sitio de restricción XhoI excepcional del vector pLPCX usando los sitios de restricción XhoI insertados en los cebadores de amplificación por PCR, como se describe en el Ejemplo 2.

Fig. 8: Esta figura (8a y 8b) ilustra la estrategia detallada de clonación, proporcionada también en el Ejemplo 2, para construcciones indicadoras retrovirales con y sin potenciadores de la cadena IgkL, lo que permitió la identificación y cuantificación de mutaciones somáticas por reversión de una mutación de terminación EGFP definida.

Fig. 9: Esta figura proporciona un estudio preliminar experimental para demostrar que los vectores retrovirales revelados permiten la mutación somática mediada por AID de secuencias, como regiones codificantes V de anticuerpos preferidas, clonadas secuencia abajo de los elementos promotores de V. El cuadro (a) muestra un análisis de la expresión de AID por inmunotransferencia de cinco clones celulares FA-12 transformados con A-MuLV y transfectados establemente con una construcción de expresión AID retroviral, cuya clonación se ilustra en la Fig. 7. El análisis de inmunotransferencia muestra una señal AID específica distintiva de aprox. 25kD en los clones transfectados FA-12 1 a 4, pero no en el clon transfectado 5 ni en el control negativo no transfectado (NC). El clon

transfectado 3 se usó para más análisis de los vectores indicadores retrovirales para la hipermutación somática (SHM) mediada por AID, ilustrada en el cuadro (b): en este caso, las construcciones indicadoras retrovirales de la Fig. 8 (una vez con potenciadores Igk y otra sin tales elementos) se transformaron retroviralmente por transducción en transfectados FA-12 3 y 5 que expresan y que no expresan la AID, respectivamente. Como se esperaba, solo cuando se transdujeron las construcciones indicadoras que contenían potenciadores en el clon transfectado FA-12 número 3 que expresaba la AID se pudo detectar transductores revertientes verdes a una frecuencia de 0,2% diez días después de la transducción. A partir de estas células verdes 0,2%, se aislaron 100 clones celulares individuales mediante separación de una sola célula y se analizaron nuevamente estos clones para detectar la fluorescencia verde mediante FACS después de la expansión. La amplia mayoría de los clones separados por la técnica de separación de una sola célula (95%) mostraron una expresión de fluorescencia verde homogénea a la misma intensidad de fluorescencia que la señal de fluorescencia verde media de células verdes 0,2% separadas originalmente, y similar al patrón de expresión GFP representativo proporcionado en el cuadro izquierdo inferior de la Fig. 9b, lo que confirma que la población verde original se debió a reversiones de la mutación de terminación EGFP. Cuatro clones mostraron un patrón de fluorescencia verde bimodal, como se representa en el histograma FACS del medio y solo 1 de las 100 células separadas clonadas mostró una fluorescencia verde casi nula (histograma FACS de la derecha).

Fig. 10: Esta figura ilustra la secuencia de la región codificante EGFP con una mutación de terminación genotecnológica usada para clonar una construcción indicadora EGFP para cuantificar la hipermutación somática. En el cuadro (a) se muestra cuál de los cuatro nucleótidos se mutaron en los codones 107 y 108 del marco de lectura abierto EGFP para generar un codón de terminación en el codón 107 y un cambio de lisina a treonina en el codón 108. Estos cuatro cambios nucleotídicos resultaron además en la introducción de un sitio de restricción SpeI excepcional, como se indicó, que podía usarse como marcador de diagnóstico para las reversiones de codón de terminación en la hipermutación somática. El nucleótido G del codón de terminación TAG está integrado en un motivo secuencial RGYW, que se sabe es muy susceptible a sufrir hipermutación somática. En 24 clones revertientes analizados mediante digestión con la enzima de restricción SpeI, se pudo confirmar que el sitio se volvía resistente a la digestión con SpeI (y por lo tanto, mutó). En diez de estos clones, el análisis de secuencia reveló que el nucleótido G en el codón de terminación TAG original había mutado a un nucleótido C dando como resultado un codón TAC, lo que confirmó el análisis de enzima de restricción y demostró que la mutación somática mediada por AID iba dirigida al G en el motivo RGYW.

(b) Este cuadro muestra todo el ORF de la EGFP mutada que se clonó en la construcción de la cadena Igy1H retroviral revelada en la Fig. 5(e), en vez de una región codificante del dominio V_H.

Figs. 11(a) y (b): Ilustración de la estrategia de clonación detallada de un vector de expresión de la cadena IgH retroviral competente de recombinación V(D)J, como se revela en el Ejemplo 4.

Fig. 12: Estudio preliminar para demostrar que las construcciones retrovirales que requieren una recombinación V(D)J de los segmentos génicos V, D y J en una configuración "cuasi-línea germinal" pueden originar construcciones de expresión de cadena pesada reordenadas productivamente y células Ig⁺ mediante transducción en linfocitos precursores positivos para RAG1/RAG2. El cuadro (a) contiene datos que muestran la generación de células positivas a inmunoglobulina de superficie (0,04%, cuadrante derecho superior del diagrama FACS izquierdo) después de la transducción de un vector de expresión retroviral competente de recombinación V(D)J (para una descripción detallada de la clonación, ver la Fig. 11) en la línea celular preB 230-238 transformada con A-MuLV. La expresión de la inmunoglobulina está unida a la expresión de la EGFP usando construcciones como las que se ilustran esquemáticamente en la Fig. 4c. Por lo tanto, las células que expresan la inmunoglobulina solo pueden generarse en la población de células verdes (es decir, establemente transducidas). El cuadro de tinción de la derecha muestra el reanálisis de la expresión de la inmunoglobulina de superficie después de una sola ronda de enriquecimiento por FACS y expansión durante 8 días en histocultivo, de las poco comunes células con inmunoglobulina de superficie (0,04%). Después de esta ronda de enriquecimiento, la frecuencia combinada de las células positivas a la inmunoglobulina aumentó a 17,8% (como se esperaba, detectables en el verde, es decir, población establemente transducida) de las que se obtuvieron y secuenciaron amplicones PCR. (b). A modo de ejemplo representativo, este cuadro muestra una secuencia de ADN (clon 225 con traducción de aminoácido en la parte superior) obtenida a partir de un amplicón PCR derivado de células con inmunoglobulina de superficie después de una ronda de enriquecimiento, que habían sido transducidas con vectores retrovirales competentes de recombinación V(D)J "cuasi-líneas germinales". Como referencia, en la parte superior de (b) se proporcionan las secuencias de las regiones codificantes de los segmentos génicos V, D y J, también con traducción de aminoácido encima de los segmentos génicos V y J, ya que la secuencia del segmento D se puede leer en tres diferentes marcos de lectura abiertos en función de la diversidad de empalme después de la recombinación V(D)J. Los puntos representan las secuencias intercaladas entre los segmentos génicos V, D y J en una configuración "cuasi línea germinal". La secuencia del clon 225 recuperado representa claramente una reordenación V(D)J *bona fide*, con las características típicas de pérdida de nucleótido y adiciones de secuencias N catalizadas por TdT claramente detectables en las uniones codificantes entre los segmentos génicos V, D y J ensamblados (todas las secuencias intercaladas eran secuencias perdidas del clon 225). La secuencia del clon 225 mostró un marco de lectura abierto y, aparte de las variaciones en las uniones codificantes antemencionadas, no contenía mutaciones somáticas adicionales en las secuencias V, D y J.

Fig. 13: Datos que muestran el análisis de un cuadro de diferentes líneas celulares preB murinas transformadas con A-MuLV para estudiar la susceptibilidad a la transferencia génica del vector derivado de MLV ecotrópico. Se transdujeron 1×10^5 células a una MOI de 0,5 utilizando una preparación de vector con el gen indicador *EGFP* (que contenía el vector de transferencia LEGFP-N1) empaquetado. La transducción se llevó a cabo como se detalla en el Ejemplo 5. Dos días después de la transducción, se detectó la transferencia génica mediante la expresión de EGFP usando FACS. Salvo por la línea celular preB 18/81, todas las otras líneas celulares preB transformadas con A-MuLV fueron susceptibles a la transducción a frecuencias entre 40% y 60% en las condiciones aplicadas, y pueden, en principio, usarse para la presente invención. Para el control negativo, se usaron células objetivo no sometidas a tratamiento que no exhibieron fluorescencia verde (no se muestran).

Fig. 14: Caracterización de un cuadro de líneas celulares preB murinas para la expresión intracelular de cadenas pesadas de IgM endógena (cy- μ H), a fin de identificar las células desprovistas de expresión de anticuerpos murinos endógenos que pueden usarse como células selectoras para la técnica *retrocyte display*. Las células se permeabilizaron y tiñeron usando anticuerpos contra la cadena pesada de la IgM murina unidos a FITC (FL1). Para los controles negativos se utilizaron células sin tratar. El experimento muestra que las líneas celulares FA-12, 1624-5, 1624-6, 18/81-cl8-11 y 40E1 poseen una expresión de anticuerpo endógeno prácticamente indetectable y por lo tanto, se pueden usar en un método de la presente invención.

Fig. 15: Ilustración de la complejidad de los vectores de expresión retroviral que poseen el diseño revelado en la Fig. 4(c) y el principio experimental para la generación de una colección de anticuerpos de cadena mezclada de IgH y la IgL. (a) Las colecciones de vectores retrovirales IgH(650)-LIB-IRES-GFP y IgL(245)-LIB-IRES-YFP abarcan colecciones definidas de regiones codificantes para cadenas pesadas (HC) y cadenas ligeras (LC) para anticuerpos completamente humanos, con una complejidad de 650 y 245 clones diferentes completamente secuenciados, respectivamente. Ambos vectores albergan la secuencia de empaquetamiento Psi (ψ), repeticiones terminal larga (LTR) flanqueadoras y una señal interna de entrada al ribosoma (IRES). De forma análoga a la expresión de una cadena polipeptídica de anticuerpos mediada por el promotor viral en la LTR 5', la IRES permite la expresión acoplada del gen indicador *gfp* e *yfp*, respectivamente. Después de la transferencia génica viral a las células selectoras, esto permite detectar y enriquecer apropiadamente las células transducidas exitosamente y que expresan la cadena inmunoglobulínica utilizando FACS.

(b) Generación de una colección de anticuerpos completamente humanos en linfocitos preB transformados. Para generar células de empaquetamiento temporal, se cotransfectan colecciones de vectores de transferencia retroviral que codifican cadenas pesadas de anticuerpos humanos (IgH(650)-LIB-IRES-GFP) con una construcción de empaquetamiento (pVPack-GP) y una construcción de envoltura (pVPack-Eco) en células receptoras adecuadas. Dos días después de la transfección, se recoge la colección de partículas de vectores generados que han empaquetado la correspondiente colección de vectores de transferencia y se emplea para la transducción de linfocitos preB selectoros. Las células transducidas que expresan las cadenas pesadas transferidas y el gen indicador *gfp* se enriquecen y expanden utilizando FACS. Después de la expansión, las células se someten a una segunda transducción. Esta vez, la colección IgL(245)-LIB-IRES-YFP se transfiere después de la expansión y enriquecimiento de las células que expresan las cadenas humanas ligeras e YFP utilizando FACS. La población resultante constituye un anticuerpo completamente humano que expresa una colección de anticuerpos humanos definidos expresados por células 1624-5 que contienen una complejidad de clones máxima $159'250$.

Fig. 16: Esta figura muestra cómo se llevó a cabo una transducción en dos etapas con colecciones IgH-IRES-GFP e IgL-IRES-YFP en condiciones que garantizaran una transducción que resultara en la expresión clonal de cadenas polipeptídicas en una amplia mayoría de las células transducidas. Se suspendieron $1,5 \times 10^6$ linfocitos preB murinos 1624-5 transformados con A-MuLV en 1 ml de medio de histocultivo enriquecido con diferentes cantidades de sobrenadante de partículas del vector (diluciones 1:1; 1:5; 1:20; 1:50; 1:100; 1:200) que contenía vectores retrovirales recombinados codificantes de las colecciones de cadenas IgH e IgL, IgH-LIB-IRES-GFP o IgL-LIB-IRES-YFP, respectivamente, descritas en la Fig. 15. Para asegurarse de que la mayoría de las células transducidas recibirían copias únicas de vectores de transferencia integrados en el genoma de la célula receptora, las células con una eficiencia de transferencia génica menor a 10% (MOI $< 0,1$, según lo detectado mediante la expresión de los indicadores GFP o YFP acoplados) se enriquecieron utilizando FACS cuatro días después de la infección. Las células se expandieron durante seis días y se sometieron a una segunda transducción utilizando partículas de vector que tenían empaquetadas las regiones codificantes de cadena ligera de anticuerpos, a una dilución 1:5 como se describió anteriormente. Luego, las células GFP-positivas seleccionadas para la expresión de la cadena pesada se infectaron con partículas de vector que transducían a la colección IgL-LIB-IRES-YFP y *vice versa*. Cuatro días después de la infección, se enriquecieron las células transducidas que expresaron el GFP y el YFP utilizando FACS. Aproximadamente 20% de las células mostraron expresión del GFP y del YFP después de la segunda transducción. Para asegurarse de que solo tuviera lugar una integración vectorial por célula, se enriqueció aproximadamente un tercio de las poblaciones que revelaron una expresión baja o moderada del gen indicador transducido en la segunda ronda (aproximadamente 8%).

Fig. 17: Valoración de la tinción de IL-15 con una población de linfocitos preB que expresan un anticuerpo de referencia contra la IL-15 mediante FACS, para definir las condiciones óptimas que permitan definir las condiciones de tinción del antígeno IL-15 óptimas para los experimentos por Retrocyte Display. El procedimiento de tinción, como

se revela detalladamente en el Ejemplo 7, incluyó la titulación del antígeno IL-15 en el intervalo de 2,5µg/ml-0,1µg/ml, a dos concentraciones diferentes de un anticuerpo policlonal secundario contra la IL-15 biotinilado, como se indica, que se detectó con un conjugado estreptavidina-PE mediante FACS. Para las células Ig⁺ de superficie se usó un anticuerpo de cadena anti-IgκL-APC como tinción de contraste. Como se puede observar, la tinción de la IL-15 óptima se logra a una concentración de 0,1 o 0,5 µg/ml de antígeno IL-15 y usando 3µg/ml del anticuerpo policlonal secundario contra la IL-15.

Fig. 18: Análisis de la identificación con FACS de una línea celular preB que expresa el anticuerpo de referencia contra la IL-15 (PC = control positivo), que se agregó a una colección diversa de linfocitos preB que expresan el anticuerpo a diferentes diluciones, usando las condiciones de tinción de IL-15 optimizadas ilustradas y determinadas en la Fig. 17. El cuadro superior izquierdo muestra la doble tinción cadena IgκL-APC/IL-15 de los linfocitos preB de control transducidas con una combinación de las colecciones de cadenas IgH e IgL, cuya generación ya se mostró en la Fig. 16 (NC = control negativo). El cuadro superior derecho muestra la doble tinción de cadena IgκL-APC/IL-15 de linfocitos preB transducidos con vectores de expresión retroviral que codifican las cadenas IgH y IgL de un anticuerpo de referencia contra la IL-15 (PC = control positivo), como se revela en detalle en el Ejemplo 7. Los datos de la FACS de las células NC muestran que aproximadamente un 50% de la colección Ab de las células transducidas son Ig⁺ de superficie, como se detectó mediante la tinción con cadena anti-IgκL-APC. Sin embargo, ninguna de las células Ig⁺ de superficie muestran unión a la IL-15. Por el contrario, en las células PC, en donde más del 90% de las células expresaron la Ig de superficie, la unión IL-15-antígeno específica queda evidenciada por una señal específica en el eje de las abscisas. Como se esperaba, a mayor expresión de la Ig de superficie en las células PC, más pronunciado es el cambio para la señal específica para la IL-15, que resulta en un patrón de tinción diagonal de las células de unión Ig⁺ de superficie/IL-15, puesta de relieve por una ventana de análisis elíptica, como se indica. El cuadro inferior, que muestra las tinciones FACS dobles para la Ig de superficie y la IL-15 de unión en cinco diferentes diluciones de células PC agregadas a la colección de anticuerpos NC aleatoria que expresan la población celular, muestra que se puede detectar un anticuerpo de referencia específico para la anti-IL-15 que expresa las células PC a frecuencias cercanas al porcentaje de células PC agregadas a la colección de células NC.

Fig. 19: Estudio demostrativo preliminar para el enriquecimiento de una población de células reactivas a la IL-15 mediante tecnología Retrocyte Display de una colección de anticuerpos, como se revela en mayor detalle en el Ejemplo 7. El cuadro superior muestra las tinciones FACS para la expresión GFP/YFP (eje de las ordenadas), indicativa de la frecuencia de células transducidas con retrovector de Ig, e IL-15/anti-IL-15-bio (eje de las abscisas), indicativa de tinción IL-15 específica. El cuadro superior izquierdo muestra el análisis FACS a dos colores de linfocitos preB de control no transducidos (NC = control negativo), el cuadro del medio muestra el análisis FACS a dos colores de linfocitos preB transducidos con un anticuerpo de referencia contra la IL-15 como control positivo (PC). El cuadro superior derecho muestra el mismo análisis FACS de tinción a dos colores de una población de células transducidas con una única cadena IgH que codifica el vector retroviral que codifica la cadena IgH del anticuerpo de referencia contra la IL-15 en combinación con una colección de cadena IgκL diversa de $>7 \times 10^4$. Por lo tanto, esta colección mezclada de cadenas IgL contiene potencialmente $>7 \times 10^4$ anticuerpos, y como era de esperar, incluso con una selección de región de interés muy restringida para células reactivas a la IL-15 y que expresan el anticuerpo, como se indica en el cuadro superior derecho de los datos de la FACS, se pudieron detectar muy pocas células reactivas a la IL-15 (aquí, 2,42% debido a una selección de resultados cercanos a los de la población negativa, como se indicó). La población enriquecida se expandió en histocultivo y se repitió tres veces el mismo procedimiento de tinción y separación por FACS, como se muestra en los tres cuadros FACS inferiores para las tres tinciones FACS en idénticas condiciones. Como se puede observar, los ciclos consecutivos de enriquecimiento/expansión celular resultaron en una población de células que era casi 100% positiva para la expresión de anticuerpo y más positiva incluso para la reactividad a la IL-15 que la línea celular PC original. Estos datos muestran claramente que mediante clasificación y expansión repetida por FACS, una población celular muy reactiva al antígeno puede enriquecerse exitosamente hasta dar una población celular prácticamente 100% reactiva al antígeno a partir de poblaciones celulares con reactividad casi indetectable usando tres rondas consecutivas de Retrocyte Display.

Fig. 20: Esta figura ilustra y confirma la reactividad al antígeno IL-15 de 4 representantes de 24 clones celulares individuales establecida después de separar mediante la técnica de separación de una sola célula a partir de una población celular enriquecida 3 veces con antígeno IL-15 como se describe en la Fig. 19. Los cuatro clones celulares seleccionados se identificaron como clon F, H, V y W y todos exhibieron una reactividad a la IL-15 específica en células GFP/YFP positivas, indicativo de los vectores retrovirales codificantes de Ig establemente transducidos. Como se esperaba, las células de expresión GFP/YFP, que expresan mayores niveles de anticuerpos, mostraron una mayor especificidad por la IL-15, lo que originó las señales de tinción diagonales características en las tinciones dobles Ig/IL-15. Todos los clones celulares mostraron una reactividad a la IL-15 específica, como lo demuestra la omisión del antígeno IL-15 en las tinciones, lo que resultó en una pérdida de la reactividad IL-15 específica (no mostrada). Los datos demuestran la validez de la teoría de que la tecnología Retrocyte Display es un método eficiente para obtener clones celulares reactivos a un antígeno a frecuencias altas, a partir de poblaciones celulares que inicialmente mostraban tener niveles de células reactivas al antígeno casi indetectables.

Fig. 21: Esta figura proporciona un segundo estudio demostrativo preliminar de enriquecimientos exitosos mediante Retrocyte Display de células reactivas al antígeno que ilustra el enriquecimiento exitoso de células reactivas al

antígeno IL-1 β de una población celular esencialmente 40% reactiva al antígeno, usando tres rondas consecutivas de enriquecimiento celular/expansión en cultivo celular por *retrocyte display*, partiendo de una población celular mínimamente reactiva a la IL-1 β en la población celular inicial. Se proporciona la doble tinción para la expresión GFP/YFP (indicativo de expresión del anticuerpo) y la reactividad a la IL-1 β . En la parte superior se proporcionan las tinciones FACS para células selectoras preB no transducidas (como control negativo = NC, parte superior izquierda) y para células cotransducidas con vectores retrovirales que codifican un anticuerpo de referencia SK48-E26 específico contra la IL-1 β humana (como control positivo = PC, parte superior derecha), como se indica. Los cuadros inferiores muestran las tinciones FACS para la expresión de anticuerpo y reactividad a la IL-1 β de una colección de anticuerpos generada barajando una colección de cadenas IgL diversa de $>1,2 \times 10^5$ clones de cadena IgL individuales contra la cadena IgH del anticuerpo de referencia SK48-E26, antes (enriquecimiento 0x) y después de 1, 2 y 3 rondas de enriquecimiento por Retrocyte Display, como se indica y revela en detalle en el Ejemplo 8. Estos datos proporcionan una prueba independiente de la teoría de que la expresión y enriquecimiento por Retrocyte Display usando un segundo antígeno es un medio poderoso para enriquecer una población de células específicas para un antígeno a partir de niveles inicialmente casi indetectables.

Fig. 22: Esta figura confirma la reactividad al antígeno IL-1 β de un anticuerpo nuevo identificado mediante Retrocyte Display, como se revela en detalle en el Ejemplo 8. A partir de la población celular enriquecida tres veces, mostrada en la Fig. 21, se establecieron 24 clones celulares individuales mediante separación de una sola célula. De estos 24 clones, 12 contenían una cadena IgL nueva, que se llamó LCB24, como se revela en el Ejemplo 8. La especificidad para la IL-1 β de la nueva cadena IgkL LCB24 coexpresada con la cadena IgH del anticuerpo de referencia específico SK48-E26 contra la IL-1 β (ver Ejemplo 8) se analizó mediante FACS después de la retransducción de los vectores de expresión retroviral de cadena IgH e IgL clonados y de secuencia caracterizada en la línea celular selectora original. Las tinciones FACS muestran el análisis de la expresión del anticuerpo (vía GFP/YFP) y la reactividad a la IL-1 β mediante FACS de dos colores, como se indicó. Como se esperaba, no se detectó ninguna reactividad a la IL-1 β en las células selectoras no transducidas (NC = control negativo, izquierda) mientras que sí se detectó una clara tinción específica de la IL-1 β en las células de control positivo que expresan el anticuerpo SK48-E26 de referencia de las cadenas IgH e IgL (medio). Se detecta una señal similar específica de la IL-1 β en las células selectoras que expresan el anticuerpo transducidas con el vector de la cadena IgH del anticuerpo de referencia SK48-E26 y la nueva cadena IgkL LCB24 completamente humana, clonada a partir de los clones de células específicas para la IL-1 β obtenidos por Retrocyte Display (derecha).

Fig. 23: Confirmación de falta de reactividad cruzada a la IL-15 del anticuerpo novedoso codificado por la cadena IgkL LCB24/cadena IgH SK48-E25. Las dos tinciones FACS de la izquierda muestran los controles negativos y positivos para el ensayo de tinción FACS de la IL-15, como se indicó (NC = control negativo, células selectoras no transducidas, PC = control positivo, células selectoras transducidas con vectores de cadena IgH e IgL que codifican un anticuerpo de referencia contra la IL-15). Las dos tinciones FACS de la derecha no muestran reactividad para la IL-15 en las células que expresan el anticuerpo, sean células que codifican el anticuerpo nuevo compuesto por las cadenas IgL LCB24 e IgH SK48-E26, o células que expresan la combinación IgH/IgL SK48-E26 original. Esto demuestra que el nuevo anticuerpo compuesto por las cadenas IgH SK48-E26 e IgL LCB24 no solo es específico para la IL-1 β sino que generalmente, no sufre reacción cruzada (o adhesiva) con otras proteínas, como la IL-15.

Fig. 24: Esta figura ilustra el enriquecimiento exitoso de células reactivas al antígeno estreptavidina-APC-Cy7 mediante tres rondas consecutivas de enriquecimiento celular/expansión en cultivo celular Retrocyte Display, a partir de una colección de anticuerpos generada mediante una mezcla de una colección de cadena IgH diversa y una IgL diversa, como se revela en el Ejemplo 9. Las células reactivas al estreptavidina-APC-Cy7 se enriquecieron mediante tres rondas consecutivas de separación celular a alta velocidad seguida de expansión en cultivo celular, de la manera indicada. La especificidad de unión de las células que expresan el anticuerpo para el antígeno estreptavidina-APC-Cy7 se demuestra mediante el análisis de los resultados de la FACS de las poblaciones celulares enriquecidas secuencialmente en presencia (cuadros inferiores) o ausencia (cuadros superiores) de un antígeno. Esto constituye un estudio demostrativo preliminar para el enriquecimiento eficiente de células específicas para un antígeno mediante la técnica Retrocyte Display en ausencia de cualquier anticuerpo de referencia que pudiera usarse para enfoques de barajado de cadenas.

Fig. 25: Los datos presentados en esta figura proporcionan una prueba de la especificidad de la población celular enriquecida por 3 rondas de Retrocyte Display revelada en la Fig. 24 para reactividad específica al fluorocromo Cy7 de la tinte en tándem estreptavidina-APC-Cy7. Se analizaron mediante FACS células selectoras no transducidas, células enriquecidas que expresaban una combinación de la colección de cadena IgH/IgL y una población de células enriquecidas por tres rondas con estreptavidina-APC-Cy7, para determinar la expresión del anticuerpo (indicada mediante fluorescencia GFP/YFP) y la reactividad a diferentes conjugados estreptavidina-fluorocromo, como se indica. La población celular enriquecida tres veces con estreptavidina-APC-Cy7 solo se unió a la estreptavidina-APC-Cy7 y no a la estreptavidina-APC ni a la estreptavidina-APC-Cy5.5 ni tampoco se detectó coloración no específica de estreptavidina-APC-Cy7 en células selectoras o células selectoras que expresaban una colección de anticuerpos diversa. Esto prueba la utilidad de la eficiente y muy específica técnica de enriquecimiento Retrocyte Display de anticuerpos específicos a partir de células que expresan una colección de anticuerpos diversa sin necesidad de cadenas de IgH o IgL de los anticuerpos de referencia específicos para el antígeno.

Fig. 26: Dos nuevos anticuerpos humanos identificados por Retrocyte Display que comparten la misma cadena IgH muestran una unión específica al antígeno estreptavidina-APC-Cy7. Como se revela en el Ejemplo 9, se pudieron identificar dos secuencias de cadena IgH diferentes (HC49 y HC58) y dos secuencias de cadena IgL diferentes (LC4 y LC10) a partir de clones celulares de una sola célula, seleccionados después de tres rondas de enriquecimiento por Retrocyte Display. En esta figura, se examinaron todos las posibles pares de cadenas IgL LC4 y LC10 con HC49 y HC58 para analizar la reactividad al antígeno objetivo estreptavidina-APC-Cy7. Para esto, diferentes combinaciones de vectores de expresión retroviral que codifican las diferentes cadenas IgH e IgL se transdujeron en células selectoras como se indica y revela en el Ejemplo 9. Como se ilustró, los nuevos anticuerpos HC58/LC4 y HC58/LC10, que comparten la misma cadena IgH ambos, se unieron específicamente al antígeno estreptavidina-APC-Cy7, mientras que los anticuerpos codificados por HC49/LC4 y HC49/LC10 no mostraron una actividad de unión significativa. La unión específica de los dos nuevos anticuerpos al antígeno estreptavidina-APC-Cy7 después de la retransducción en células selectoras proporciona una prueba concluyente de que es posible usar la tecnología Retrocyte Display como se revela en la presente, para identificar ligandos de anticuerpos poco comunes en colecciones de anticuerpos complejas.

Terminología

Es conveniente señalar que cuando en la presente se usa "y/o" se deberá interpretar que cada una de las dos características o componentes específicos, con o sin la otra, constituyen una revelación específica. Por ejemplo, "A y/o B" deberá interpretarse como una revelación específica de cada una de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, como si cada una fuera consignada individualmente en la presente.

Maduración por afinidad: Un proceso inmunitario muy regulado que utiliza a los antígenos para mejorar la especificidad de unión de los anticuerpos producidos por linfocitos B estimulados mediante exposición a los antígenos, que en su mayoría, tiene lugar en los centros germinales. El proceso lo causa la hipermutación somática dirigida a las regiones codificantes de los dominios variables de los anticuerpos aunada a la expansión selectiva y supervivencia de los linfocitos B que generan una mayor afinidad por los anticuerpos.

Anticuerpo: Este término describe a una inmunoglobulina, sea natural o parcial o totalmente sintética. El término también abarca a cualquier polipéptido o proteína que contiene un sitio de unión antígeno-anticuerpo, como anticuerpos solo de cadena pesada de, por ejemplo, camellos o llamas. Un anticuerpo de longitud completa comprende dos cadenas pesadas (H) idénticas y dos cadenas ligeras (L) idénticas. En su forma monomérica, dos cadenas IgH y dos cadenas IgL se conectan por enlaces disulfuro y forman una molécula simétrica en forma de Y que posee dos dominios de unión formados por la combinación de las regiones variables de las cadenas IgH e IgL.

Los anticuerpos se pueden aislar u obtener mediante purificación a partir de fuentes naturales, o se pueden obtener mediante ingeniería genética, recombinación genética o síntesis química, y pueden contener aminoácidos no codificados por los genes de línea germinal de la inmunoglobulina. Un anticuerpo totalmente humano comprende cadenas pesadas y ligeras humanas, es decir, dominios variables y constantes de la especie humana. Un anticuerpo híbrido comprende dominios de región variable de una especie vertebrada combinados con dominios de región constante de otra especie vertebrada. Los dominios constantes de un anticuerpo híbrido se derivan habitualmente de uno o varios anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanizados se pueden producir mediante el injerto de CDR de anticuerpos no humanos en las regiones de armazón de los dominios variables de la IgH e IgL de origen humano.

Fragmento de anticuerpo: Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo entero pueden cumplir la función de unir antígenos. Los ejemplos de fragmentos de unión incluyen (i) el fragmento Fab integrado por los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd integrado por los dominios VH y CH1 ; (iii) el fragmento Fv integrado por los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb compuesto por el dominio VH o VL; (v) las regiones CDR aisladas; (vi) los fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos; (vii) moléculas Fv de cadena única (scFv), donde un dominio V_H y un dominio V_L están unidos por un fragmento de unión peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión de antígeno; (viii) dímeros Fv biespecíficos de cadena única; y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos contruidos por fusión génica. Las moléculas diacuerpo, Fv o scFv pueden estabilizarse mediante la incorporación de puentes de disulfuro que unen los dominios V_H y V_L. También pueden fabricarse minicuerpos que comprendan un scFv unido a un dominio CH3. Otros ejemplos de fragmentos de unión son el Fab', que difiere de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxílico del dominio CH1 de la cadena pesada, incluida una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo, y el Fab'-SH, que es un fragmento Fab' en donde el (los) residuo(s) cisteína del dominio constante posee(n) un grupo tiol libre. En algunos casos, también se puede considerar que una cadena pesada o ligera es un fragmento de anticuerpo. El experto en la materia comprenderá fácilmente que todos los fragmentos de anticuerpo mencionados anteriormente poseen por lo menos una función del anticuerpo natural entero a partir del cual se derivan tales fragmentos y que por lo tanto, se les denomina fragmentos "funcionales".

Antígeno: Cualquier biomolécula o entidad química que puede unirse mediante los dominios variables de las inmunoglobulinas (o anticuerpos).

- Proteína de unión: Este término define a una proteína de un par de moléculas que se unen una con la otra. El compañero de unión de una proteína de unión se denomina generalmente ligando. Las proteínas de un par unido pueden ser naturales o parcial o totalmente sintéticas. Una proteína del par de moléculas tiene un área en su superficie, o una cavidad, que se une a una organización polar y espacial concreta de la otra proteína integrante del par de moléculas, y que por lo tanto, es su complementaria. Algunos ejemplos de tipos de parejas de unión son los pares de unión antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, hormona-receptor de hormona, receptor-ligando, enzima-sustrato. La presente invención se relaciona preferentemente con las reacciones de tipo antígeno-anticuerpo.
- Región determinante de la complementariedad (CDR): Este término se refiere a las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras de una inmunoglobulina. Las CDR son las regiones en la estructura tridimensional de una inmunoglobulina que establecen contacto directo con el antígeno. Habitualmente, un anticuerpo contiene 3 CDR en la cadena pesada y 3 CDR en la cadena ligera. En general, las CDR son las partes más diversas de los receptores de antígenos.
- Dominio: Un residuo estructural de una biomolécula que se caracteriza por una estructura tridimensional específica (por ej., dominios de región constante o variable de inmunoglobulinas que se relacionan estructuralmente, como los dominios de tipo Ig que se pueden encontrar en muchas moléculas del sistema inmunológico, que pertenecen a la denominada superfamilia de Ig).
- Centro germinal: Estructura histológica definida en los órganos del sistema linfático periférico (por ej., ganglios linfáticos o bazo) donde ocurren interacciones relacionadas entre células que presentan antígenos y diferentes poblaciones de linfocitos, que dan como resultado la expansión proliferativa de linfocitos reactivos a los antígenos, la maduración de la afinidad y la recombinación de cambio de clase de anticuerpos producidos por linfocitos B reactivos a los antígenos.
- Configuración de la línea germinal: Es la configuración no reordenada de genes y locus de genes, tal como se heredan de los progenitores, y como se heredarán a las futuras generaciones por medio de la línea germinal. Las instancias de recombinación de ADN que tienen lugar en las células somáticas, como por ejemplo, recombinación V(D)J en linfocitos, dan lugar a la reordenación o pérdida de información genética en determinados locus génicos y por lo tanto, a un cambio en los genes provenientes de la configuración de la línea germinal.
- Linfocito preB: Un linfocito B precursor se caracteriza por la expresión de determinados genes específicos de las células B precursoras, como por ejemplo, los genes $\lambda 5$ y V_{preB1} y V_{preB2} , y la expresión de los factores precursores específicos del sistema linfático involucrados en la recombinación V(D)J (por ejemplo, RAG-1, RAG-2). Además, los linfocitos B precursores se caracterizan por la presencia de DJ_H en ambos alelos de cadena pesada o por lo menos, una reordenación V_HDJ_H en por lo menos un alelo de la cadena pesada de la inmunoglobulina, mientras que los locus de los genes de la cadena liviana continúan en la configuración de la línea germinal, sin reordenar, de forma tal que los linfocitos preB no pueden expresar anticuerpos completos.
- Órganos linfáticos primarios: Órganos en donde se desarrollan linfocitos a partir de los hemocitoblastos, en ratones y humanos, por ejemplo, la médula ósea, el timo y, durante la vida fetal, el hígado.
- Configuración "cuasi línea germinal": La disposición artificial de los segmentos génicos V, opcionalmente D, y J con secuencias señal de recombinación flanqueantes clonadas a partir de locus de genes de inmunoglobulina germinativa en construcciones genéticas artificiales de forma tal que esa disposición de los segmentos génicos V, opcionalmente D, y J en esas construcciones genéticas artificiales sigue permitiendo la recombinación en un sitio específico de los segmentos génicos para formar una región codificante variable mediante el proceso de recombinación V(D)J.
- Mutación somática: Un proceso en las células somáticas que da como resultado la introducción de mutaciones puntuales en regiones específicas del genoma. Cuando esto ocurre con una frecuencia alta ($>10^{-4}$ mutaciones por par de bases por división celular) se le denomina hipermutación somática.
- Recombinación V(D)J: Es el proceso para generar diversidad de receptores de linfocitos T y anticuerpos y es el método por el cual se crean los genes de los anticuerpos funcionales. Comprende la reordenación de muchos segmentos génicos que codifican las proteínas de cadena pesada y ligera de las inmunoglobulinas y ocurre en los linfocitos.
- Transfectar/Transfección: En el contexto de las células eucariotas, es el proceso de introducir secuencias de ácido nucleico en las células eucariotas, usualmente asociado con el uso de métodos químicos y/o físicos.
- Transformar/Transformación: En el contexto de células eucariotas, es el proceso de immortalizar una célula para establecer una línea celular que prolifera continuamente.
- Transducir: Es el proceso de introducir ADN en células de vertebrados a través de la producción de virus recombinantes. Para ello, se transfecta una línea celular empaquetadora que expresa proteínas estructurales para

partículas virales con ADN viral recombinado que comprende los elementos que regulan el empaquetado del ADN viral en las proteínas estructurales virales. De esta manera, se producen virus recombinados que se pueden usar para infectar las células objetivo (mamíferas) e introducir la información genética clonada en el genoma viral recombinado.

Vector/Construcción: Una secuencia de ácido nucleico generada artificialmente que se puede usar para transportar elementos de ácido nucleico entre diferentes organismos y especies y que puede usarse también para propagar, amplificar y mantener la información genómica.

Descripción detallada

Los anticuerpos o las inmunoglobulinas, constituyen la clase de proteínas de unión más extendida que ha demostrado ser particularmente útil en aplicaciones terapéuticas y diagnósticas. Los anticuerpos terapéuticos se han convertido en la clase de fármacos biológicos más exitosa desde el punto de vista comercial, existiendo un permanente interés en métodos nuevos y eficaces para desarrollar una terapéutica basada en anticuerpos (Baker, 2005).

Los anticuerpos constan de dos glicoproteínas idénticas de cadena pesada (H) y cadena ligera (L) que se encuentran unidas covalentemente a través de enlaces disulfuro (Fig. 2a). Cada polipéptido de inmunoglobulina de cadena pesada (IgH) y de cadena ligera (IgL) comprende un dominio variable aminoterminal que varía en los diferentes anticuerpos y una región constante carboxiterminal que es idéntica para los diferentes anticuerpos que pertenecen al mismo subtipo de inmunoglobulina (isotipo) (Fig. 2a). La combinación de los dominios variables de cadena IgH e IgL crea el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo y determina su especificidad, en tanto las regiones constantes determinan la función inmunitaria efectora de un anticuerpo. La variabilidad de las inmunoglobulinas en sus dominios variables resulta del hecho de que los dominios V_H y V_L son codificados por una multiplicidad de segmentos génicos que se denominan segmentos génicos V (variable), D (diversidad), y J (de acoplamiento). Durante la diferenciación de los linfocitos B, un segmento génico V, uno D (sólo presente en el locus de la cadena IgH) y uno J, se seleccionan al azar en cada célula y se reordenan en un sitio específico a fin de generar la región que codifica a los dominios V_H o V_L . Este proceso de recombinación genética en un sitio específico sólo tiene lugar en los linfocitos precursores y se conoce como recombinación V(D)J (Grawunder *et al.*, 1998) (también ver Fig. 2b y 2c). La reordenación de los segmentos génicos está mediada por los productos de los genes activados por reactivación (RAG) 1 y 2. Debido a la multiplicidad de segmentos génicos V, D, y J y a la imprecisión en el acoplamiento de los segmentos génicos, puede generarse un enorme repertorio de especificidades de región V diferentes mediante los millones de linfocitos B producidos cada día por el sistema inmunitario (Grawunder *et al.*, 1998). Debido a que el locus del gen de cadena pesada de la inmunoglobulina contiene los segmentos génicos V, D y J, la región codificante para un dominio V_H de un anticuerpo requiere dos eventos de reordenación secuencial V(D)J, en tanto que el locus del gen de inmunoglobulina carece de segmentos génicos D y la región codificante V_L es generada por un evento de reordenación V a J (Fig. 2c). Por lo tanto, la diversidad de unión que se genera por la recombinación V(D)J en la región CDR3 de las cadenas IgH es mayor que la diversidad de unión generada por un solo evento de reordenación para las cadenas IgL. Además, en las primeras etapas de diferenciación de los linfocitos B, durante las cuales tiene lugar la reordenación del gen de la cadena IgH, se expresa la enzima desoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT), la cual es capaz de adicionar nucleótidos no codificados en las uniones D a J y V a D (la denominada diversidad de secuencia amino), diversificando más el repertorio CDR3 de la cadena IgH. Por el contrario, el repertorio CDR3 de la cadena IgL, que se forma tras la unión del segmento V al J durante la diferenciación de linfocitos B cuando la expresión TdT es significativamente reducida (Li *et al.*, 1993), es algo menos complejo. Aparte de la generación de la diversidad CDR3 en las regiones codificantes V_H y V_L , ambos repertorios de las cadenas IgH e IgL pueden diversificarse aún más mediante el proceso de hipermutación somática disparado en los linfocitos B maduros en el transcurso de una reacción inmunitaria que depende de los linfocitos T (Papavasiliou & Schatz, 2002). Las mutaciones somáticas son dirigidas específicamente a las regiones codificantes V_H y V_L y mediadas por la enzima desaminasa de citidina inducida por activación (abreviada AID, ver: Papavasiliou & Schatz, 2002), específica para el linaje B. Como consecuencia de la hipermutación somática que tiene lugar durante la inmunización, las células que expresan mutantes de anticuerpos de mayor afinidad contra el inmunógeno son seleccionadas positivamente en el transcurso de una inmunización que en su mayor parte tiene lugar en centros germinales, dando como resultado un enriquecimiento de células que producen anticuerpos de mayor afinidad. Estos anticuerpos ahora también acumulan mutaciones en las CDR 1 y 2, proceso que se conoce como maduración de la afinidad del repertorio de anticuerpos. La diversificación mediada por AID y el direccionamiento específico a las regiones codificantes V_H y V_L aumenta significativamente en presencia de elementos genéticos *cis*-reguladores o motivos, en particular, elementos potenciadores del locus de los genes de las cadenas IgH e IgL, ubicados en la proximidad de las regiones codificantes reordenadas V_H y V_L (Bachl & Olsson, 1999).

Además de los anticuerpos clásicos de longitud completa que se utilizan con fines terapéuticos, se están investigando cada vez más en cuanto a sus aplicaciones terapéuticas y diagnósticas, otros formatos de proteínas de unión que comprenden fragmentos de anticuerpos completamente humanos, por ejemplo, los llamados fragmentos F_{ab} (Fig. 2a), fragmentos F_v de cadena única (Fig. 2a), nanocuerpos, que consisten solamente de dominios V_H únicos, etc. Sin embargo, es evidente para un experto en la técnica que dichos fragmentos de anticuerpos

funcionales pueden obtenerse fácilmente a partir de anticuerpos de longitud completa, ya sea por métodos bioquímicos convencionales sobre bases de proteínas, o por métodos convencionales de biología molecular si se dispone de la información codificante del anticuerpo de longitud completa deseado.

Tradicionalmente, los anticuerpos monoclonales dirigidos contra una molécula o epítipo de interés (antígeno) son generados por inmunización de pequeños animales de laboratorio o de granja, por ejemplo, ratones, ratas, conejos, cabras o burros, respectivamente. Después de repetidas inmunizaciones, los animales se desangran para aislar los anticuerpos policlonales presentes en su suero sanguíneo, o en el caso de la generación de anticuerpos monoclonales, los animales son sacrificados para aislar los linfocitos de los órganos linfáticos secundarios, como los ganglios linfáticos o el bazo. Los linfocitos aislados se fusionan a los mielocitos inmortales para generar hibridomas que son luego subclonados y analizados en cuanto a la secreción de anticuerpos monoclonales que exhiben las propiedades funcionales deseadas, como por ejemplo, la unión a un antígeno u objetivo específico.

Desde el primer gran avance en el campo de la ingeniería de anticuerpos, a saber, el desarrollo de la tecnología de hibridomas para la generación de los llamados anticuerpos monoclonales realizado por Köhler y Milstein (Köhler & Milstein, 1975), transcurrió mucho tiempo antes de que los anticuerpos monoclonales pudieran utilizarse en el tratamiento de enfermedades humanas.

Las principales razones para este lento ingreso de los anticuerpos en la clínica fueron los obstáculos iniciales asociados con el uso de anticuerpos de roedores para tratar a pacientes humanos. Si dichos anticuerpos se infunden en el sistema inmunitario de un paciente, el sistema inmunitario reconoce los anticuerpos de roedores como una proteína extraña y desencadena una respuesta inmunitaria contra estos anticuerpos, entre ellas, la generación de anticuerpos neutralizantes (conocidos como HAMA=respuesta humana contra el anticuerpo de ratón). Una respuesta HAMA puede conducir a una disminución significativa de la vida media, de ahí que la eficacia del anticuerpo aplicado puede incluso producir efectos secundarios graves si el sistema inmunitario reacciona en forma exagerada a la proteína no humana inyectada.

Por lo tanto, existía un gran interés médico y comercial por desarrollar anticuerpos terapéuticos que fueran “más” similares a los anticuerpos humanos. Inicialmente, esto se logró por medio de la manipulación genética de los anticuerpos de roedores existentes dando como resultado el desarrollo de anticuerpos híbridos o humanizados (Clark, 2000). Los anticuerpos híbridos se generan por la fusión de los dominios de unión variables de un anticuerpo de roedor a las regiones constantes de un anticuerpo humano, por medio de técnicas de clonación e ingeniería genética. Los anticuerpos humanizados, por el contrario, se generan sólo transfiriendo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un dominio variable de un anticuerpo de roedor al marco de región variable de un anticuerpo humano, que también puede llevarse a cabo por medio de técnicas de biología molecular convencionales. En tanto el procedimiento para generar anticuerpos híbridos es directo, estos anticuerpos aún contienen 33% de secuencias xenogénicas y albergan un gran potencial para la inmunogenicidad (Clark, 2000). De hecho, existe gran cantidad de bibliografía sobre las respuestas inmunitarias a las partes de ratón de un anticuerpo híbrido y se las denomina respuestas HACA (HACA=humana contra anticuerpo híbrido).

En contraste con lo mencionado anteriormente, ha disminuido más el potencial inmunogénico de los anticuerpos humanizados. Sin embargo, el procedimiento para obtener anticuerpos humanizados mediante ingeniería genética manteniendo al mismo tiempo las afinidades y especificidades de unión originales de los anticuerpos de roedor luego del injerto de CDR no es simple y a menudo requiere de una intensa optimización complementaria mediante ciclos repetidos de mutagénesis y detección. Por las razones antes mencionadas, en los últimos años los enfoques de hibridación y humanización han dejado de ser los métodos de elección para el desarrollo de los anticuerpos terapéuticos.

El alejamiento de los enfoques de anticuerpos híbridos y humanizados para el desarrollo de anticuerpos terapéuticos, ha sido causado también por el avance de plataformas de tecnologías innovadoras que permiten la creación de anticuerpos “completamente humanos”, que en secuencias de aminoácidos son idénticos a los anticuerpos presentes en el suero humano. Teóricamente, se cree que los anticuerpos completamente humanos son los que causan menores efectos secundarios y de inmunogenicidad en pacientes humanos.

Las dos plataformas de desarrollo de “anticuerpos completamente humanos” más consolidadas son:

A) Tecnología de ratón transgénico e inmunoglobulina humana, en la cual grandes transgenes de los locus de los genes de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulinas humanas de la línea germinal han sido introducidos en el genoma de ratón (Green & Jakobovits, 1998; Jakobovits *et al.*, documento WO98/24893 A2). A fin de utilizar estos ratones transgénicos para el desarrollo de anticuerpos humanos, estas cepas de ratones transgénicos se han cruzado con cepas de genes de ratones con genes inactivados que albergan deleciones funcionales en sus locus de genes de cadena pesada y liviana κ de inmunoglobulina endógenos. Por ende, estos ratones transgénicos con inmunoglobulina humana desencadenan una gran respuesta inmunitaria humoral tras la inmunización excepto en que aproximadamente la mitad de las células que producen el anticuerpo todavía albergan cadenas endógenas ligeras λ de ratón que por lo tanto son inútiles para el desarrollo ulterior de anticuerpos terapéuticos y deben desecharse.

B) Tecnología de expresión en fago, que se basa en la expresión (exhibición) de colecciones muy diversas de fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de cadena única F_v o F_{ab}) sobre la superficie de bacteriófagos de *E. coli* (Clackson *et al.*, 1991; McCafferty *et al.*, documento WO 92/01047 A1). Para la identificación de ligandos específicos, se unen colecciones de fagos de complejidad, calidad y origen adecuados a antígenos inmovilizados (“panning”, selección), para enriquecer la unión de clones de fagos al antígeno inmovilizado. Después de varias rondas de selección, se determinan las secuencias de los clones de unión seleccionados. Una variación del método es la tecnología de expresión de ribosomas completamente *in vitro*, en la cual fragmentos de anticuerpos no se expresan en el fago sino que se expresan mediante la transcripción y traducción *in vitro*, en condiciones en las que los fragmentos de unión traducidos todavía se “adhieren” a los ribosomas (Hanes & Plückthun, 1997). Tanto para la expresión en fago o en ribosomas un paso crítico es la reingeniería de los fragmentos de unión en los anticuerpos de longitud completa que luego se expresan en las células de vertebrados. Después de la reingeniería de los clones seleccionados por fago en un formato de anticuerpos de longitud completa y expresión de células de vertebrados, debe analizarse si los anticuerpos se pueden expresar adecuadamente y si las características de unión del fago se mantienen, lo cual puede no ser así necesariamente.

A pesar de que las tecnologías de ratones transgénicos con inmunoglobulina humana y de tecnologías de expresión en fago han producido un importante impacto en el desarrollo de anticuerpos terapéuticos, ambas plataformas tecnológicas tienen ventajas y desventajas asociadas a las mismas.

Una ventaja de la tecnología de ratones transgénicos es que puede producir anticuerpos de alta afinidad debido a la maduración de la afinidad natural que tiene lugar en estos ratones tras la inmunización *in vivo* y se ha demostrado que el perfil de inmunización de anticuerpos humanos con respecto a un antígeno dado derivado de los ratones transgénicos humanos puede ser comparable con el de los ratones naturales. Sin embargo, varias de las desventajas asociadas a los animales transgénicos con inmunoglobulina humana son:

1) Si los animales transgénicos son tolerantes al antígeno, en la mayoría de los casos debido a la gran similitud estructural con las proteínas anfitrionas expresadas en forma endógena, la generación de anticuerpos de alta afinidad contra dichos antígenos “conservados” puede resultar muy difícil o incluso imposible. 2) Al igual que en los animales naturales normales, los anticuerpos a partir de los animales transgénicos con inmunoglobulina humana se generan preferentemente contra epítopos antigénicos potentes, por lo que desarrollar un anticuerpo contra epítopos funcionales pero débiles, de valor terapéutico puede ser una tarea difícil. 3) Por último, los animales transgénicos con inmunoglobulina humana no se pueden utilizar para la optimización de la afinidad de los anticuerpos actuales. La razón para esto es que los períodos de tiempo necesarios para la generación de animales transgénicos, sólo para la optimización de un clon de anticuerpo dado, son demasiado largos. Dicho enfoque implicaría la generación de dos cepas de ratones transgénicos de cadena IgH e IgL para un anticuerpo específico y luego requeriría además el retrocruzamiento genético de estas dos cepas transgénicas con al menos dos cepas de animales con genes inactivados deficientes para la expresión de ambas cadenas, pesada y ligera κ , de inmunoglobulina endógena, proceso que requeriría varias generaciones de reproducción y mayores plazos.

Limitaciones similares a las anteriores se aplican a una plataforma de tecnologías descrita recientemente, basada en el desarrollo de ratones, en donde los segmentos génicos variables (V), de diversidad (D) y de acoplamiento (J) de la línea germinal de los locus de los genes de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina de ratón han sido reemplazados por (partes de) las regiones génicas V, D y J de la línea germinal mediante direccionamiento de genes a un sitio específico (Murphy & Yancopoulos, WO 02/066630 A1). En estos ratones “con gen de inmunoglobulina inactivado”, los segmentos génicos V, D y J de murinos, han sido reemplazados en sitios específicos por los de los locus de los genes de las cadenas ligera y pesada de los genes de inmunoglobulina humana por medio de la recombinación homóloga en la línea germinal de ratones. Al contrario de los ratones transgénicos con inmunoglobulina humana que producen anticuerpos completamente humanos, esta cepa de ratones produce por lo tanto anticuerpos “híbridos inversos”, que transportan las regiones de unión al antígeno humano en un esqueleto de región constante de ratón.

Los enfoques de expresión en fago y/o ribosomas tienen la ventaja reconocida de ser plataformas de tecnologías muy rápidas porque en pocas semanas se puede lograr la identificación de los primeros ligandos a partir de colecciones complejas de proteínas de unión. Sin embargo, la expresión en fago también se asocia con ventajas importantes. 1) Debido a la ausencia de cualquier maduración de afinidad en el sistema, no es sencillo identificar los ligandos de alta afinidad a partir de una detección de expresión en fago o ribosoma. Para solucionar este problema, se han desarrollado colecciones de fagos extremadamente complejas que representan más de 10^{12} clones. Pero aun utilizando dichas colecciones complejas, los clones de unión iniciales a menudo tienen una afinidad al antígeno por debajo de la óptima y dichos ligandos habitualmente deben optimizarse utilizando procedimientos complementarios tediosos y largos. 2) En la expresión en fago, sólo se expresan los fragmentos de anticuerpos tales como los fragmentos scF_v o F_{ab} porque el genoma del fago sólo puede alojar regiones codificantes para moléculas relativamente pequeñas. 3) Las proteínas de unión deben fusionarse a proteínas portadoras tales como la proteína del fago gIII. Las proteínas de fusión resultantes a menudo revelan menor reactividad al antígeno en comparación con sus anticuerpos o proteínas activas de unión progenitores (Hoogenboom & Chames, 2000). 4) La expresión en fago no permite fácilmente el ensamblaje controlado de las proteínas que logran un fenotipo de unión a través de la formación de homo y heteromultímeros porque por ejemplo las proteínas diméricas son obligadas a ensamblarse

mediante moléculas conectoras covalentes. Sin embargo, en el caso de la ingeniería de anticuerpos es esencial el ensamblaje regulado apropiadamente de las cadenas pesada y liviana de inmunoglobulina ya que no todas las cadenas pesadas de anticuerpos son capaces de emparejarse con cualquier cadena liviana. 5) Los sistemas bacterianos o basados en bacteriófagos no brindan las modificaciones postraducción apropiadas (glicosilación, miristoilación y similares) de la proteína de interés expresada que a menudo influye negativamente en las características de unión de las proteínas expresadas. 6) La expresión procariótica da como resultado un plegamiento de proteínas diferente en comparación con las células de vertebrados, ya que el ambiente citoplasmático difiere drásticamente de las células anfitrionas eucariotas o de vertebrados, por ejemplo, en el potencial redox y la carencia de chaperones. 7) Los sistemas de expresión en fago son sometidos posteriormente a ensayos de unión o captura del antígeno para enriquecer las células reactivas bajo condiciones de selección ("panning") no fisiológicas que pueden conducir a la identificación de un gran porcentaje de ligandos positivos falsos que finalmente deben ser desechados.

Como resultado de los obstáculos mencionados anteriormente, muchos fragmentos de anticuerpos de expresión en fago seleccionados exhiben una afinidad mediocre y/o pueden transportar artefactos estructurales. Además, una vez que los ligandos de expresión en fago seleccionados se rediseñan genéticamente y se expresan como anticuerpos en células de vertebrados puede suceder que los anticuerpos de fago seleccionados no expresen las características de unión o lo hagan deficientemente o que exhiban características de unión alteradas.

Para resolver algunas de las limitaciones de la tecnología de ratones transgénicos/inactivados para inmunoglobulina humana y de la expresión en fago, se ha desarrollado recientemente una tecnología alternativa que implica la modificación genética de linfocitos preB primarios de muridos *in vitro*, dando como resultado células que expresan anticuerpos humanos seguido de su injerto en ratones receptores inmunodeficientes que carecen de un compartimiento de linfocitos B funcionales (Grawunder & Melchers, documento WO 03/068819 A1). Esto conduce a la reconstitución parcial de los subconjuntos de linfocitos B que expresan anticuerpos humanos en los ratones injertados que posteriormente pueden ser inmunizados con cualquier antígeno o ligando deseado. Esta tecnología puede utilizarse bien para desarrollar nuevos anticuerpos o proteínas de unión o para optimizar los anticuerpos actuales con relación a su afinidad contra un objetivo definido (Grawunder & Melchers, documento WO 03/068819 A1).

En este método se prefiere el uso de sistemas de expresión retroviral porque la transferencia genética de las copias únicas de las construcciones de expresión pueden transferirse a linfocitos preB individuales (Kitamura *et al.*, 1995; Stitz J *et al.*, 2005), y también porque existe completa libertad de elección en cuanto a qué construcciones de expresión de anticuerpos usar para el injerto en ratones (por ejemplo, colecciones de anticuerpos preseleccionados al antígeno, colecciones de anticuerpos de pacientes afectados o de clones de anticuerpos individuales). Por lo tanto, una ventaja específica de esta tecnología es la flexibilidad de aplicación al desarrollo de anticuerpos *de novo*, así como también a la optimización de los anticuerpos experimentales terapéuticos actuales.

Se han descrito otros sistemas basados en roedores para el desarrollo de anticuerpos completamente humanos, los cuales involucran el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas humanas aisladas de donantes humanos en ratones inmunodeficientes (Mosier & Wilson, documento WO 89/12823 A1). En dichos ratones injertados con células humanas, pueden crecer linfocitos B humanos hasta cierto grado. Sin embargo, pese a los recientes perfeccionamientos de este método (Traggai *et al.*, 2004), no se ha logrado generar una respuesta inmunitaria humoral satisfactoria que implique la maduración de la afinidad de los anticuerpos humanos en dichos "ratones humanizados". Además, como en el caso de los ratones transgénicos con inmunoglobulina humana o ratones "inactivados", no es posible optimizar los actuales anticuerpos.

Cualquier plataforma de tecnologías de anticuerpo basada en ratones requiere habitualmente la inmunización *in vivo*, lo cual sigue siendo un proceso largo cuando se lo compara con los enfoques *in vitro*.

Por lo tanto, además de los enfoques relacionados con ratones anteriormente mencionados, se han perfeccionado en los últimos tiempos una variedad de tecnologías *in vitro* alternativas. Sin embargo, resta probar todavía cuán eficientes serán estos sistemas para la creación de productos de anticuerpos de alta afinidad y calidad. Un sistema *in vitro* se basa en el aislamiento de linfocitos B de memoria enriquecidos con antígeno, obtenidos de pacientes humanos con una enfermedad específica que pueden aislarse y posteriormente immortalizarse mediante la transformación *in vitro* del virus de Epstein-Barr (EBV), seguida de la detección de líneas EBV reactivas al antígeno (Lanzavecchia, documento WO 04/76677 A2). Similares en concepto, pero diferentes en cuanto a metodología, son los enfoques en los que las células del plasma productoras de anticuerpos obtenidas de pacientes con un estado de enfermedad aguda se aíslan primero a partir de la sangre periférica y luego se immortalizan mediante fusión con los heteromielomas no productores, seguido de un análisis para la detección de productores de anticuerpos deseados (Lang *et al.*, documento WO 90/13660 A2). Alternativamente, se han descrito métodos dirigidos al aislamiento de los linfocitos B de personas vacunadas o inmunizadas, seguido del aislamiento y clonación de genes de anticuerpos específicos, ya sea a partir de poblaciones de células (Lawson & Lightwood, documento WO 04/106377 A1; Schrader, WO 92/02551 A1) o mediante PCR de una sola célula (Muraguchi *et al.*, documento WO 04/051266 A1). Sin embargo, todas estas tecnologías dependen de la disponibilidad de poblaciones de linfocitos B pertinentes en pacientes humanos y son bastante limitadas en cuanto a su aplicación general, por lo que son utilizadas

principalmente para la identificación de anticuerpos terapéuticos antiinfecciosos experimentales. Además, con ninguno de los enfoques basados en la detección de linfocitos B humanos es posible llevar a cabo la maduración de la afinidad, ni el desarrollo de anticuerpos dirigidos al antígeno ni la optimización de los anticuerpos actuales.

5 Por lo tanto, se han descrito recientemente otros métodos *in vitro* alternativos que implican la expresión y detección de anticuerpos recombinados en células eucariotas utilizando sistemas de expresión transitoria (Zauderer & Smith, documento WO 02/102855 A2 y Beerli *et al.*, documento WO 08/055795 A1). A pesar de que estos sistemas sortean algunos de los cuellos de botella de los ratones transgénicos y de las tecnologías de expresión en fago y de linfocitos B humanos, estos sistemas están caracterizados por una variedad de limitaciones. En primer lugar, las tecnologías conocidas de expresión/detección de anticuerpos basadas en células eucariotas no confieren un patrón de expresión estable para los anticuerpos recombinados, excluyendo los ciclos repetitivos de enriquecimiento de las células que expresan los anticuerpos con la especificidad de unión deseada. En segundo lugar, ninguno de los enfoques que involucran la expresión de anticuerpos en células eucariotas conocidos permite el control de la expresión clonal de los clones de los ligandos, lo cual, cuando se trata de la creación de anticuerpos terapéuticos, hace que sea difícil identificar un par de cadenas IgH e IgL compatibles con la actividad de unión al antígeno o ligando deseada. En tercer lugar, la tecnología descrita en Zauderer y Smith (WO 02/102855 A2) no permite ninguna mutagénesis *in vitro* ni la recombinación genética de los anticuerpos expresados sino que es simplemente un procedimiento de detección. Por lo tanto, los aspectos relativos a la maduración de la afinidad de las proteínas de unión no son abordados por esta técnica. Por último, ninguno de los sistemas de expresión/detección de células eucariotas son compatibles con la generación *in situ* de repertorios de anticuerpos diversos a partir de construcciones de expresión de anticuerpos individuales que explotan el mecanismo de recombinación V(D)J de los segmentos génicos V, D y J de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina.

Jensen *et al.* (documento EP 1 041 143 A) han propuesto un método alternativo para la identificación de péptidos y ácidos nucleicos biológicamente activos. El método preferido descrito en el documento EP 1 041 143 A comprende un procedimiento de detección inicial en el cual se puede introducir un gran número de vectores retrovirales en las células de modo que la célula individual puede expresar una variedad de ARN o péptidos diferentes. Las células que exhiben un cambio en su fenotipo se aíslan posteriormente y el ADN retroviral en ese clon puede aislarse mediante PCR. Este producto obtenido por PCR puede utilizarse luego para volver a transfectar las células empaquetadoras virales para crear más vectores retrovirales. Estos vectores retrovirales pueden entonces utilizarse para la transducción de diferentes células y, finalmente, después de un segundo procedimiento de clonación, puede identificarse la sustancia activa. En esencia, este método resulta en un cambio indirecto en el fenotipo de una célula mediante la importación de péptidos o ácidos nucleicos biológicamente activos. Esto contrasta con el método de la presente invención mediante el cual las construcciones transducidas en forma retroviral codifican directamente las proteínas de unión, preferiblemente anticuerpos, a las cuales se dirige la detección. Debe destacarse también que los péptidos y ácidos nucleicos descritos en el documento EP 1 041 143 A difieren sustancialmente en tamaño de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos identificados por los métodos de la presente invención.

En el documento WO 03/083075 A2 (Bremel *et al.*) se establece otro método para la detección genómica basada en retrovirus. Dicho método se refiere a la expresión y detección de las secuencias de ADN genómico que codifican genes y proteínas sin caracterizar. Se describe un proceso en el cual una línea celular es transducida con una construcción de expresión retroviral de modo tal que un virus de ADN genómico se inserta en el genoma de una línea celular como un provirus, y luego se analiza directamente la expresión de los polipéptidos a partir del provirus. Dicho método no permite el enriquecimiento de la línea celular ni el aislamiento e identificación de los polipéptidos expresados antes de la realización del análisis, lo cual le resta valor a la tecnología de detección de alto rendimiento desarrollada por Bremel y colaboradores.

Una solicitud de patente recientemente publicada (documento WO 08/055795 A1) por Beerli y colaboradores describe una plataforma de detección para el aislamiento de anticuerpos humanos que utiliza un sistema de expresión del virus Sindbis. Una característica esencial de esta plataforma es la generación de una colección de partida en la que linfocitos B específicos para un antígeno de interés se aíslan directamente de las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) de donantes humanos. Se generan colecciones de scFv recombinados y reactivos al antígeno a partir de este grupo de linfocitos B, las cuales se detectan mediante expresión en la superficie de células de mamíferos utilizando el sistema de expresión del virus Sindbis. Al igual que la expresión en fago, uno de los obstáculos de este sistema es que los scFv de interés deben volver a diseñarse genéticamente y expresarse como IgG de longitud completa en células de vertebrados. Dicho proceso puede asociarse a una pérdida de afinidad del anticuerpo de interés en la conversión ya que estos anticuerpos pueden no expresarse bien en células de vertebrados y/o pueden presentar características de unión alteradas.

Por el contrario, la invención descrita en el presente documento comprende una combinación exclusiva y extremadamente eficaz de métodos para el desarrollo y optimización de las proteínas de unión, es decir, anticuerpos o fragmentos de estos. En comparación con las tecnologías basadas en ratones, las principales ventajas de la invención descrita en el presente son la total flexibilidad en términos de optimización y el desarrollo de anticuerpos *de novo*, y la velocidad para identificar ligandos específicos en cortos períodos de tiempo. Como todos los aspectos de la invención se realizan *in vitro*, no existen limitaciones con respecto al desarrollo de anticuerpos contra antígenos, que se conservan en gran medida a través de las especies o que pueden resultar tóxicos en animales

experimentales.

En comparación con las tecnologías de expresión en fago, las ventajas claves de la invención descrita en el presente documento es que las proteínas de unión, a saber los anticuerpos, pueden expresarse como anticuerpos de longitud completa, en una célula de vertebrados, y en un ambiente de linfocitos B, es decir, la célula anfitriona natural de los anticuerpos, garantizando el plegamiento de proteínas más natural y apropiado, la modificación postraduccion correcta y un control de calidad para la formación de pares de cadenas pesada y liviana.

En comparación con los enfoques basados en linfocitos B humanos las ventajas claves de la invención descrita radican en la total flexibilidad relativa al desarrollo de anticuerpos contra cualquier objetivo deseado, la posibilidad de optimizar la afinidad de los anticuerpos actuales, una total libertad de opción en cuanto a qué tipo de anticuerpo se expresa en el sistema (enriquecidos para el antígeno, sintéticos, de pacientes, en condiciones de barajado de cadenas IgH e IgL, etc.).

En comparación con otros sistemas de expresión basados en células eucariotas que involucran, ya sea construcciones de expresión basadas en plásmidos o vectores virales no integradores, las ventajas claves de la invención descrita de 'Retrocyte Display' radican en que es posible lograr la expresión estable, sostenida y clonal mediante el uso de una tecnología de transferencia retroviral de genes. La expresión estable, sostenida y clonal de los anticuerpos recombinados en las células objetivo permite la realización de ciclos repetitivos de células específicas para el antígeno o ligando, que comprenden la posibilidad de aislar y expandir las células monoclonales para la identificación de los genes de anticuerpos. Además, la invención descrita aquí permite la producción de diversidad genética adicional tras la transducción retroviral en células anfitrionas de vertebrados *in situ* utilizando construcciones retrovirales únicas, ya sea mediante el uso del mecanismo específico para linfocitos de recombinación V(D)J o del proceso de hipermutación somática para la mutagénesis ulterior de proteínas de unión.

Por lo tanto, en comparación con cualquiera de las tecnologías conocidas en la técnica para el desarrollo de anticuerpos terapéuticos, el método de '*retrocyte display*' descrito aquí proporciona soluciones únicas, nuevas y potentes para muchas de las limitaciones evidentes de las tecnologías preexistentes.

La invención descrita en el presente documento, es ampliamente aplicable a la expresión, detección e identificación de las proteínas de unión que se unen de manera específica al ligando o al antígeno de interés. A pesar de que la invención se puede llevar a cabo con cualquier proteína de unión, que incluye, sin limitación, homo o heterorreceptores, monoméricos o multiméricos unidos a membrana, como los receptores de los linfocitos T, receptores de citocina o quemocina, pero también con otras proteínas de andamiaje, las proteínas de unión preferidas de la invención son los anticuerpos de longitud completa, siendo particularmente preferidos los anticuerpos completamente humanos. Sin embargo, se entenderá que para la realización de la invención es posible utilizar cualquier fragmento (funcional) de un anticuerpo, que incluye, sin limitación los fragmentos de cadena única Fv (scFv), fragmentos Fab, F(ab')₂, dominios únicos V_H o V_L, cadenas únicas pesadas o ligeras o cualquier combinación de estos, con cualquier modificación natural o realizada mediante ingeniería genética. Con respecto a los anticuerpos de longitud completa, la invención es particularmente aplicable a cualquier clase de modificaciones diseñadas o manipuladas artificialmente en regiones de unión de anticuerpos, por ejemplo, las generadas por mutagénesis dirigida al sitio o la región, la fusión de secuencias naturales provenientes de diferentes anticuerpos, la distribución al azar de secuencias CDR, barajado de ADN, PCR propensa a error, sólo por mencionar algunos métodos con fines ilustrativos.

Un método para la expresión de proteínas de unión de conformidad con la invención es el uso de transducción de células anfitrionas de vertebrados mediada por vectores retrovirales.

El uso de vectores retrovirales ha sido investigado durante muchos años en el campo de la terapia génica. Por ejemplo, para diseñar vectores asociados a los adenovirus (AAV) que puedan ser dirigidos a tipos específicos de células, Perabo *et al.*, (documento WO 03/054197 A2) han insertado secuencias que codifican los péptidos objetivo en forma aleatoria en el gen del cápside viral, en un sitio crítico para la unión al receptor celular primario y producido colecciones de AAV que expresaban los péptidos en el contexto del cápside viral. La presión selectiva originada por el ambiente del cultivo guió la selección por medio de la capacidad de los clones virales para ejecutar cada paso en el proceso de infección, a saber, la unión, captación, eliminación de las capas, translocación nuclear, replicación y expresión del gen. Mediante el uso de esta técnica, se generaron vectores que lograron la transducción eficaz de células de leucemia. A pesar de que dicha técnica puede ser útil para producir mutantes virales que infecten las células objetivo previamente resistentes a la infección mediante AAV naturales, no genera colecciones diversas de proteínas de unión *in vitro*.

Como tales, los métodos descritos en la presente solicitud para la expresión de las proteínas de unión tienen varias ventajas clave sobre cualquiera de los métodos conocidos en la técnica para la expresión de proteínas recombinadas en las células anfitrionas eucariotas y/o de vertebrados.

1) Las construcciones retrovirales recombinadas se integran de manera estable al genoma de la célula anfitriona confiriendo así un fenotipo de expresión estable y sostenida de la proteína de unión. 2) Mediante la utilización de la

relación apropiada de partículas retrovirales a células objetivo, denominada "multiplicidad de infección" (MOI), si se lleva a cabo preferiblemente a una MOI menor o igual 0,1, se puede controlar la transducción retroviral de modo tal que la mayoría de las células transducidas retroviralmente sean modificadas genéticamente por una sola construcción retroviral recombinada que se integra al genoma de la célula anfitriona, dando como resultado la expresión clonal de al menos una proteína de unión deseada. Dado que la expresión clonal de las proteínas de unión facilita enormemente la identificación y clonación de proteínas de unión individuales, este aspecto representa por lo tanto una realización preferida de la invención. Sin embargo, en una realización alternativa, la invención puede también llevarse a cabo utilizando la transducción retroviral a MOI mayores que 0,1.

A pesar de las ventajas de la transducción retroviral antes mencionadas como base para la *retrocyte display*, es posible lograr la expresión de las proteínas de unión recombinadas en células anfitrionas de vertebrados por otros métodos, como por ejemplo, pero no limitándose a, la transfección transitoria o estable de ADN, la transfección de ARN o por transferencia de vectores virales basados en ADN, como vectores de adenovirus o poxvirus. No obstante, ninguno de los métodos alternativos antes mencionados permite la expresión estable y clonal fácilmente controlable de las proteínas de unión en células anfitrionas de vertebrados.

Las células anfitrionas de vertebrados para la realización de la invención son células del linaje de linfocitos B, a saber los linfocitos B precursores, que carecen de expresión de anticuerpos endógenos pero que expresan proteínas accesorias favorables, como por ejemplo, chaperones para el plegamiento apropiado de proteínas y ensamblaje de anticuerpos, o proteínas de membrana accesorias que facilitan el depósito de las moléculas de anticuerpo en la membrana, como por ejemplo, las proteínas Igα o Igβ específicas para linfocitos B.

El principio de expresión de las proteínas recombinantes mediante transducción retroviral en células anfitrionas de vertebrados es un procedimiento ya establecido e implica la construcción de vectores retrovirales recombinados que son relativamente pequeños (tamaño máximo de ADN recombinado a incorporar: 8-10 kB) y que se pueden clonar y manipular mediante métodos de biología molecular convencionales como vectores de plásmidos, a partir de los cuales se puede transcribir el genoma del ARN retroviral. Un genoma retroviral natural sólo contiene tres genes, *gag*, *pol* y *env*, que codifican las proteínas nucleares, una integrasa, proteasa, ribonucleasa retrovirales, y una transcriptasa inversa, y proteínas de envoltura respectivamente (Fig. 3a). Además, el genoma retroviral contiene secuencias *cis*-reguladoras como la secuencia Psi (Ψ) necesaria para el empaquetamiento del genoma del ARN retroviral en el interior de las partículas de virus, una señal polyA para la terminación de la transcripción retroviral, y por último, las llamadas repeticiones terminales largas 5' y 3' (LTR) que contienen elementos promotores y señales para la integración retroviral en el interior del genoma de la célula anfitriona (Fig. 3a). Para la construcción de los retrovirus recombinantes, se reemplazan las regiones codificantes *gag*, *pol* y *env* de un retrovirus natural por cualquier casete de expresión para un gen de interés (Fig. 3a), entre ellos, elementos *cis*-reguladores pertinentes, como promotores o potenciadores. Para integrar en forma estable dichos genomas retrovirales recombinantes en el interior de un genoma anfitrión, se debe transfectar, en forma transitoria o estable, un vector de plásmido que contenga un genoma retroviral en el interior de la llamada línea de células empaquetadoras retrovirales (PCL), que expresan las proteínas virales estructurales codificadas por *gag*, *pol* y *env* *en trans* de manera transitoria o estable permitiendo, por lo tanto, el empaquetamiento del genoma viral recombinante (el vector de transferencia) en el interior de partículas retrovirales incompetentes para la replicación (Fig. 3b). Estas partículas retrovirales permiten la infección en una sola ronda (transducción) de las células objetivo (Fig. 3b). El ingreso de la partícula retroviral en el interior de las células objetivo es mediado por una interacción específica de la proteína Env con un receptor específico en la célula objetivo. Por ende, la naturaleza de la proteína Env determina el tropismo de las partículas retrovirales hacia células anfitrionas específicas que expresan el receptor cognado. Los retrovirus ecotrópicos están limitados a las células de roedores, los retrovirus anfotrópicos pueden infectar diversas especies, entre ellas, las células de roedores y de humanos, y los retrovirus pantrópicos pueden infectar cualquier célula en replicación que tenga membrana, ya que el ingreso a la célula tiene lugar por medio de estructuras presentes en todas las membranas de las células eucariotas. También pueden generarse partículas de vectores retrovirales con una variedad de tropismos diferentes utilizando proteínas de envoltura heterólogas de otros virus tales como el virus de leucemia de simios gibones (GaLV), el virus de la estomatitis vesicular (VSV) o VIH y SIV o incluso proteínas de la membrana celular, sólo por nombrar unos pocos con fines ilustrativos, técnica que se conoce con el nombre de "complementación" ("pseudotyping"). Luego del ingreso en la célula, el retrovirus puede liberar el genoma viral en el interior de la célula anfitriona, donde las proteínas virales median en la transcripción inversa del genoma en el ADNc y finalmente en su integración estable en el interior del genoma de la célula anfitriona, permitiendo la expresión estable de los genes liberados (Fig. 3b). En una realización preferida de la invención, se utilizan partículas de MLV ecotrópico para mediar en la transferencia de genes al interior de los linfocitos B de muridos. Sin embargo, un experto en la técnica podrá apreciar que para realizar la invención se puede emplear cualquier vector retroviral infeccioso complementado (*pseudotyped*) con cualquier proteína de envoltura o transmembranaria, con la condición de que medie en la transducción en cualquier célula selectora objetivo apropiada, independiente de las especies progenitoras donantes, del tipo celular o de su expresión de un receptor cognado que medie en el ingreso del vector a la célula.

Para lograr la transferencia de genes mediada por vectores, las partículas que contienen al vector (conteniendo transcritos de genomas retrovirales recombinados, o vector de transferencia) se pueden cultivar a partir del sobrenadante del cultivo celular de las células empaquetadoras que expresan, en forma estable o transitoria, los

vectores de transferencia (Fig. 3b). Esto puede llevarse a cabo en una amplia gama de protocolos y variaciones de estos, conocidos por un experto en la técnica. Las realizaciones preferidas de esta invención comprenden: 1) la preparación de la partícula retroviral *in vitro* que contiene a los sobrenadantes utilizando, bien el pasaje a través de un filtro apropiado o un paso de centrifugación que separe las células empaquetadoras de las partículas del vector. Estas preparaciones de partículas retrovirales se utilizan posteriormente para la transducción a las células anfitrionas de vertebrados mediante la incubación conjunta en un período de tiempo variable o realizando la llamada "spin infection" (infección por rotación). Aquí, se mezcla una suspensión de células objetivo con la partícula retroviral que contiene el medio y se somete a centrifugación a baja velocidad (Fig. 3b). 2) De manera alternativa, a fin de permitir la transducción de las células objetivo, se puede realizar el cultivo conjunto de las células objetivo con las células empaquetadoras permitiendo el contacto célula a célula o la separación de ambas poblaciones de células mediante una membrana que permite el pasaje de las partículas retrovirales pero no el de las células empaquetadoras.

Como células objetivo anfitrionas para la transducción retroviral, una realización preferida del método es usar células del linaje de linfocitos B de roedores que no expresan las inmunoglobulinas murinas endógenas y que se pueden transducir con retrovirus de diversidad anfitriona ecotrópica. Las células de la línea de linfocitos B tienen la ventaja de que ya expresan las proteínas Igα e Igβ específicas de los linfocitos B que favorecen la expresión en la superficie celular y el anclaje de las inmunoglobulinas de membrana de longitud completa. Al respecto, las células derivadas de células plasmáticas que no producen inmunoglobulinas, como por ejemplo, las células de mieloma, como por ejemplo (no restrictivamente) Sp2/0, NSO, X63 y Ag8653, generalmente carecen de las proteínas Igα e Igβ para el depósito de inmunoglobulinas de membrana. En estos casos, y en cualquier otra célula anfitriona de vertebrados en donde no se expresan las proteínas Igα e Igβ, se puede usar el método de todas maneras si se confiere la expresión de las proteínas Igα e Igβ mediante transfección o transducción de vectores de expresión para las Igα e Igβ, un procedimiento estándar para cualquier persona experta en la materia. De esta forma, mediante la expresión ectópica de ambas proteínas Igα e Igβ, el método se puede llevar a cabo en cualquier línea de células anfitrionas de vertebrados, siempre que se produzcan las partículas retrovirales con el tropismo apropiado, capaces de transducir esa línea de células anfitrionas de vertebrados. Para aclarar el tema, la innovación revelada en la presente puede realizarse en cualquier célula anfitriona de vertebrado si se usan partículas retrovirales pantrópicas (por ejemplo, sin limitación, las partículas complementadas con la proteína G de VSV) en relación con una célula anfitriona modificada para expresar ectópicamente las moléculas Igα e Igβ que anclan las inmunoglobulinas. Sin embargo, esto no queda contemplado por la presente invención.

Las células que se han de utilizar de conformidad con la invención derivan del linaje de linfocitos B y se limitan a células B precursoras de cualquier especie de vertebrado, tales como células B precursoras primarias que se pueden cultivar en un cultivo tisular durante periodos de tiempo prolongados. Los linfocitos B precursores representan las células anfitrionas ideales para la expresión retroviral de las inmunoglobulinas, dado que la mayoría de esas líneas celulares no expresan las proteínas de inmunoglobulinas endógenas. En particular, dado que las líneas celulares de linfocitos preB murinos son fáciles de obtener a partir de cualquier línea de células de ratón mediante transformación con el virus de la leucemia murina de Abelson (A-MuLV). Sin embargo, tanto los linfocitos preB primarios que proliferan a largo plazo como los linfocitos preB transformados con A-MuLV expresan las proteínas específicas de los linfocitos preB VpreB y λ5, que juntas forman la denominada cadena ligera sustituta, que en ausencia de las cadenas ligeras convencionales puede formar complejos receptores de linfocitos preB formados por la cadena ligera sustituta y la cadena pesada de la inmunoglobulina. Ya que se desean expresar las inmunoglobulinas compuestas por cadenas ligeras y pesadas recombinadas, se utilizan los linfocitos preB que no expresan los componentes de la cadena ligera sustituta, que comprende los productos génicos de los genes λ5, o VpreB1 o VpreB2, sea que tengan uno de estos genes inactivos, dos o los tres. Como se sabe que la cadena ligera sustituta puede unirse a las cadenas pesadas heterólogas, es probable que la expresión de la cadena ligera sustituta interfiera, en diferentes grados, con la detección de los pares IgH/IgL, pero debido a que generalmente los niveles de expresión de las proteínas de la cadena ligera sustituta en los linfocitos preB son bajos, el método podría aún ser realizable si se usan linfocitos preB naturales que expresen los componentes de la cadena ligera suplente, aunque no se contempla en la invención. En resumen, para el método, se puede usar cualquier célula de vertebrado que exprese las Igα e Igβ y que no exprese las proteínas de inmunoglobulinas endógenas como célula anfitriona objetivo; pero de conformidad con la invención las células anfitrionas para realizar la invención son los linfocitos preB que carezcan de la cadena ligera suplente.

Las proteínas de unión preferidas para expresar, detectar e identificar son los anticuerpos de longitud completa, y por la secuencia de aminoácidos de las inmunoglobulinas completamente humanas. Sin embargo, se entenderá que cualquier proteína de unión capaz de expresarse en células de vertebrado podrá someterse a técnicas de detección y selección de una unión a ligando o antígeno específico. Por ejemplo, tales proteínas de unión pueden incluir fragmentos de anticuerpos de cualquier especie vertebrada como por ej., Fv monocaténario, fragmentos Fab (Fig. 2a) o dominios V_H o V_L únicos, o una cadena ligera o pesada, expresada en una manera que permita el depósito sobre la superficie de la membrana celular. La expresión retroviral de cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas se logra preferentemente, mediante la transducción secuencial de construcciones de expresión retroviral separadas para cadenas pesadas y ligeras. Sin embargo, la invención también puede realizarse mediante una cotransducción de las células objetivo en donde se usan construcciones retrovirales separadas para las cadenas IgH e IgL. La expresión separada de las cadenas de IgH e IgL a partir de vectores retrovirales diferentes

ofrece la ventaja de que las colecciones de vectores retrovirales que codifican una colección diversa de cadenas pesadas de inmunoglobulinas se pueden combinar aleatoriamente con las colecciones de vectores de expresión retroviral que codifican una colección diversa de cadenas ligeras de inmunoglobulinas. Esta acción, denominada mezcla de cadenas pesadas y ligeras, puede crear una gran diversidad de especificidades de unión a inmunoglobulina, incluso cuando el número total de colecciones de cadenas pesadas y ligeras es limitado (por ej., 10^4 cadenas pesadas diferentes, combinadas aleatoriamente con 10^4 cadenas ligeras diferentes teóricamente resulta en 10^8 especificidades de anticuerpos diferentes). La mezcla de colecciones de vectores de cadenas IgH e IgL se lleva a cabo, preferentemente, mediante una mezcla unilateral, es decir, una cadena polipeptídica de un anticuerpo es una construcción única que codifica una única cadena de anticuerpos.

Sin embargo, se comprenderá que la expresión de las cadenas IgH e IgL retrovirales también se puede lograr si ambas proteínas están codificadas en el mismo esqueleto retroviral (ver más adelante). En su configuración más sencilla, la expresión de las cadenas ligeras y pesadas se confiere mediante la clonación de ADNc de cadena pesada y ligera en un vector retroviral vacío, donde la expresión está impulsada por la actividad promotora de la LTR 5' y el procesamiento adecuado del ARN está mediado por las secuencias LTR 3' (Fig. 3a). Las construcciones de cadena pesada deben contener, preferentemente, sus regiones codificantes transmembranarias endógenas para permitir que las inmunoglobulinas recombinadas se depositen de forma óptima en la membrana. Sin embargo, para los expertos en la materia, resultará claro que también se pueden fusionar dominios transmembranarias de otras proteínas transmembranarias a las regiones constantes de los anticuerpos para garantizar el depósito de las inmunoglobulinas modificadas expresadas. En particular, en el contexto de la expresión de fragmentos de anticuerpos o la expresión de proteínas de unión diferentes a inmunoglobulinas, puede ser provechoso usar diferentes regiones transmembranarias de proteínas unidas a la membrana para la expresión de los ligandos en la superficie celular.

Se pueden usar vectores de expresión para inmunoglobulinas recombinadas que codifican todos los isotipos de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas, que en caso de los anticuerpos completamente humanos, permite la expresión de los anticuerpos IgM, IgD, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, IgA₂ e IgE, que contienen la cadena ligera Igk o la Igl. En todos los vectores de expresión retroviral para cadenas pesadas y ligeras humanas, se prefiere reemplazar solo la región codificante variable de una cadena ligera y pesada humana, usando enzimas de restricción únicas, como por ejemplo, pero sin limitación, la HindIII y la Eco47III, como se muestra en el esquema de vectores de expresión de anticuerpos retrovirales (4a y 4b). Esto permitirá clonar y reemplazar fácilmente las regiones codificantes variables en vectores de expresión retroviral, sea con colecciones de regiones V o con regiones codificante de la región V individuales, en marco con las regiones codificantes constantes para las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina. Este esquema de intercambiar solo los dominios de la región variable, sea apuntando a generar vectores de expresión que codifican una sola especificidad o a generar una colección de proteínas de unión, será favorable. En relación con esto, se pueden expresar anticuerpos de longitud completa que contienen dominios de región variable y dominios de región constante derivados de especies diferentes (anticuerpos híbridos).

Se construyó el vector de expresión retroviral para proteínas de unión más simple mediante la inserción de una región codificante de ADNc para la proteína de unión o el gen de interés en el esqueleto de un vector de expresión retroviral "vacío" (Fig. 3a). Incluso en ausencia de todo marcador de selección y/o marcador de detección (por ej., proteína verde fluorescente mejorada, EGFP por sus siglas en inglés) que permita la detección directa de las células transducidas, la invención podría realizarse porque las células que expresan establemente las proteínas de unión de los vectores retrovirales pueden identificarse y aislarse basándose en la expresión estable de las proteínas de unión unidas a la membrana. Sin embargo, se prefieren varias características incluidas en los vectores de expresión retroviral. La primera es un elemento promotor inducible o muy constitutivo que impulsa la expresión de las proteínas de unión recombinadas, ubicadas directamente hacia 5' de las regiones ADNc codificantes (Fig. 4a, b). Esos promotores pueden ser, por ejemplo, sin limitación, promotores constitutivos, como el promotor inmediato temprano del CMV, el promotor β -actina y el promotor EF-1 α , o los promotores inducibles como el promotor tetraciclina o cualquier otro promotor inducible por antibiótico, que pueden aumentar o disminuir la expresión por adición o remoción de tetraciclina u otros antibióticos y derivados de ellos, como la doxiciclina. La inclusión de elementos promotores inducibles en las construcciones de expresión retroviral es otra realización preferida porque se sabe que en algunos esqueletos de vectores retrovirales se pueden silenciar promotores LTR 5' e incluso promotores constitutivos fuertes.

Además de los elementos promotores, incluir genes marcadores en las construcciones de expresión retroviral que luego permiten seleccionar y/o controlar la transducción retroviral estable de células anfitrionas sin detección de proteínas de unión recombinadas (Fig. 4a, b) constituye una realización preferida. Los marcadores de selección y/o detección son particularmente útiles para el protocolo de transducción retroviral de dos pasos preferido, que incluye la transducción secuencial de vectores de expresión retroviral de cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina. En un protocolo de transducción de dos etapas, primero se transduce una célula anfitriona de vertebrado con por lo menos una construcción de expresión retroviral que codifica una primera cadena polipeptídica de inmunoglobulina (o varias primeras cadenas) y después de que se expresa establemente por lo menos una primera cadena polipeptídica, se realiza una segunda transducción con por lo menos una construcción de expresión retroviral que codifica la otra u otras cadenas polipeptídicas de inmunoglobulina correspondientes, lo que permite posteriormente generar un anticuerpo completo o una colección de anticuerpos. Si un marcador de selección o detección se usa en

la selección o detección de un primer acontecimiento de transducción exitoso, es muy útil optimizar las frecuencias de cotransducción de por lo menos dos construcciones de expresión retroviral que codifican cadenas separadas de una proteína de unión multimérica, como los anticuerpos. Por lo tanto, se prefiere el uso de marcadores de selección y/o detección.

Los marcadores de selección que confieren resistencia a los antibióticos útiles para la selección de células mamíferas incluyen, sin limitación, por ejemplo, genes para resistencia a la puomicina, neomicina, higromicina B, ácido micofenólico, histidinol, bleomicina y fleomicina. Para la expresión de proteínas multiméricas, como anticuerpos, codificadas por construcciones retrovirales separadas, se prefiere que la expresión de diferentes cadenas polipeptídicas esté unidas a diferentes marcadores de selección lo que permite una selección separada en la transducción estable de las correspondientes construcciones de expresión.

Los genes marcadores, que permiten controlar la transducción retroviral en las células anfitrionas, incluyen, sin limitación, genes que confieren autofluorescencia a las células transducidas, como por ejemplo, sin limitación, la proteína verde fluorescente (GFP), la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP), la proteína amarilla fluorescente (YFP), la proteína azul fluorescente (BFP) y la proteína roja fluorescente (RFP). Alternativamente, se pueden usar marcadores de superficie celular como el CD7 o variantes truncadas de este, el CD34 o variantes truncadas de este, o el receptor del factor de crecimiento de nervios de afinidad baja. En una realización preferida, la expresión de estos marcadores de selección de antibióticos, marcadores fluorescentes o marcadores de superficie celular, está aunada a la expresión de la proteína de unión recombinada por medio de las llamadas secuencias internas de entrada al ribosoma (IRES), lo que en las células de vertebrados permite la coexpresión de dos genes de un único elemento promotor (Fig. 4b). Sin embargo, el experto en la materia también podrá llevar a cabo la invención mediante la expresión de un gen selector y/o marcador de un casete de expresión separado contenido en la construcción retroviral, impulsada por un elemento promotor adicional. Para la expresión de proteínas multiméricas, como las inmunoglobulinas, de vectores retrovirales separados, se prefiere que cadenas de proteínas de unión diferentes estén unidas a marcadores de selección y/o detección diferentes, lo que permite realizar un control separado para lograr la transducción estable de las construcciones de expresión diferentes.

En caso de que la expresión de la proteína de unión recombinada esté impulsada por un promotor separado, como se describió anteriormente, también se puede clonar cualquier gen marcador de selección o detección en secuencia abajo de la LTR 5' y secuencia abajo de la LTR 5' y de la señal de empaquetamiento ψ de forma tal que su expresión esté impulsada por el promotor LTR 5' (ver Figs. 3 y 4).

Como se mencionó anteriormente, la invención describe el expresar anticuerpos recombinados o fragmentos de los mismos en células de la línea de linfocitos B, a saber en los linfocitos preB. Por lo tanto, se prefiere fomentar la expresión de los anticuerpos recombinados mediante combinaciones de promotores y potenciadores que se saben confieren una alto nivel de expresión selectivamente en las células de la línea de linfocitos B. Dichas combinaciones promotor/potenciador pueden ser, por ejemplo, sin limitación, combinaciones de promotor de cadena ligera κ de inmunoglobulina, potenciador 3' κ e intrón κ , o combinaciones de potenciador intrón de cadena pesada y 3' α y de cadena pesada de inmunoglobulina. Se prefiere la combinación promotor de cadena ligera κ , potenciador 3' κ e intrón κ (Fig. 4a, b) porque se sabe que esta combinación permite un alto nivel de expresión de las cadenas de inmunoglobulina en las células de la línea de linfocitos B y porque esta combinación de elementos genéticos *cis*-reguladores es capaz de favorecer la hipermutación somática de las regiones codificantes de los anticuerpos de forma regulada y mediada por la enzima AID (desaminasa de citidina inducida por activación) activada, que es una realización de la invención como se detalla más adelante.

Sin embargo, cualquier experto en la materia podrá apreciar que la expresión de un anticuerpo recombinado determinado en los vectores retrovirales para realizar la invención podrá llevarse a cabo por cualquier combinación de elementos potenciador/promotor *cis*-regulatorio y regiones codificantes que permita la expresión del anticuerpo en la célula anfitriona de vertebrado deseada en la superficie de la membrana celular.

Aunque una de las realizaciones preferidas de esta invención la constituye la expresión de proteínas de unión multiméricas, como los anticuerpos, a partir de construcciones de expresión retroviral separadas (Fig. 4a y b), la invención también podrá realizarse si la expresión de diferentes cadenas proteicas de las proteínas de unión multiméricas está unida en la misma construcción de expresión retroviral. En el caso de las inmunoglobulinas, esto puede lograrse, entre otros maneras, mediante la expresión de la cadena pesada y ligera de un promotor y la separación de las regiones codificantes de las cadenas pesadas y ligeras mediante IRES. En esta alternativa, se prefiere clonar la cadena pesada justo secuencia abajo del promotor y la cadena ligera secuencia abajo de la IRES porque se sabe que un gen que sigue a la IRES se expresa frecuentemente a niveles algo inferiores a los de un gen secuencia arriba de la IRES. Como las cadenas ligeras son las moléculas más pequeñas, se anticipa que se logrará una mejor expresión estequiométrica de las cadenas pesadas y ligeras expresada vía unión a la IRES que si la expresión de la cadena ligera se controla mediante IRES.

Alternativamente, la coexpresión de dos cadenas de una proteína de unión dimérica como un anticuerpos, se puede lograr mediante la clonación de dos casetes de expresión separados en un solo esqueleto retroviral, de forma tal de controlar la expresión de cada cadena de proteína de unión individual. En vez de este enfoque, también se puede

unir la expresión de dos cadenas de proteínas de unión diferentes en el mismo vector mediante el uso de promotores bidireccionales que confieren actividades de transcripción en direcciones opuestas. Esta última opción posee la ventaja potencial de que no haya interferencia de promotor, que podría afectar negativamente los niveles de expresión de los promotores cercanos.

Cabe subrayar que independientemente de la organización genética detallada de los vectores retrovirales que albergan dos regiones codificantes de proteínas de unión, por ej., cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas, este método permite una única transferencia génica retroviral de los pares de proteínas de unión en células objetivo, lo que facilita el control de la expresión clonal de las proteínas de unión diméricas y reduce el marco de tiempo para la generación de una población celular que exprese el ligando, en comparación con un protocolo de transducción retroviral de dos etapas.

Además de los elementos genéticos *cis*-regulatorios, como promotores y potenciadores, y genes marcadores seleccionables o detectables como marcadores resistentes a los antibióticos y genes codificantes de proteínas autofluorescentes, las regiones codificantes de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina se pueden clonar en vectores de expresión retroviral en diferentes contextos.

En una realización preferida de la invención las regiones codificantes de la cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina se clonan en construcciones de expresión retroviral como secuencias de ADNc contiguas que incluyen las secuencias líderes necesarias para una adecuada secreción y/o expresión en superficie. La Fig. 4a ilustra ejemplos del diseño básico de esos vectores de expresión con elementos potenciadores. Preferentemente, las cadenas pesadas codifican los isotipos de cadena pesada $\gamma 1$ y cadena ligera κ humanos; sin embargo, se comprenderá que se puede utilizar cualquier otro isotipo de cadena ligera y liviana humano o de otra especie vertebrada para llevar a cabo la invención. En esos vectores de expresión ADNc retroviral se prefiere incluir una única enzima de restricción en la unión entre las regiones codificantes variable y constante, lo que permitiría reemplazar solamente las regiones codificantes V_H y V_L para alterar la especificidad de los anticuerpos expresados, o que permite insertar una multitud de regiones codificantes V_H y V_L para expresar colecciones de anticuerpos retrovirales diversas en las células objetivo. En una realización preferida, el sitio de la enzima de restricción introducido en los bordes de las V_H -Cy1 y V_L -Ck es un sitio Eco47III (Fig. 4a, b), lo que no altera la composición del aminoácido de las cadenas pesadas expresadas y solo provoca un cambio de treonina a serina en la primera posición de la región codificante κ constante, lo que no afecta las propiedades de unión de las moléculas IgG₁ humanas expresadas retroviralmente.

Como alternativa a las construcciones retrovirales que contienen la información codificante para anticuerpos heterólogos preferentemente totalmente humanos en la configuración del ADNc, se pueden emplear vectores de expresión retroviral que contengan las regiones codificantes en la configuración genómica, con la estructura exón-intrón típica de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina de la línea germinal. Como los vectores retrovirales se transcribirán en el ARNm durante el empaquetamiento de la partícula retroviral, esa organización de las construcciones de expresión requiere que la organización transcripcional de las regiones codificantes corra en dirección opuesta a la orientación transcripcional de la LTR 5' del genoma retroviral, porque de lo contrario el vector de transferencia retroviral ya estaría empalmado con lo que la estructura exón-intrón se perdería antes de la transducción e integración estable de la construcción recombinada en las células objetivo. Sin embargo, estas construcciones ofrecen la funcionalidad de que los anticuerpos se pueden expresar como anticuerpos secretado o unidos a la membrana, en función de la naturaleza de la célula objetivo para la transducción, y la capacidad de la célula objetivo de terminar la transcripción en el codón de terminación interna para los anticuerpos secretados, o alternativamente, de empalmar los aceptores de los exones de la inmunoglobulina de membrana por medio del corte y empalme de un donante de corte y empalme secuencia arriba del codón de terminación de anticuerpos secretados.

Un aspecto preferido de la invención es la generación y uso de construcciones de expresión retroviral para anticuerpos humanos o cualquier anticuerpo heterólogo o fragmento de este, en donde se necesita ensamblar la región codificante variable de la cadena pesada y/o cadena ligera en las células objetivo a partir de los segmentos génicos V, opcionalmente D, y J en una configuración "cuasi línea germinal" mediante el proceso de recombinación V(D)J. En la Fig. 4b, se ilustra el diseño básico de tales vectores de expresión, que comparten la característica de las construcciones no reordenables de que se pueden reemplazar los casetes "línea germinal" V-D-J o V-J para las cadenas pesadas y ligeras por sitios de restricción únicos, inclusive preferentemente, el Eco47III en el límite 3' de la región codificante del elemento J. Los elementos V, D y J contenidos en tales vectores están flanqueados por secuencias señal de recombinación (RSS) conservadas, que se sabe son motivos de reconocimiento para los genes de activación de recombinación (RAG) 1 y 2. Después de la coexpresión de los RAG1 y RAG2 en cualquier célula de vertebrado, esos vectores se recombinarán los segmentos V, opcionalmente D, y J, en sitios específicos, para generar las regiones V_H y V_L que codifican los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos, respectivamente. Normalmente, la expresión de los genes RAG-1 y RAG-2, y con ello, la actividad de recombinación V(D)J, está limitada a los linfocitos precursores. Por lo tanto, el uso de los linfocitos B precursores para realizar la invención proporciona automáticamente la actividad para la recombinación V(D)J. Sin embargo, se sabe que después de la sobreexpresión de RAG-1 y RAG-2, cualquier línea celular somática de vertebrado puede convertirse en apta para la recombinación V(D)J, y cualquier persona experta en la materia puede por lo tanto,

realizar este aspecto con cualquier línea no precursora de linfocitos confiriéndole expresión ectópica de RAG-1 y RAG-2. Alternativamente, se pueden utilizar incluso líneas celulares carentes de RAG-1 y RAG-2 en donde la deficiencia de RAG-1 o RAG-2 se suple mediante la sobreexpresión del correspondiente gen RAG o fragmento de este. Esto, sin embargo, no queda contemplado por la invención.

Dichas construcciones reordenables V(D)J poseen la ventaja de que a partir de una única construcción de expresión retroviral que se transduce establemente en una célula anfitriona de vertebrado, se puede generar un repertorio diverso de especificidades de anticuerpos mediante la recombinación V(D)J mediada por RAG-1 y RAG-2.

Aunque se sabe que la unión de los segmentos génicos V, D y J involucra un alto grado de imprecisión que contribuye significativamente a las diversas secuencias de aminoácidos que se encuentran en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) 3 de V_H y V_L, se prefiere emplear una colección de construcciones retrovirales V-D-J-Cy1 y V-J-Ck, que representan varias familias de la región V, elementos D y J, para aumentar la variabilidad ya a nivel de las secuencias del segmento génico de la línea germinal proporcionadas. No obstante, si el uso preferido de construcciones retrovirales que permiten el ensamblaje somático de los segmentos V, opcionalmente D, y J mediado por el proceso de recombinación V(D)J permite generar una gran diversidad de regiones de unión a dominio variable mediante la transducción en los linfocitos precursores *in situ*, de forma tal de que se puede generar una colección diversa de cadenas IgH e IgL a partir de una única construcción o de un número limitado de construcciones.

La diversidad generada por la unión imprecisa de los segmentos génicos V, D y J aumenta en gran medida por la presencia de la desoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT), que se expresa en las primeras fases de desarrollo de los linfocitos y es la única ADN-polimerasa capaz de añadir nucleótidos a los extremos 3' del ADN sin una hebra no codificante de ADN complementaria. Para aumentar la diversidad de la unión se prefiere emplear células con altos niveles de expresión de TdT endógena o alternativamente, expresar ectópicamente la TdT en las células anfitrionas usadas para la *retrocyte display* por métodos conocidos en la técnica.

Otra realización de la invención es el uso de las construcciones retrovirales reordenables V(D)J que contienen más de un segmento génico V, D o J, de forma tal que por medio del proceso de recombinación V(D)J, se pueden usar diferentes segmentos génicos V, D y J en diferentes clones reordenados a partir de la misma construcción. La incorporación de una multitud de segmentos génicos V, D y J diferentes en esas construcciones solo está restringida por la capacidad total de los vectores retrovirales que aceptan ADN, que según se sabe está máximamente en el intervalo de 8 a 10 kilobases.

Aunque el empleo de las construcciones retrovirales competentes por recombinación V(D)J ((Fig. 4a,b cuadros inferiores) para la expresión de anticuerpos heterólogos o fragmentos de estos, es un aspecto de la presente invención, es evidente que la generación de un repertorio diverso por medio de este enfoque está limitado, fundamentalmente, a la generación de diversidad en las regiones CDR3 de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina, muy similar a la característica de un repertorio de anticuerpos primarios generado durante la linfopoyesis temprana de células B.

Una característica distintiva del sistema inmunitario adaptativo es su capacidad de maduración de la afinidad de los dominios variables de los anticuerpos, que se basa en la hipermutación somática de las regiones codificantes de los dominios variables. Se sabe que la enzima desaminasa de citidina inducida por activación (AID) incrementa intensamente la hipermutación somática. Un nivel alto de hipermutación somática depende también de la presencia de potenciadores *cis*-reguladores del locus génico de la inmunoglobulina, y se ha descrito claramente un efecto beneficioso de las combinaciones de los potenciadores 3'κ e intrón Igκ. Por lo tanto, un aspecto de la presente invención incluye el empleo de construcciones de expresión retroviral que contienen estos elementos *cis*-regulatorios para expresar retrovíricamente tales construcciones de expresión de inmunoglobulina en células objetivo que expresan endógena o ectópicamente la enzima AID, sea constitutiva o induciblemente, por métodos conocidos en la técnica.

La aplicación de la tecnología 'Retrocyte Display' en el contexto construcciones retrovirales aceptables obtenidas por hipermutación somática y en el contexto de células anfitrionas que expresan la AID permite una mayor diversificación de un anticuerpo *in situ*, después de la transducción en células anfitrionas que expresan al AID.

La combinación de estos aspectos de la invención recapitula todos los acontecimientos moleculares y genéticos que tienen lugar en el sistema inmunitario adaptativo, principalmente la generación de un repertorio de anticuerpos primarios a partir de una construcción o un número limitado de construcciones que expresan un número limitado de segmentos génicos V, D y J y la hipermutación somática adicional mediada por AID de las regiones codificantes para los dominios variables de unión al antígeno de los anticuerpos.

La selección específica de anticuerpos con una alta afinidad por los antígenos deseados se puede lograr mediante la tecnología 'Retrocyte Display', que utiliza tecnología basada en FACS estándar para detectar los elementos con mayor grado de unión a los antígenos deseados y los separa mediante técnicas de separación celular preparativa de alta velocidad. De esta forma, se pueden aislar selectivamente ligandos fuertes y los genes del anticuerpo

codificados por los vectores retrovirales se pueden aislar nuevamente, clonar y secuenciar de células o clones celulares seleccionados mediante métodos de biología molecular estándares conocidos en la técnica, inclusive, sin limitación, RT-PCR y genómica.

5 En una realización preferida, la etapa final de selección de células se realiza mediante separación de una sola célula, que permite la aislación clonal y expansión final de clones celulares reactivos al antígeno, lo que facilita la clonación y determinación de la secuencia de la región codificante de los pares de cadenas IgH e IgL análogas de ligandos seleccionados.

10 Si se desea, las células enriquecidas por FACS se pueden expandir en un histocultivo y opcionalmente, se pueden someter nuevamente a unión a antígeno y seleccionar las células con una alta reactividad mediante separación celular de alta velocidad, proceso que opcionalmente, se puede aplicar repetidamente hasta alcanzar la intensidad de coloración deseada y por lo tanto, la especificidad de unión esperada para un antígeno deseado (Fig. 1). Este enriquecimiento selectivo y expansión *in vitro* de las células reactivas al antígeno imita el resultado selectivo de ligandos de mayor afinidad que ocurre en las reacciones inmunitarias dependientes de los linfocitos T.

Cabe señalar que el enriquecimiento de células reactivas al antígeno asistido por la separación celular de alta velocidad es tan solo un método preferido de la presente invención, pero también se pueden aplicar otras formas de seleccionar y aislar las células para mejorar la reactividad al antígeno, como por ejemplo, sin limitación, métodos *panning* donde se unen las células a antígenos inmovilizados en un soporte sólido. Es más, es posible enriquecer las células reactivas al antígeno mediante enfoques micromanipulativos, por ejemplo, sin limitación, hacer crecer células en condiciones de dilución restrictivas en placas de microtitulación o como clones celulares en medio semisólido, que permiten marcar y/o teñir específicamente los antígenos y su identificación por medios que incluyen el uso del microscopio seguidos de elección manual y/o asistida por robótica de los clones reactivos al antígeno.

25 Otra realización de la invención comprende realizar ciclos repetidos de selección de antígeno/selección por FACS/expansión de células reactivas al antígeno en presencia de condiciones de mutagénesis, buscando que las mutaciones se den específicamente en las regiones codificantes de los dominios variables de unión de los anticuerpos. Mediante este enfoque, en cada ronda de amplificación celular se generan mutantes con mayor afinidad, que se generan *in situ*. Mediante la separación celular y enriquecimiento de células que muestran una unión al antígeno incrementada por *retrocyte display*, se pueden enriquecer y expandir selectivamente mutantes con mayor afinidad. Se puede lograr una alta tasa de mutación dirigida a los dominios de la región variable del anticuerpo mediante sobreexpresión de la enzima AID en las células que expresan el anticuerpo, en particular, cuando las construcciones de expresión contienen potenciadores y promotores *cis*-regulatorios, incluidos, sin limitación, potenciadores 3'k e intrón Igk, que se sabe facilitan la hipermutación somática mediada por AID en las regiones variables del anticuerpo (Fig. 4a y b). Aunque tal enfoque podría llevarse a cabo usando células que expresan constitutivamente la AID, endógena o ectópicamente, un aspecto de la invención utiliza los vectores de expresión de la AID, en donde se puede provocar la expresión de la AID y luego detenerla usando promotores inducibles, por ej., sin limitación sistemas promotores inducibles con tetraciclina y/o doxíciclina (Gossen & Bujard, 1992), en donde la expresión del gen de interés se controla mediante un promotor CMV mínimo flanqueado por repeticiones en tándem del tet-operón procariótico, y cuya expresión se puede provocar o suprimir usando una proteína de fusión HSV-VP16-Tet-represora, cuya unión al tet-operón se controla alostéricamente con tetraciclina o derivados de tetraciclina.

45 La presente invención se explica más detalladamente en los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLO 1

Clonación de vectores de expresión retroviral para cadenas pesadas de inmunoglobulina (IgH) y cadenas ligeras de inmunoglobulina (IgL) completamente humanos que contienen marcadores de selección para los antibióticos higromicina B y puromicina, respectivamente.

50 Como se mencionó anteriormente, la invención se puede utilizar con vectores de expresión retroviral para proteínas de unión de diferentes diseños (comparar por ej., las Figs. 4a-c). Como un ejemplo de uno de los diseños de vector que se pueden utilizar para llevar a cabo la invención, en la presente se describe la estrategia de clonación detallada para los vectores de expresión retroviral que permiten la expresión de anticuerpos IgG₁/κL completamente humanos y la selección para mantener estables esos vectores en las células objetivo usando marcadores resistentes a antibióticos.

a) Construcción de vectores de expresión retroviral para cadenas pesadas de inmunoglobulina (IgH) humana

60 Como punto de inicio para la construcción de vectores de expresión retroviral para la cadena pesada de la inmunoglobulina humana, se usó el vector retroviral pLHCX disponible en el mercado (BD-Clontech, Mountain View, CA) (Fig. 5a). El pLHCX contiene un gen marcador resistente a la higromicina B activado por el promotor LTR 5' del esqueleto retroviral. Además, el pLHCX contiene el promotor inmediato temprano del CMV seguido por un sitio de clonación múltiple (MCS) simple para la inserción de los genes de interés a expresar. Además, el esqueleto pLHCX

contiene un sitio de restricción BglII único y conveniente secuencia arriba del promotor CMV (Fig. 5a) en el que se pueden clonar elementos genéticos adicionales.

Una realización preferida de la invención es usar la enzima de restricción Eco47III para clonar (manteniendo el mismo marco) las regiones codificantes V_H humanas en las regiones codificantes de la cadena pesada γ 1 constante humana, ya que este sitio de enzima de restricción en particular se puede introducir en la unión entre las regiones codificantes V_H y Cy1 sin cambiar la composición de los aminoácidos de las cadenas IgH expresadas. Sin embargo, el pLHCX contiene un sitio de restricción Eco47III en la señal de empaquetamiento ψ (Fig. 5a) que impediría el uso directo del Eco47III para la estrategia de clonación de la región V_H mencionada anteriormente. Para eliminar este sitio de restricción Eco47III inconveniente del esqueleto del vector pLHCX, se llevó a cabo la primera etapa preliminar de clonación que se describe a continuación, como se detalla en la Fig. 5a. Se eliminó el sitio Eco47III en la señal de empaquetamiento ψ mediante mutagénesis dirigida al sitio usando un estuche comercial QuikchangeTM (Stratagene, La Jolla, CA), en la que se reemplazó el tercer nucleótido C de la secuencia AGCGCT de reconocimiento de Eco47III con un nucleótido A usando pares cebadores específicos que conferirían la mutación deseada, siguiendo las instrucciones del fabricante. El vector modificado se designó como pLHCX-m1 y se verificó que esta sustitución de un solo par de bases en la señal de empaquetamiento ψ (Psi) no afectara la eficiencia de transducción retroviral del vector modificado pLHCX-m1 (no se muestran datos).

Se clonaron en paralelo los ADNc que codifican la región constante para la Cy1 humana (con o sin las regiones codificantes transmembranarias M1 y M2) en el esqueleto pLHCX-m1. Los fragmentos de ADN Cy1-m y Cy1-s se amplificaron mediante RT-PCR usando ADNc de linfocitos humanos de sangre periférica como plantilla y los cebadores directos e inversos Sec-ID1, Sec-ID2, Sec-ID3 (ver más adelante). Para la amplificación RT-PCR de IgG humana de membrana, se usó la combinación de cebadores Sec-ID1 y Sec-ID2, y para la clonación de la versión secretada de IgG humana, se utilizó la combinación de cebadores Sec-ID1 y Sec-ID3. Los cebadores de amplificación PCR directos e inversos contenían los sitios de restricción HindIII y ClaI, respectivamente, que permiten la clonación direccional de los fragmentos amplificados por PCR en los sitios HindIII y ClaI secuencia abajo del promotor CMV en el pLHCX-m1 (Fig. 5a). El cebador de amplificación PCR directo contenía además un sitio Eco47III interno útil para fusionar en el marco las regiones V_H a las regiones constantes, sin cambiar la composición de aminoácidos de las cadenas pesadas IgG₁ de longitud completa expresadas. Los cebadores de amplificación PCR inversos Sec-ID2 y Sec-ID3 contenían sitios NotI internos adicionales que permiten que la enzima de restricción digiera la construcción justo secuencia abajo de la región codificante, a los efectos generales de la clonación, por ej., el intercambio de la región codificante de la región constante para la expresión de diferentes isotipos Ig.

Sec-ID1: 5'-GATCAAGCTTAGCGCTTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC-3'
HindIII/Eco47III

El cebador Sec-ID2 se usó como cebador inverso para la amplificación PCR de la versión secretada de IgG₁ humana junto con el Sec-ID1, y contenía un único sitio NotI (subrayado) a los efectos de la clonación.

Sec-ID2: 5'-GATCATCGATGCGGCCGCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGG-3'
ClaI / NotI

El cebador Sec-ID3 se usó como cebador inverso para la amplificación PCR de la versión unida a la membrana de IgG₁ humana junto con el Sec-ID1, y contenía un único sitio NotI (subrayado) a los efectos de la clonación.

Sec-ID3: 5'-GATCATCGATGCGGCCGCTTAGGCCCCCTGCCTGATCATGTTC-3'
ClaI / NotI

Los productos resultantes de la PCR de ca. 1,0kb par a la versión secretada de la Cy1 humana y de ca. 1,2 kb para la versión unida a la membrana de la Cy1 humana se digirieron con enzimas de restricción HindIII y ClaI y se clonaron direccionalmente en paralelo en los sitios de restricción compatibles pLHCX-m1, lo que dio como resultado los plásmidos pLHCX-m1-Cy1-s y pLHCX-m1-Cy1-m, respectivamente (ver también Fig. 5b). Entonces, después se pudieron clonar las regiones V_H en las regiones codificantes para la Cy1 humana secretada o unida a membrana, usando las enzimas de restricción HindIII y Eco47III, que flanquean los fragmentos de la región V_H (Fig. 5b). Esta combinación de enzimas de restricción se encuentra muy pocas veces en las regiones codificante V_H humana de las siete familias de segmentos V humanos.

Para construir un vector de expresión de cadena pesada IgG₁ completamente humano, se insertó una región codificante V_H humana de un anticuerpo completamente humano previamente identificado, específico para la NIP-ovoalbúmina, en las construcciones pLHCX-m1-Cy1s y pLHCX-m1-Cy1m como un fragmento HindIII-Eco47III que dio como resultado los plásmidos pLHCX-m1-VHCy1s y pLHCX-m1-VHCy1m, respectivamente (Fig. 5c). En la Sec-ID4 se proporciona la región codificante V_H para el anticuerpo humano específico NIP-ovoalbúmina que incluye la secuencia líder y los sitios de clonación 5'-HindIII y 3'Eco47III. Cabe señalar que se agregaron dos nucleótidos C adicionales secuencia arriba de la ATG de inicio para mejorar la traducción (aproximación de una secuencia de consenso Kozak):

Sec-ID4:

5 AAGCTTCCATGGAGTTTGGGCTcAGCTGGGTTTTCTTGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGTCCAGGTGCAGC
TGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTAC
CTTCAGTAGCTATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCA
TATGATGGAAGCAATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAA
CACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAATGGTCGACC
ACCGGAAAGCTACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTAGCGC
10 **T**

En la Sec-ID4, los sitios de restricción HindIII y Eco47III para la clonación están subrayados. La ATG de inicio de la secuencia líder comienza en la posición 9.

Aunque estos vectores de expresión de la cadena pesada IgG₁ humana ilustrados en la Fig. 5c son suficientes para realizar la invención y llevar a cabo la *retrocyte display* en combinación con los vectores de expresión de la cadena IgL retroviral, la funcionalidad de dirigir la hipermutación somática a las regiones codificante V_H requiere la presencia de determinados potenciadores *cis*-regulatorios de los locus génicos de la cadena pesada o ligera de la inmunoglobulina. Dado que se sabe que los potenciadores 3'κ e intrón κ del locus génico de la cadena ligera κ pueden dirigir la hipermutación somática a las regiones V localizadas secuencia abajo de un promotor activo, se modificaron los vectores de expresión de cadena pesada Ig humana retroviral pLHCXm1-VHCg1m y pLHCXm1-VHCg1s (Fig.5c) para que incluyeran los potenciadores 3'κ e intrón κ, de la siguiente manera. La secuencia del potenciador intrón κ murino (κiE) está ubicada dentro de una región intergénica de ca. 2,3kb localizada entre el elemento Jk5 y la región codificante constante κ, cuya secuencia se puede derivar a partir del artículo # V00777 de NCBI-Genbank. El κiE central comprende solo unas 0,5kb dentro de esta región intragénica y su secuencia se puede derivar del artículo # X00268 de NCBI Genbank. El fragmento de 2,3kb entero, desde Jk5 a Cκ, incluida la región κiE, contiene un sitio BglII que impide usar esta enzima de restricción para clonar un fragmento genómico amplificado por PCR en los vectores pLHCX-m1-VHCγ1-s y pLHCX-m1-VHCγ1-m. Sin embargo, no hay un fragmento de enzima de restricción BamHI interno en esta región lo que permite clonar un fragmento PCR genómico flanqueado por el sitio BamHI en los vectores pLHCX-mod1-VHCγ1s y pLHCX-m1-VHCγ1m alineados con BglII (Fig. 5c). Se construyeron vectores que contenían toda la región intragénica de ca. 2,3 kb entre Jk5 y Cκ mediante amplificación PCR de este fragmento genómico de ADN genómico murino utilizando los cebadores directos e inversos Sec-ID5 y Sec-ID6, que contenían ambos los sitios de restricción BamHI (subrayados) para clonar en el sitio de restricción BglII único de pLHCX-m1-VHCγ1s y pLHCX-m1-VHCγ1m, lo que dio como resultado los plásmidos pLHCX-m1-VHCγ1s-κiE y pLHCX-m1-VHCγ1m-κiE, respectivamente (Fig. 5d).

Sec-ID5: 5'-GATC**GGATCC**GTACACTTTTCTCATCTTTTTTATGTG-3'
BamHI

40 Sec-ID6: 5'-GATC**GGATCC**CTGAGGAAGGAAGCACAGAGGATGG-3'
BamHI

Además de insertar todo el fragmento κ IE ca. 2,3kb que contenía un fragmento genómico del locus génico de cadena ligera κ murino, también se clonó un fragmento PCR genómico más corto de ca. 0,8 kb (posición 3634-4394 de V00777, Sec-ID7), que contenía el κ IE central, en el sitio BglII único de pLHCX-m1-VHCy1-s y pLHCX-m1-VHCy1-m (no se muestra). Los cebadores PCR directo e inverso usados para la amplificación PCR de este fragmento de ADN genómico se representan en Sec-ID8 y Sec-ID9.

Sec-ID7:

50 5'GAAAAATGTTTAACTCAGCTACTATAATCCCATAATTTTGAAAAC TATTTATTAGCTTTTGTGTTTGACCTTCCC
TAGCCAAAGGCAACTATTTAAGGACCTTTAAAACTCTTGAAACTACTTTAGAGTCATTAAGTTATTTAACCACTTT
TAATTACTTTAAAATGATGTCAATTCCCTTTAACTATTAATTTATTTTAAGGGGGGAAAGGCTGCTCATAATTCTA
TTGTTTTTCTTGGTAAAGAACTCTCAGTTTTCTGTTTTACTACCTCTGTCACCCAAGAGTTGGCATCTCAACAGAG
GGGACTTTCCGAGAGGCCATCTGGCAGTTGCTTAAGATCAGAAGTGAAGTCTGCCAGTTCCTCCAAGGCAGGTG
55 GCCCAGATTACAGTTGACCTGTTCTGGTGTGGCTAAAAATTGTCCCATGTGTTACAAACCATTAGACCAGGGTC
TGATGAATTGCTCAGAATATTTCTGGACACCCAAATACAGACCCTGGCTTAAGGCCCTGTCCATACAGTAGGTTT
AGCTTGGCTACACCAAAGGAAGCCATACAGAGGCTAATATCAGAGTATTCTTGGAAGAGACAGGAGAAAAATGAA
AGCCAGTTTCTGCTCTTACCTTATGTGCTTGTGTTTCAGACTCCCAAACATCAGGAGTGTGAGATAAACTGGTCTG
AATCTCTGTCTGAAGCATGGAAC TGAAGAAATGTAGTTTCAGGGAAGAAAGGCAATAGAAGGAAGCCTGAGAA
60 TATCTTCAAGGG-3'

Sec-ID8: 5'-GATC**GGATCC**GAAAAATGTTTAACTCAGCTAC-3'
BamHI

65 Sec-ID9: 5'-GATC**GGATCC**CCCTTTGAAGATATTCTCAGGCTTCC-3'
 BamHI

El fragmento kiE ca. 0,8kb que contenía el fragmento PCR genómico también se clonó como un fragmento PCR digerido con BamHI en el sitio de restricción único BglII de los vectores pLHCX-m1-VHCy1-s y pLHCX-m1-VHCy1-m (no se muestran).

La secuencia del potenciador 3'k murina depositada se puede recuperar de NCBI-Genbank, número de referencia X15878, y está comprendido en una secuencia de genes 808bp localizada ca. 8,7 kb secuencia abajo de la región codificante k constante en el genoma murino.

El potenciador 3'k murino no contiene un sitio ClaI interno y por lo tanto, se le amplificó por PCR a partir de ADN genómico murino usando los cebadores PCR directo e inverso Sec-ID10 y Sec-ID11, respectivamente, que contenían sitios de restricción ClaI adicionales para clonar en el sitio ClaI único de los vectores retrovirales pLHCX-m1-VHCy1s-3'k E y pLHCX-m1-VHCy1m-3'k E (Fig. 5d).

Sec-ID10: 5'-GAGAATCGATAGCTCAAACCAGCTTAGGCTACAC-3'
ClaI

Sec-ID11: 5'-GAGAATCGATTAGAACGTGTCTGGGCCCATG-3'
ClaI

Esto dio como resultado los vectores finales de expresión de cadena Igy₁H pLHCX-m1-VHCy1s-3'kE-kiE y pLHCX-m1-VHCy1m-3'kE-kiE (Fig. 5e) que codifican cualquiera de las cadenas pesadas Ig que, ante la coexpresión de la cadena IgL, llevan a la producción de anticuerpos IgG₁ humanos en forma secretada o de membrana, respectivamente.

Adicionalmente, ambos vectores contienen elementos cis-regulatorios kiE y 3'kE secuencia arriba y secuencia abajo del casete de expresión de la cadena Igy₁H, que confiere hipermutación somática a las regiones V_H de las cadenas Igy₁H expresadas.

b) Clonación de vectores de expresión retroviral para cadenas ligeras Igk humanas

Como punto de partida para la construcción de vectores de expresión retroviral para la cadena ligera de la inmunoglobulina humana, que permiten seleccionar antibióticos para la integración retroviral, se usó el vector retroviral pLPCX disponible en el mercado (BD-Clontech, Mountain View, CA)(Fig. 6a). Este vector contiene un marcador de selección de antibióticos que otorga resistencia a la puromicina, impulsada por el promotor LTR 5' del esqueleto retroviral. Aunque con un diseño similar al del esqueleto pLHCX (ver el Ejemplo 1a), el pLPCX contiene dos sitios Eco47III y un MCS con más sitios de restricción, pero carece del conveniente sitio BglII único secuencia arriba del promotor CMV (Fig. 6a).

Para eliminar las enzimas de restricción Eco47III del esqueleto del vector pLPCX y al mismo tiempo introducir una enzima de restricción única BglII secuencia arriba del promotor CMV, se llevaron a cabo las siguientes etapas preliminares de clonación: En una primera etapa, se eliminaron los sitios Eco47III en las señales de empaquetamiento de pLHCX mediante mutagénesis dirigida al sitio usando un estuche comercial Quikchange™ (Stratagene, La Jolla, CA), en la que se reemplazó el tercer nucleótido C de la secuencia AGCGCT de reconocimiento de Eco47III con un nucleótido A usando pares cebadores específicos que conferían la mutación deseada, siguiendo las instrucciones del fabricante (Fig. 6a). Se verificó que esta sustitución de un solo par de bases en la señal de empaquetamiento ψ (Psi) no afectara las eficiencias de transducción retroviral de los vectores mutados (no se muestran datos). El vector mutado se designó como pLPCX-m1 (Fig. 6a). Con el fin de obtener un esqueleto de vector pLPCX totalmente desprovisto de sitios Eco47III y que además incluyera un único sitio BglII secuencia arriba del promotor CMV, se clonó un fragmento AscI-NcoI del pLPCX-m1, en el cual el extremo de ADN digerido por el NcoI se rellenó con enzima Klenow, en un esqueleto pLHCX digerido por AscI-BlnI, en donde el extremo de ADN digerido por BlnI se rellenó con enzima Klenow (Fig. 6b), generando así un vector designado como pLPCX-m2, en donde en esencia, solo el gen higromicina B del pLHCX fue reemplazado por el marcador de resistencia a la puromicina del pLPCX (Fig. 6b).

Para la construcción del vector de expresión de la cadena IgkL, se clonó la región codificante constante de la cadena ligera k por PCR a partir de ADNc de linfocitos humanos de sangre periférica usando los cebadores directos e inversos Sec-ID12 y Sec-ID13 que contenían los sitios de restricción HindIII y ClaI respectivamente, para la clonación direccional en el pLPCX-m2 (Fig. 6b). Como se describió en la sección a.), el cebador directo Sec-ID12 contenía también un sitio Eco47III que permitió la fusión en el marco de las regiones codificantes V_L con la región de codificación constante de la cadena ligera k, lo que dio como resultado solo una sustitución conservada de treonina por serina en la primera posición de la cadena ligera k constante humana. El cebador inverso contenía un sitio NotI interno adicional para facilitar procedimientos de clonación posteriores como por ejemplo, el intercambio de la región codificante constante k.

Sec-ID12: 5'-GATCAAGCTTAGCGCTCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATC-3'

HindIII/Eco47III

Sec-ID13: 5'-GATCATCGATGCGGCCGCCTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCT-3'
 ClaI / NotI

La inserción de la región codificante constante de la cadena ligera κ flanqueada por los sitios HindIII/Eco47III en el extremo 5' y los sitios NotI/ClaI en el extremo 3', en el pLPCX-m2 dio como resultado el plásmido pLPCX-m2-Ck.

Para construir un vector de expresión de cadena pesada IgkL humana completo, se insertó una región codificante Vk humana de un anticuerpo completamente humano identificado previamente, específico para la NIP-ovoalbúmina, se insertó en la construcción pLPCX-m2-Ck como un fragmento HindIII-Eco47III (Fig. 6c). En la Sec-ID14 se proporciona la región de codificación Vk para el anticuerpo humano específico NIP-ovoalbúmina incluida la secuencia líder y los sitios de clonación 5'-HindIII y 3'Eco47III. Cabe señalar que se agregaron dos nucleótidos C adicionales secuencia arriba de la ATG de partida para mejorar la traducción (aproximación de una secuencia de consenso Kozak):

Sec-ID14: 5'-

AAGCTTCCATGGATATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGGTGCCAGATG
 TGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGG
 CAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATG
 CTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACCTCACC
 ATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGCAACTTACTACTGTcAACAGAGTTACAGTACCCCCACTTTCGGCCAA
 GGGACCAAGGTGGAAATCAAGCGCT-3'

En la Sec-ID14, los sitios de restricción HindIII y Eco47III para la clonación están subrayados. La ATG de inicio de la secuencia líder comienza en la posición 9. La inserción de este fragmento HindIII-Eco47III en el pLPCX-m2-Ck alineado con HindIII-Eco47III dio como resultado la construcción de expresión pLPCX-m2-VkCk (Fig. 6c).

Aunque este vector de expresión retroviral de cadena ligera κ es suficiente para realizar la invención y llevar a cabo la *retrocyte display* después de la coexpresión con vectores de expresión retroviral de la cadena pesada Ig, se clonaron vectores adicionales que contenían los elementos kiE y 3'kE, siguiendo la misma estrategia de clonación que para las construcciones de expresión de la cadena pesada Ig. Así, se insertó el kiE murino en el sitio único BglII en pLPCX-m2-Vk-Ck, secuencia arriba del promotor CMV, sea como un fragmento genómico PCR digerido por BamHI de ca. 2,3 kb y amplificado con el par de cebadores Sec-ID5 y Sec-ID6 (ver descripción anterior), o como un fragmento genómico PCR digerido por BamHI de ca. 0,8 kb y amplificado con el par de cebadores Sec-ID8 y Sec-ID9 (ver descripción anterior). En la presente, solo se representa la clonación en el pLPCX-m2-VkCk del fragmento de ca. 2,3 kb que contiene el kiE murino, que da como resultado el plásmido pLPCX-m2-VkCk-kiE (Fig. 6d).

Finalmente, y de manera análoga a la construcción kiE y 3'kE que contiene los vectores de expresión retroviral de la cadena IgH descrita en el Ejemplo 1a anterior, se insertó el 3'kE murino como un fragmento genómico PCR digerido con ClaI amplificado con el par de cebadores Sec-ID10 y Sec-ID11 en el sitio de restricción ClaI único secuencia abajo de la región codificante de cadena ligera κ para generar el vector de expresión retroviral pLPCX-m2-Vk-Ck-kiE-3'kE (Fig. 6d).

Como el vector de expresión de la cadena IgH que contiene los elementos kiE y 3'kE, este vector contiene ahora todos los elementos cis-regulatorios necesarios para conferir hipermutación somática a cualquier región codificante Vk clonada en la construcción (ver más adelante).

EJEMPLO 2

Generación de una línea celular que sobreexpresa la desaminasa de citidina inducida por activación (AID)

Se ha demostrado que la desaminasa de citidina inducida por activación (AID), proteína específica de los linfocitos B, es un factor *transactivador* único necesario y suficiente para conferir un fenotipo de hipermutación somática a cualquier línea celular de vertebrado. En las células que expresan la AID, la hipermutación somática se puede dirigir específicamente a los locus génicos transcripcionalmente activos, si están ordenados en el contexto correcto en relación a los potenciadores cis-regulatorios, en particular los elementos kiE y 3'kE del locus de la cadena ligera κ de la inmunoglobulina. Para obtener líneas celulares que expresan establemente la AID, primero se realizó una construcción de expresión retroviral que codifica la AID murina, de la siguiente manera:

El ADNc AID murino se amplificó por PCR usando Pfx-polimerasa de alta fidelidad (Invitrogen, Carlsbad, CA) de ADNc de bazo de ratón según las instrucciones del fabricante, usando los cebadores PCR directos e inversos Sec-ID15 y Sec-ID16, que contenían sitios de clonación XhoI adicionales para ligar el fragmento amplificado por PCR con vectores compatibles. Además, el cebador directo contenía dos nucleótidos C adicionales (en cursiva) secuencia abajo del sitio XhoI y secuencia arriba del codón de iniciación ATG del ORF de la AID murina, para aproximar una secuencia de iniciación de traducción Kozak y garantizar así la traducción apropiada del ADNc clonado.

Sec-ID15: 5'-AATACTCGAGCCATGGACAGCCTTCTGATGAAGCAAAAG-3'
XhoI

5 Sec-ID16: 5'-AATACTCGAGTCAAAATCCCAACATACGAAATGCATC-3'
XhoI

10 El producto de RT-PCR de 620 bp resultante se digirió con XhoI y se ligó en el pLPCX digerido con XhoI y tratado con fosfatasa alcalina, de BD-Clontech (Mountain View, CA). Los productos de unión que contienen el inserto en la orientación correcta se determinaron mediante prueba diagnóstica de digestión con enzima de restricción. Un clon con el patrón de enzima de restricción correcto que contenía el inserto de ADNc AID murino en la orientación correcta se verificó mediante secuenciación de ADN y se denominó pLPCX-mAID (Fig. 7).

15 La secuencia de ADNc AID murino clonada se correspondió exactamente con el ORF ADNc AID proporcionado por NCBI-Genbank número de registro AF132979.

20 Luego, se transfectaron 10µg de construcción pLPCX-mAID alineada con PvuI en 5x10⁶ linfocitos preB transformados con Abelson FA-12 resuspendidos en 800µl de medio RPMI mediante electroporación a 300V, 960µF, a temperatura ambiente. Las células transfectadas se resuspendieron en 20ml de medio de histocultivo que contenía FCS y se colocaron en diez placas de 96 pocillos a 200µl/pocillo. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se seleccionaron las células establemente tranfectadas agregando 2µg/ml de antibiótico puomicina en el medio de histocultivo.

25 Después de 10-14 días, se detectaron docenas de colonias resistentes a la puomicina y los clones seleccionados se transfirieron a medio de histocultivo fresco que contenía 2µg/ml de puomicina. Los clones resistentes a la puomicina se dejaron crecer y proliferar más y se analizó un número determinado de clones para determinar la expresión de la proteína AID murina mediante inmunotransferencia ECL usando un anticuerpo contra la AID murina recomendado por el fabricante (ver Fig. 9a).

30 Se detectó una banda de proteína AID específica en aprox. 80% de los clones celulares FA-12-AID transfectados analizados, que mostraron tener un peso molecular aparente de 25kD, como se esperaba. De esto se concluyó que se obtuvieron varias líneas celulares sobreexpresando constitutivamente la proteína AID murina.

EJEMPLO 3

35 **Demostración de hipermutación somática dirigida a un gen indicador en construcciones de expresión retroviral de inmunoglobulina humana que contienen elementos κ E y $3'\kappa$ E cis-regulatorios.**

40 Luego se demostró que las regiones variables de los anticuerpos humanos en construcciones de expresión retroviral, como se revela en esta invención, son blancos para la hipermutación somática mediada por AID. Para ello, se generó una construcción indicadora en donde el ORF de la región V de una cadena IgH humana se reemplazó con una EGFP ORF mutada en donde se había introducido un codón de terminación en el contexto de un motivo secuencial RGYW que se sabe es muy susceptible a sufrir hipermutación somática (Bachl & Olsson, 1999).

45 La mutación de terminación se introdujo en el codón 107 de la EGFP ORF cambiando un codón de tirosina a un codón de terminación TAG. Además, se modificó el codón 108 lo que generó un nuevo sitio de restricción SpeI de diagnóstico dentro de la secuencia EGFP mutada, de forma tal que ante la reversión de la mutación de terminación en el codón 107, el sitio SpeI es destruido, lo que facilita la identificación y caracterización de los revertientes. La modificación de secuencia introducida en la EGFP ORF se representa en la Fig. 10a; la EGFP ORF mutada completa se representa en la Fig. 10b.

50 La construcción indicadora para demostrar la hipermutación somática se construyó de la siguiente manera:

55 La EGFP ORF se amplificó por PCR usando el plásmido pIRES-EGFP (BD-Clontech, Mountain View, CA) como plantilla con Pfx-Polimerasa de alta fidelidad (Invitrogen, Carlsbad, CA) y los cebadores directos Sec-ID17 y Sec-ID18, que contenían cada uno, sitios de restricción HindIII y Eco47III adicionales que permitían reemplazar la región V_H del pLHCxm1-VHCy-s- κ E-3' κ E con una EGFP ORF. El cebador directo contenía dos nucleótidos C adicionales secuencia arriba del codón de iniciación ATG, en cursiva, que aproxima una secuencia consenso de inicio de traducción Kozak y garantiza un inicio de traducción adecuada en el codón de iniciación ATG correcto.

60 Sec-ID17: 5'-CGCAAGCTTCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC-3'
HindIII

65 Sec-ID18: 5'-TAGAGCGCTCTTGACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTG-3'
Eco47III

El fragmento EGFP PCR amplificado con Pfx de 737 bp se clonó directamente en el vector pCR4-Topo que es parte de un equipo de clonación PCR Zero-Blunt (Invitrogen, Carlsbad, CA), lo que dio como resultado el vector pCR4-Topo-EGFP (Fig. 11). Luego, se mutó un clon de secuencia verificada del pCR4-Topo-EGFP en los codones 107 y 108 de la EGFP ORF como se ilustra en la Fig. 10, usando un equipo Quikchange™ (Stratagene, La Jolla, CA) según las indicaciones del fabricante y pares de cebadores específicos para las mutaciones deseadas, con lo que se generó el plásmido pCR4-Topo-EGFPmut.

La EGFP ORF de secuencia verificada del pCR4-Topo-EGFPmut se recuperó a partir del plásmido mediante digestión doble con enzima de restricción usando las enzimas de restricción HindIII y Eco47III. El fragmento digerido se ligó en el plásmido pLHCXm1-VHCy-s-kiE-3'kE doblemente digerido con HindIII y Eco47III (Fig. 5e) y en el plásmido pLHCXm1-VHCy-s doblemente digerido con HindIII y Eco47III (Fig. 5c), que no contenían potenciadores. Luego, en ambos vectores se reemplazaron las regiones codificantes V_H con la EGFP ORF mutada, que se fusionaron en el mismo marco a las regiones Cy₁, lo que dio como resultado al plásmido indicador pLHCXm1-E(mut)-Cy-s-kiE-3'kE y el plásmido de control pLHCXm1-E(mut)-Cy-s (Fig. 11).

Los dos plásmidos se transdujeron en los clones transfectados FA-12 AID resistentes a la puomicina 3 (que expresa la AID) y 5 (que no expresa la AID) como control. Las células transducidas se cultivaron en higromicina B 2mg/ml 24 horas después de la transducción y se analizaron para detectar la presencia de células autofluorescentes verdes después de 6, 8 y 10 días de histocultivo. Solo en el experimento, en que se expresó una construcción indicadora EGFP mutada en el contexto con kiE y 3'kE (es decir, usando el plásmido pLHCXm1-E(mut)-Cy-s-kiE-3'kE) y en el clon transfectado FA-12 AID, en el cual la expresión de la AID se detectó mediante inmunotransferencia (es decir, clon transfectado FA-12 AID 3), se pudieron detectar células autofluorescentes verdes después de 6, 8 y 10 días de histocultivo, cuando se pudo detectó mediante FACS una frecuencia de estado estable de ca. 0,2% (Fig. 9b) de células verdes. En ninguno de los experimentos de control (AID no expresada, y/o sin potenciadores en las construcciones, no se muestran datos) se pudo detectar células verdes dentro de los 10 días que duró el experimento.

Del 0,2% EGFP de población positiva, se colocaron 192 células en pocillos individuales en placas de 96 pocillos, y se analizaron 100 de esos clones mediante FACS para detectar fluorescencia verde después de permitir la proliferación de células suficientes. De los 100 clones analizados, 95 mostraron un patrón de fluorescencia homogéneo, similar en intensidad al detectado para las células seleccionadas por separación de una sola célula, es decir, a fluorescencia ca. 10^2 log (autofluorescencia de células de control FA-12 permaneció por debajo de 10^1 log, indicado por línea de umbral). Cuatro clones exhibieron un patrón de fluorescencia heterogéneo con aprox. la mitad de las células negativas y la mitad positivas para la expresión de EGFP. Solo uno de los 100 clones analizados tuvo una fluorescencia EGFP casi indetectable aunque este clon estuvo también casi por encima de los niveles de autofluorescencia de fondo. El patrón EGFP negativo y heterogéneo que exhibieron cinco clones pudo deberse al silenciamiento posicional (parcial) de la expresión EGFP de los integrantes retrovirales, o pudo deberse a las herramientas de separación de una sola célula. Sin embargo, en la mayoría de los clones (95%), se detectó claramente la expresión EGFP. Veinticuatro de esos clones se analizaron mediante PCR utilizando los cebadores Sec-ID17 y Sec-ID18 para reamplificar el gen EGFP a partir de las células establemente transducidas.

A diferencia de un producto PCR de un vector indicador que contenía la EGFP ORF mutada, ninguno de los 24 productos PCR obtenidos a partir de los clones que expresan la EGFP, pudo digerirse con la enzima de restricción SpeI, lo que sugiere una reversión de la mutación de terminación en el codón 107 de la EGFP ORF mutada (no se muestran datos).

Se analizaron 10 de los productos PCR para determinar la secuencia de ADN, y se confirmó que todos esos 10 clones contenían la mutación G->C del nucleótido G en el motivo RGYW introducido en la EGFP ORF, como se describió anteriormente en la literatura (Bachl & Olsson, 1999).

Esto demuestra que, en función de la presencia de elementos genéticos cis-regulatorios, como elementos kiE y 3'kE, y de la expresión de AID, se pueden lograr niveles elevados de mutación somática, y por lo tanto, de mutagénesis, en las regiones de ADN secuencia abajo de un promotor activo, y por lo tanto, en las regiones codificantes V_H de las cadenas de anticuerpos humanos en el contexto de las construcciones de expresión retroviral reveladas.

En cuanto a estimar el grado de mutación somática dependiente de la AID en las construcciones kiE y 3'kE, la frecuencia de mutación estuvo en aproximadamente 3×10^{-5} mutaciones/bp/generación. Este valor está por debajo de las frecuencias de hipermutación somática registradas *in vivo*, las que pueden alcanzar frecuencias de hasta 10^{-4} e incluso 10^{-3} /bp/generación. Sin embargo, la frecuencia de mutación detectada fue significativamente más alta que la frecuencia de mutación de fondo informada en células de vertebrados, la que se estima ronda las 10^{-8} mutaciones/bp/generación. Por lo tanto, se concluye que las altas frecuencias de mutaciones somáticas se centran específicamente en las regiones frecuencia abajo de un promotor activo en las construcciones retrovirales reveladas en forma dependiente de un potenciador y la AID, lo que permite aplicar la tecnología Retrocyte Display en condiciones mutagenizantes *in vivo* basándose en la hipermutación somática mediada por la expresión de la AID.

EJEMPLO 4**Demostración de generación *in situ* de regiones codificantes de anticuerpos humanos usando vectores de expresión retrovirales adecuados para la recombinación V(D)J**

- 5 a) Clonación de un vector de expresión de cadena pesada humana (IgH) retroviral que requiere recombinación V(D)J antes de la expresión de la cadena IgH

10 Como enfoque alternativo a la expresión retroviral de cadenas pesadas (H) y ligeras (L) de los vectores de expresión ADNc descritos en el Ejemplo 1, se construyó una clase de vector de cadena IgH retroviral diferente en donde la región codificante variable está codificada por segmentos V, D y J separados en una configuración "cuasi línea germinal" que es necesario ensamblar mediante un proceso de recombinación V(D)J antes de la expresión. La recombinación V(D)J interviene en el ensamblaje de los segmentos génicos V, D y J de forma específica para el sitio pero ligeramente imprecisa de forma tal que se pueden generar diferentes regiones codificantes a partir de una sola construcción de expresión mediante la transducción en células activas en recombinación V(D)J *in situ*, como por ej.,

15 linfocitos B precursores.

20 Para este ejemplo, se clonaron individualmente por PCR los segmentos génicos V_H3.30, D_H1.26 y J_H3 a partir de ADN genómico derivado de células mononucleares de sangre periférica humana pobre en linfocitos B (PBMC). Los cebadores PCR usados para la amplificación de los segmentos génicos V, D y J de la línea germinal se eligieron de forma tal que incluyeran las secuencias flanqueadoras de ADN que comprendían secuencias señal de recombinación (RSS) conservadas y secuencias de ADN intervinientes adicionales para obtener un ensamblaje apropiado de los segmentos V, D y J. Todos los amplicones PCR se generaron utilizando ADN-polimerasa Pfx termoestable (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se subclonaron inicialmente en un vector de clonación pSC-B PCR (Stratagene, La Jolla, CA), en ambos casos de conformidad con las instrucciones de los proveedores. Los

25 fragmentos PCR, subclonados en el pSC-B, se verificaron por secuenciación de ADN y los fragmentos se utilizaron para etapas posteriores de clonación solo si se había verificado la secuencia de ADN.

30 Para la amplificación PCR de un fragmento V_H3.30 humano de línea germinal, se usaron los cebadores Sec-ID19 y Sec-ID20 que contenían los sitios de restricción BamHI y NheI (de la manera indicada) lo que permitió la subsiguiente clonación de los fragmentos de ADN clonados por PCR.

Sec-ID19: 5'-ATTTGGATCCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCG-3'
BamHI

35 Sec-ID20: 5'-CCCGCTAGCTCCTGACAGGAAACAGCCTCCATCTGCACCT-3'
NheI

De esta manera, se obtuvo un amplicón PCR de 623bp de longitud que contenía el segmento génico VH3.30 con ADN flanqueante (Sec-ID21), ver Fig. 11a.

40 Sec-ID21:
5'-atttGGATCCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGATTCATGGAGAA
ATAGAGAGACTGAGTGTGAGTGAACATGAGTGAGAAAACTGGATTTGTGTGGCATTCTTGATAACGGTGTCTCT
TCTGTTTGCAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTC
45 CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAG
GCAAGGGGCTAGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC
CGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACAC
GGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGACACAGTGAGGGGAAGTCATTGTGCGCCAGACACAAACCTCCCTGCAGG
AACGCTGGGGGGAAATCAGCGGCAGGGGGCGCTCAGGAGCCACTGATCAGAGTCAGCCCTGGAGGCAGGTGC
50 AGATGGAGGCTGTTTCCTGTGTCAGGAGGCTAGCggg3'

Luego, se amplificó por PCR un fragmento de ADN genómico humano que contenía el fragmento DH1.26 humano con ADN genómico flanqueante, usando el par de cebadores Sec-ID22 y Sec-ID23 con sitios de restricción para las enzimas de restricción NheI y XhoI, respectivamente (Fig. 11a).

55 Sec-ID22: 5'-GGAGCTAGCGGGCTGCCAGTCCTCACCCACACCTAAGGT-3'
NheI

60 Sec-ID23: 5'-GGGCTCGAGTCCTCACCATCCAATGGGGACACTGTGGAGC-3'
XhoI

De esta manera, se obtuvo un amplicón PCR de 336bp de longitud que contenía el segmento génico DH1.26 con ADN flanqueante (Sec-ID24).

65 Sec-ID24:

5'gga**GCTAGC**GGGCTGCCAGTCTCACCCACACCTAAGGTGAGCCACAGCCGCCAGAGCCTCCACAGGAGAC
 CCCACCCAGCAGCCCAGCCCCTACCCAGGAGGCCCCAGAGCTCAGGGCGCCTGGGTGGATTCTGAACAGCCC
 CGAGTCACGGTGGGTATAGTGGGAGCTACTACCACTGTGAGAAAAGCTATGTCCAAAAGTCTCTCCCGCCACT
 GCTGGAGGCCAGCCAGAGAAGGGACCAGCCGCCGAACATACGACCTTCCAGACCTCATGACCCCCAGCA
 CTTGGAGCTCCACAGTGTCCCCATTGGATGGTGAGGA**CTCGAG**ccc3'

Por último, se amplificó por PCR un fragmento de ADN genómico humano que contenía el fragmento JH3 humano con ADN genómico flanqueante, usando el par de cebadores Sec-ID25 y Sec-ID26 con sitios de restricción para las enzimas de restricción Sall y XbaI/HindIII, respectivamente, como se indica (Fig. 11a).

Sec-ID25: 5'-GGAG**GCTCGAC**CCCTGCCTGGGTCTCAGCCCCGGGGTCTGTG-3'
 Sall

Sec-ID26: 5'-TATAT**TCTAGA**ATAT**AAGCTT**AGCCATCTTACCTGAAGAGACGGTGACC-3'
 XbaI HindIII

De esta manera, se obtuvo un amplicón PCR de 239bp de longitud que contenía el segmento génico JH3 con ADN flanqueante (Sec-ID27).

Sec-ID27:

5'gga**GCTCGAC**CCCTGCCTGGGTCTCAGCCCCGGGGTCTGTGTGGCTGGGGACAGGGACGCCGGCTGCCTCTG
 CTCTGTGCTTGGCCATGTGACCCATTCGAGTGTCTGCACGGGCACAGTTTGTGTCTGGGCAGGAACAGGG
 ACTGTGTCCTTGTGTGATGCTTTTGTATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGGTAAGATGGC
 T**AAGCTT**atat**TCTAGA**tata3'

Los tres fragmentos de ADN Sec-ID21, Sec-ID24 y Sec-ID27 se habían clonado secuencialmente en un vector versátil que contenía los sitios de restricción BamHI, NheI, XhoI y XbaI, de forma tal de poder ensamblar un casete con los segmentos génicos VH3.30, DH1.26 y JH3 mediante ligadura secuencial de los fragmentos de ADN por medio de los sitios de restricción compatibles. El fragmento Sec-ID21 se ligó como un fragmento BamHI-NheI en el vector versátil alineado con BamHI-NheI, luego el segmento Sec-ID24 digerido con NheI-XhoI se ligó en el vector versátil alineado con NheI-XhoI, que ya contenía el fragmento Sec-ID21, y por último, el fragmento Sec-ID27 digerido con Sall-XbaI se ligó en el vector versátil alineado con XhoI-XbaI que ya contenía los segmentos Sec-ID21 y Sec-ID24 clonados, con lo que se generó un casete VH3.30- DH1.26-JH3 artificial en un vector versátil (Fig. 11a).

Luego, todo el casete "cuasi línea germinal" con los segmentos génicos VH3.30, DH1.26 y JH3 ensamblados artificialmente se clonó en el vector retroviral MigR1 (Pear *et al.* 1998) que ya contenía la región codificante para una cadena μ H humana (Sec-ID28, ver más adelante) clonado en los sitios de restricción BglII y HpaI del vector MigR1 (construcción MigR1- μ H, Fig. 11b). Se pudo usar un sitio XhoI que separaba la región codificante VH de la región codificante de la cadena μ H constante en MigR1- μ H (en negrita, a mitad de Sec-ID28) para ligar en el mismo marco el casete VH3.30- DH1.26-JH3 a la región codificante de la cadena μ H constante, sin afectar la secuencia de aminoácidos en la transición de JH a región codificante constante.

Sec-ID28:

5'**AGATCT**ACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTTGTTGCGATTTTGAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGC
 AGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCCGGCAGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCGGCCTCTGGATT
 CACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAATGGGTCTCAGCTATCA
 CTTGGAATAGTGGTCACATAGACTATGCGGACTCTGTGGAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG
 AACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGATACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGTCTCGTAC
 CTTAGCACCGCGTCTCTCCCTTGAATTTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACCGT**CTCGAG**CGCTAGTGCATCCG
 CCCCCAACCTTTTCCCCCTCGTCTCCTGTGAGAATTTCCCGTCCGATACGAGCAGCGTGGCCGTTGGCTGCCTC
 GCACAGGACTTCTTTCCCGACTCCATCACTTTCTCCTGGAAATACAAGAACAACCTTGACATCAGCAGCACCCG
 GGGCTTCCCATCAGTCTGTAGAGGGGGCAAGTACGACGCCACCTCACAGGTGCTGCTGCCTTCCAAGGACGTC
 ATGCAGGGCACAGACGAACACGTGGTGTGCAAAGTCCAGCACCCCAACGGCAACAAGAAAAGAACGTGCCTC
 TTCCAGTGATTGCCGAGCTGCCTCCCAAGTGAGCGTCTTCGTCCACCCCGGACGCGCTTCTTCGGCAACCC
 CCGCAAGTCCAAGCTCATCTGCCAGGCCACGGTTTCAGTCCCGGCAGATTACAGGTGTCTGGCTGCGCGAG
 GGAAGCAGGTGGGGTCTGGCGTACCCACGGACAGGTGCAGGCTGAGGCCAAAGAGTCTGGGCCCCACGACC
 TACAAGGTGACCAGCACACTGACCATCAAAGAGCGCACTGGCTCAGCCAGAGCATGTTACCTGCCGCGTGG
 ATCCAGAGGGCCTGACCTTCCAGCAGATGCGTCTCCTCATGTGTGTCCCGATCAAGACACAGCCATCCGGGT
 CTTCCGATCCCGCCATCCTTTGCCAGCATCTTCTCCACCAAGTCCACCAAGTTGACCTGGTGCATCAGACCC
 TGACCACCTATGACAGCGTGACCATCTCCTGGACCCGCCAGAATGGCGAAGCTGTGAAAACCCACACCAACATC
 TCCGAGAGCCACCCCAATGCCACTTTCAGCGCCGTGGGTGAGGCCAGCATCTGCGAGGATGACTGGAATTCCG
 GGGAGAGGTTACGTGCACCGTGACCCACACAGACCTGCCCTCGCCACTGAAGCAGACCATCTCCCGGCCCAA
 GGGGGTGGCCCTGCACAGGCCCGATGTCTACTTGCTGCCACAGCCCGGGAGCAGCTGAACCTGCGGGAGTC
 GGCCACCATCACGTGCCTGGTGACGGGCTTCTCTCCCGCGGACGTCTTCGTGCAGTGGATGCAGAGGGGGCA
 GCCCTGTCCCGGAGAAGTATGTGACCAAGCCCAATGCCTGAGCCCCAGGCCCGGACGCTTCTTCG
 CCACAGCTCCTGACCGTGTCCGAAGAGGAATGGAACACAGCGGGGAGACCTACACCTGCGTGGTGGCCCATGA
 GGCCCTGCCCAACAGGGTCACCGAGAGGACCGTGGACAAGTCCACCGAGGGGGAGGTGAGCGCCGACGAGG

AGGGCTTTGAGAACCTGTGGGCCACCGCCTCCACCTTCATCGTCCTCTTCCTCCTGAGCCTCTTCTACAGTACC
ACCGTCACCTGTTC AAGGTGAAATGAGCGGCCGCTTTACGC GTTAAC3'

Los sitios de restricción BglII-HpaI en los extremos 5' y 3' del inserto, respectivamente, también están subrayados y en negrita, e indican la transición al esqueleto del vector MigR1 (Pear *et al.* 1998).

Para reemplazar la región codificante de V en la Sec-ID28 del esqueleto retroviral MigR1 con el casete "cuasi línea germinal" VH3.30-DH1.26-JH3, fue necesario amplificar nuevamente por PCR el fragmento VH3.30-DH1.26-JH3 de aprox. 1,1kb usando un cebador directo Sec-ID29 con BglII y un cebador inverso Sec-ID30 con XhoI (Fig. 11a).

Sec-ID29: 5'-GAAGATCTCACCATGGAGTTTG-3'
BglII

Sec-ID30: 5'-ATCTTACCTCTCGAGACGGTGA-3'
XhoI

El fragmento resultante de aprox. 1,1kb se digirió con BglII y XhoI y se ligó en la cadena μ H alineada con BglII-XhoI que contenía el vector MigR1, lo que dio como resultado el vector de expresión retroviral pVDJ- μ H-MigR1, apto para la recombinación V-D-J (Fig. 11b).

b) Demostración de recombinación V(D)J bona fide en vectores V-D-J retrovirales, que genera secuencias diversas mediante transducción en linfocitos B precursores.

Para demostrar que puede haber recombinación V(D)J adecuada en vectores retrovirales que contienen segmentos génicos V, D y J en una configuración "cuasi línea germinal", se sometió a transducción el vector pVDJ- μ H-MigR1 en la línea celular pre-B 230-238 transformada con A-MuLV, conjuntamente con un vector de expresión de cadena IgL retroviral, como se describe en el Ejemplo 1b. Solo si tiene lugar un evento de recombinación V(D)J en la construcción pVDJ- μ H-MigR1 que resulte en la reordenación de los segmentos génicos V, D y J conservando el mismo marco, se puede expresar un anticuerpo IgM humano de cadena total en la superficie celular de células doblemente transducidas. La eficiencia de transducción del vector pVDJ- μ H-MigR1 se puede controlar mediante la coexpresión del gen marcador EGFP unido a IRES. Como se puede apreciar en la Fig. 12(a), solo una población muy pequeña (0,04%) de las células transducidas, por lo menos, con la construcción pVDJ- μ H-MigR1 (eficiencia de la transducción: 44,7%) exhibió expresión de IgM en la superficie celular detectable, medida por FACS con un anticuerpo contra la cadena ligera kappa. Notablemente, prácticamente no se detectaron células que expresaran la IgM en la población de células no transducidas con la construcción pVDJ- μ H-MigR1 (cuadrante inferior derecho de la Fig. 12(a)), lo que demuestra la especificidad de la tinción.

Las escasas células que expresan la IgM detectables en el cuadrante superior derecho de la Fig. 12(a) se separaron mediante separación celular preparativa usando un separador celular de alta velocidad FACS-Aria (BD, Franklin Lakes, NJ) y se expandieron en histocultivo celular durante 8 días para caracterizar los integrantes retrovirales. Los datos de la FACS para la expresión de la EGFP (indicativa de la construcción pVDJ- μ H-MigR1 integradora) e IgM de superficie después de 8 días de expansión mostraron posiblemente pocas células expandidas clonalmente que exhibieran IgM en la superficie celular y contuvieran la construcción pVDJ- μ H-MigR1 (según datos medidos por fluorescencia verde, Fig. 12(b)). Las poblaciones celulares que se destacan en el área superior derecha del diagrama FACS de la Fig. 12(b) se separaron y se preparó ADN genómico a partir de poblaciones celulares agrupadas.

Se analizó el ADN genómico mediante PCR de diagnóstico usando cebadores que se unían a la construcción pVDJ- μ H-MigR1 secuencia arriba de la región VH y secuencia abajo de la región JH. Como se esperaba, la PCR de diagnóstico dio como resultado dos bandas separadas con casi la misma intensidad, indicativo de segmentos génicos V, D y J no reordenados (fragmento de aprox. 1,2 kb) y un fragmento más pequeño, de aprox. 0,5kb indicativo de segmentos génicos recombinados V(D)J (no se muestran datos). La secuenciación de la banda PCR más larga confirmó que este amplicón PCR representaba el casete V-D-J no reordenado, todavía en configuración "cuasi línea germinal". Estas construcciones no reordenadas igual eran detectables en las células IgM positivas si se habían transducido las células con más de una construcción, de los cuales no todos podrían resultar accesibles para la recombinación V(D)J. El amplicón PCR más pequeño no dio como resultado una secuencia distintiva cuando se secuenció el producto PCR y fue necesario subclonarlo en el vector de clonación PCR pSC-B para analizar las secuencias de los fragmentos PCR individuales.

De 6 plásmidos analizados, 2 contenían secuencias de recombinación V(D)J *bona-fide* idénticas que mostraban todas las características típicas del acoplamiento de segmentos génicos V, D y J por recombinación V(D)J, inclusive pérdida de nucleótido en las regiones codificantes y adición de secuencias no codificadas (regiones N) catalizadas por la enzima específica del linfocito precursor desoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT) (Fig. 12(b)).

Las dos secuencias recuperadas, representadas por la secuencia del clon 225 (Fig. 12b), ya son prueba suficiente de la capacidad de los vectores de expresión retroviral que contienen los segmentos génicos V, D y J para sufrir

recombinación V(D)J en los linfocitos B precursores, puesto que no hay otra explicación de cómo estas secuencias, que muestran todos los signos de un acontecimiento de recombinación V(D)J *bona fide*, podrían haberse generado de otra manera, incluso si en este punto la eficiencia parece baja. Se concluye que con el aumento de la eficiencia de la recombinación V(D)J en el contexto de la transducción retroviral de los linfocitos precursores, se puede generar una colección diversa de secuencias de anticuerpos a partir de un número limitado de vectores retrovirales que contienen los segmentos génicos V, D y J en una configuración "cuasi línea germinal".

EJEMPLO 5

Identificación y caracterización de líneas celulares de linfocitos B murinos selectores apropiados para Retrocyte Display

a) La expresión de anticuerpos endógenos en líneas de linfocitos B puede obstaculizar potencialmente su utilidad como células selectoras en técnicas de *retrocyte display*, dado que el apareamiento de cadenas de inmunoglobulina murina endógena con cadenas de anticuerpo recombinados puede afectar negativamente su expresión en la superficie celular o puede resultar en la expresión de inmunoglobulinas humanas-murinas mixtas con especificidades de unión indefinibles. Por lo tanto, se estudió una línea de linfocitos pre-B murinos transformados con el virus de la leucemia murina de Abelson (A-MuLV) descrita en la literatura, para analizar la expresión intracelular de las cadenas pesadas (μ H) de la IgM endógena, usando anticuerpos contra la cadena pesada de IgM de murina unida a FITC (Southern Biotech). Estas células incluyeron las células de las líneas 40E1, 230-238, 204-1-8 (Alt *et al.*, 1981), 18-81, 18-81 subclón 8-11 (Rosenberg & Baltimore 1978), 63-12 (denominada aquí FA-12) de ratones deficientes en RAG-2 (Sinkai *et al.*, 1992), y 1624-5, 1624-6 de ratones con tres genes de cadena ligera sustituta inactivados (Shimizu *et al.*, 2002). Las células se permeabilizaron usando el equipo Fix/Perm (Caltech) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como se muestra en la Fig. 14, las líneas celulares FA-12, 40E1 y 18-81 subclón 8-11, 1624-5 y 1624-6, mostraron una señal mínima o ninguna señal para la tinción de IgM intracelular que las califique como células selectoras apropiadas para Retrocyte Display.

b) Como la Retrocyte Display está basada en la transferencia génica mediada por un vector retroviral, el grupo de líneas celulares pre-B murinas transformadas con A-MuLV se examinó para determinar su susceptibilidad a la transducción retroviral utilizando partículas de un vector derivado con MLV ecotrópico que contenían un gen marcador de proteína fluorescente verde (GFP) (Fig. 13). Se transdujeron 1×10^5 células a una MOI de 0,5 utilizando un preparado de vector que empaquetaba el vector de transferencia LEGFP-N1 que incluía el gen indicador GFP (Clontech) previamente valorado en células preB 8-11 subclón 18-81 mediante dilución limitada. Las partículas de vector se generaron como se describe a continuación. La transducción se llevó a cabo mediante infección con centrifugado en tubos Eppendorf de 1,5 ml a 3.300 rpm y 30°C durante 3 horas. Dos días después de la transducción, se analizó la transferencia de genes determinado la frecuencia de células que expresaban el GFP mediante análisis FACS. Para los controles negativos se utilizaron células objetivo sin tratar. Como se ilustra en la Fig. 13, solo las células 18-81 originales mostraron una permisividad muy baja a la transducción con el vector MLV (<10%). Otras líneas celulares revelaron eficiencias de transferencia génica $\geq 40\%$. Las células de las líneas FA-12, 40E1 y 1624-5 tuvieron una eficiencia de transferencia génica máxima y llegaron a >50 % en este experimento.

Se encontró que las células FA12, 40E1 y 1624-5 tomadas en conjunto eran las más adecuadas para la Retrocyte Display considerando ambos criterios: a) baja o ninguna expresión de inmunoglobulina murina endógena, y b) susceptibilidad a la transducción retroviral. Sin embargo, como se desea expresar inmunoglobulinas compuestas de cadenas ligeras y pesada, también se prefieren linfocitos B que carezcan de expresión de componentes de cadena ligera sustituta (expresable de genes $\lambda 5$ o VpreB1 o Vpre) ya que éstos también pueden competir por asociarse a la cadena pesada con las cadenas ligeras recombinadas en las células preB naturales. Por lo tanto, se espera que las células 1624-5 derivadas de ratones con tres genes inactivados de cadena ligera sustituta sean las células más apropiadas para continuar aplicando la tecnología *retrocyte display*. Sin embargo se comprenderá que para llevar a cabo el método revelado en la presente, se podrá usar cualquier otra línea celular, inclusive las líneas celulares adicionales analizadas en la presente, que satisfagan los criterios de no expresar la inmunoglobulina endógena, o expresarla en niveles bajos, y de una buena transducibilidad retroviral.

EJEMPLO 6

Generación de células selectoras que expresan estable y clonalmente colecciones de anticuerpos completamente humanos

Para generar partículas de vector que poseen vectores de transferencia empaquetados que codifican cadenas de anticuerpos completamente humanos y colecciones de estos, y su posterior uso para la transducción de líneas celulares de linfocitos B murinos, se realizaron experimentos de infección según el método siguiente. Se colocaron células embrionarias humanas 293T-HEK de riñón en placas, a razón de 2×10^6 células en 10 ml de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) enriquecido con suero bovino fetal (FCS) al 10% y L-glutamina por placa de histocultivo de 10cm, 16 a 24 horas antes de la transfección. Se prepararon mezclas de 5 μ g de los respectivos vectores de transferencia IgL(245)-LIB-IRES-YFP e IgH(650)-LIB-IRES-GFP (colecciones codificantes de cadenas pesadas y ligeras unidas a una construcción de expresión IRES a GFP o YFP, Fig. 15), 3 μ g de pVPack-GP (una construcción de expresión que incluye los genes *gag* y *pol* del MLV) y 2,5 μ g de pVPack-Eco (una construcción de expresión que incluye el gen *env* del MLV ecotrópico, ambos de STRATAGENE), se las incubó con 30 μ l de Fugene

(Roche) en 1ml de DMEM sin suero, y se dejaron reposar durante 15 a 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, la mezcla Eugene/ADN se agregó lentamente a las células 293T-HEK sembradas en las placas de 10cm. Se transfectaron vectores de transferencia codificantes de la cadena pesada y ligera en células de empaquetamiento transitorio separadas.

Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se recogieron de las células de empaquetamiento transitorio los sobrenadantes que contenían partículas del vector y se centrifugó a 3.000rpm para eliminar las células contaminantes. Se suspendieron $1,5 \times 10^6$ linfocitos B murinos 1624-5 en 1ml de medio enriquecido con diferentes cantidades de partículas de vector (dilución 1:1; 1:5; 1:20; 1:50; 1:100; 1:200) que empaquetaban las regiones codificantes de la cadena pesada o ligera de los anticuerpos. La transducción se llevó a cabo mediante centrifugado en tubos Eppendorf de 1,5ml a 3.300rpm y 30°C durante 3 horas. Los sobrenadantes que no se utilizaron se almacenaron a -80°C para usarlos más adelante. Para garantizar que se integraran al genoma de la célula anfitriona copias simples de los vectores de transferencia, las células que cuatro días después de la infección mostraran una eficiencia de transferencia de genes menor al 10% (detectada mediante la expresión de GFP o YFP) se enriquecieron usando FACS (Fig. 16). Las células se expandieron durante seis días y se sometieron a una segunda transducción utilizando partículas de vector previamente congeladas que tenían empaquetadas las regiones codificantes de cadena ligera de anticuerpos, a una dilución 1:5 como se describió anteriormente. Luego, las células GFP-positivas seleccionadas para la expresión de la cadena pesada se infectaron con partículas de vector que transducían la colección cadena-IRES-YFP y *vice versa* (Figs. 15 & 16). Cuatro días después de la infección, se enriquecieron las células transducidas exitosamente que expresaron el GFP y el YFP utilizando FACS. Aproximadamente 20% de las células mostraron expresión del GFP e YFP después de la segunda transducción. Para asegurarse de que solo tuviera lugar una integración vectorial por célula, se enriqueció aproximadamente un tercio de las poblaciones que revelaron una expresión baja o moderada del gen indicador transducido en la segunda ronda (aproximadamente 8%, ver Fig. 16).

EJEMPLO 7

Detección y enriquecimiento de células que expresan anticuerpos humanos reactivos al antígeno, mediante Retrocyte Display

a) Para preparar un experimento que validara la tecnología Retrocyte Display, se determinaron en primer lugar las condiciones de detección y tinción óptimas para los anticuerpos de unión IL-15 expresados retroviralmente en células selectoras. Se mezclaron linfocitos preB 1624-5 transformados con A-MuLV que coexpresaban una colección de cadenas IgL e IgH humanas, en una relación 2:1 con linfocitos preB 1624-5 transformados con A-MuLV que expresaban vectores de expresión retroviral que codificaban los anticuerpos humanos contra la IL-15 en la superficie celular. Las muestras celulares mezcladas se incubaron con diferentes concentraciones de IL-15 humana recombinada (0,1 a 2,5µg/ml) y diferentes concentraciones de un anticuerpo anti-hu-IL-15 policlonal biotinilado (1,0 y 3,0µg/ml), de la manera indicada, que se reveló con estreptavidina-ficoeritrina (strep-PE). Para diferenciar las células que expresaban los anticuerpos de las células que no expresaban la inmunoglobulina, se contratiñeron las muestras con un anticuerpo anti-hu-IgkL-APC. Como se puede apreciar en los dos cuadros superiores derechos de la Fig. 17, las células reactivas a la IL-15 se detectaron más eficientemente (20,1 y 20,4%) usando una combinación de 0,1 y 0,5µg/ml de IL-15 recombinada como reactivo primario y 3,0µg/ml del anticuerpo anti-hu-IL-15 biotinilado como reactivo de tinción secundario.

b) Luego, se llevó a cabo un experimento preliminar de eficacia en donde se agregó un anticuerpo de referencia específico para la IL-15 humana a un grupo de células que expresaban una colección diversa de anticuerpos humanos, y posteriormente se analizaron mediante FACS las células reactivas al antígeno. Para preparar este experimento, se tiñó una colección de anticuerpos expresados retroviralmente en células 1624-5 (ver Ejemplo 6) para detectar la expresión de Ig de superficie y la unión a la IL-15 (NC), conjuntamente con una línea celular 1624-5 que expresaba el anticuerpo de referencia específico para el antígeno contra la IL-15 humana (PC). Los análisis FACS en estas líneas celulares NC y PC se muestran en la Fig. 18, y demuestran la tinción específica para la IL-15 del anticuerpo de referencia contra la IL-15 experimentada en la superficie de las células PC. Para analizar si la línea celular que expresaba el anti-IL-15 Ab de referencia sigue siendo cuantitativamente detectable mediante FACS si las células PC se agregan a las células NC que expresan una colección aleatoria de anticuerpos humanos, se estudiaron diferentes diluciones de células PC en la colección NC mediante FACS para detectar la unión específica a la IL-15, usando las condiciones de tinción de IL-15 optimizadas determinadas anteriormente. El análisis por FACS de las células de control negativo reveló que solo una pequeña población mostraba actividad de unión a la IL-15. Por el contrario, más del 60% de la población de control positivo mostró unión a la IL-15. Después de mezclar ambas poblaciones anteriores en relaciones de 10, 12,5, 25, 37,5 y 50%, se observó una correlación entre los porcentajes de las células de control positivo mezcladas en el grupo de células de la colección de anticuerpos con la fracción de células que mostraban unión a la IL-15. Por lo tanto, se concluye que las células reactivas a la IL-15 pueden detectarse cuantitativamente mediante tinción FACS en mezclas con otras células que expresan anticuerpos no específicos.

c) A continuación, se llevó a cabo un experimento preliminar demostrativo en donde las células reactivas a la IL-15 se enriquecieron mediante Retrocyte Display. Para ello, se generó una colección diversa de anticuerpos humanos

expresados en linfocitos preB 1624-5 mediante transducción retroviral de una cadena IgH de IL-15 (unida a GFP) y cotransducción de una colección compleja (7×10^4) de cadenas IgkL humanas (unidas a YFP). De este modo, se creó una colección de anticuerpos Retrocyte Display barajando una colección diversa de cadenas IgkL humana contra una única cadena IgH de un anticuerpo humano específico contra la IL-15. Las células se tiñeron para detectar la reactividad a la IL-15 utilizando condiciones optimizadas como se describió anteriormente. Las células reactivas a la IL-15 se enriquecieron mediante tres rondas consecutivas de separación celular a alta velocidad seguido de expansión en histocultivo celular. Después de tres rondas de enriquecimiento por Retrocyte Display, se obtuvo una población de células que expresaban los anticuerpos humanos y que en esencia, se teñían cuantitativamente para el antígeno IL-15 a partir de una población de células donde las células reactivas a la IL-15 eran prácticamente indetectables (Fig. 19). Este experimento demostró que pueden usar rondas repetidas de Retrocyte Display para enriquecer eficientemente una población de células de unión a la IL-15.

d) Confirmación de la especificidad de unión a la IL-15 de clones celulares individuales establecidos a partir de una agrupación de células enriquecidas tres veces con IL-15 (ver ejemplo anterior). Luego, a partir de la agrupación de células que se sometió tres veces a enriquecimiento por Retrocyte Display específico para la IL-15, se establecieron 25 clones celulares individuales mediante separación de una sola célula. Estos 25 clones celulares se caracterizaron para su especificidad a la IL-15 mediante tinción con IL-15, usando las condiciones de tinción previamente optimizadas (ver Ejemplo 7^a). Como control para la especificidad de la tinción IL-15, todos los clones se incubaron también con todos los reactivos de tinción, salvo el antígeno IL-15. La mayoría de los 25 clones celulares mostraron un patrón de tinción muy específico para la IL-15 que se perdió cuando el antígeno IL-15 se dejó fuera de la reacción de tinción. En la Fig. 19 se muestran resultados representativos de tinción específica para la IL-15 en 4 clones celulares individuales seleccionados. Las tinciones para estos clones son representativas de todos los 25 clones celulares (nombrados en orden alfabético de la A a la Y) establecidos a partir de una población celular enriquecida 3 veces con antígeno IL-15, todos los cuales arrojaron resultados positivos para la unión al antígeno IL-15. Los controles positivos y negativos para la especificidad de tinción se muestran en la Fig. 19.

EJEMPLO 8

Enfoque de barajado de cadenas o evolución guiada: Detección y enriquecimiento iterativo de células que expresan un anticuerpo humano específico para un antígeno, mediante separación celular de alta velocidad, clonación de las regiones codificantes de la región variable de células seleccionadas por antígeno y confirmación de la especificidad del antígeno

Como se describió anteriormente (Ejemplo 6), se generó una colección de células que expresan una colección de cadenas IgkL humana con una complejidad aproximada de $1,2 \times 10^5$ en combinación con el anticuerpo de referencia de cadena pesada SK48-E26 (Young *et al.*, WO 95/07997 A1) dirigido contra el antígeno humano IL-1 β . El esqueleto del vector retroviral que incluye estas cadenas se representa más detalladamente en las Figuras 4c y 11 (ver también el Ejemplo 4). Para esto, 3×10^6 linfocitos preB 1624-5 transformados con A-MuLV se transdujeron con partículas que contienen el vector de transferencia que codifica a la cadena IgH SK48-E26, a una MOI de menos de 0,1. Un día después de la transducción, se enriquecieron las células GFP-positivas mediante separación celular a alta velocidad usando un FACSaria de BD. Las células seleccionadas se expandieron en tejido tisular en un incubador con humidificación durante cinco días. Después de la expansión, la población celular se transdujo con partículas que habían empaquetado la colección de cadenas IgkL a una MOI de 1,5 mediante infección con rotación estándar como se describió anteriormente (Ejemplo 5), y se dejó que las células se recuperaran de la transducción durante dos días en tejido tisular. Después de dos días de recuperación y expansión, se enriquecieron 5×10^5 células que coexpresaban GFP e YFP, y que por lo tanto incluían por lo menos una construcción de cadena pesada y una de cadena ligera, mediante separación celular preparativa usando una FACSaria de BD. La población celular enriquecida para la coexpresión de construcciones de cadena IgH e IgL se expandieron por otros cuatro días en histocultivo. Después de esta expansión final, se tiñó una alícuota de 2×10^6 células que expresaban la colección de cadenas IgH/IgL con $2 \mu\text{g/ml}$ en un volumen de $100 \mu\text{l}$ con IL-1 β humana recombinada (R&D Systems) durante 30 minutos sobre hielo, seguido de los lavados con tampón salino de fosfato (PBS) enriquecido con suero bovino fetal al 1% (FCS). Después de incubar con anticuerpos policlonales contra la IL-1 β y conjugados con biotina, las células se lavaron dos veces y luego se tiñeron con estreptavidina-APC para detectar las células que se habían unido al antígeno y enriquecerlas posteriormente mediante citometría de flujo. Después de una primera ronda de separación celular por FACS, las células se expandieron durante cinco días y se sometieron a otra ronda de tinción anti-IL-1 β y enriquecimiento de células positivas a la tinción como se describió anteriormente. Esta selección se repitió tres veces (Fig. 21). La población celular obtenida después de tres rondas de enriquecimiento por Retrocyte Display se tiñó nuevamente para detectar la unión a IL-1 β como se describió anteriormente, pero esta vez, las células reactivas no se enriquecieron como las poblaciones activas anteriores sino que se seleccionaron clones celulares individuales y se colocaron en placas de 96 pocillos mediante selección de una sola célula usando una FACSaria de BD. Después de siete días de histocultivo y expansión, los clones celulares se analizaron nuevamente para determinar la especificidad al antígeno IL-1 β usando el protocolo descrito y además, como control negativo, con todos los reactivos secundarios salvo por el antígeno IL-1 β . Como se esperaba y se demostró usando citometría de flujo, algunos clones mostraron unión específica al antígeno deseado, según lo revelado usando una señal FACS específica en presencia del antígeno, pero no en ausencia él (sin considerar la unión de fondo de los clones a ninguno de los reactivos de detección secundarios). Sin embargo, algunos clones mostraron una señal de tinción

independientemente de la presencia del antígeno, lo que indicó que estos clones se unieron de forma no específica a cualquiera de los reactivos secundarios usados para la detección de la reactividad a la IL-1 β . En total, se aisló el ADN genómico de 24 clones celulares y se usó como plantilla para una PCR genómica estándar en la que se emplearon los oligonucleótidos Sec-ID31 y Sec-ID32, que se unieron específicamente secuencia arriba y secuencia abajo de la región variable de las cadenas ligeras humanas codificadas en la colección de cadenas ligeras retrovirales, respectivamente.

Sec-ID31: 5'-CCTTGAACCTCCTCGTTCGACCC-3'

Sec-ID32: 5'-AGGCACAACAGAGGCAGTTCCAG-3'

Se obtuvieron amplicones PCR del tamaño esperado de cada clon celular analizado y los amplicones PCR se sometieron directamente a análisis de secuencia de ADN. De los 24 clones analizados, doce mostraron que contenían una cadena IgkL idéntica pero novedosa, denominada LCB24, y como se esperaba, también contenía la cadena IgH de SK48-E26, según se determinó por separado.

Como se esperaba, los 12 clones que expresaban la cadena IgL LCB24 en combinación con la cadena IgH SK48-E26 mostraron señales específicas para la IL-1 β en la citometría de flujo, como se mencionó anteriormente.

Se digirió un amplicón PCR seleccionado que contenía la cadena IgkL LCB24 novedosa amplificada, con las enzimas de restricción HindIII y Eco47III flanqueando la región codificante variable (Fig. 4c), y se clonó el fragmento en un vector de expresión de cadena IgkL retroviral con sitios de restricción compatibles, lo que permitió fusionar en el mismo marco de la región codificante V_L LCB24 con la región codificante de cadena ligera kappa humana constante. Por lo tanto, el vector resultante codificó una cadena IgkL completamente humana novedosa.

El vector de expresión retroviral de la cadena IgkL LCB24, de secuencia verificada y reclonado, se transdujo junto con la cadena IgH SK48E26 del anticuerpo de referencia IL-1 β SK48-E26 en células 1624-5. Después de expandir en tejido tisular durante 2 días, las células GFP+/YFP+ se enriquecieron mediante separación celular de alta velocidad usando una FACSaria de BD. Las células resultantes que expresan la Ig se analizaron primero para determinar su capacidad de unirse a la IL-1 β como se describió. Como se esperaba, se confirmó su reactividad mediada por la expresión de LCB24 con la cadena pesada de SK48-E26 (Fig. 22). Para excluir el que anticuerpo novedoso en general reaccionara de forma cruzada con otros antígenos o proteínas, las células que expresaban la combinación LCB24 IgL/SK48-E26 se analizaron para determinar la reactividad a la IL-15, como se describió anteriormente. Como se muestra en la Fig. 23, no se pudo detectar ninguna reactividad a la IL-15 para el anticuerpo novedoso IgL LCB24/HC SK48-E26, lo que probó la especificidad al antígeno deseado del anticuerpo novedoso. Los controles posteriores incluyeron una línea celular que expresaba un anticuerpo de referencia específico contra la IL-15 (como control positivo) y el anticuerpo SK48-E26 IL-1 β original. Aunque las células que expresaban el anticuerpo contra la IL-15 mostraron tinción específica a la IL-15 como se esperaba, no se detectó reactividad alguna para el anticuerpo SK48-E26 IL-1 β o las células (Fig. 23).

En resumen, se identificó una cadena ligera novedosa para mediar la reactividad al antígeno específica en un experimento de detección en donde se utilizó una colección de cadenas ligeras barajadas contra la cadena pesada de un anticuerpo de referencia específico contra la IL-1 β SK48-E26.

EJEMPLO 9

Detección por Retrocyte Display en colecciones de cadenas IgH e IgL barajadas. Detección y enriquecimiento iterativo de células que expresan un anticuerpo humano específico para un antígeno, mediante separación celular de alta velocidad, clonación de las regiones codificantes de la región variable de células seleccionadas por antígeno y confirmación de la especificidad del antígeno

Como se describió anteriormente (Ejemplo 6), se generó una colección de células que expresaban una colección de cadenas pesadas con una complejidad de aproximadamente $6,5 \times 10^5$ (unidas a GFP) usando una MOI de aproximadamente 0,1. El esqueleto del vector retroviral que incluye estas cadenas se representa más detalladamente en las Figuras 4c y 11 (ver también el Ejemplo 4). Para esto, 3×10^6 linfocitos preB 1624-5 transformados con A-MuLV se transdujeron con partículas que contienen el vector de transferencia que codifica a la colección de cadenas IgH mencionada anteriormente, a una MOI de menos de 0,1. Dos días después de la transducción, se enriquecieron las células GFP-positivas mediante una técnica estándar de separación celular a alta velocidad, usando un FACSaria de BD. Después de seleccionar células GFP+, las células se expandieron en histocultivo durante otros dos días. Después de la expansión, la población de células GFP+ se transdujo con partículas que tenían empaquetadas la colección de cadenas ligeras que consistía de 245 cadenas ligeras de secuencia caracterizada, a una MOI >1 como se describió anteriormente. Dos días después de la transducción, las células GFP+/YFP+ doblemente transducidas se enriquecieron mediante separación celular de alta velocidad y la población celular, que ahora contenía ambas colecciones de cadenas IgH e IgL en la mayoría de las células, se expandió nuevamente durante tres días en histocultivo. Después de esto, se tiñó una alícuota de $2,5 \times 10^5$ células con una mezcla de antígenos que incluía, entre otros, SAV (estreptavidin)-APC-Cy7 como se describió anteriormente (ver el Ejemplo 8), y se enriqueció para reactividad del antígeno deseado usando citometría de flujo.

Paralelamente, la población celular que expresaba la colección de anticuerpos IgH/IgL, se tiñó con anticuerpos específicos contra la IgL kappa. Se encontró que aproximadamente 75% de estas células expresaban los anticuerpos humanos en la superficie celular (no se muestran datos). Las células reactivas al antígeno se seleccionaron por separación celular de alta velocidad usando una FACSaria de BD y las células enriquecidas se expandieron en tejido tisular durante siete días. Los mismos procedimientos de tinción y enriquecimiento celular descritos anteriormente se repitieron dos veces más. Después de tres rondas de selección con Retrocyte Display, la población celular resultante se tiñó nuevamente para evaluar la unión del antígeno SAV-APC-Cy7 y se analizó mediante citometría de flujo. Como se representa en la Fig. 24, la población obtenida mostró unión al SAV-APC-Cy7 lo que indicó la selección exitosa de anticuerpos específicos para el antígeno SAV-APC-Cy7. Para evaluar la especificidad de la reactividad al antígeno SAV-APC-Cy7 objetivo, las células que expresan la colección enriquecida tres veces también se tiñeron con los antígenos SAV-APC y SAV-PerCP-Cy5.5 (Fig. 25). De manera similar a las células no transducidas y las células que expresan la colección no seleccionada que sirvieron como controles negativos, estos antígenos no se unieron a las células enriquecidas tres veces con SAV-APC-Cy7. Sin embargo, estas últimas células revelaron una vez más una fuerte reactividad al SAV-APC-Cy7, lo que indicó que la especificidad al antígeno de la población celular seleccionada estaba dirigida contra el fluorocromo Cy7 del colorante en tándem SAV-APC-Cy7.

El ADN genómico de la población celular enriquecida tres veces se aisló y usó como plantilla para una PCR genómica estándar en la que se emplearon los oligonucleótidos Sec-ID31 (ver más arriba) y Sec-ID33 que se unieron específicamente secuencia arriba y secuencia abajo de las regiones codificantes de las cadenas pesadas y ligeras humanas codificadas en las colecciones retrovirales.

Sec-ID33: 5'-CGGTTCGGGGAAGTAGTCCTT GAC-3')

Se obtuvieron amplicones PCR para las cadenas pesadas y las cadenas ligeras del tamaño esperado y se subclonaron separadamente en un vector de clonación fragmento PCR estándar pSC-B (Stratagene), según las recomendaciones del fabricante. Los clones de plásmido pSC-B que contenían las regiones de cadena pesada y ligera clonadas se aislaron a partir de 10 clones bacterianos, cada uno de ellos resultante de la subclonación del fragmento PCR IgH y la subclonación del fragmento PCR IgL, todo lo que se analizó para determinar la secuencia de ADN. La secuenciación del ADN reveló dos secuencias de cadena IgH diferentes, que se denominaron HC49 y HC58, y dos secuencias de cadena IgL diferentes, que se denominaron LC4 y LC10.

Los fragmentos de ADN que contenían las regiones codificantes V_H y V_L se aislaron a partir de los clones de secuencia verificada mediante digestión con HindIII y Eco47III, ya que estas enzimas de restricción flanquean las regiones variables (ver Fig. 4c) de las respectivas regiones V_H y V_L de HC49, HC58, LC4 y LC10. Las regiones V_H y V_L de HC49, HC58, LC4 y LC10 aisladas se clonaron en un vector receptor retroviral que incluía las regiones constantes de una cadena Ig γ 1H humana (expresión IRES unida a GFP) y una cadena Ig κ L humana (expresión IRES unida a YFP), respectivamente, como se describió anteriormente. De esa manera, se generaron construcciones de vector de expresión retroviral que codifican las cadenas IgH e IgL completamente humanas para las cadenas IgH HC58 y HC49, IgL LC10 y LC4 novedosas. Después de cotransducir estos vectores en linfocitos preB 1624-5 y expandirlos durante 8 días, las células GFP+/YFP+ se enriquecieron mediante citometría de flujo, como anteriormente. Las células resultantes se analizaron primero para determinar su capacidad de unión al SAV-APC-Cy7 como se describió. Como se muestra en la Fig. 26, la reactividad de las células que expresan los anticuerpos HC49/LC4 y HC/LC10 no mostró una actividad de unión contra SAV-APC-Cy7 significativa. Por otra parte, se pudo detectar fácilmente la reactividad mediada por los anticuerpos HC58/LC4 y HC58/LC10. Esto configura una prueba de la identificación exitosa de anticuerpos específicos para el antígeno novedosos mediante la tecnología Retrocyte Display basándose en el barajado de colecciones diversas de cadenas IgH y cadenas IgL, sin necesidad de conocer ni la cadena IgH ni la IgL de un anticuerpo de referencia con una especificidad al antígeno conocida.

Bibliografía:

- Alt F, Rosenberg N, Lewis S, Thomas E, Baltimore D (1981) "Organization and reorganization of immunoglobulin genes in A-MULV-transformed cells: rearrangement of heavy but not light chain genes" *Cell* 27, 381-390.
- 5 • Bachl J y Olsson C (1999) "Hypermutation targets a green fluorescent protein-encoding transgene in the presence of immunoglobulin enhancers" *Eur J. Immunol.* 29, 1383-1389.
- Baker M (2005) "Upping the ante on antibodies" *Nature Biotechnology* 23, 1065-1072.
- Boder ET, Midelfort KS, Wittrup KD (2000) "Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 10701-5.
- 10 • Clackson T, Hoogenboom H, Griffiths AD, Winter G (1991) "Making antibody fragments using phage display libraries" *Nature* 352, 624-628.
- Clark M (2000) "Antibody humanization: A case of the 'Emperor's new clothes'?" *Immunol. Today* 21, 397-402.
- Dunn IS (1995) "Assembly of functional bacteriophage lambda virions incorporating C-terminal peptide or protein fusions with the major tail protein" *J. Mol. Biol.* 248, 497-506.
- 15 • Efimov VP, Nepluev IV, Mesyanzhinov VV (1995) "Bacteriophage T4 as a surface display vector" *Virus Genes* 10, 173-7.
- Gossen M y Bujard H (1992) "Tight control of gene expression in vertebrate cells by tetracycline-responsive promoters" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5547-5551.
- Grawunder U, West RB, Lieber MR (1998) "Antigen receptor gene rearrangement" *Curr. Opin. Immunol.* 10: 172-180.
- 20 • Green LL y Jakobovits A (1998) "Regulation of B cell development by variable gene complexity in mice reconstituted with human immunoglobulin yeast artificial chromosomes" *J. Exp. Med.* 188, 483-495.
- Hanes J y Plückthun A (1997) "*In vitro* selection and evolution of functional proteins by using ribosome display" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4937-4942.
- 25 • Hanes J, Schaffitzel C, Knappik A & Pluckthun A (2000) "Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naïve library selected and evolved by ribosome display" *Nature Biotech.* 18, 1287-1292.
- Hoogenboom HR y Chames P (2000) "Natural and designer binding sites made by phage display technology" *Immunol. Today* 21, 371-378.
- Kitamura T, Onishi T, Kinoshita S, Shibuya A, Miyajima A, Nolan GP (1995) "Efficient screening of retroviral cDNA expression libraries" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 9146-9150.
- 30 • Köhler G y Milstein C (1975) "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity" *Nature* 256, 495-497.
- Li YS, Hayakawa K, Hardy RR (1993) "The regulated expression of B lineage associated genes during B cell differentiation in bone marrow and fetal liver" *J. Exp. Med.* 178, 951-960.
- 35 • Li M (2000) "Applications of display technology in protein analysis" *Nature Biotechnology* 18, 1251-6.
- Lipovsek D & Pluckthun A (2004) "*In-vitro* protein evolution by ribosome display and mRNA display" *J. Immunol. Methods* 290, 51-67.
- Maruyama IN, Maruyama HI, Brenner S (1994) "Lambda foo: a lambda phage vector for the expression of foreign proteins" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8273-7.
- 40 • Papavasiliou FN y Schatz DG (2002) "Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity" *Cell* 109, Suppl: S35-S44.
- Pear WS, Miller JP, Xu L, Pui JC, Soffer B, Quackenbush RC, Pendergast AM, Bronson R, Aster JC, Scott ML, Baltimore D (1998) "Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow" *Blood* 92, 3780-92.
- 45 • Ren ZJ, Lewis GK, Wingfield PT, Locke EG, Steven AC, Black LW (1996) "Phage display of intact domains at high copy number: a system based on SOC, the small outer capsid protein of bacteriophage T4" *Protein Sci.* 5, 1833-43.
- Rosenberg N y Baltimore D (1978) "The effect of helper virus on Abelson virus-induced transformation of lymphoid cells" *J. Exp. Med.* 147, 1126-1141.
- 50 • Rosenberg A (1996) "T select phage display system: a powerful new protein display system based on the bacteriophage T7" *Innovations* 6, 1-6.
- Santini C, Brennan D, Mennuni C, Hoess RH, Nicosia A, Cortese R, Luzzago A (1998) "Efficient display of an HCV cDNA expression library as C-terminal fusion to the capsid protein D of bacteriophage lambda" *J. Mol. Biol.* 282, 125-35.
- 55 • Shimizu T, Mundt C, Licence S, Melchers F, Mårtensson IL (2002) "VpreB1/VpreB2/lambda 5 triple-deficient mice show impaired B cell development but functional allelic exclusion of the IgH locus" *J. Immunol.* 168, 6286-6293.
- Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM, *et al.* (1992) "RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement" *Cell* 68, 855-867.
- 60 • Smith GP (1985) "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface" *Science* 228, 1315-17.
- Sternberg N & Hoess RH (1995) "Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(5), 1609-13.
- Stitz J, Krutzik PO, Nolan GP (2005) "Screening of retroviral cDNA libraries for factors involved in protein

phosphorylation in signaling cascades" Nucleic Acids Res. 33, e39.

- Traggiai E, Chicha L, Mazzucchelli L, Bronz L, Piffaretti JC, Lanzavecchia A, Manz MG (2004) "Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice" Science 304, 104-107.

- 5 • EP 1 041 143 A: Jensen MR, Pedersen FS, Mouritzen S, Hindersson P, Duch M, Soerensen MS, Dalum I, Lund AH "A method for identification of biologically active peptides and nucleic acids".
- WO 89/12823 A1: Mosier DE y Wilson DB "Human immune system in non-human animal".
- WO 90/13660 A2: Lang AB, Larrick JW, Cryz SJ "Human monoclonal antibodies to sero-specific determinants of gram-negative bacteria".
- 10 • WO 92/01047 A1: McCafferty J, Pope AR, Johnson KS, Hoogenboom HRJM, Griffiths AD, Jackson RH, Holliger, KP, Marks JD, Clackson TP, Chiswell DJ, Winter GP, Bonnert TP "Methods for producing members of specific binding pairs".
- WO 92/02551 A1: Schrader JW "Methods for the production of proteins with a desired function".
- WO 95/01997 A1: Young PR, Gross MS, Jonak ZL, Theisen TW, Hurle MR, Jackson JR "Recombinant and humanized IL-1beta antibodies for treatment of IL-1 mediated inflammatory disorders in man".
- 15 • WO 98/24893 A2: Jakobovits A, Kucherlapati R, Klapholz S, Mendez M, Green L "Transgenic mammals having human Ig loci including plural V_H and V_k regions and antibodies produced therefrom".
- WO 02/066630 A1: Murphy AJ y Yancopoulos GD "Methods of modifying eukaryotic cells".
- WO 02/102855 A2: Zauderer M y Smith ES "In vitro methods for producing and identifying immunoglobulin molecules in eukaryotic cells".
- 20 • WO 03/017935 A2: van der Winkel JGJ, van Dijk MA, Schuurman J, Gerritsen AF, Baadsgaard O "Human antibodies specific for interleukin 15 (IL-15)".
- WO 03/054197 A2: Perabo L, Büning H, Enssle J, Reid M, Hallek M "A library of modified structural genes or capsid modified particles useful for the identification of viral clones with desired cell tropism".
- 25 • WO 03/068819 A1: Grawunder U y Melchers GF "Method for the generation of genetically modified vertebrate precursor lymphocytes and use thereof for the production of heterologous binding proteins".
- WO 03/083075 A2: Bremel RD, Bleck GT, Imboden M, Eakle K "Retrovirus-based genomic screening".
- WO 04/051266 A1: Muraguchi A, Kishi H, Tamiya E, Suzuki M "Microwell array chip for detecting antigen-specific lymphocyte, method of detecting antigen-specific lymphocyte and method of cloning antigen-specific lymphocyte antigen receptor gene".
- 30 • WO 04/076677 A2: Lanzavecchia A "Monoclonal antibody production by EBV transformation of B cells".
- WO 04/106377 A1: Lawson ADG y Lightwood DJ "Methods for producing antibodies".
- WO 08/055795 A1: Beerli R, Bachmann M, Bauer M "Selection of human monoclonal antibodies by mammalian cell display".

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> 4-Anticuerpo AG
 <120> Aislamiento e identificación de proteínas de unión específicas al antígeno o al ligando
 <130> 2133 EP
 <140>
 <141>
 <150> EP 08004096.7
 <151> 05-03-2008
 <150> US 61/125,886
 <151> 29-04-2008
 <160> 33
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 1
 gatcaagctt agcgcttcca ccaagggccc atcggtcttc cc 42
 <210> 2
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 2
 gatcatcgat gcggccgctc atttaccgag agacagggag agg 43
 <210> 3
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 3
 gatcatcgat gcggccgcta ggccccctgc ctgatcatgt tc 42
 <210> 4
 <211> 443
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Región codificante VH para el anticuerpo humano específico de NIP-ovoalbúmina
 <400> 4
 aagcttccat ggagtttggg ctgagctggg ttttccttgt tgctctttta agaggtgtcc 60

agtgctcaggt gcagctggtg gagtctg999 gaggcgtggt ccagcctggg aggtccctga 120
gactctcctg tgcagcctct ggattcacct tcagtagcta tgctatgcac tgggtccgcc 180
aggctccagg caaggggctg gagtgggtgg cagttatatc atatgatgga agcaataaat 240
actacgcaga ctccgtgaag ggccgattca ccatctccag agacaattcc aagaacacgc 300
tgtatctgca aatgaacagc ctgagagctg aggacacggc tgtgtattac tgtgagagaa 360
tggtcgacca cgcggaaagc tactactact actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga 420
caatggtcac cgtctctagc gct 443

<210> 5
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 5
gatcggatcc gtacactttt ctcatctttt tttatgtg 38

<210> 6
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 6
gatcggatcc ctgaggaagg aagcacagag gatgg 35

<210> 7
<211> 766
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<223> Fragmento de PCR genómico

<400> 7
gaaaaatgtt taactcagct actataatcc cataattttg aaaactatit attagctttt 60
gtgtttgacc ctcccttagc caaaggcaac tatttaagga ccttttaaaa ctcttgaaac 120
tacttttagag tcattaagtt atttaaccac ttttaattac tttaaaatga tgtcaattcc 180
cttttaacta ttaatttatt ttaagggggg aaaggctgct cataattcta ttgtttttct 240
tggtaaagaa ctctcagttt tcgtttttac tacctctgtc acccaagagt tggcatctca 300
acagagggga ctttccgaga ggccatctgg cagttgctta agatcagaag tgaagtctgc 360
cagttcctcc aaggcagggtg gccagatta cagttgacct gtcttggtgt ggctaaaaat 420
tgtcccatgt ggttacaaac cattagacca gggctctgatg aattgctcag aatatttctg 480
gacacccaaa tacagaccct ggcttaaggc cctgtccata cagtaggttt agcttggtca 540
caccaaagga agccatacag aggctaatat cagagtattc ttggaagaga caggagaaaa 600

tgaagccag tttctgctct taccttatgt gcttgtgttc agactcccaa acatcaggag	660
tgtcagataa actggtctga atctctgtct gaagcatgga actgaaaaga atgtagtttc	720
aggaagaaa ggcaatagaa ggaagcctga gaatatcttc aaaggg	766
<210> 8	
<211> 32	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebador	
<400> 8	
gacgcatcc gaaaaatggt taactcagct ac	32
<210> 9	
<211> 36	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebador	
<400> 9	
gacgcatcc ccccttgaag atattctcag gcttcc	36
<210> 10	
<211> 34	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebador	
<400> 10	
gagaatcgat agctcaaacc agcttaggct acac	34
<210> 11	
<211> 32	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebador	
<400> 11	
gagaatcgat tagaacgtgt ctgggcccca tg	32
<210> 12	
<211> 42	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebador	
<400> 12	
gatcaagctt agcgctctgt ggctgcacca tctgtcttca tc	42

<210> 13
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 13
 gatcatcgat gcggccgcct aacactctcc cctgttgaag ct 42

<210> 14
 <211> 396
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Región codificante vkappa para el anticuerpo humano
 específico de NIP-ovoalbúmina
 <400> 14
 aagcttccat ggatatgagg gtccccgctc agctcctggg gctcctgcta ctctggctcc 60
 gaggtgccag atgtgacatc cagatgaccc agtctccatc ctccctgtct gcatctgtag 120
 gagacagagt caccatcact tgccgggcaa gtcagagcat tagcagctat ttaaattggt 180
 atcagcagaa accagggaaa gcccctaagc tcctgatcta tgctgcatcc agtttgcaaa 240
 gtgggggtccc atcaagggtc agtggcagtg gatctgggac agatttcact ctcaccatca 300
 gcagtctgca acctgaagat ttgcaactt actactgtca acagagttac agtaccacca 360
 ctttcggcca agggaccaag gtggaaatca agcgcct 396

<210> 15
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 15
 aatactcgag ccatggacag ccttctgatg aagcaaaag 39

<210> 16
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 16
 aatactcgag tcaaaatccc aacatacgaa atgcatc 37

<210> 17
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador

<400> 17
cgcaagcttc catggtgagc aagggcgagg agctgttc 38

<210> 18
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 18
tagagcgctc ttgtacagct cgtccatgcc gagagtg 37

<210> 19
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 19
atttggatcc caccatggag tttgggctga gctgggtttt cctcg 45

<210> 20
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 20
cccgctagct cctgacagga aacagcctcc atctgcacct 40

<210> 21
<211> 623
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Fragmento de ADN genómico

<400> 21
atttggatcc caccatggag tttgggctga gctgggtttt cctcgttgct cttttaagag 60
gtgattcatg gagaaataga gagactgagt gtgagtgaac atgagtgaga aaaactggat 120
ttgtgtggca ttttctgata acggtgtcct tctgtttgca ggtgtccagt gtcaggtgca 180
gctggtggag tctgggggag gcgtggtcca gcctgggagg tccctgagac tctcctgtgc 240
agcctctgga ttcaccttca gtagctatgc tatgcactgg gtccgccagg ctccaggcaa 300
ggggctagag tgggtggcag ttatatcata tgatggaagt aataaatact acgcagactc 360
cgtgaagggc cgattcacca tctccagaga caattccaag aacacgctgt atctgcaaat 420
gaacagcctg agagctgagg acacggctgt gtattactgt gcgagagaca cagtgagggg 480
aagtcattgt gcgcccagac acaaacctcc ctgcaggaaac gctgggggga aatcagcggc 540
agggggcgct caggagccac tgatcagagt cagccctgga ggcaggtgca gatggaggct 600

gtttcctgtc aggagctagc ggg	623
<210> 22	
<211> 40	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebador	
<400> 22	
ggagctagcg ggctgccagt cctcaccca cacctaaggt	40
<210> 23	
<211> 40	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebador	
<400> 23	
gggctcgagt cctcaccatc caatggggac actgtggagc	40
<210> 24	
<211> 336	
<212> ADN	
<213> Homo sapiens	
<220>	
<223> Fragmento de ADN genómico	
<400> 24	
ggagctagcg ggctgccagt cctcaccca cacctaaggt gagccacagc cgccagagcc	60
tccacaggag accccaccca gcagcccagc cctacccag gaggccccag agctcagggc	120
gcctgggtgg attctgaaca gcccagagtc acggtgggta tagtgggagc tactaccact	180
gtgagaaaag ctatgtccaa aactgtctcc cggccactgc tggaggccca gccagagaag	240
ggaccagccg cccgaacata cgaccttccc agacctcatg acccccagca cttggagctc	300
cacagtgtcc ccattggatg gtgaggactc gagccc	336
<210> 25	
<211> 40	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Cebador	
<400> 25	
ggagtcgacc cctgcctggg tctcagccc ggggtctgtg	40
<210> 26	
<211> 48	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	

<223> Cebador

<400> 26
tataatctaga atataagctt agccatctta cctgaagaga cggtgacc 48

<210> 27
<211> 239
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Fragmento de ADN genómico

<400> 27
ggagtcgacc cctgcctggg tctcagcccg ggggtctgtg tggctgggga cagggacgcc 60
ggctgcctct gctctgtgct tgggccatgt gacccattcg agtgcctgc acgggcacag 120
gtttgtgtct gggcaggaac agggactgtg tccctgtgtg atgcttttga tatctggggc 180
caagggacaa tggtcaccgt ctcttcaggt aagatggcta agcttatatt ctagatata 239

<210> 28
<211> 1875
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Región codificante para una cadena UH humana

<400> 28
agatctacca tggagtttgg gctgagctgg gttttccttg ttgcgatttt agaaggtgtc 60
cagtgtgagg tgcagctggg ggagtcctgg ggaggcttgg tacagcccgg caggctccctg 120
agactctcct gtgcggcctc tggattcacc tttgatgatt atgccatgca ctgggtccgg 180
caagctccag ggaagggcct ggaatgggtc tcagctatca cttggaatag tggtcacata 240
gactatgcgg actctgtgga gggccgattc accatctcca gagacaacgc caagaactcc 300
ctgtatctgc aaatgaacag tctgagagct gaggatacgg ccgtatatta ctgtgcgaaa 360
gtctctgacc ttagcaccgc gtcctccctt gactattggg gccaaaggta cctggtcacc 420
gtctcgagcg ctagtgcac cgcaccaacc cttttccccc tcgtctcctg tgagaattcc 480
ccgtcggata cgagcagcgt ggccgttggc tgcctcgac aggacttcct tcccgaactc 540
atcactttct cctggaaata caagaacaac tctgacatca gcagcaccgg gggcttccca 600
tcagtcctga gagggggcaa gtacgcagcc acctcacagg tgctgctgcc ttccaaggac 660
gtcatgcagg gcacagacga acacgtgggtg tgcaaagtcc agcaccctca cggcaacaaa 720
gaaaagaacg tgcctcttcc agtgattgcc gagctgcctc ccaaagtggc cgtcttcgtc 780
ccaccccgcg acggcttctt cggcaacccc cgcaagtcca agctcatctg ccaggccacg 840
ggtttcagtc cccggcagat tcagggtgtc tggctgcgag aggggaagca ggtggggtct 900
ggcgtcacca cggaccaggt gcaggctgag gccaaagagt ctggggccac gacctacaag 960
gtgaccagca cactgaccat caaagagagc gactgggtca gccagagcat gttcacctgc 1020
cgcgtggatc acaggggcct gaccttccag cagaatgcgt cctccatgtg tgtccccgat 1080

caagacacag ccatccgggt cttcgccatc cccccatcct ttgccagcat cttcctcacc 1140
aagtccacca agttgacctg cctgggtcaca gacctgacca cctatgacag cgtgaccatc 1200
tcctggaccc gccagaatgg cgaagctgtg aaaaccacaca ccaacatctc cgagagccac 1260
cccaatgcca ctttcagcgc cgtgggtgag gccagcatct gcgaggatga ctggaattcc 1320
ggggagaggt tcacgtgcac cgtgaccacac acagacctgc cctcgccact gaagcagacc 1380
atctcccggc ccaaggggggt ggccctgcac agggccgatg tctacttgct gccaccagcc 1440
cgggagcagc tgaacctgcg ggagtcggcc accatcacgt gcctgggtgac gggcttctct 1500
cccgcggacg tcttcgtgca gtggatgcag agggggcagc cttgtcccc ggagaagtat 1560
gtgaccagcg ccccaatgcc tgagccccag gccccaggcc ggtacttcgc ccacagcatc 1620
ctgaccgtgt ccgaagagga atggaacacg ggggagacct acacctgcgt ggtggcccat 1680
gaggccctgc ccaacaggggt caccgagagg accgtggaca agtccaccga gggggaggtg 1740
agcgcgacg aggaggggctt tgagaacctg tggggccaccg cctccacctt catcgtcctc 1800
ttcctcctga gcctcttcta cagtaccacc gtcaccttgt tcaagggtgaa atgagcggcc 1860
gctttacgcg ttaac 1875

<210> 29
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 29
gaagatctca ccatggagtt tg 22

<210> 30
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 30
atcttacctc tcgagacggt ga 22

<210> 31
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 31
ccttgaacct cctcgttcga ccc 23

<210> 32
<211> 23

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 32
aggcacaaca gaggcagttc cag

23

<210> 33
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 33
cggttcgggg aagtagtcct tgac

24

REIVINDICACIONES

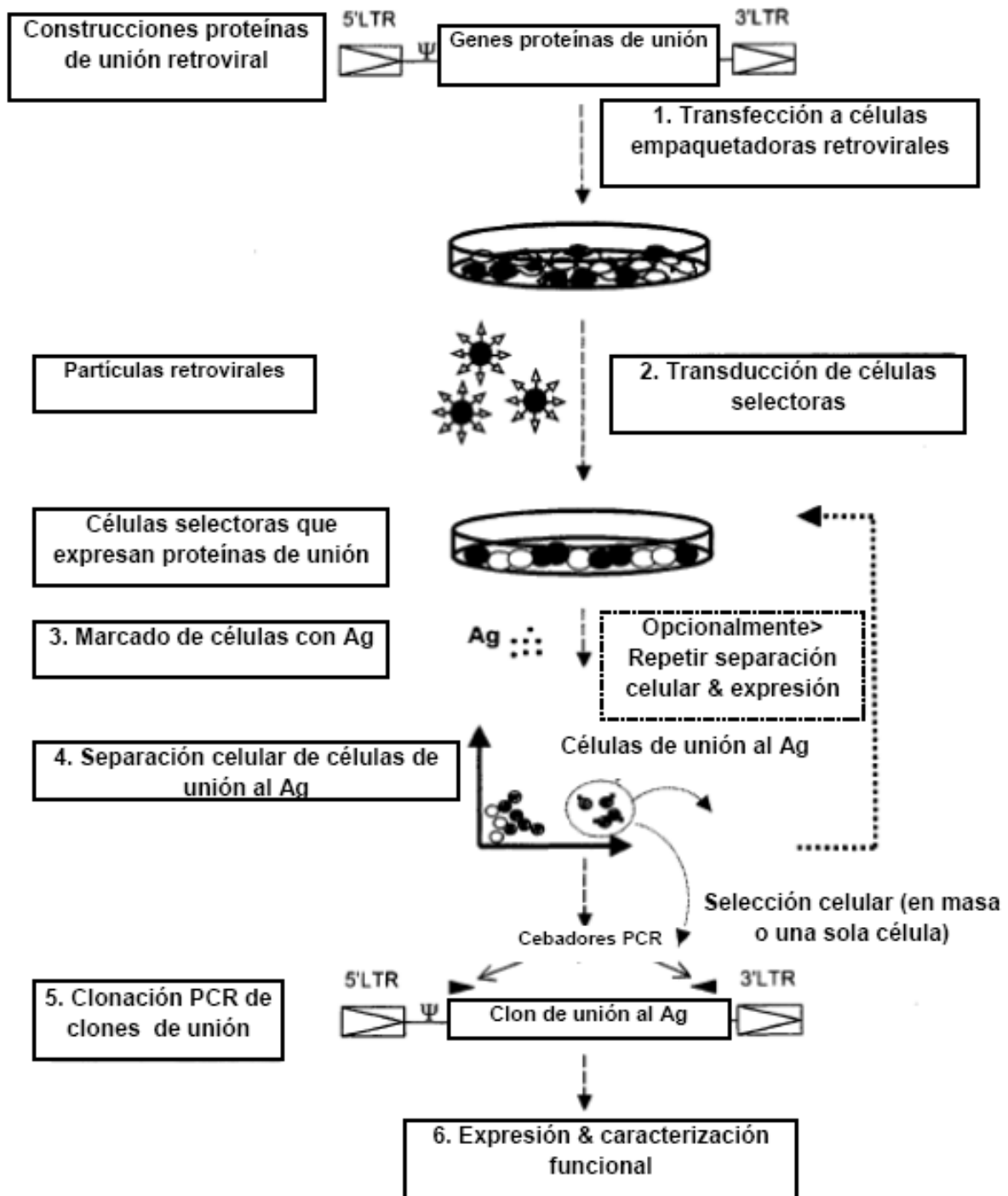
1. Un método para aislar e identificar por lo menos una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo o fragmento del mismo específico para un antígeno o ligando deseado, que comprende las etapas de:
 - (a) transducir al menos una construcción de expresión retroviral que codifica un anticuerpo o fragmento del mismo en células anfitrionas de vertebrados mediante el uso de partículas retrovirales incompetentes para la replicación, donde la al menos una construcción se integra de forma estable en el genoma de la célula anfitriona de modo que las células anfitrionas transducidas son capaces de expresar y presentar dicho anticuerpo o fragmento del mismo en su superficie celular y donde las células anfitrionas de vertebrados son linfocitos B precursores que expresan de forma endógena moléculas de Igα e Igβ que facilitan la deposición en membrana de dicho anticuerpo o fragmento del mismo y que son incapaces de expresar polipéptidos de anticuerpos endógenos y al menos un componente de la cadena ligera sustituta;
 - (b) expresar de forma estable dicho anticuerpo o fragmento del mismo en dichas células anfitrionas de vertebrados y presentar el mismo en su superficie celular;
 - (c) enriquecer las células anfitrionas de vertebrados que expresan dicho anticuerpo o fragmento del mismo sobre la base de su capacidad para unirse a dicho antígeno o ligando deseado mediante la separación de células que exhiben una unión al antígeno específica a partir de una población de células que no se unen, de este modo se aíslan selectivamente anticuerpos enlazantes potentes con una afinidad elevada por dicho antígeno o ligando deseado; y
 - (d) aislar e identificar dicha al menos una secuencia de nucleótidos que codifica dicho anticuerpo o fragmento de este a partir de las células anfitrionas de vertebrados transducidas y enriquecidas retroviralmente.
2. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde la etapa (d) está precedida por la expansión de dichas células anfitrionas de vertebrados enriquecidas en histocultivo.
3. El método de conformidad con la reivindicación 1 en donde la etapa (c) está seguida por la expansión de tales células anfitrionas de vertebrados enriquecidas en histocultivo, después de lo cual se repite la etapa (c) como se definió en la reivindicación 1, por lo menos una vez.
4. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde la transducción retroviral se lleva a cabo a una multiplicidad de infección igual o menor a 0,1.
5. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.
6. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde el fragmento de un anticuerpo se selecciona del grupo integrado por: una cadena pesada, una cadena ligera, un dominio V_H único, un dominio V_L único, un fragmento scFv, un fragmento Fab y un fragmento F(ab')₂.
7. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde las células anfitrionas de vertebrados se derivan de un grupo de especies integrado por peces cartilaginosos, peces teleósteos, anfibios, reptiles, aves, mamíferos, incluidos cerdos, ovejas, ganado vacuno, caballos y roedores, inclusive ratones, ratas, conejos y cobayos.
8. El método de conformidad con la reivindicación 7 en donde la especie de célula anfitrión de vertebrado preferida es de ratón.
9. El método de conformidad con la reivindicación 5 en donde el anticuerpo de longitud completa se selecciona del grupo integrado por: un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo híbrido.
10. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en donde la al menos una secuencia de nucleótidos es una pluralidad de secuencias de nucleótidos que codifica (i) una secuencia de cadena pesada de anticuerpo y múltiples secuencias de cadena ligera de anticuerpo, o (ii) una secuencia de cadena ligera de anticuerpo y múltiples secuencias de cadena pesada de anticuerpo.
11. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo comprende un dominio de unión variable codificado por esa al menos una construcción de expresión retroviral que permite la recombinación V(D)J a fin de generar una secuencia codificante para un dominio de unión variable tras la transducción retroviral.
12. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en donde la etapa (b) se lleva a cabo en condiciones mutagenizantes.
13. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en donde la expresión de ese anticuerpo o fragmento del mismo en las células anfitrionas de vertebrado transducidas retroviralmente está unido operativamente a
 - (a) por lo menos un marcador de selección de antibiótico,
 - (b) por lo menos un marcador de detección, y/o a
 - (c) una combinación de los mismos,

y en donde la expresión de dicho anticuerpo o fragmento del mismo está unida al uso de por lo menos una secuencia interna de entrada al ribosoma (IRES).

- 5 14. El método de conformidad con la reivindicación 13 en donde el al menos un marcador de detección es
 - (i) una proteína fluorescente seleccionada del grupo integrado por la proteína verde fluorescente (GFP), la proteína amarilla fluorescente (YFP), la proteína roja fluorescente (RFP) y la proteína azul fluorescente (BFP); o
 - (ii) un marcador de superficie celular seleccionado del grupo integrado por CD7, CD34 y el receptor del factor de crecimiento de nervios de baja afinidad.
- 10 15. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en donde la etapa (c) de enriquecimiento se lleva a cabo mediante separación física de células a partir de una población de células que no se unen, usando:
 - (i) separación de células activadas por fluorescencia (FACS);
 - (ii) micromanipulación; o
 - (iii) métodos panning para antígeno o ligando deseado inmovilizado.

15

Fig. 1



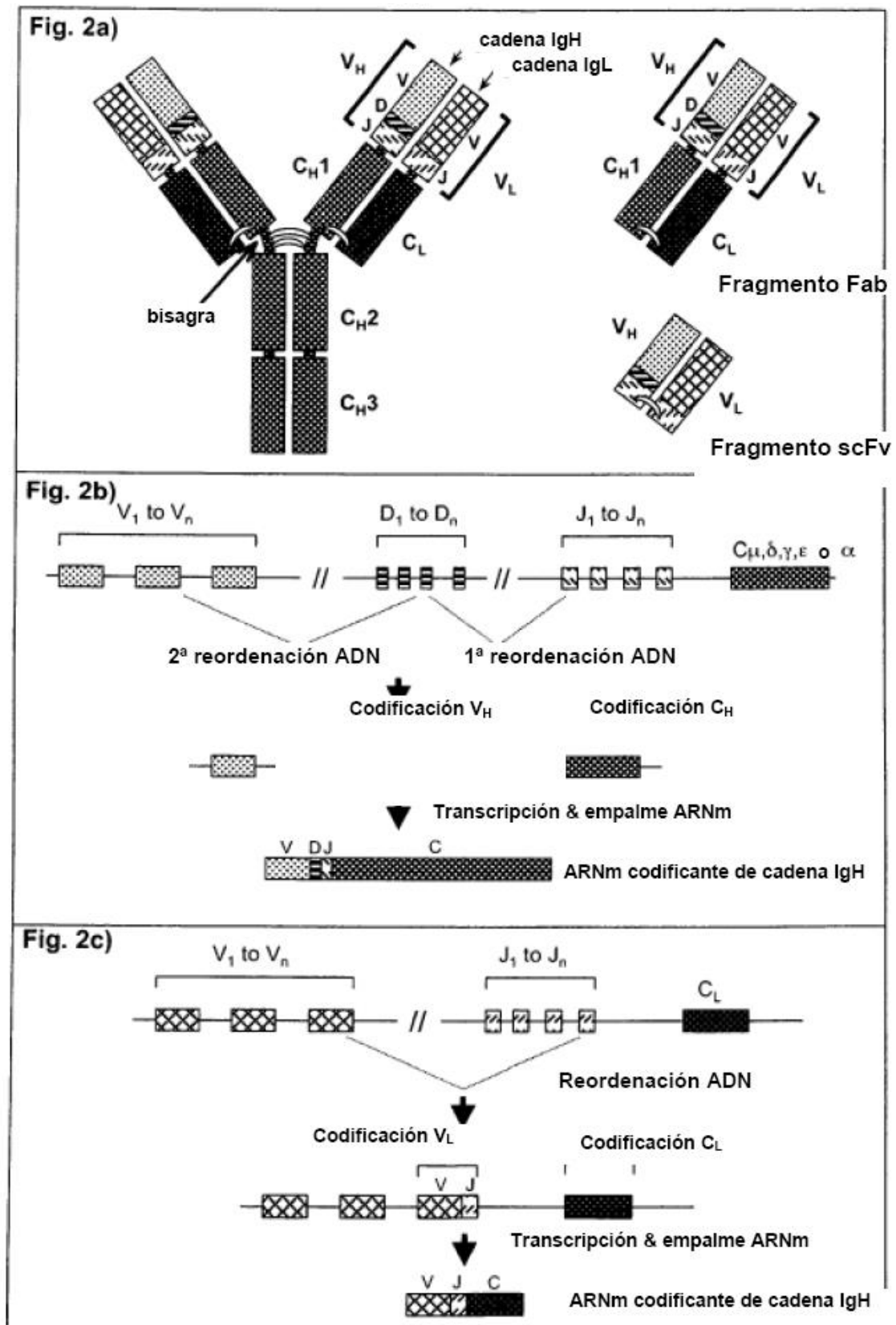


Fig. 3a)

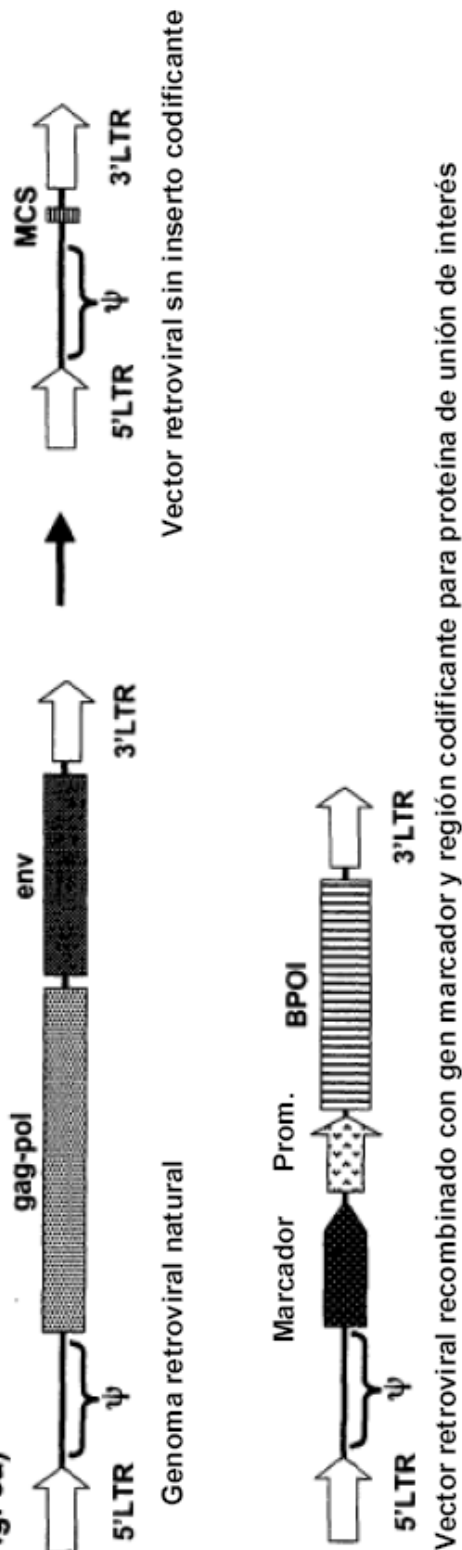


Fig. 3b)

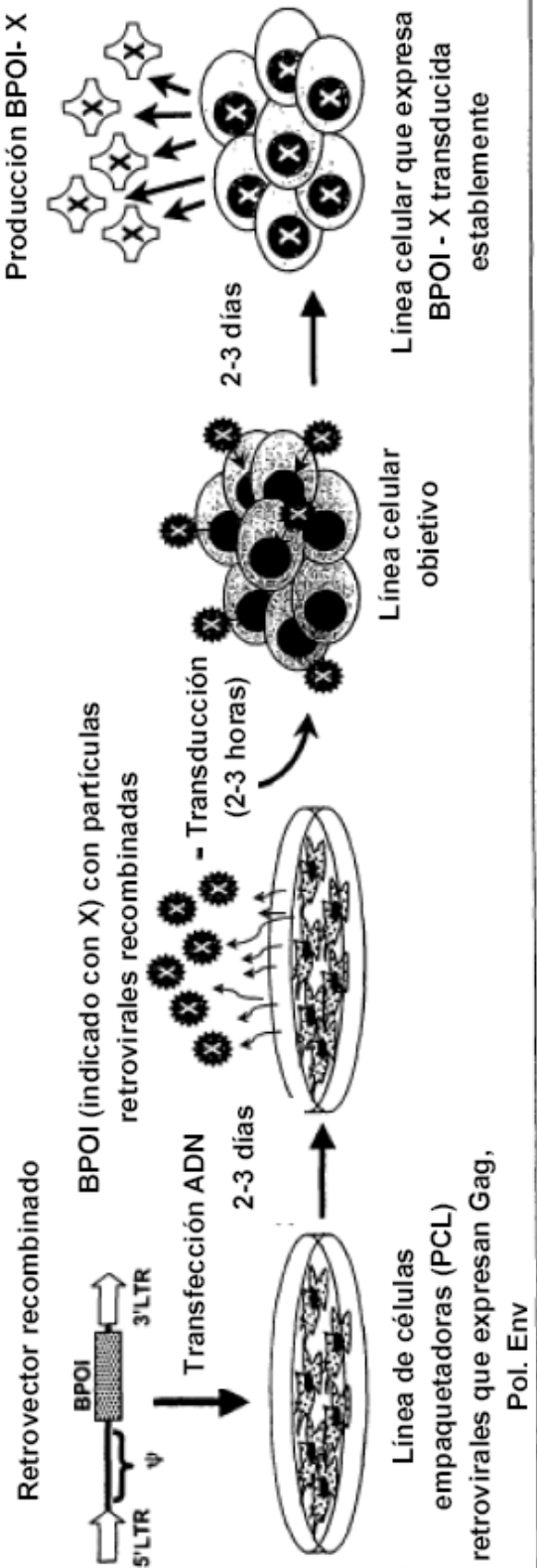


Fig. 4a+b

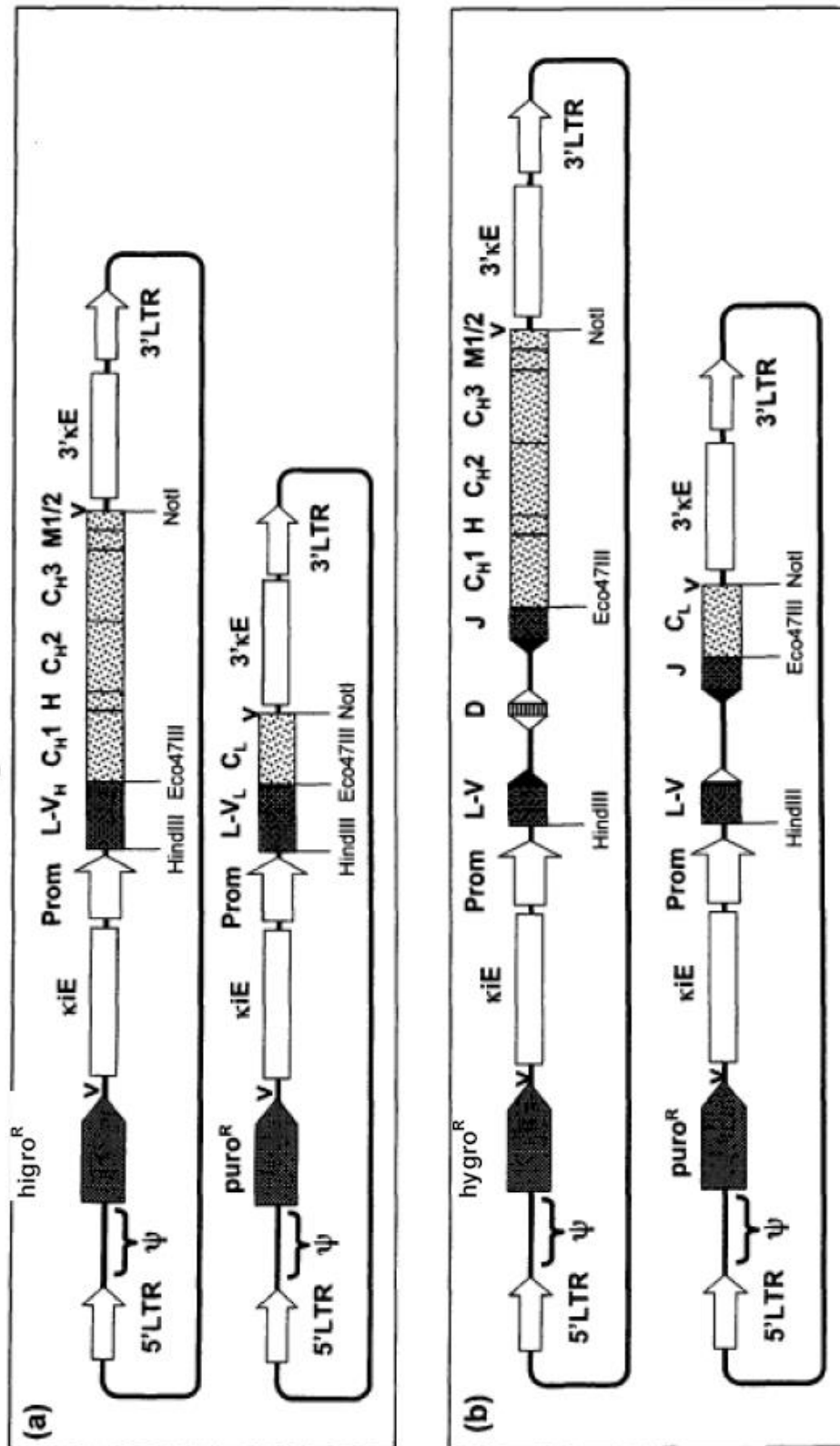
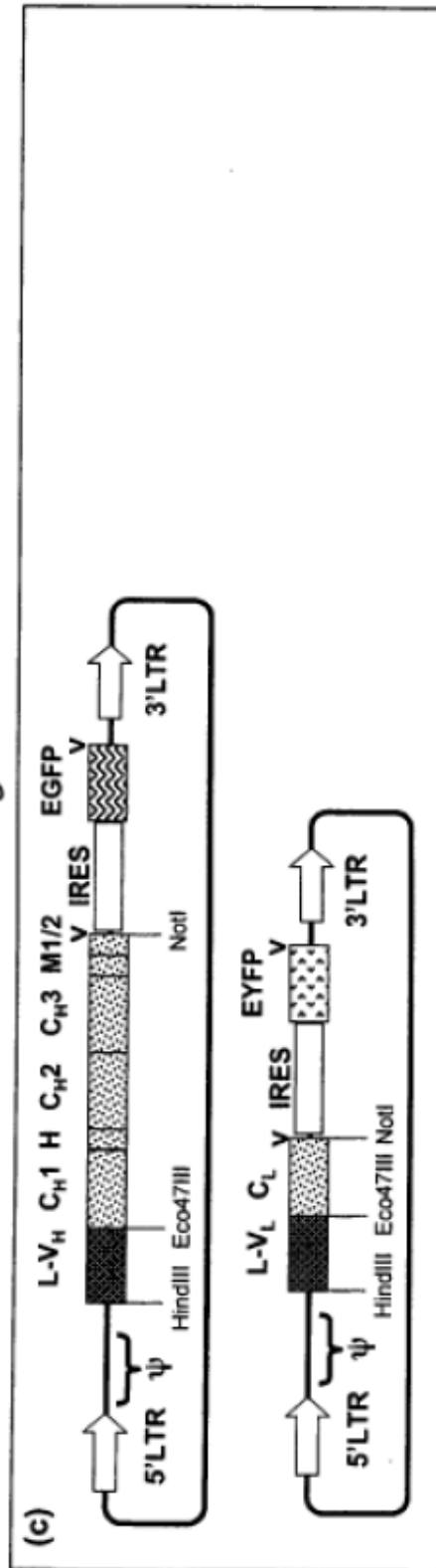
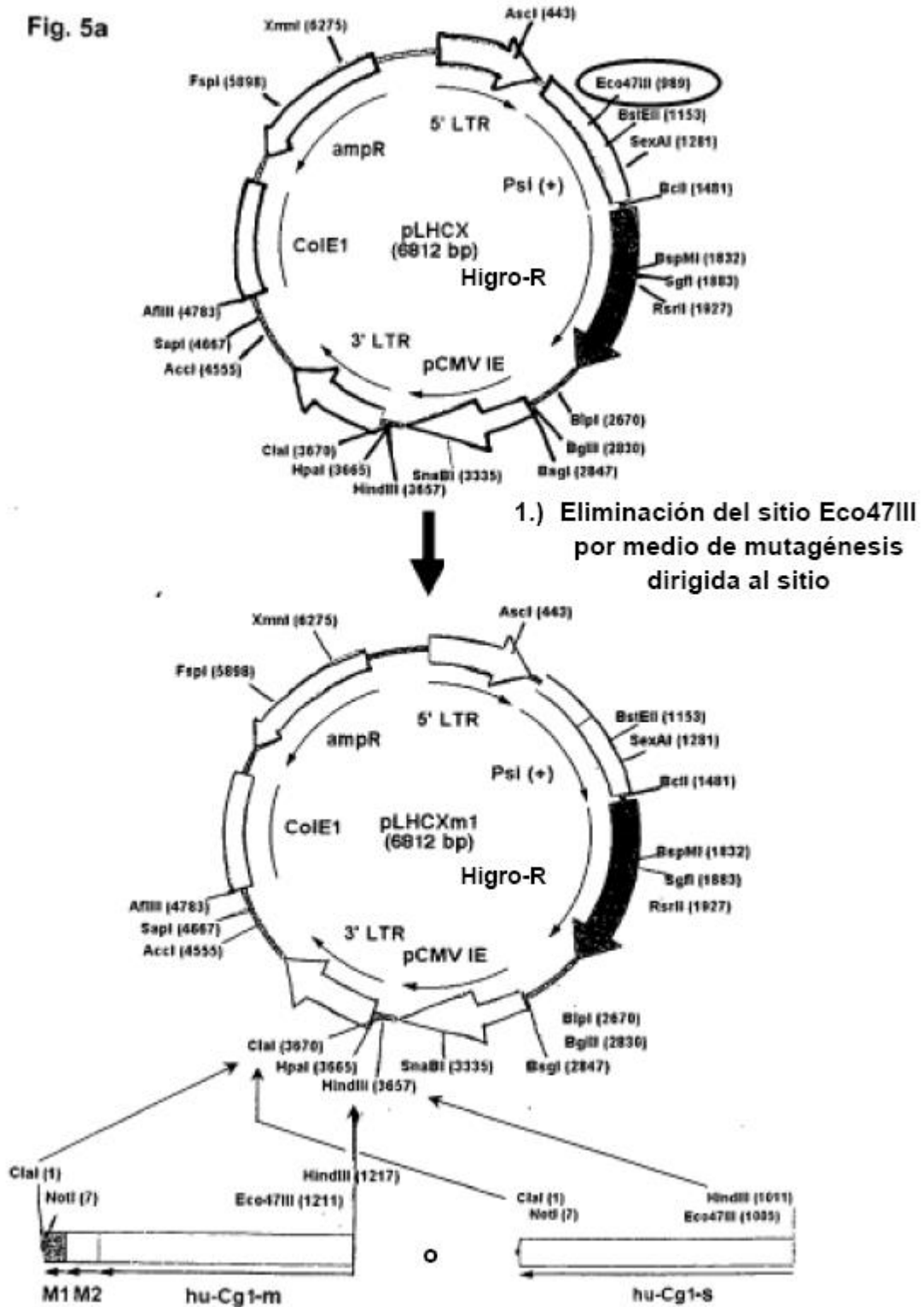


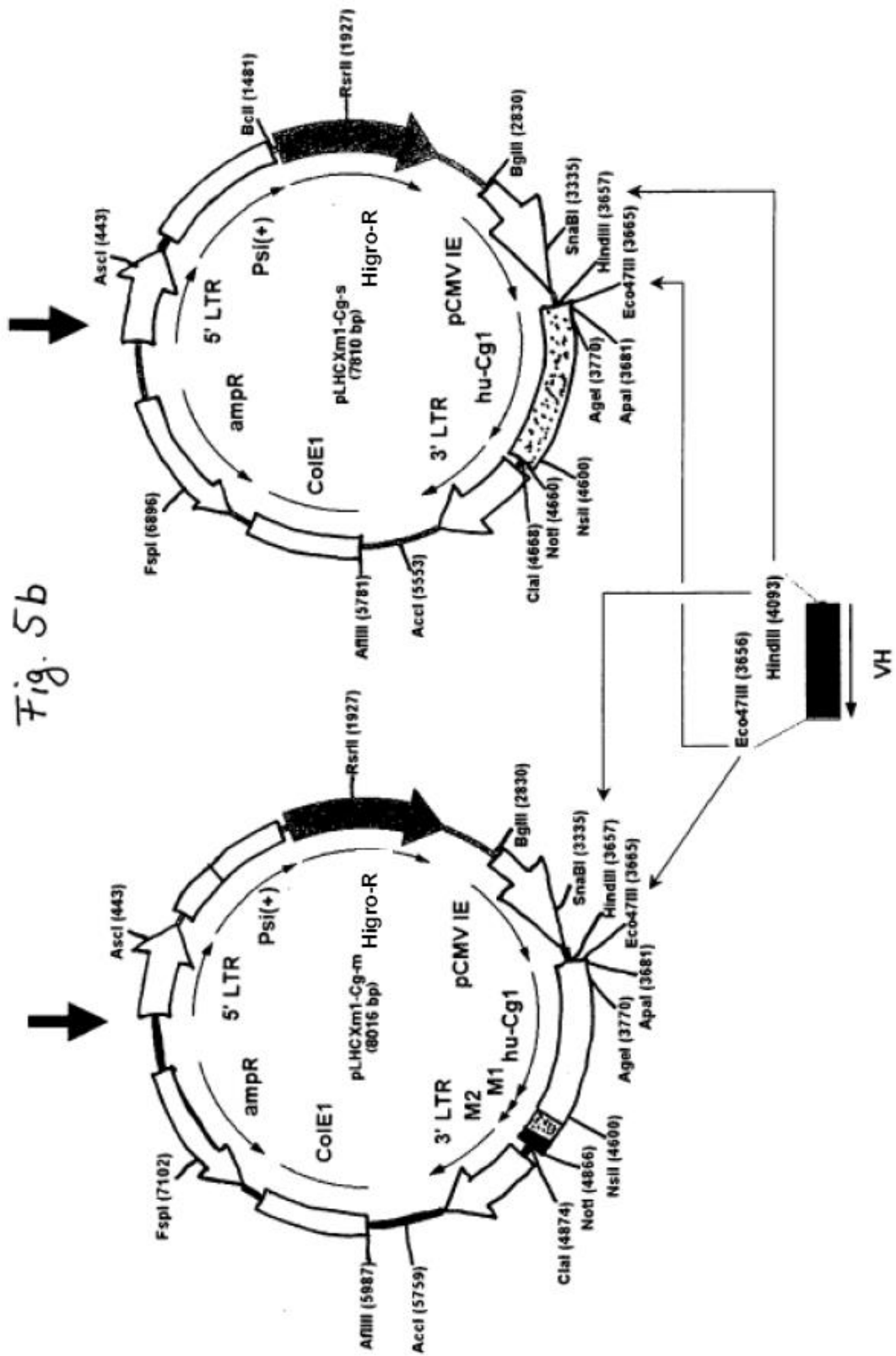
Fig. 4c

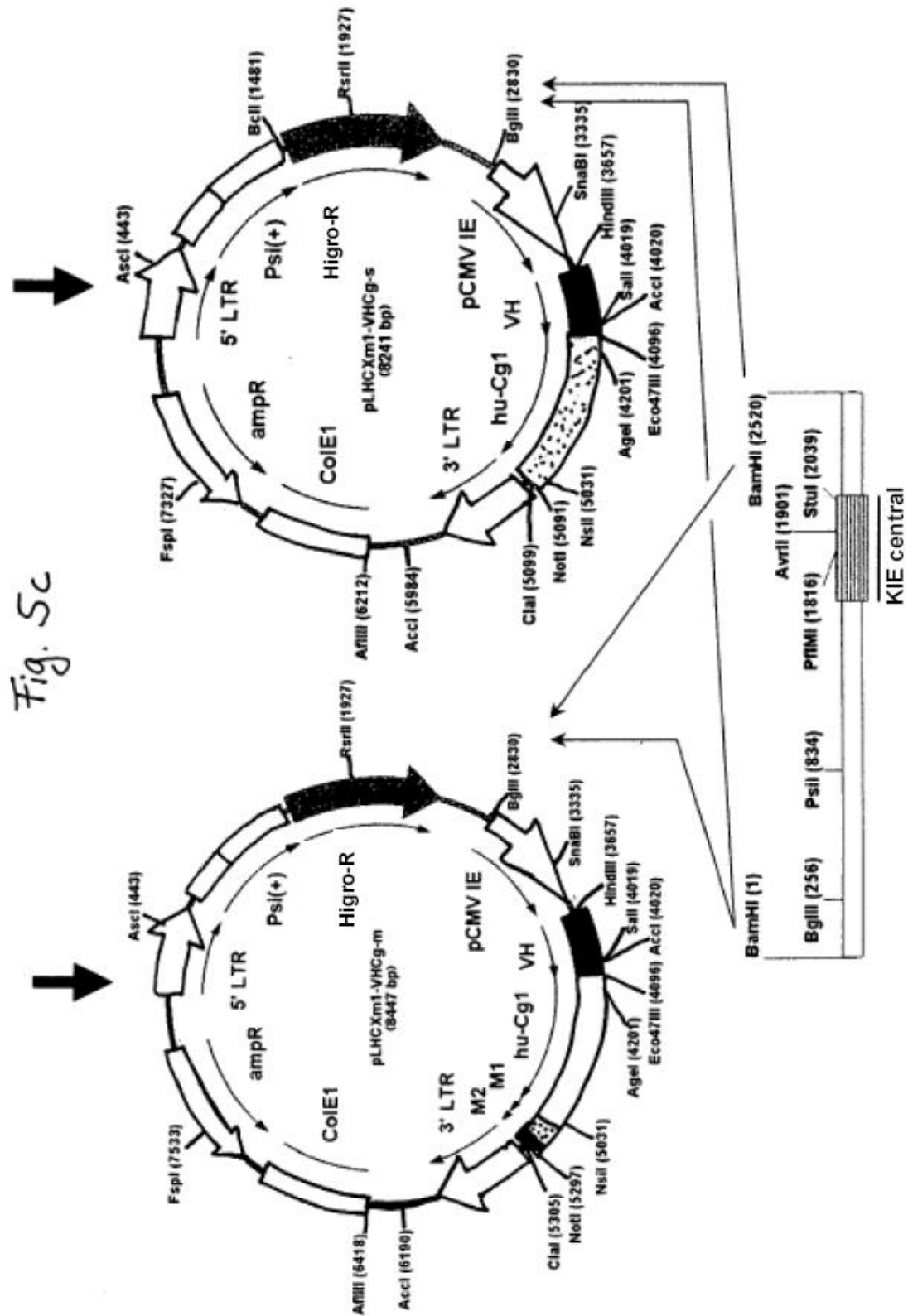


- y ◀ : 23 pares de bases se secuencias señal de recombinación y ◀ : 12 pares de bases RSS
- LTR : I repetición terminal (RSS) ψ : señal de empaquetamiento v : codón de terminación

Fig. 5a







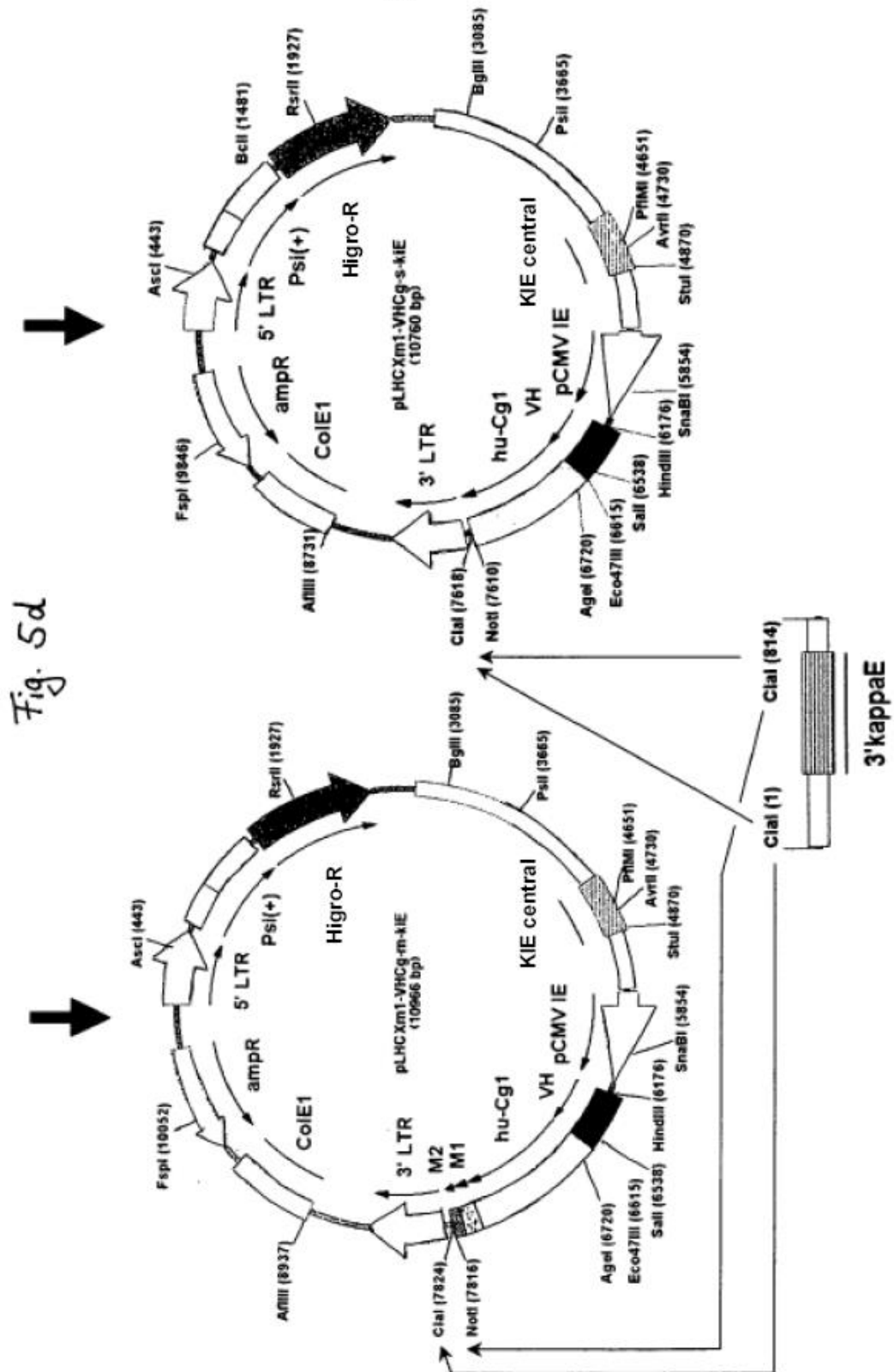
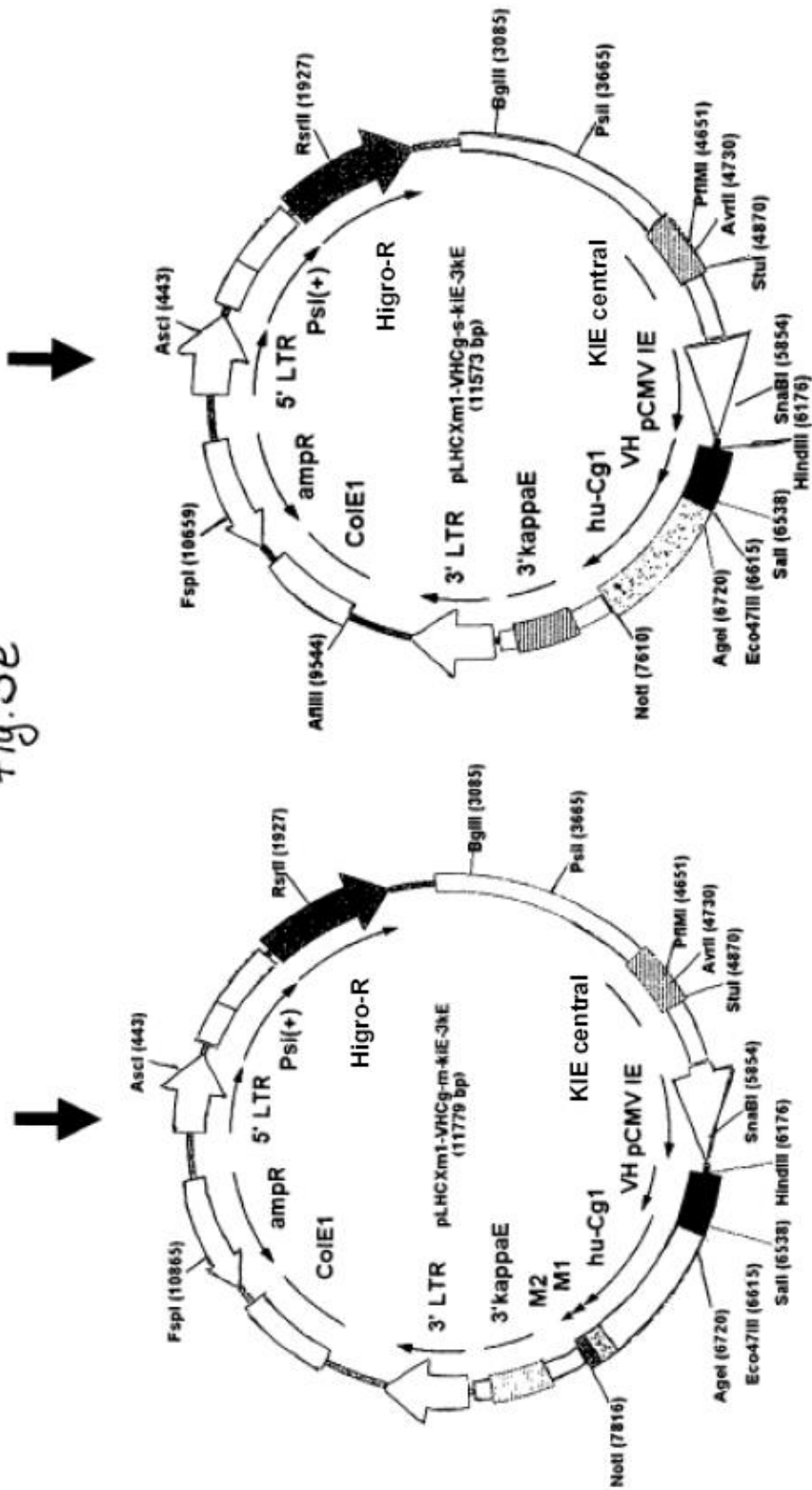
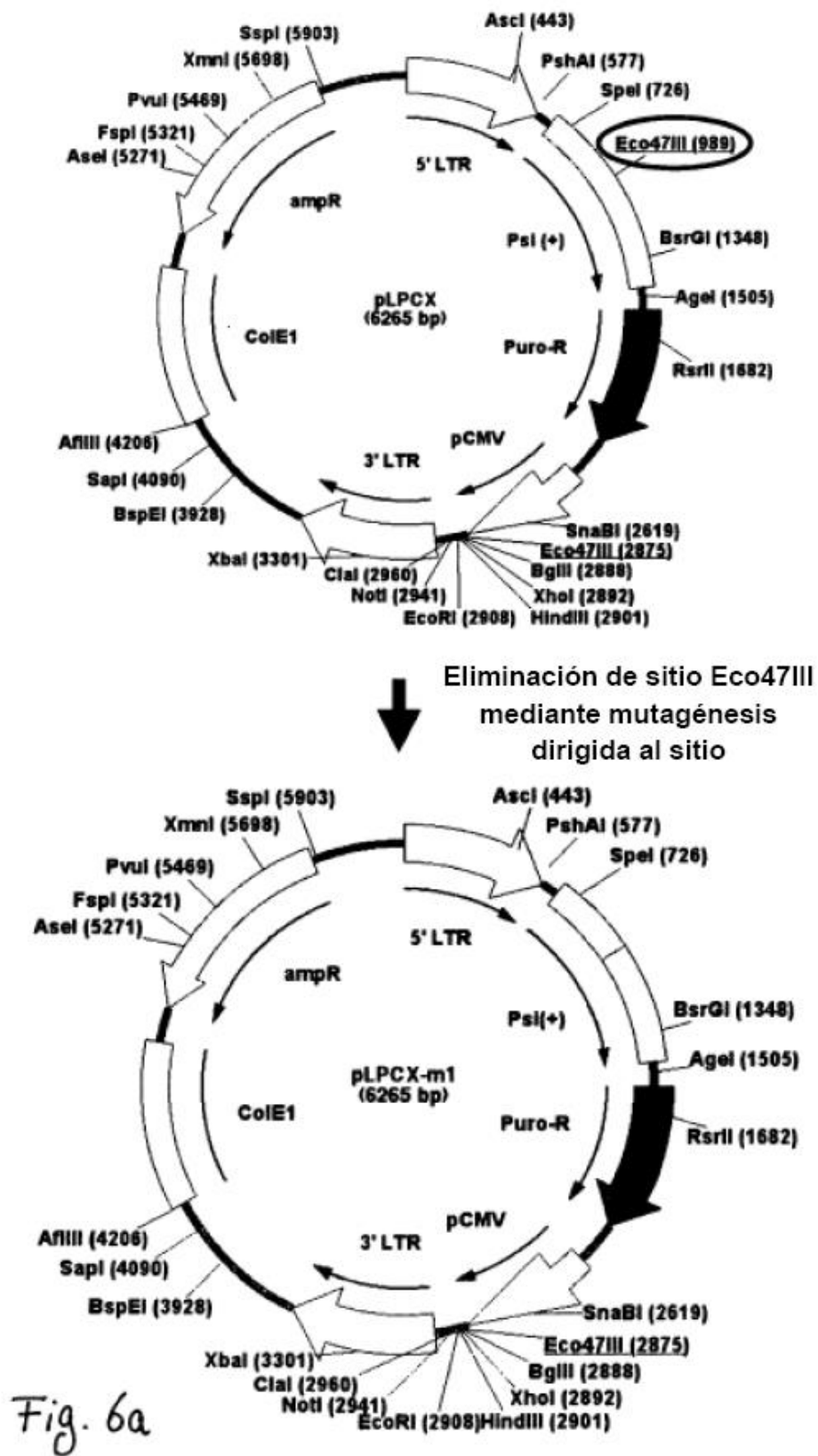


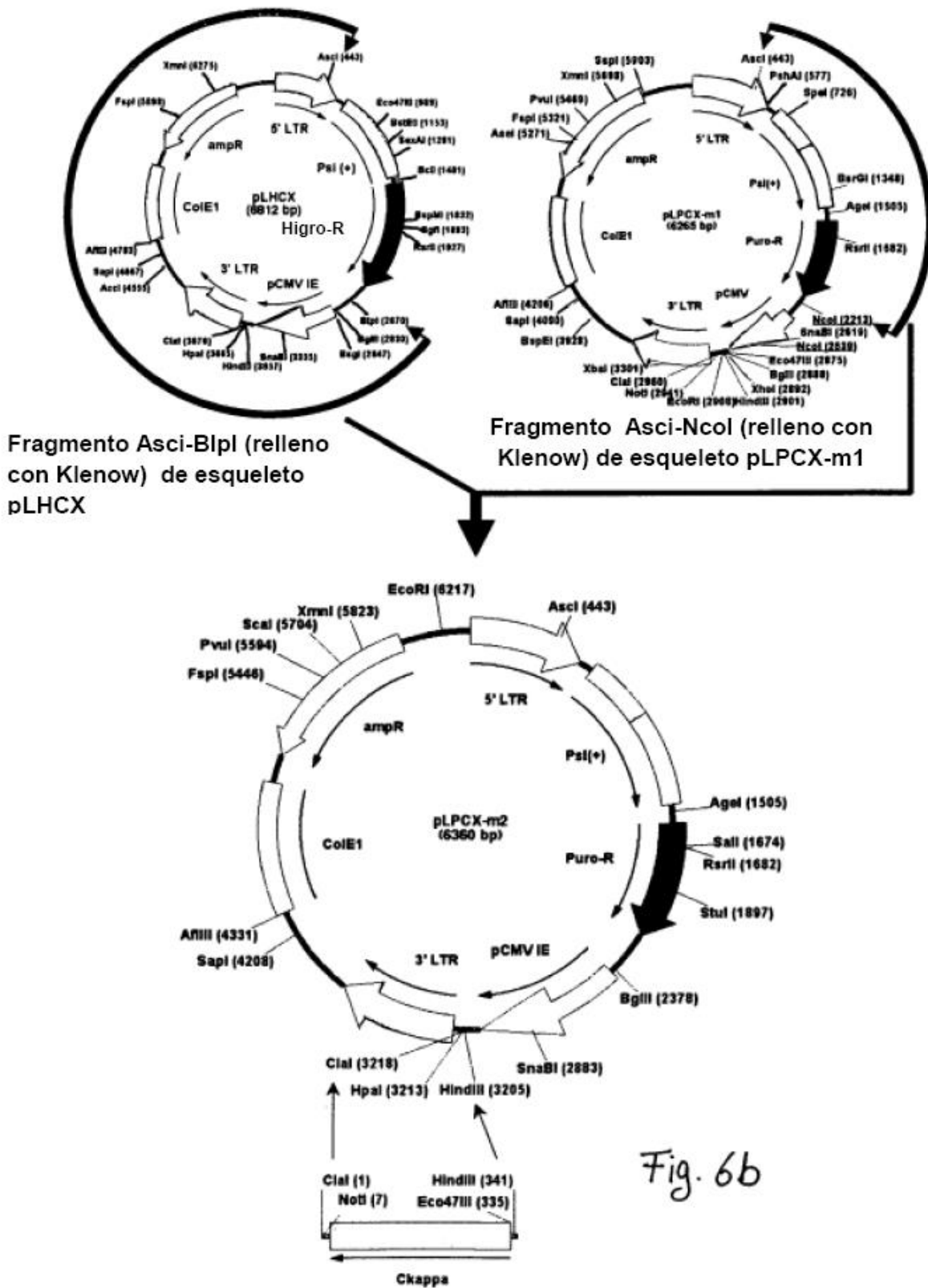
Fig. 5e



Construcción de expresión retroviral para y1H unida a membrana

Construcción de expresión retroviral para y1H secretada





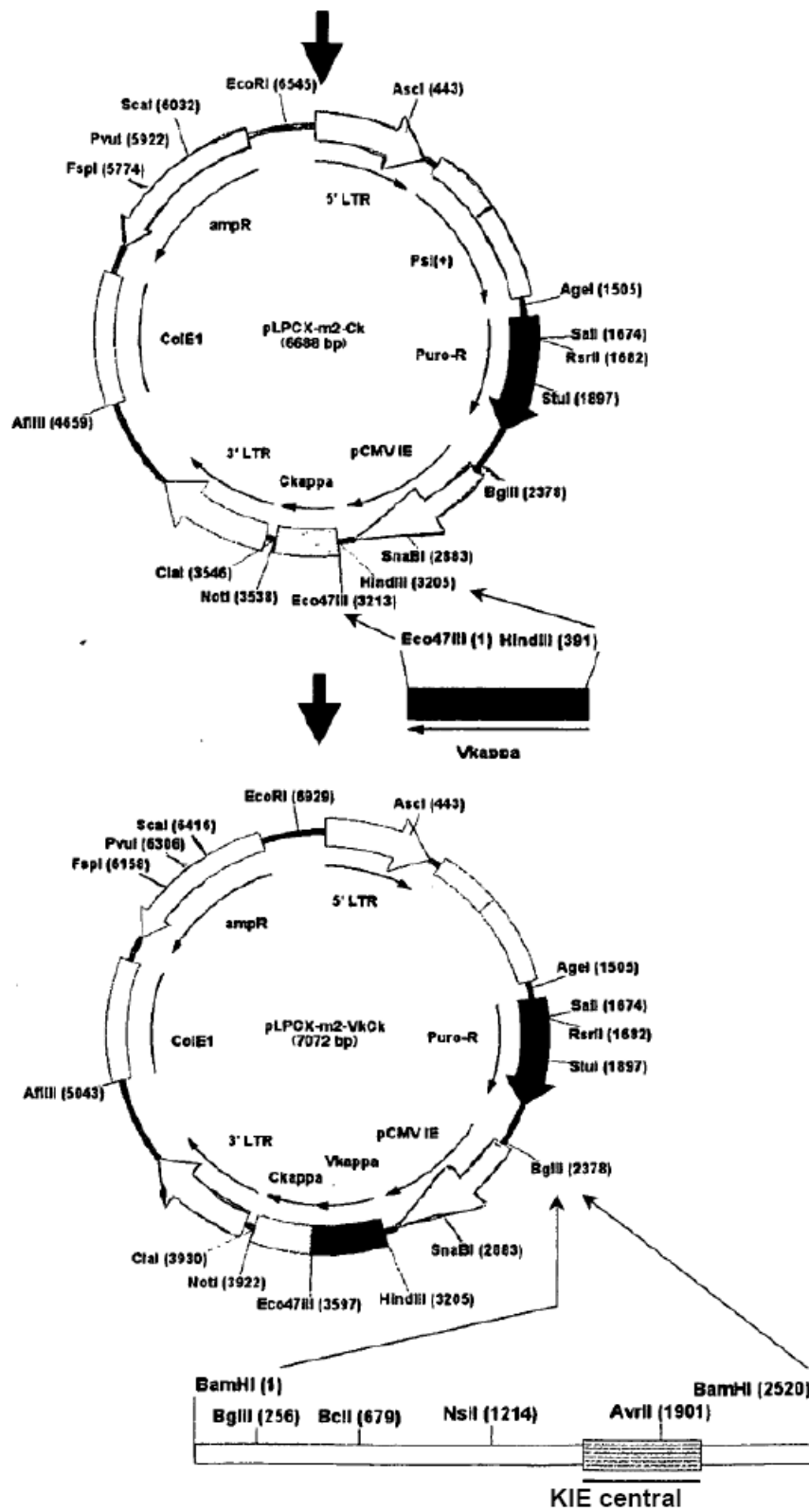


Fig. 6c

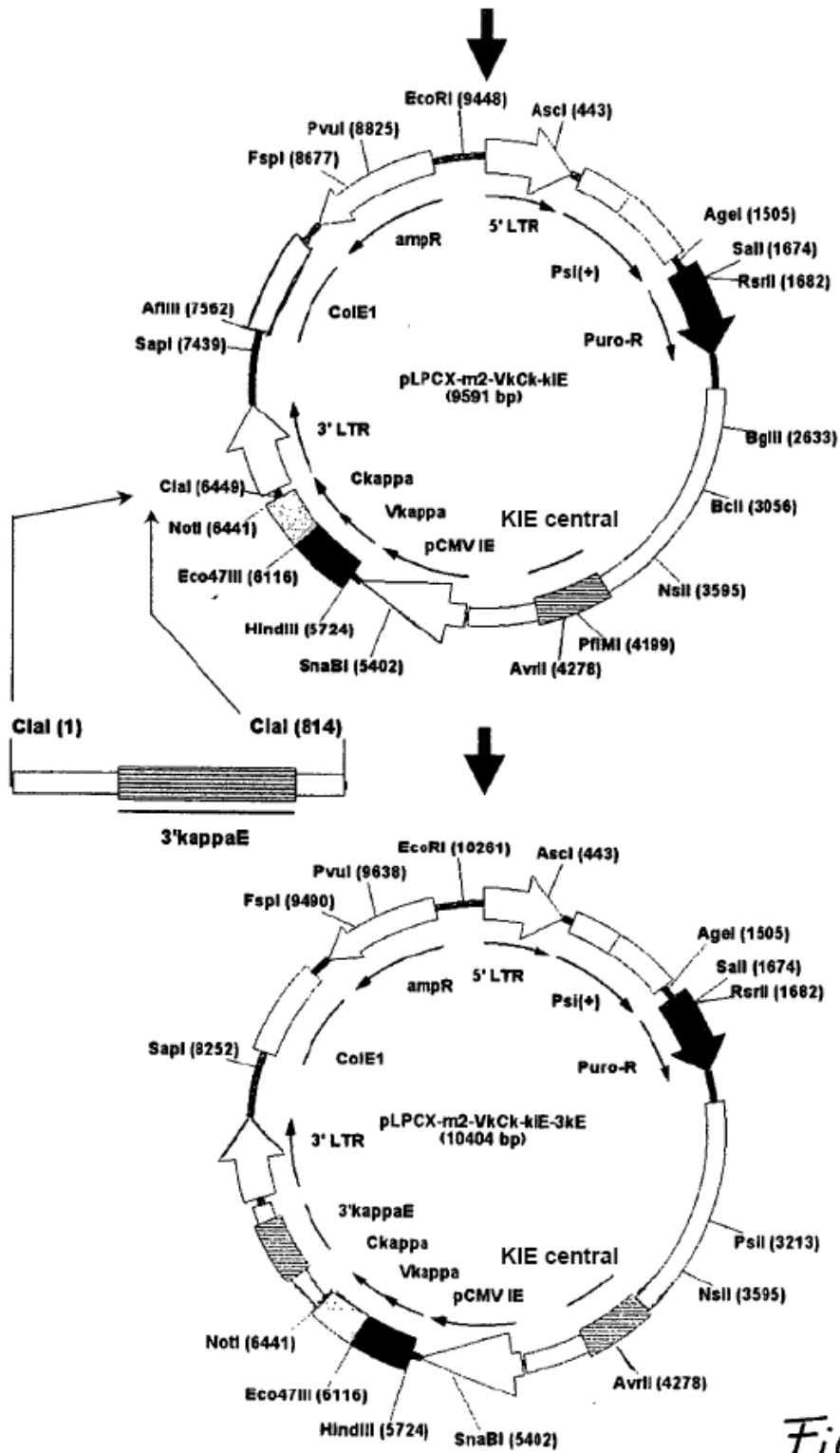


Fig. 6d

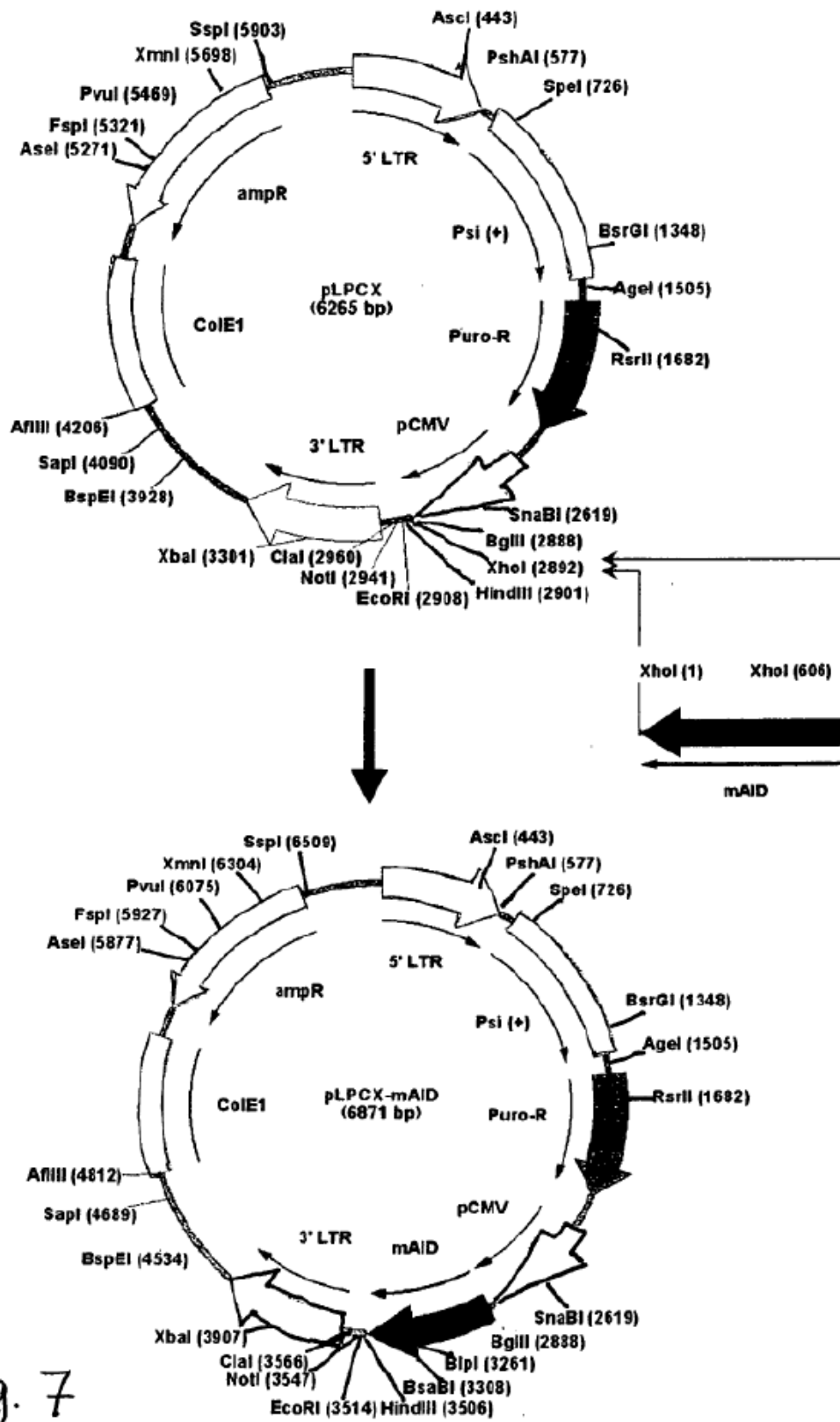


Fig. 7

- 1.) Amplificación PCR de marco de lectura abierto EGFP usando
plantilla : pIRES-EGFP + cebadores PCR : Seq-ID 17 & Seq-ID 18

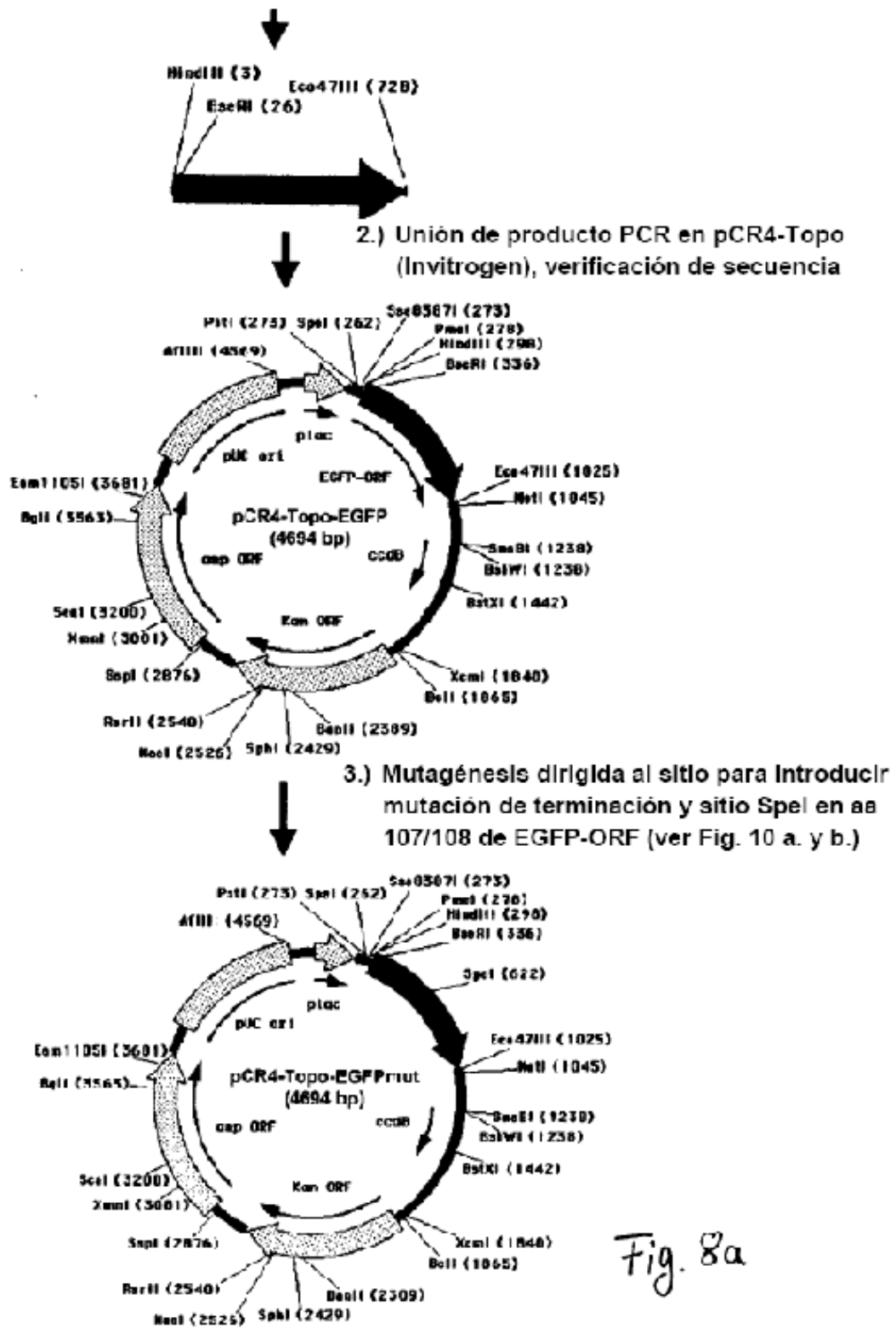


Fig. 8b

4.) Unión de EGFP ORF mutado
como fragmentos HindIII/Eco47III del
pCR4-Topo EGFPmut en pLHCXm1-
VHCY-s y en pLHCXm1-VHCY-s-K
iE-3'kE

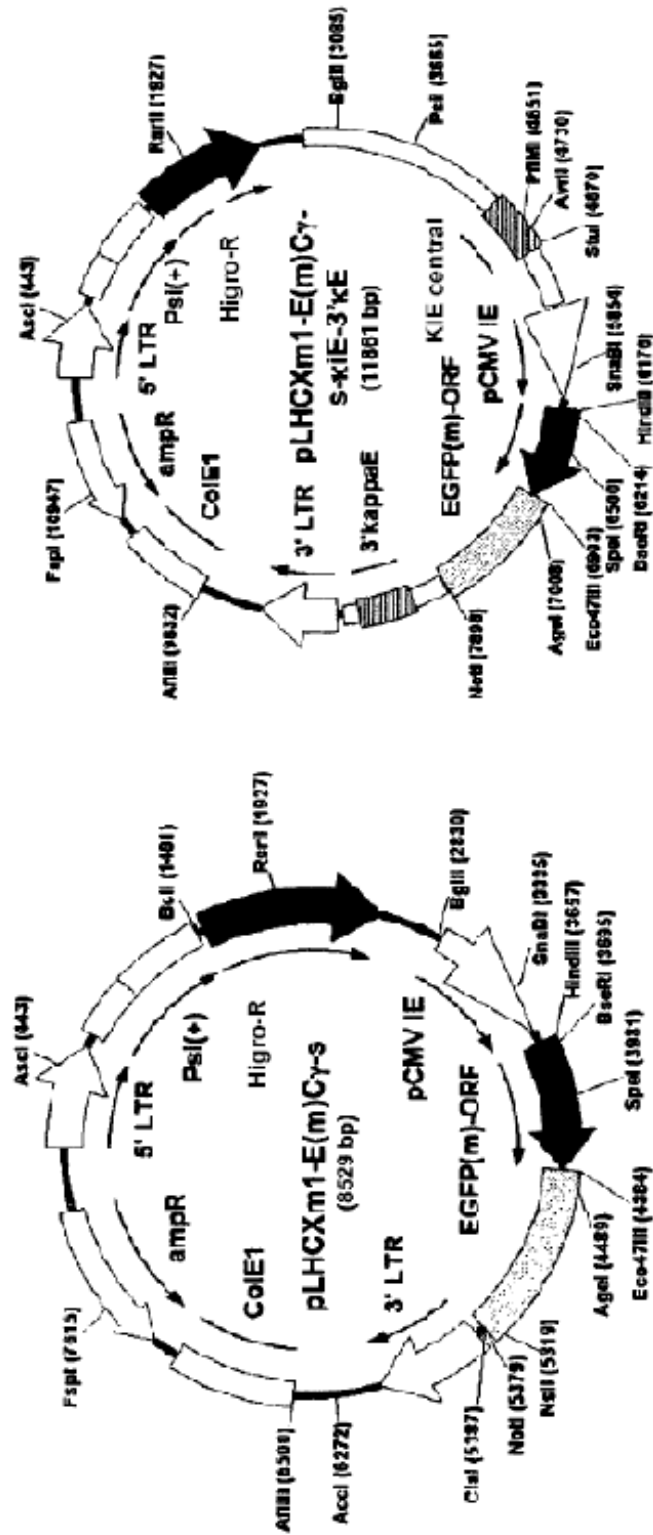


Fig. 9 a)

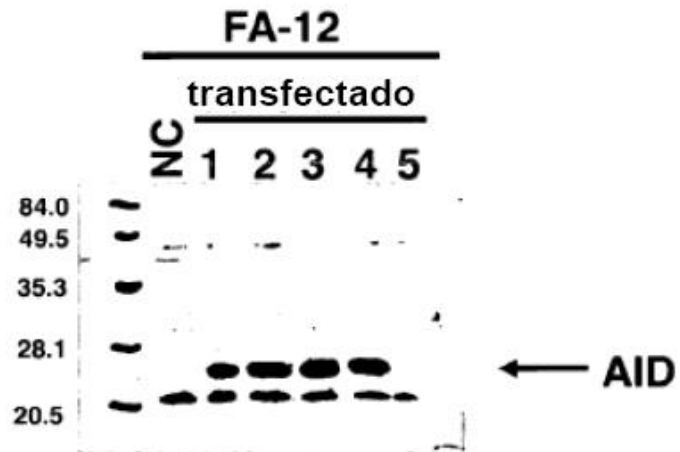
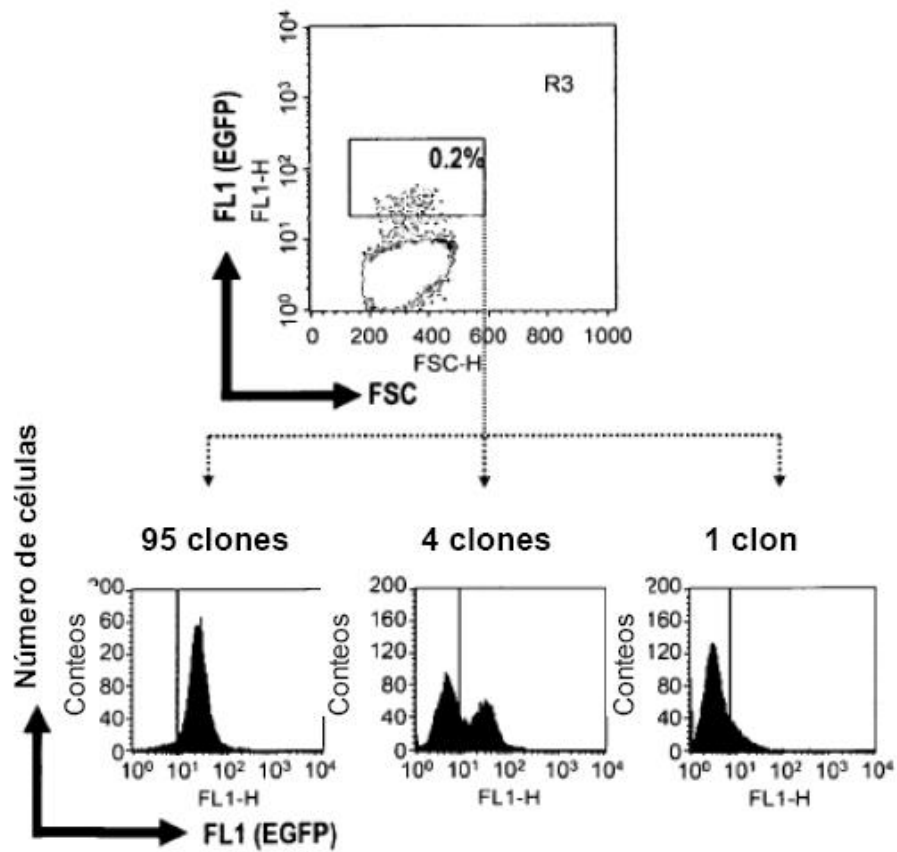
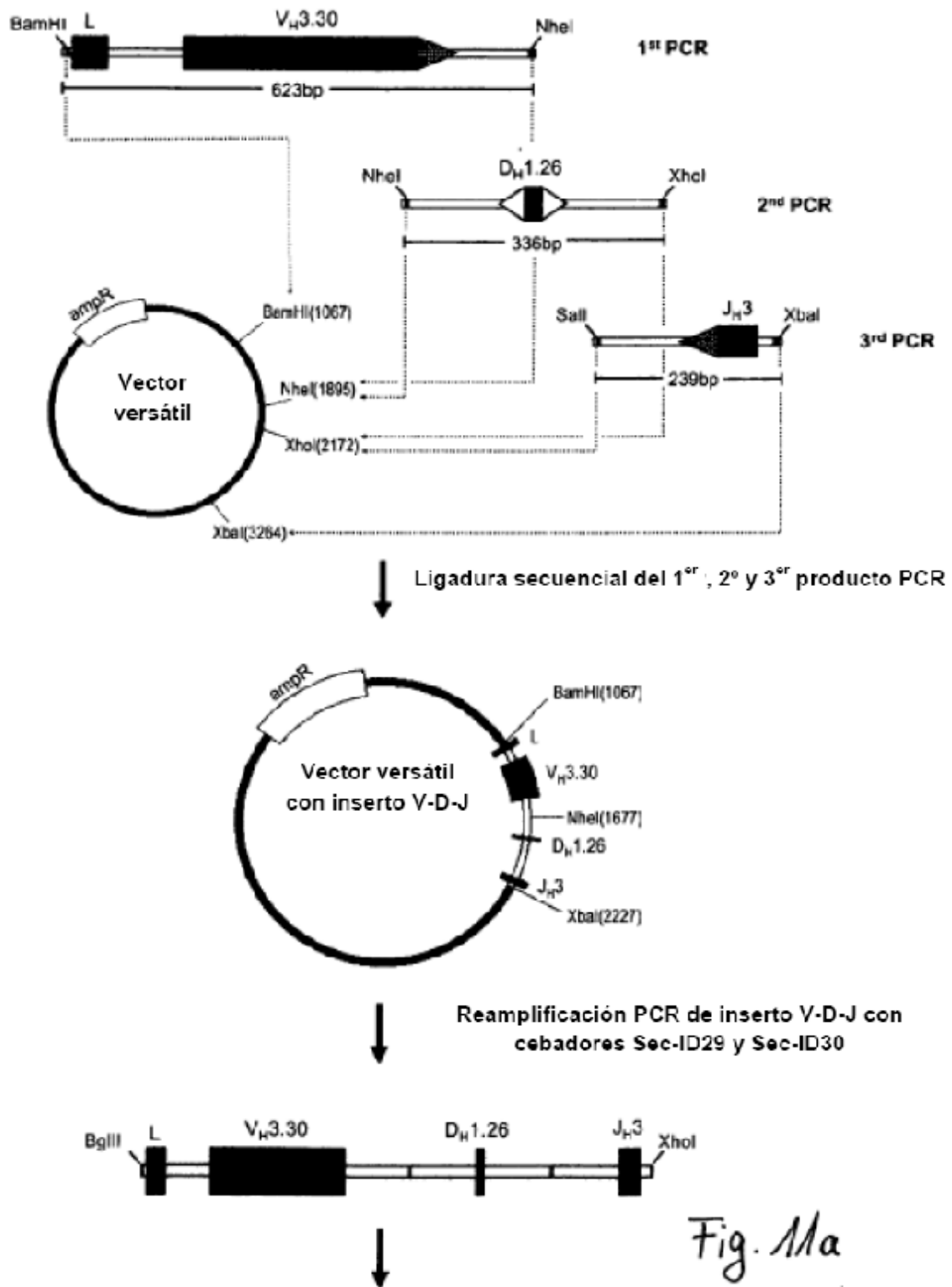


Fig. 9 b)





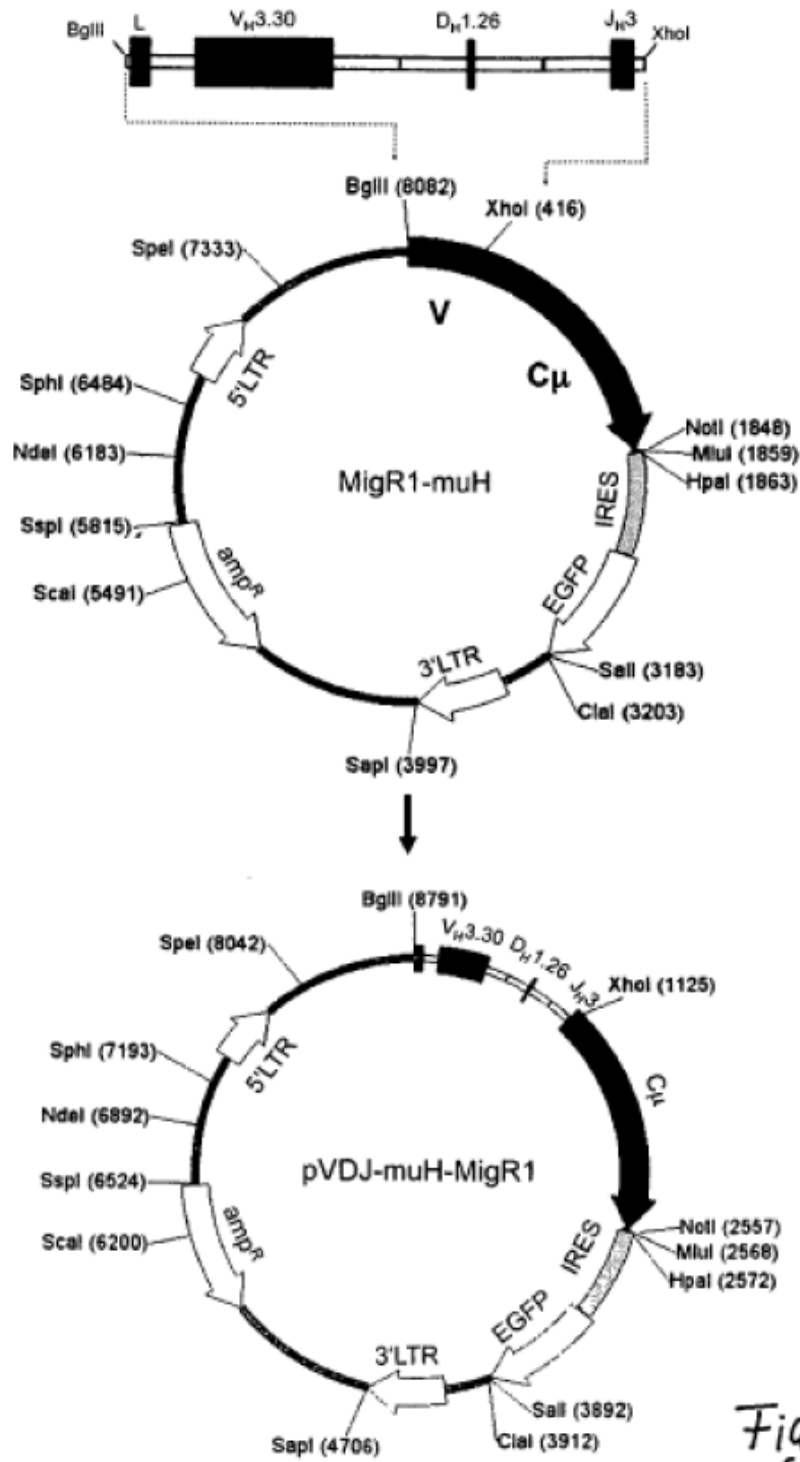
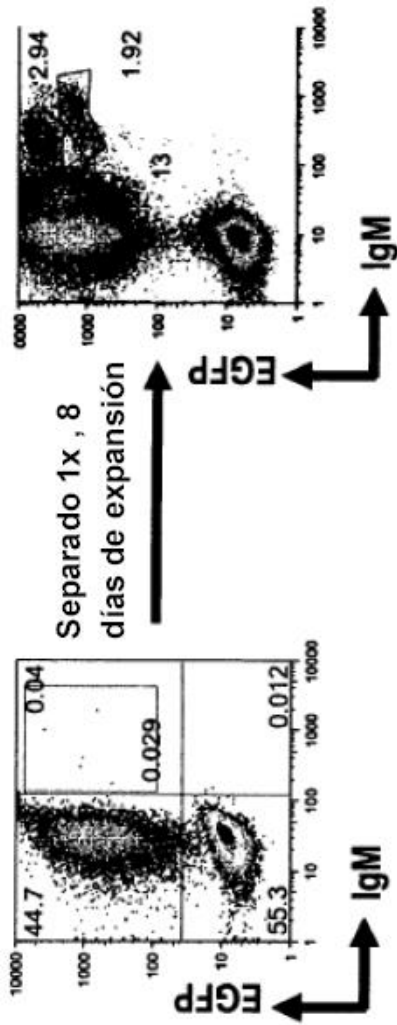


Fig. 11b

Fig. 12

(a)



(b)

Línea germinal	Y Y C A K TAT TAC TGT GCG AAA GA G GTA TAG TGG GAG CTA CTAC T GAT GCT TTT GAT ATC TGG V _H 3.30 D _H 1.26 J _H 3
Clon 225	Y Y C A K D Q TAT TAC TGT GCG AAA GA T CAA V _H 3.30 N-region D _H 1.26 J _H 3

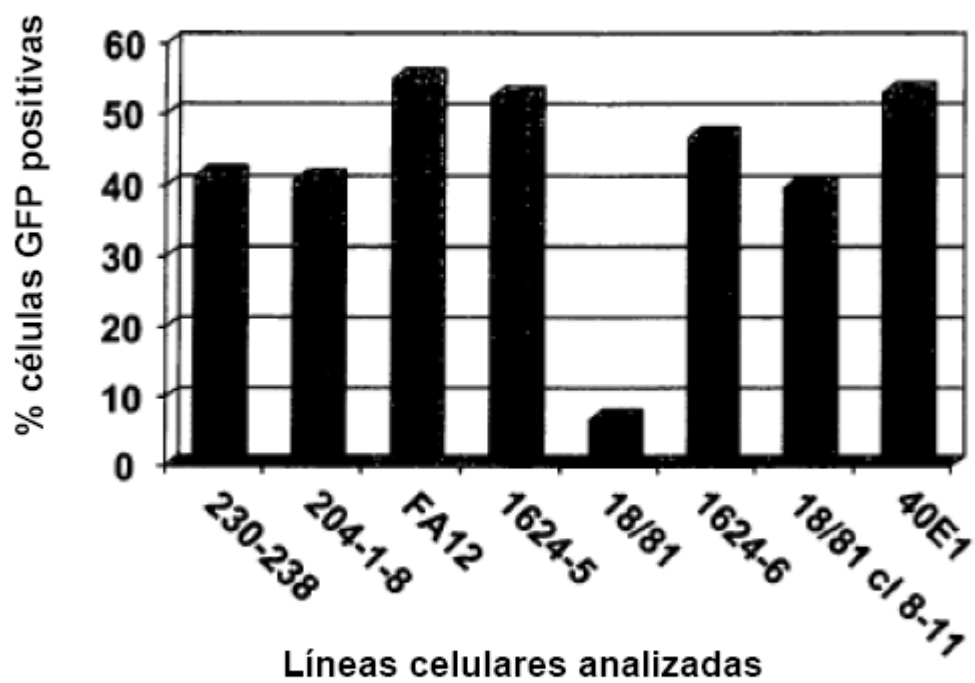


Fig. 13

Fig. 14

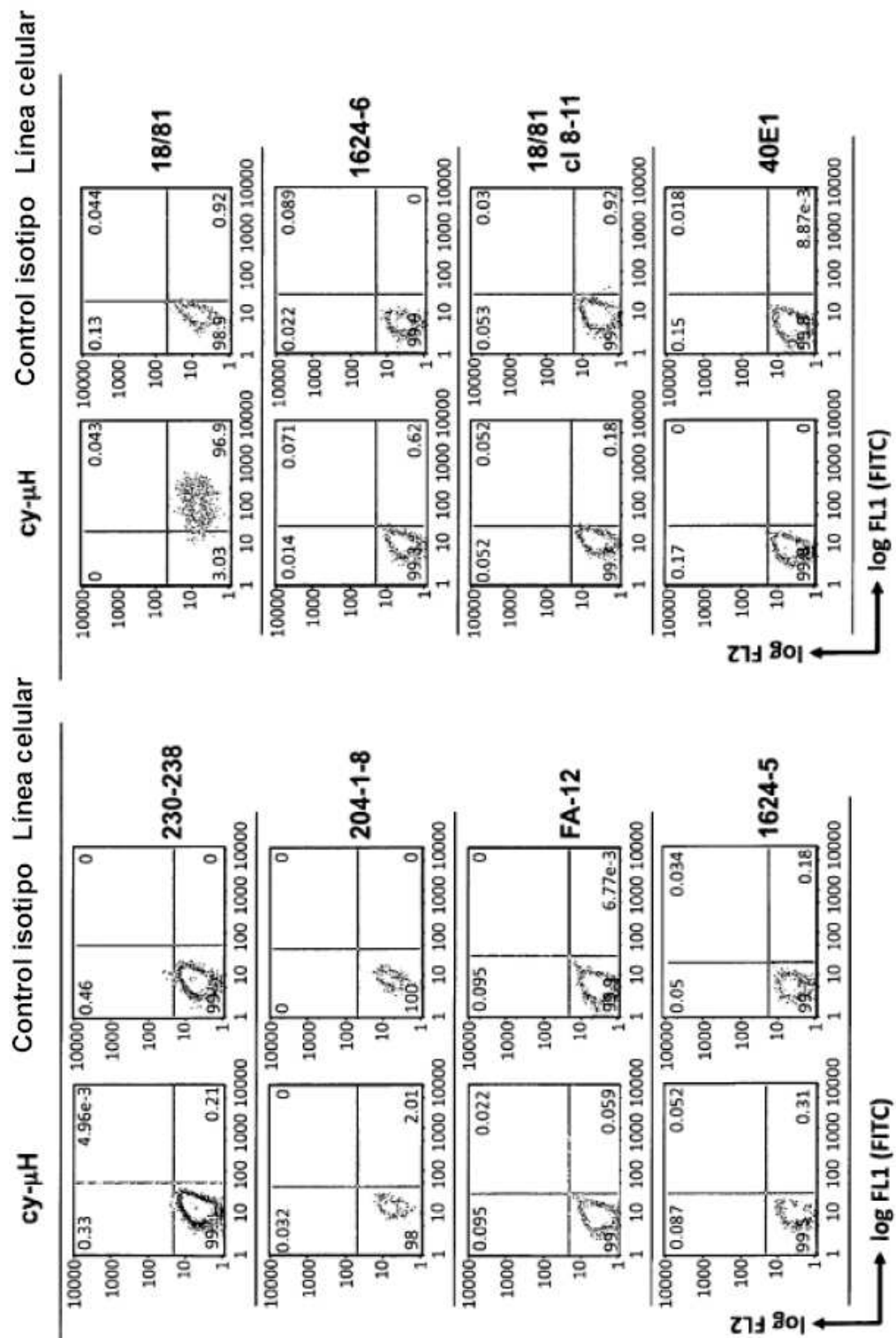


Fig. 15

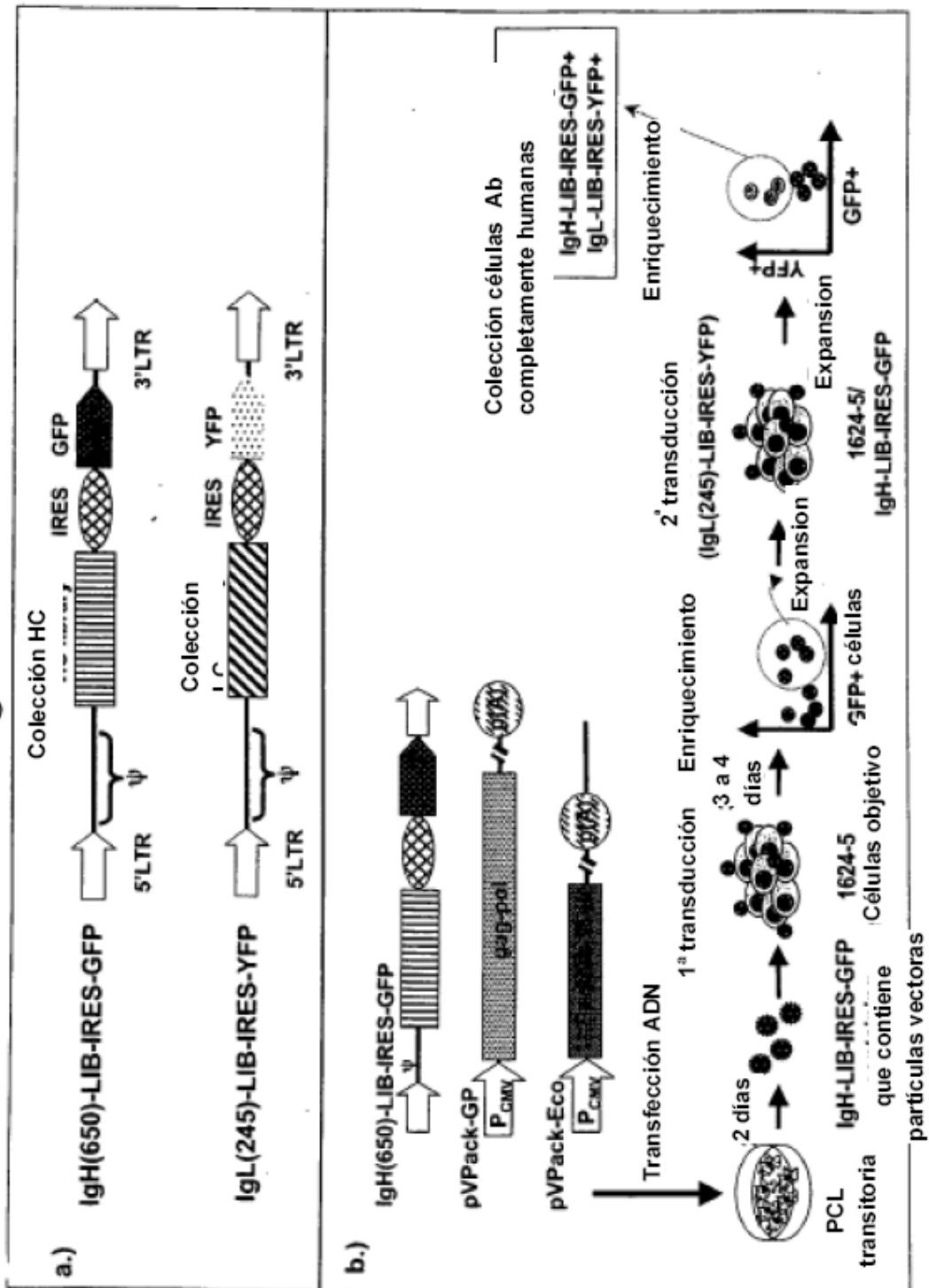


Fig. 16

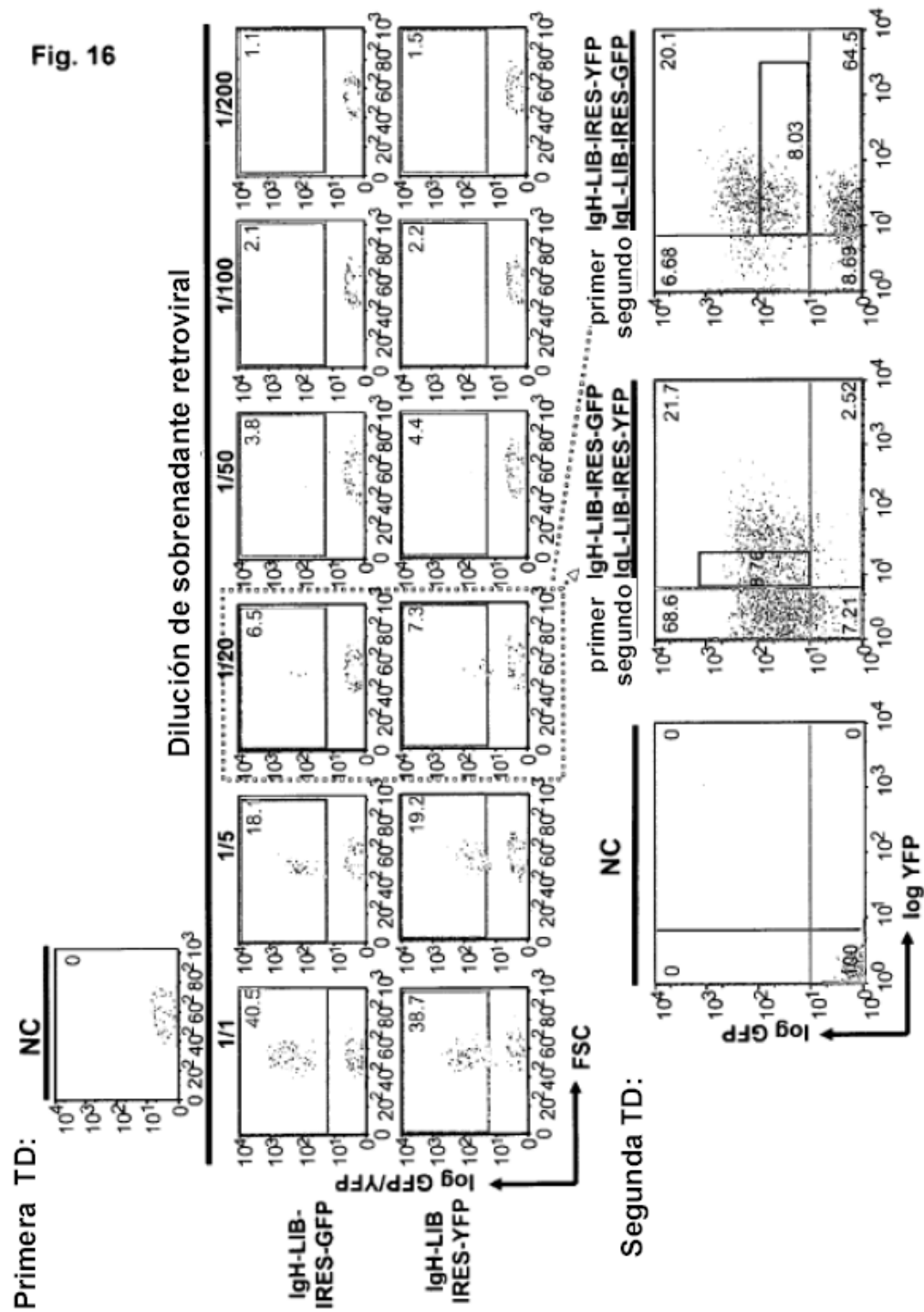


Fig. 17

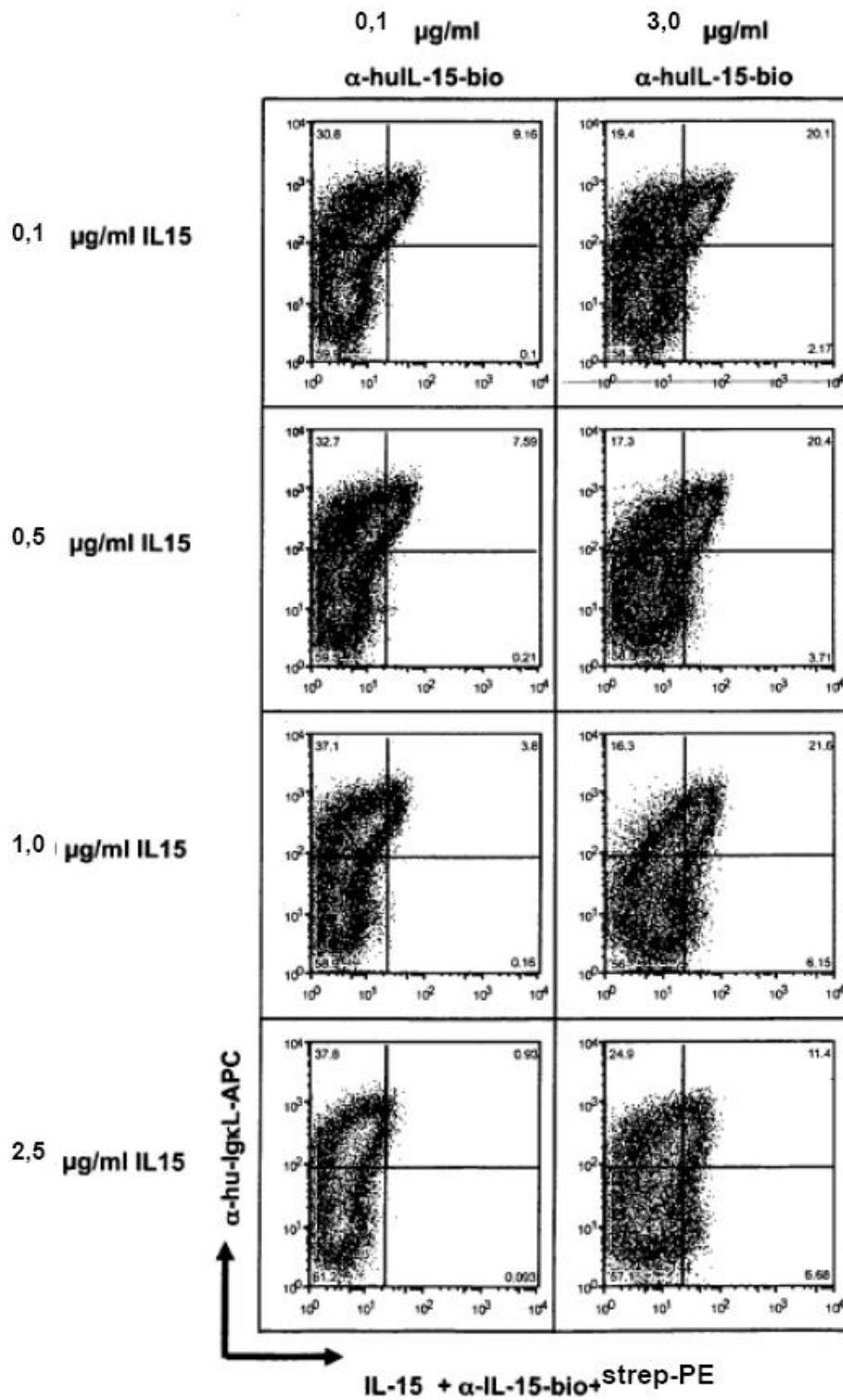


Fig. 18

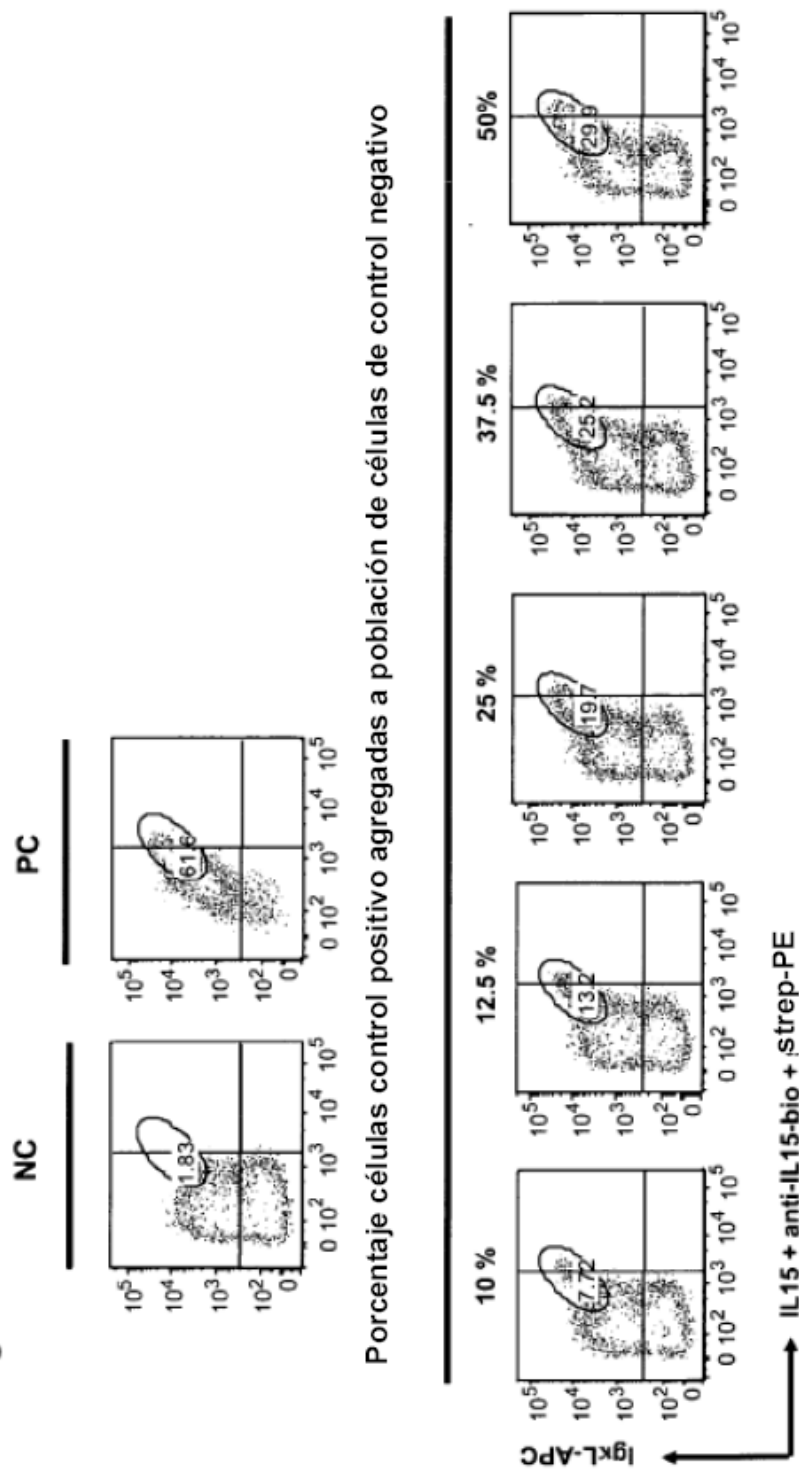


Fig. 19

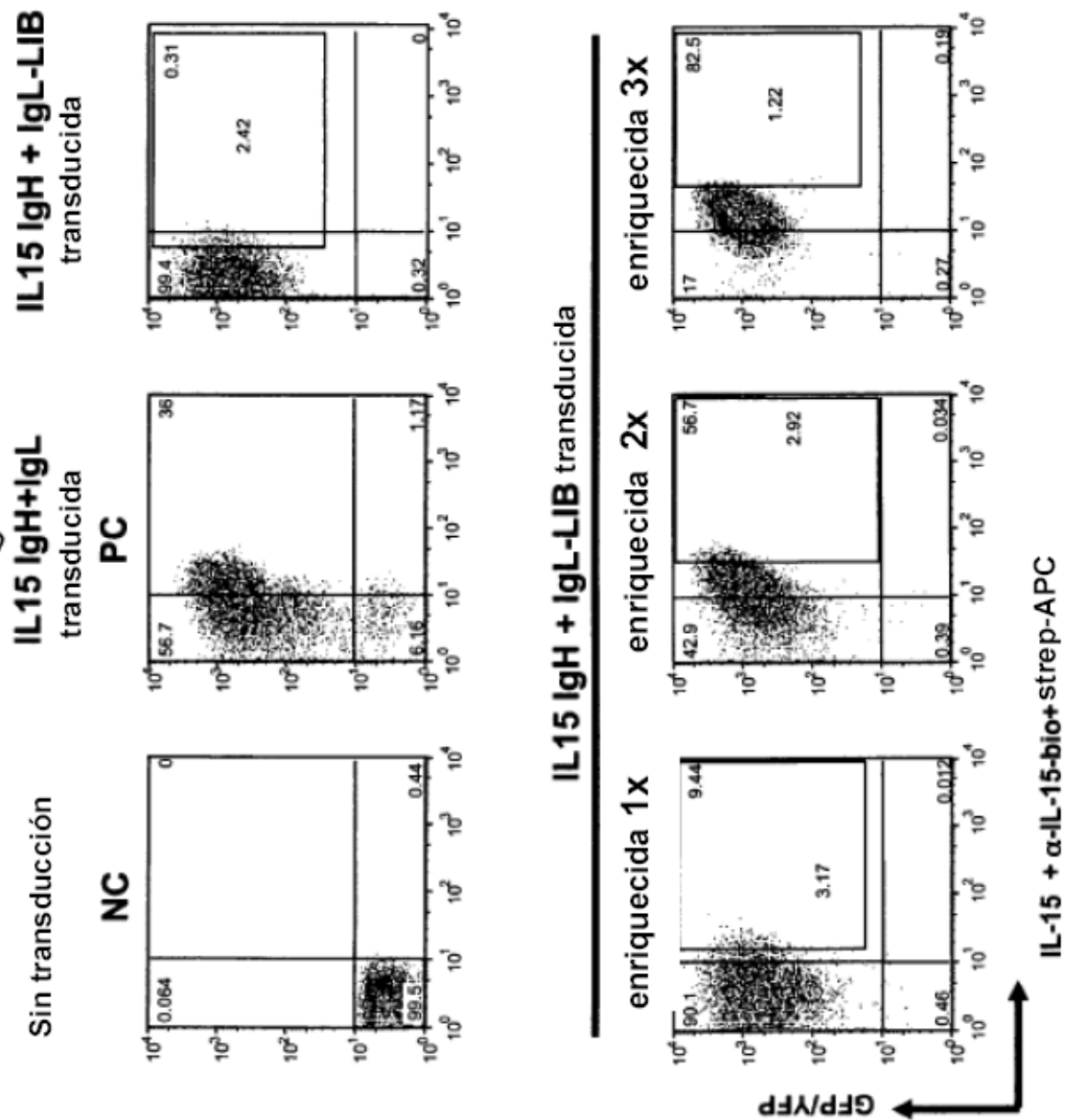


Fig. 20

IL15 IgH+IgL
transducida

Sin transducción

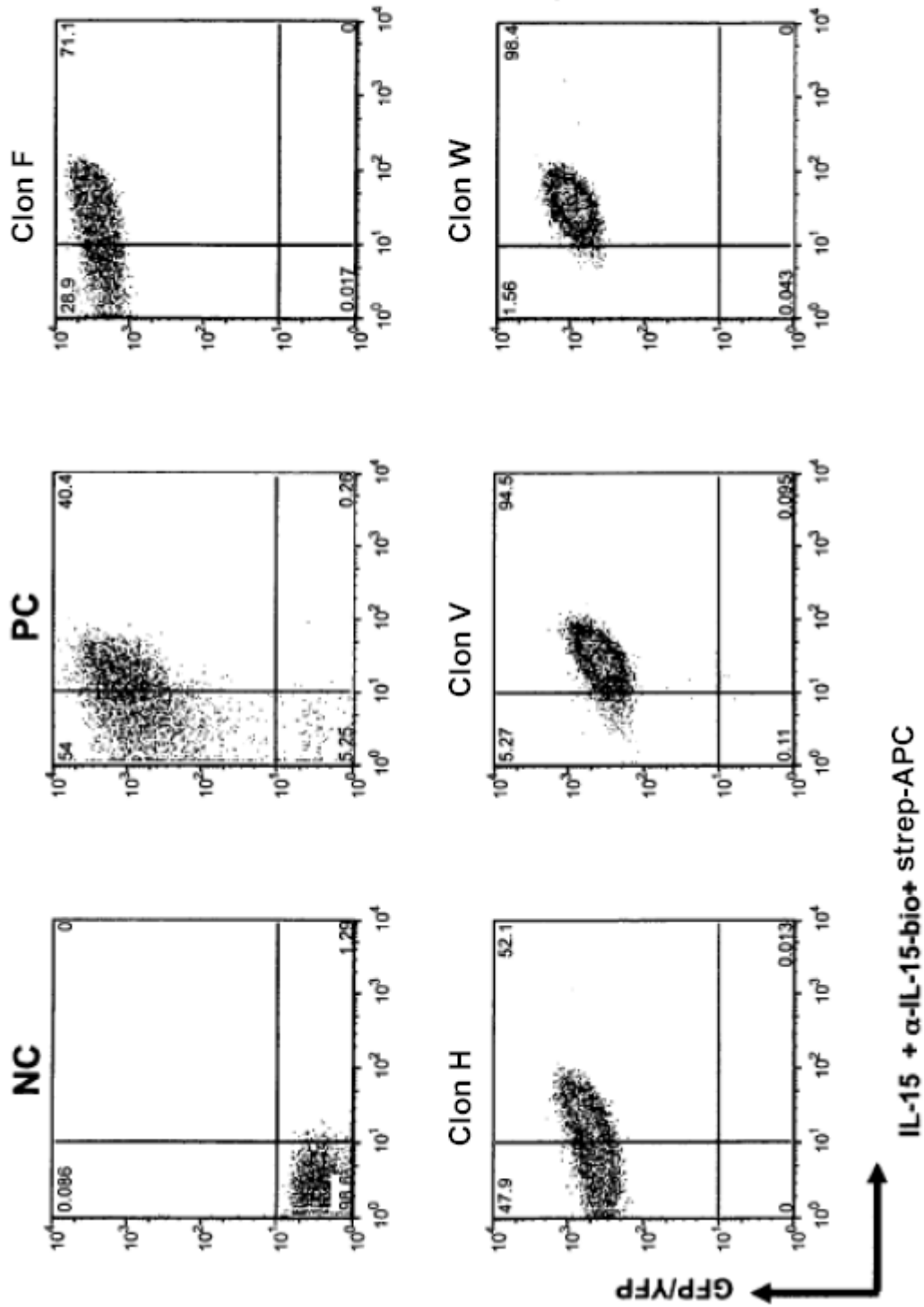


Fig. 2A

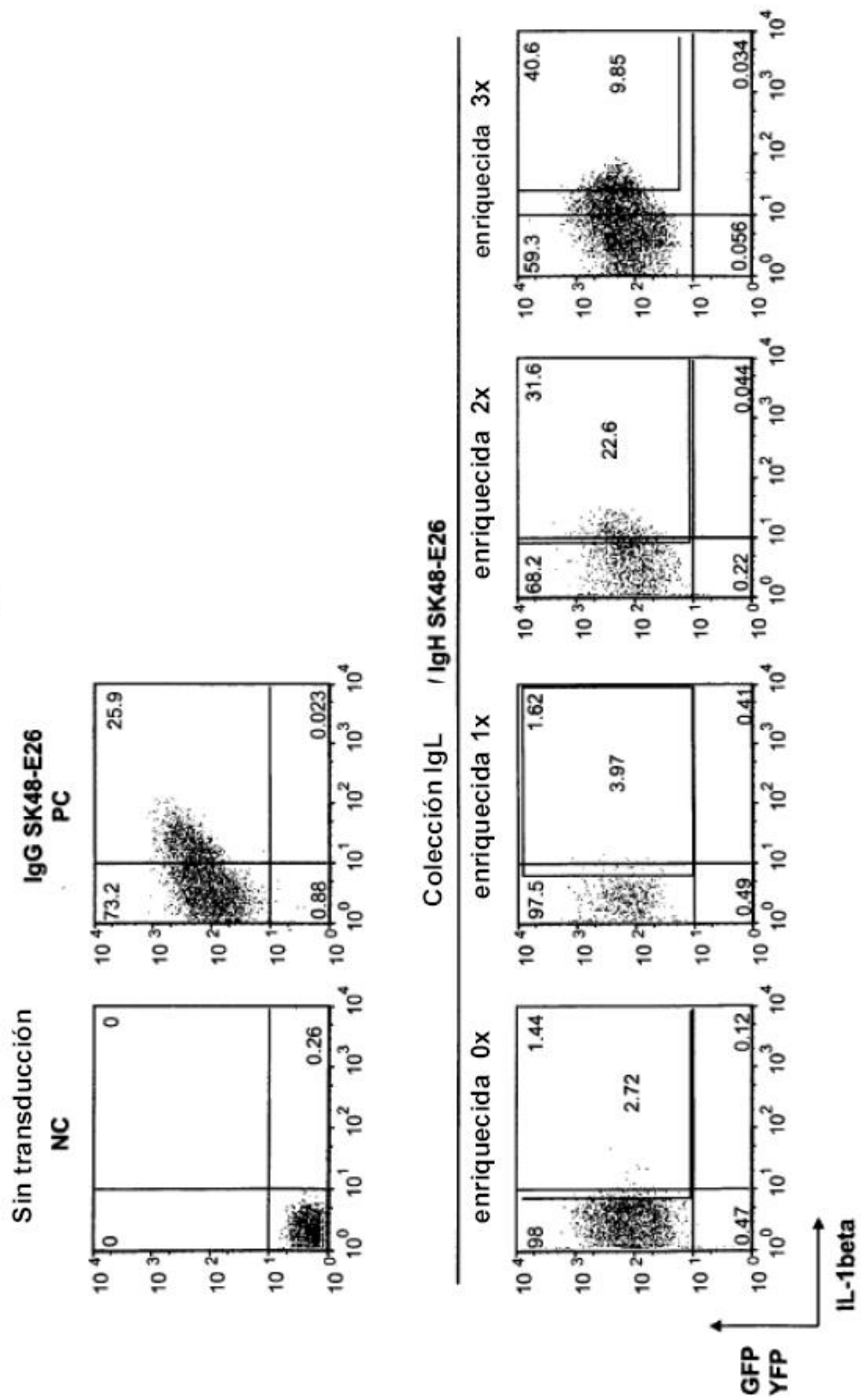


Fig. 22

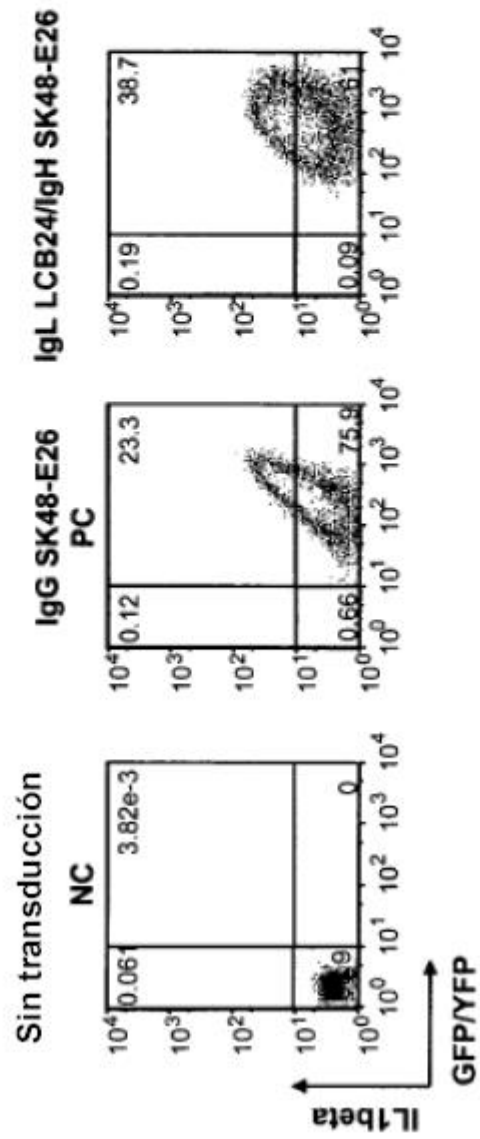


Fig. 23

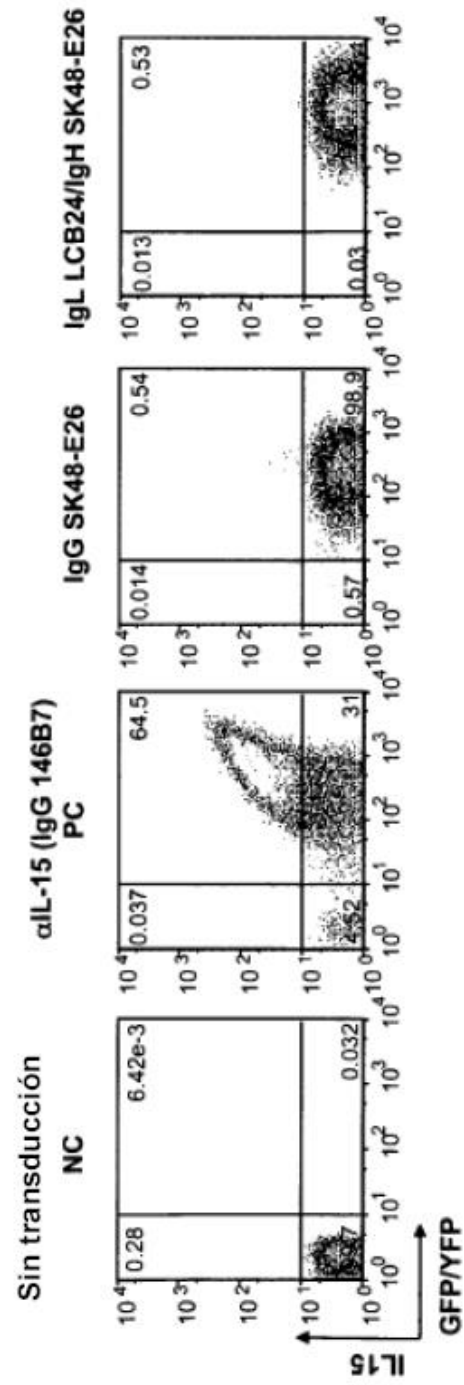
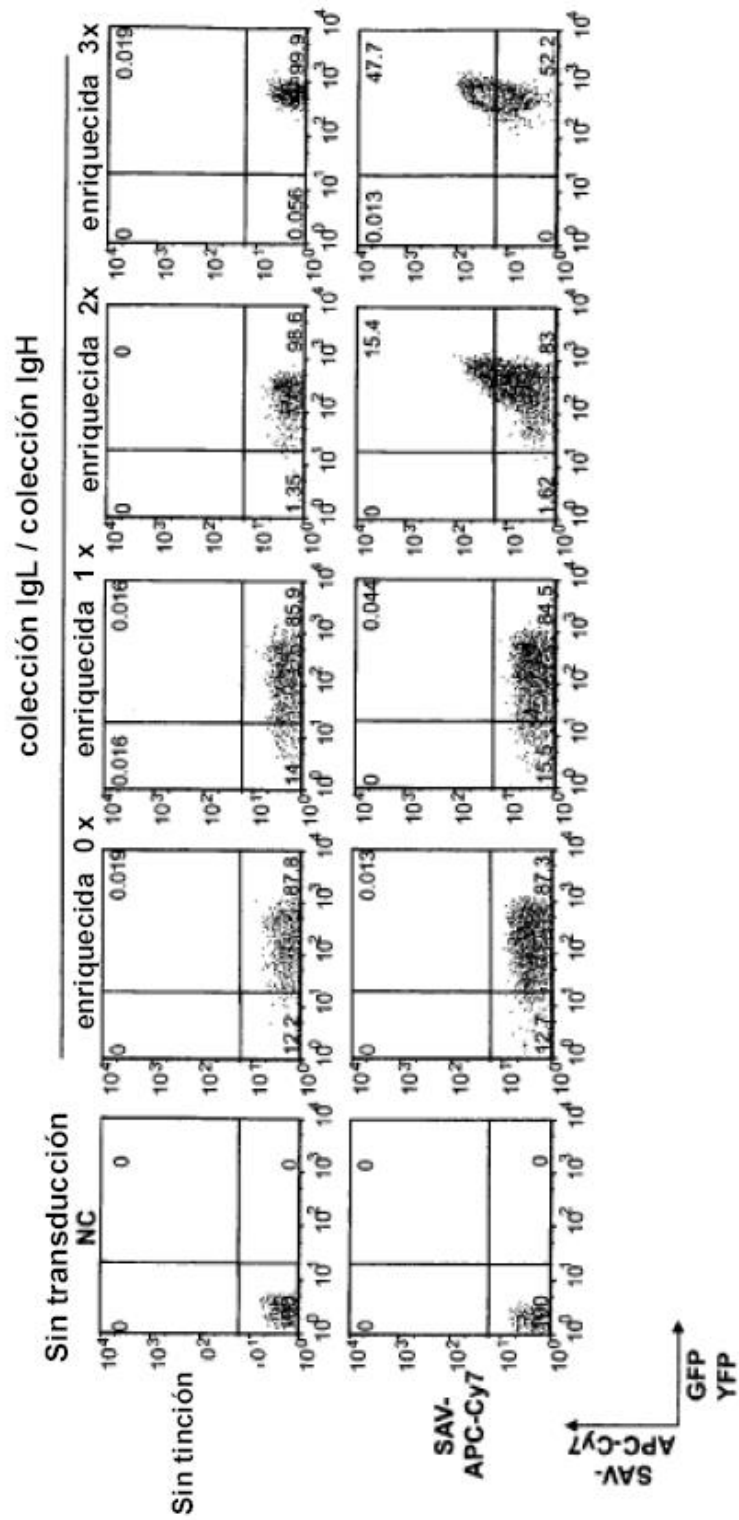


Fig. 24



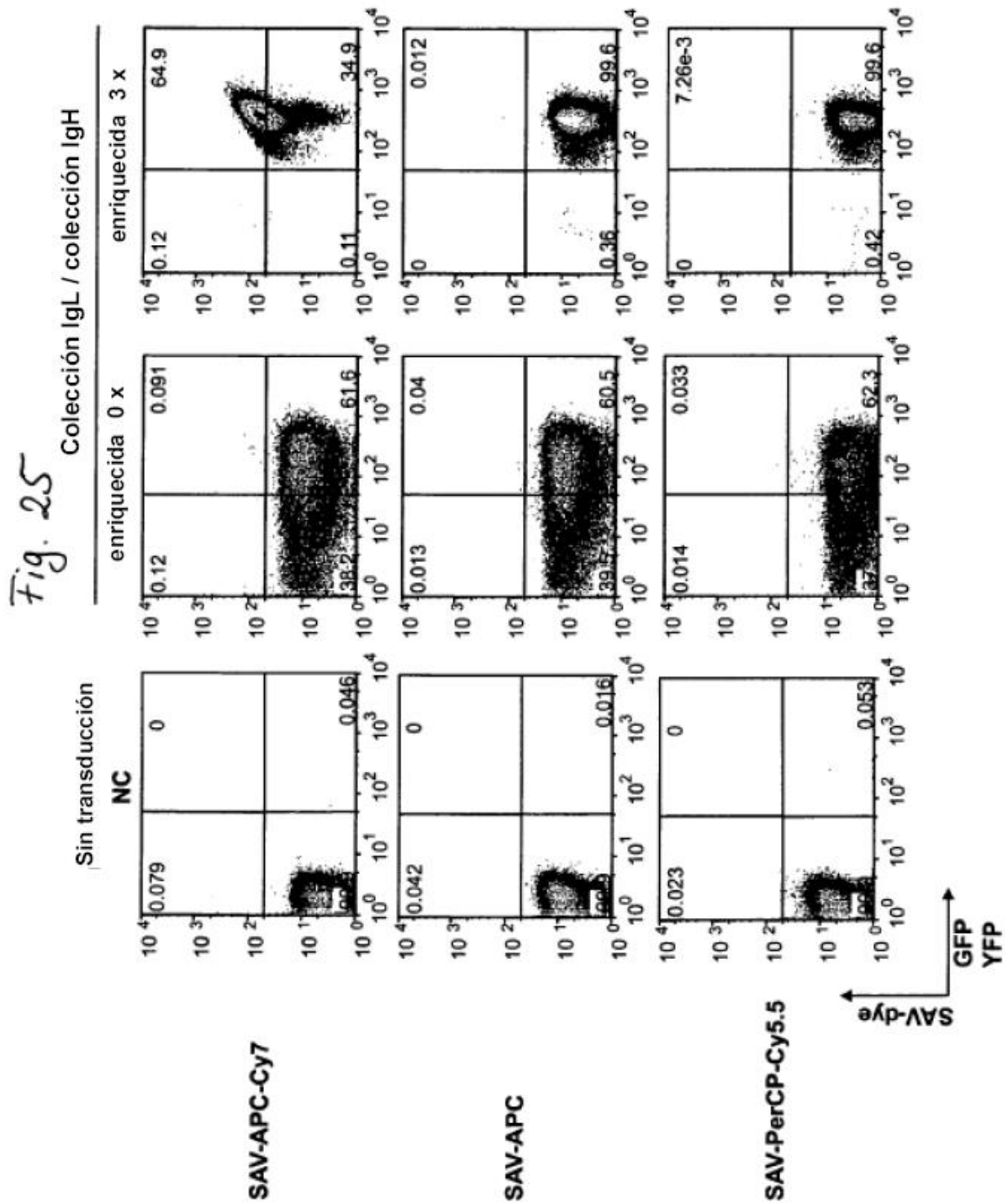


Fig. 26

